



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

ELISA MARA DE ABREU FURQUIM

**Avaliação dos efeitos da coenzima Q10 utilizada como
coadjuvante local e/ou sistêmica ao tratamento mecânico da
periodontite experimental em ratos tratados com nicotina**

Araçatuba - SP
2022

ELISA MARA DE ABREU FURQUIM

**Avaliação dos efeitos da coenzima Q10 utilizada como
coadjuvante local e/ou sistêmica ao tratamento mecânico da
periodontite experimental em ratos tratados com nicotina**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Coorientadora: Prof. Dr. Mariza Akemi Matsumoto

**Araçatuba - SP
2022**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

F989a Furquim, Elisa Mara de Abreu.
Avaliação dos efeitos da coenzima Q10 utilizada como coadjuvante local e/ou sistêmica ao tratamento mecânico da periodontite experimental em ratos tratados com nicotina / Elisa Mara de Abreu Furquim. - Araçatuba, 2022
72 f. : il.; tab.

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

1. Periodontite 2. Nicotina 3. Ubiquinona
4. Coenzima Q I.T.

Black D64
CDD 617.64

Ana Claudia M. Grieger Manzatti CRB-8/6315

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, *Vânia e Urias*, razões do meu viver e meus melhores amigos. Por abdicarem de suas vidas e sonhos em prol dos meus sonhos e dos meus irmãos, por lutarem todos os dias com garra e determinação para proporcionarem a nós o que há de melhor, pela nossa educação e conhecimento. Por todo apoio dedicado em cada etapa da vida e inclusive durante o Mestrado, sendo ouvintes, amparo, torcedores, admiradores e acima de tudo por serem minha paz e calma ao final de cada dia desta jornada, mostrando que nunca estive sozinha. Por serem presentes mesmo com toda distância física sempre oferecendo amor e carinho. Serei eternamente grata diante da grandeza do amor que me transmitem, por me compreenderem em meio a tantas incompreensões, viverem os meus problemas, medos e inseguranças como seus, sonharem meus sonhos e se felicitarem imensamente com minhas felicidades. São os meus maiores exemplos de fortaleza e luta. Obrigada por terem me transmitido valores e princípios genuínos. Os senhores são o que eu tenho de mais valioso na vida, são os motivos dos meus sorrisos e o amor mais sincero que existe, aos senhores minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, *Taynara, Ynara e Junior*, por serem a extensão dos meus pais e o laço mais verdadeiro e puro de amizade e cumplicidade. Agradeço por caminharem junto a mim desde a infância com as nossas brincadeiras até a vida adulta, onde sonhamos juntos e por serem abrigo em situações difíceis e compartilharem comigo das felicidades que nos foram presenteadas. Sou privilegiada por ter recebido os melhores presentes dos nossos pais: vocês. Obrigada por uma vida inteira de irmandade e amor.

A memória do meu Avô padrinho e Avó Madrinha, *Oswaldo e Geni*, por todo amor e valores que me dedicaram em vida, por sempre acreditarem na educação, honestidade,

humildade, generosidade e trabalho, transmitindo reais valores a todos nós. Pelo abraço de despedida quando fui estudar fora de casa e por falarem para eu sempre correr atrás dos meus sonhos, a saudade é gigante, mas o amor é eterno. Tenho certeza de que estão orgulhosos da caminhada da Família Furquim e que a conclusão desta etapa também seria de muita felicidade e orgulho para vocês.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

A *Deus*, por ter me dado sabedoria, paciência e fé para trilhar este caminho, derramando bênçãos e me enchendo de força e persistência para enfrentar todas as adversidades e me regado de gratidão e felicidade por cada etapa concluída e vencida. Além de tudo por ter iluminado esta fase e jornada com pessoas queridas, aprendizados únicos e inesquecíveis, que me auxiliaram a evoluir e amadurecer como pessoa e profissional.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida*, por ter me recebido e acolhido na Periodontia e na pós-graduação com todo cuidado, atenção e carinho. Por te acreditado no meu potencial na época de graduação, sendo paciente e respeitoso com minhas dificuldades e inseguranças. Seu apoio, estímulo e confiança foram essenciais para minha escolha feliz do curso de mestrado na Periodontia. Desde o início do Mestrado foi acolhedor e sempre buscou me orientar e auxiliar em cada etapa com toda paciência, sabedoria e educação admiráveis, dando oportunidades únicas e ensinamentos valiosos que me enriqueceram de uma forma grandiosa. Além de me dar voz e liberdade dentro da equipe de trabalho, escutando minhas opiniões e ideias, desenvolvendo um lado de confiança e independência que foram importantes para o meu amadurecimento profissional e que eu nunca acreditei que teria. Serei eternamente grata pela confiança que depositou em mim, por me fazer enxergar o lado positivo de cada experiência, por fazer eu acreditar em mim e no meu potencial, por todas as vezes que escutou meus desabafos, pelas inúmeras vezes que foi solícito e empático tentando me ajudar e acalmar mesmo que de longe, pela relação de respeito e carinho que construímos. Por sempre me fazer sentir segura e amparada nesta etapa. O seu jeito leve, humilde, sereno e alegre fizeram os dias de trabalho serem felizes e de bom convívio com toda equipe. Minha admiração e

inspiração pelo senhor são imensuráveis e minha gratidão eterna. Tenho muito orgulho e me sinto honrada de ser sua orientada, obrigada pelo privilégio e oportunidade.

À minha coorientadora, **Prof. Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, por ter me preparado de forma única e atenciosa durante meus seis anos de Iniciação Científica. Todas as minhas conquistas e oportunidades que me levaram ao Mestrado, bem como as bolsas de Fomento durante o curso, só foram possíveis graças à sua orientação e pela oportunidade rica de caminhar junto contigo e sua equipe. A senhora sempre foi e é uma inspiração de profissional, professora e pesquisadora por conduzir seu trabalho com muito amor, dedicação, respeito e acima de tudo com humildade. Além de tudo é uma pessoa iluminada e de muita fé e transmite isso aos seus em forma de cuidado, atenção, ajuda e ensinamentos. Cada momento que compartilhamos, cada lembrança que gera sorrisos e todos os ensinamentos, conselhos e oportunidades serão sempre recordados por mim e com tamanha gratidão e felicidade. Obrigada por ter acreditado em mim desde do começo, por ter dado uma bagagem de comprometimento, empenho e acima de tudo respeito ao trabalho. Obrigada por todo auxílio no mestrado, pelos conselhos, por sempre ter um ombro amigo nos momentos feliz e tristes. Serei eternamente grata por nosso encontro lá em 2014 e por ver que construímos uma relação de muito carinho, admiração e acima de tudo uma amizade valiosa.

Ao, **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, pela prontidão e aceite em compor a banca avaliadora, pelo auxílio incansável na condução deste trabalho e pelos seus ensinamentos valiosos. Agradeço imensamente por toda paciência e por todos os ensinamentos, sou muito feliz e grata pela nossa aproximação, tem uma bagagem rica de conhecimento e é um privilégio poder aprender contigo. Obrigada por todo apoio, cuidado e atenção comigo na reta final do mestrado,

foi peça fundamental para conclusão deste trabalho. Muita admiração por sua forma de conduzir suas atividades sempre com um sorriso no rosto, com humildade e simplicidade. Além de tudo é um exemplo de docente com tamanha didática e sabedoria, saiba que é uma inspiração para mim.

Ao **Prof. Dr. Thiago Marchi Martins**, pela prontidão e aceite em compor a banca avaliadora, disponibilizando um tempo dos seus compromissos para contribuir com minha formação. Agradeço a oportunidade de trabalharmos juntos em outros projetos e poder aprender contigo. É um exemplo de professor, pesquisador e um nome de muita admiração e respeito dentro da Periodontia. É uma honra tê-lo como banca da minha dissertação de Mestrado. Obrigada por toda atenção e acolhimento comigo e por sempre me tratar com muito respeito e de forma humilde.

À **Prof. Dra. Roberta Okamoto**, por ter me recebido no meu primeiro ano no Departamento de Ciências Básicas, com o privilégio de acompanhar o seu trabalho maravilhoso e ter me indicado à aluna de Iniciação para Prof. Mariza, sendo uma peça fundamental para minha jornada. Obrigada por compor à minha banca do Exame Geral de Qualificação do Mestrado, contribuindo com toda sua capacidade para minha formação. Obrigada pela forma carinhosa que sempre me tratou, sempre me acolhendo com um sorriso. É uma inspiração de pesquisadora para mim, muita admiração e carinho pela senhora.

Aos **membros suplentes** da banca avaliadora que se disponibilizaram a contribuir com esta etapa e trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alvaro Francisco Bosco** pelo privilégio de conviver e aprender contigo na Clínica de Pós-graduação durante minha graduação, sempre me tratando de forma paterna, humilde e com conselhos sábios. Uma honra poder acompanhar de perto um dos nomes que mais admiro e me inspiro dentro da Periodontia.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, na pessoa do seu Diretor, **Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara**, pela oportunidade de realização da graduação, do curso do mestrado e a execução desta pesquisa.

Ao programa de **Pós-Graduação em Odontologia**, na pessoa de seu coordenador **Prof. Dr. Wirley Gonçalves Assunção**, pela oportunidade de fazer parte de um programa de excelência e por todas as ferramentas que o mesmo me proporcionou para conclusão do curso.

Ao Departamento de **Diagnóstico e Cirurgia**, na pessoa do chefe de departamento **Prof. Dr. Francisley Ávila de Souza**, pela recepção, espaço e ferramentas de auxílio que me ofereceram na condução desta pesquisa.

À disciplina de **Periodontia**, nas pessoas dos Docentes **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, Profa. Dra. Maria José Hitomi Nagata e Profa. Dra. Letícia Helena Theodoro** pela recepção na disciplina durante a monitoria e pela oportunidade de acompanhar a graduação durante o Mestrado, por todos os ensinamentos de Periodontia.

À *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP*, pela concessão da Bolsa de Mestrado (processo nº2020/06654-6).

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Código de financiamento 001)*, pela concessão da Bolsa de Mestrado anteriormente à aprovação da Fapesp.

Aos meus colegas de equipe e pós-graduação: *David Jonathan Rodrigues Gusman, Henrique Rinald Matheus, Luiz Guilherme Fiorin, Bianca Rafaeli Piovezan, Halef Diego Turini e Otávio Augusto Pacheco Vitória* pela parceria e auxílio neste trabalho e em outros da equipe. Além do bom convívio e amizade, pela paciência, conselhos, ensinamentos e por vivermos os dias no laboratório com alto astral.

Ao meu colega e amigo de Pós-graduação e uma grande inspiração, *Henrique Rinald Matheus*, por ter me acolhido na monitoria de periodontia com todo entusiasmo, gentileza, respeito, empatia e carinho. Por toda paciência e dedicação que teve comigo no meu primeiro ano de mestrado, estando ao meu lado em cada passo e ensinado com calma e didática cada procedimento, respeitando meu tempo e sempre me dedicando uma palavra de incentivo e apoio. Obrigada por sempre estar de prontidão para me ajudar mesmo em outro país, sempre disposto a ouvir, ensinar e dar boas risadas. Sua amizade é um presente para mim.

Ao meu colega e amigo de Pós-graduação, *Halef Diego Turini*, por ter chegado com seu jeito reservado e observador conquistando minha amizade e confiança com seus valores de berço genuínos, mostrando-se sempre solícito a me ajudar e aprender, bem como com o olhar empático para com todos. Agradeço todas as vezes que me fez companhia no laboratório para não me deixar sozinha durante a noite e finais de semana, abdicando de seus momentos de paz

e descanso em prol de atenção e cuidado comigo, sua amizade é valiosa, obrigada por tamanho presente.

Aos alunos de Iniciação Científica do Prof. Juliano: *Letícia, Gabriel, Gabriela, Bruno, Ruan, Giovanna Cattarin, Bianca, Maria Eduarda, José Guilherme, Giovanna Fortunato, Julia e Laura* por todo auxílio nos períodos experimentais bem como nas etapas laboratoriais deste trabalho. A ajuda de vocês se faz necessária para condução de todos os trabalhos, obrigada pelo comprometimento e prontidão que tiveram comigo e este trabalho. Obrigada pelo bom convívio e pela confiança na nossa equipe.

À minha amiga e irmã de apartamento, *Ana Cláudia Rodrigues*, por ter me dado as mãos nesta jornada de pós-graduação, criamos uma relação de respeito, carinho, irmandade e amizade. Obrigada por ser meu ombro amigo diário, minha conselheira e ouvinte, por se preocupar comigo em pequenos detalhes, que demonstram muito carinho e afeto. Nosso lar tornou-se harmonioso e um ambiente de paz e calma, nas nossas diferenças nos ajudamos e nos tornamos mais fortes, sendo incentivo e estímulo para evoluirmos. Obrigada por ter me amparado em cada crise, cada choro mesmo sem saber o que dizer, mas cheia de preocupação e atenção. Obrigada por entender meu jeito difícil e cheio de manias e ter paciência de lidar com ele. Obrigada por vibrar com minha felicidade e torcer para o meu bem de coração sincero. Sem você essa jornada seria muito mais difícil, mas tê-la como família de Araçatuba na pós-graduação, fez com que eu me sentisse segura, amparada e em casa. Obrigada por tanto, você é um exemplo de dedicação, disciplina, humildade. Te admiro demais, socorrinho.

Aos *meus familiares*, por fazerem parte do quem eu sou e da minha história, por torcerem e ampararem meus sonhos mesmo sem entendê-los.

Aos meus *amigos de longa e recente data*, por serem morada e riso fácil. Por entenderem minha ausência e se felicitarem com minhas conquistas. Ter vocês para contar e compartilhar as felicidades é um presente.

Aos meus amigos de ingresso no Mestrado: *Lucas Tavares Piacenza, Cleber del Rei, Felipe Yuudi e Winícius Araújo e Ana Carolina Bacelar* pela amizade, conversas e parceria durante as disciplinas da pós-graduação e também pela amizade sincera que se manteve ao longo do mestrado, obrigada pela torcida e apoio.

Aos *funcionários da Seção de Pós-Graduação* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, *em nome da Cristiane*, pela eficiência, paciência e prontidão para solucionar problemas, esclarecer dúvidas e auxiliando de forma significativa para conclusão desta etapa.

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

Aos *animais* utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

Epígrafe

*Guarda-me como à menina dos teus olhos;
esconde-me à sombra das tuas asas*

Salmos 17:8

Resumo

Furquim EMA. Avaliação dos efeitos da coenzima Q10 utilizada como coadjuvante local e/ou sistêmica ao tratamento mecânico da periodontite experimental em ratos tratados com nicotina [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

RESUMO

O propósito do estudo foi avaliar a efetividade da raspagem e alisamento radicular (RAR) associado à coenzima Q10 (CQ10) administrada localmente e/ou sistemicamente no tratamento da periodontite experimental (PE) em ratos tratados sistemicamente com nicotina (NIC). 128 ratos (*Wistar*) foram divididos em oito grupos (n=16). Durante todo o período experimental, os animais receberam duas injeções subcutâneas diárias de 3mg/kg de hemissulfato de nicotina ou solução salina (SS) na região dorsal, com 12 horas de intervalo entre elas, começando nos 30 dias que antecederam à indução da PE. Após 15 dias da indução da PE, o protocolo de RAR foi realizado bem como o tratamento coadjuvante local e/ou sistêmico com CQ10, com e sem tratamento com a NIC, sendo: **SS-PE-RAR** e **NIC-PE-RAR**: irrigação subgengival com SS; **SS-PE-RAR/Q10L** e **NIC-PE-RAR/Q10L**: irrigação subgengival com 1ml solução de CQ10; **SS-PE-RAR/Q10S** e **NIC-PE-RAR/Q10S**: gavagem gástrica diária com 120 mg de CQ10; **SS-PE-RAR/Q10LS** e **NIC-PE-RAR/Q10LS**: irrigação subgengival com 1ml solução de CQ10 e gavagem gástrica diária com 120 mg de CQ10. As eutanásias foram realizadas 7 e 28 dias após tratamento. As peças coletadas foram processadas com desmineralização para as análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica para detecção de TRAP. Os dados foram submetidos ao teste paramétrico Anova two-way e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Na análise histopatológica, pode-se observar que os grupos **NIC-PE-RAR-Q10L** e **NIC-PE-RAR-Q10LS** apresentaram tecidos periodontais com aspecto de normalidade, com preservação da inserção conjuntiva e de região de furca preservada aos 7 e 28 dias, de modo distinto do grupo **NIC-PE-RAR** e **NIC-PE-RAR-Q10S** em ambos os períodos. Na análise histométrica, pode-se observar maior porcentagem de osso na furca (POF) ($p \leq 0,05$) nos grupos **NIC-PE-RAR-Q10L**, **NIC-PE-RAR-Q10S** e **NIC-PE-RAR-Q10LS** em comparação com o grupo **NIC-PE-RAR** em ambos os períodos e também com o grupo **SS-PE-RAR** aos 28 dias. Pode-se observar menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) no grupo **NIC-PE-RAR-Q10L** quando comparado aos grupos **SS-PE-RAR** e **NIC-PE-RAR** aos 7 dias e no grupo **NIC-PE-RAR-Q10LS** quando comparado aos mesmos grupos aos 28 dias. Conclui-se que RAR associado à CQ10 utilizada local e local/sistemicamente no tratamento da PE em ratos tratados sistemicamente com nicotina foram efetivas mostrando resultados favoráveis nas análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica. **Palavras-chave:** Periodontite. Nicotina. Ubiquinona. Coenzima Q.

Abstract

Furquim EMA. Evaluation of the effects of coenzyme Q10 as local and/or systemic adjuvant to mechanical treatment of experimental periodontitis in rats treated with nicotine. [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista; 2022.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of scaling and root planing (SRP) combined with adjunctive local and/or systemic administration of coenzyme Q10 (CQ10) for the treatment of experimental periodontitis (EP) in rats systemically treated with nicotine (NIC). 128 *Wistar* rats were divided into 8 groups (n=16). Throughout the experiment, animals received two subcutaneous injections of either 3mg/kg nicotine hemissulfate or physiological saline solution (PSS) with 12 h interval between them. These injections were initiated 30 days prior EP induction. 15 days after EP induction, the protocol for SRP was performed together (or not) with local and/or systemic adjunctive CQ10 administration in animals treated with either NIC or PSS, as described: **PSS-EP-SRP** and **NIC-EP-SRP**: subgingival irrigation with PSS; **PSS-EP-SRP/Q10L** and **NIC-EP-SRP/Q10L**: subgingival irrigation with 1ml of CQ10 solution; **PSS-EP-SRP/Q10S** and **NIC-EP-SRP/Q10S**: daily gastric gavage with 120 mg of CQ10; **PSS-EP-SRP/Q10LS** and **NIC-EP-SRP/Q10LS**: subgingival irrigation with 1ml of CQ10 solution and daily gastric gavage with 120 mg of CQ10. The euthanasia was performed at 7 and 28 days after treatment. The specimens were collected and processed for histopathologic, histometric and immunochemical for TRAP analyzes. The data were submitted to the two-way ANOVA and Tukey's post-test. The level of significance adopted was 5% ($p \leq 0.05$). In the histopathological analysis, it can be observed that the **NIC-PE-RAR-Q10L** and **NIC-PE-RAR-Q10LS** groups presented periodontal tissues with normal aspect, preserving the conjunctival insertion and furca region preserved at 7 and 28 days, differently from the **NIC-PE-RAR** and **NIC-PE-RAR-Q10S** groups in both periods. In histometric analysis, a higher percentage of bone in furca (PBF) ($p \leq 0.05$) can be observed in the **NIC-PE-RAR-Q10L**, **NIC-PE-RAR-Q10S** and **NIC-PE-RAR-Q10LS** groups compared to the **NIC-PE-RAR** group in both periods and also with the **SS-PE-RAR** group at 28 days. A lower number of TRAP-positive cells ($p \leq 0.05$) can be observed in the **NIC-PE-RAR-Q10L** group when compared to the **SS-PE-RAR** and **NIC-PE-RAR** groups at 7 days and in the **NIC-PE-RAR-Q10LS** group when compared to the same groups at 28 days. It was concluded that RAR associated with CQ10 used locally and locally/systemically in the treatment of EP in rats treated systemically with NIC were effective, showing favorable results in histopathological, histometric and

immunohistochemical analyses. **Keywords:** Periodontitis. Nicotine. Ubiquinone. coenzyme Q10

Listas e Sumário

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Irrigação subgingival após o tratamento periodontal nos grupos PE-RAR/Q10L, PE-RAR/Q10LS, NIC-PE-RAR/Q10L e NIC-PE-RAR/Q10LS com solução de CQ10. 39
- FIGURA 2 - Linha do Tempo 40
- FIGURA 3 -Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos no período experimental de 7 dias. A- Grupo SS-PE-RAR aos 7 dias; B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 7 dias; C- Grupo SS-PE-RAR-Q10S aos 7 dias, D- Grupo SS-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. E-Grupo NIC-PE-RAR aos 7 dias; F- Grupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 7 dias; G- Grupo NIC-PE-RAR-Q10S aos 7 dias; H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. Abreviações: ao: osso alveolar. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala: 500µm. 46
- FIGURA 4 – Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos no período experimental de 28 dias. A- Grupo SS-PE-RAR aos 28 dias; B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 28 dias; C- Grupo SS-PE-RAR-Q10S aos 28 dias, D- Grupo SS-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. E-Grupo NIC-PE-RAR aos 28 dias; F- Grupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 28 dias; G- Grupo NIC-PE-RAR-Q10S aos 28 dias; H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. Abreviações: ao: osso alveolar. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala: 500µm. 47
- FIGURA 5- Gráfico mostrando a quantificação (Médias ± Desvio Padrão) da porcentagem de osso na furca (POF) para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. ¥, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS, NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. ∞, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com o grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 28 dias. α, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias.β, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. ¶, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-

PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. †, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com o grupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 28 dias. 49

FIGURA 6- Gráfico mostrando a quantificação (Médias \pm Desvio Padrão) da quantificação de células TRAP positivas para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L e SS-PE-RAR-Q10LS. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L e SS-PE-RAR-Q10LS. β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L e NIC-PE-RAR-Q10L. \mathbb{P} , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10-LS e NIC-PE-RAR-Q10LS. 51

FIGURA 7- Padrão de imunomarcção de células TRAP positivas no período experimental de 7 dias. A- Grupo SS-PE-RAR, B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L, C-Grupo SS-PE-RAR-Q10S, D-Grupo SS-PE-RAR-Q10LS, E-Grupo NIC-PE-RAR, F-GRUPO NIC-PE-RAR-Q10L, G-Grupo NIC-PE-RAR-Q10S e H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS. Setas indicando imunomarcção positiva. Aumento original de 200x. Barra de escala de 50 μ m. Contra-colocaração *Hematoxilina de Harris*. 51

FIGURA 8- Padrão de imunomarcção de células TRAP positivas no período experimental de 28 dias. A- Grupo SS-PE-RAR, B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L, C-Grupo SS-PE-RAR-Q10S, D-Grupo SS-PE-RAR-Q10LS, E-Grupo NIC-PE-RAR, F-GRUPO NIC-PE-RAR-Q10L, G-Grupo NIC-PE-RAR-Q10S e H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS. Setas indicando imunomarcção positiva. Aumento original de 200x. Barra de escala de 50 μ m. Contra-colocaração *Hematoxilina de Harris*. 52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Grupos experimentais. Q10L-tratamento local c.om Q10; Q10S-tratamento sistêmico com Q10; Q10LS-tratamento local e sistêmico com Q10 38

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	28
2 PROPOSIÇÃO	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Animais	35
3.2 Cálculo amostral e randomização	35
3.3 Grupos experimentais	36
3.4 Protocolo de administração de nicotina ou solução de hipoclorito de sódio	38
3.5 Sedação e anestesia	38
3.6 Indução de periodontite experimental	39
3.8 Raspagem e alisamento radicular	39
3.9 Preparo e administração da Coenzima Q10	39
3.10 Períodos experimentais e obtenção das amostras	40
3.11 Linha do tempo	40
3.12 Processamento laboratorial	40
3.13 Processamento imunoistoquímico	41
3.14 Análise dos resultados	41
4 RESULTADOS	44
5 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	72

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é um dos vícios que exercem maior influência sobre o comportamento e saúde dos indivíduos, sendo que mundialmente mais de 5 milhões de mortes estão a ele relacionadas.¹⁻³ Dentre os componentes do tabaco encontra-se a nicotina, principal alcaloide da folha do tabaco, o qual possui propriedades toxicológicas e é responsável pela dependência química de seus usuários.^{4,5}

Considera-se o tabagismo como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de cânceres, doenças pulmonares e cardiovasculares, como a doença pulmonar obstrutiva crônica e a aterosclerose, respectivamente, entre outras.^{1,6-9} Tratando-se da cavidade bucal, sabe-se que o tabagismo é fator de risco para o câncer bucal, perda dentária e para as doenças periodontais.¹⁰⁻¹³

A periodontite é uma doença multifatorial, tendo como o principal fator etiológico a placa dentária.¹⁴ Já é sedimentado na literatura que o vício de fumar influencia na progressão da doença.¹⁵⁻¹⁷ Recentemente, no Workshop Mundial para classificação das Doenças e Condições Periodontais e Peri-implantares definiu-se o tabagismo e o Diabetes mellitus como fatores de risco que podem mudar o grau da doença, refletindo no risco e progressão da periodontite.¹⁸

Na literatura já é evidente que o vício de fumar altera negativamente o sistema inflamatório, resposta humoral, síntese de colágeno, proliferação de fibroblastos, sistema vascular e também a diferenciação de células ósseas como os osteoclastos, efeitos que resultam tanto em comprometimentos sistêmicos quanto no periodonto.¹⁹⁻²⁵ Tratando-se do sistema inflamatório, observa-se que em fumantes há um aumento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) na circulação,^{21,26} diminuição de capacidade quimiotática dos leucócitos,² diminuição na produção de imunoglobulinas, aumento de linfócitos-T,^{27,28} aumento das proteínas da fase aguda como a Proteína C – reativa e fibrinogênio,^{19,29-31} bem como o também aumento das citocinas inflamatórias como a interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α).³²⁻³⁵ Associa-se, ainda, alterações vasculares como disfunção endotelial influenciada pelo maior número de espécies reativas de nitrogênio,^{36,37} aumento da viscosidade do sangue e a vasoconstrição dos vasos periféricos.³⁸⁻⁴¹

Além disso, alguns autores defendem que fumantes possuem níveis séricos mais baixos de vitamina C, alfa-caroteno, beta-caroteno.^{42,43} Ademais, sabe-se também que o vício de fumar

provoca estresse oxidativo nas células e tecidos causados pelas moléculas oxidantes presentes no cigarro e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).^{44,45}

No periodonto, há estudos que mostram que a administração diária de nicotina influencia na proliferação de fibroblastos²³ e ainda reduzem a viabilidade celular tanto dos fibroblastos gengivais quanto dos fibroblastos do ligamento periodontal.^{46,47} Altas concentrações de nicotina parecem inibir a proliferação de fibronectina e colágeno²⁴ e diminuem a produção de colágeno tipo I e III em culturas de fibroblastos tratados com nicotina.⁴⁸ Deveci *et al.* (2018) mostraram em um estudo animal com ratos, que a nicotina diminui a produção das metaloproteinases da matriz (MMPs) e da síntese de colágeno⁴⁹.

Ge *et al.*⁵⁰ demonstraram que a nicotina influencia na resposta inflamatória da doença periodontal e a mesma é mediada por células T e CD4+ do ligamento periodontal. Além disso, a nicotina tem influência nas citocinas pró-inflamatórias, uma vez que em pacientes fumantes há um aumento da expressão das interleucinas IL-1b, IL-4, IL-6 e IL-8.³⁴ Observa-se também no fluido gengival crevicular um aumento significativo de TNF- α .⁵¹⁻⁵³

Adicionalmente, há achados que demonstram que a nicotina afeta as fases da osteogênese, alterando a diferenciação dos osteoblastos e afetando as células do periodonto.²⁵ Além disso, a literatura mostra que a nicotina aumenta o número de osteoclastos nos tecidos periodontais e ainda aumenta receptor ativador de NF Kappa β ligante (RANKL).⁵⁴ Alguns estudos sugerem que em fumantes há um aumento das taxas do ligante RANKL em relação à osteoprotegerina.^{55,56} Garcia *et al.*⁵⁷ demonstraram que a administração de nicotina influenciou na atividade reabsortiva, onde houve aumento de células TRAP-positivas identificadas pela marcação imunoistoquímica. Há autores que demonstram que a administração de nicotina diminuiu o volume ósseo trabecular, a espessura das trabéculas e a aposição de matriz mineralizada, além de aumentar a perda óssea alveolar.^{58,59}

O tratamento convencional da periodontite consiste na raspagem e alisamento radicular (RAR) das superfícies radiculares com a finalidade de remoção de placa dentária e cálculo dental.⁶⁰ No entanto, é frequente o insucesso da RAR em pacientes fumantes e grande parte das recidivas da periodontite são presentes nos pacientes que fazem o uso do cigarro, não respondendo de forma adequada ao tratamento periodontal.⁶¹⁻⁶³ Corroborando a estes achados, Garcia *et al.*⁵⁷ mostraram que a nicotina atrasou o processo de cicatrização e reparo após o tratamento periodontal em um estudo animal com ratos.

Algumas terapias coadjuvantes e profiláticas podem ser associadas à RAR, como o uso de antioxidantes, mostrando efeitos positivos no tratamento da gengivite e periodontite.^{64,65} A Coenzima Q10 (CQ10), também conhecida como ubiquinona, vem sendo estudada pelo seu efeito antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres,⁶⁶ mostrando resultados favoráveis para doenças cardiovasculares, diabetes, doença de Parkinson e doença periodontal.⁶⁷

A CQ10 é intrínseca no tecido humano, inclusive na gengiva, e exerce papel importante na transferência de elétrons na mitocôndria.^{68,69} No entanto, há uma deficiência de CQ10 em tecidos como o coração, mucosa gástrica e gengiva.⁷⁰ De modo interessante, foi demonstrado por meio de biópsia de tecido gengival que, em pacientes com periodontite há uma deficiência de CQ10 notando-se, também, deficiência nos leucócitos no sangue periférico.^{69,71}

Dentre os efeitos da CQ10 destaca-se o efeito antioxidante intracelular e sua capacidade de eliminar radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS).⁷² Figueiro et al.⁷³ em estudo *in vitro* sugeriram que o efeito catabólico da nicotina pode ser revertido pelo uso de antioxidantes como a CQ10. Recentemente, Hornos Carneiro et al.⁷⁴ demonstraram que o efeito antioxidante da CQ10 neutralizou a toxicidade causada pelo Bisfenol A (BPA) em células de vermes *Caenorhabditis elegans* e ainda que sua suplementação seria benéfica para reduzir os danos à fertilidade que o BPA exerce.

Manthena et al.⁶⁵ demonstraram que a suplementação por via oral do CQ10 obteve melhoras significativas na inflamação gengival. Além da administração sistêmica da CQ10, pode-se realizar a aplicação tópica nas bolsas gengivas, como alguns autores demonstram e evidenciam respostas favoráveis para o tratamento da doença periodontal.^{75,76}

Sabe-se que a periodontite é uma doença que causa estresse oxidativo^{77,78} e que a nicotina, por sua vez, também provoca este estresse e a produção de ROS.^{44,45} Apesar dos estudos mostrarem melhoras na inflamação gengival com o uso da CQ10, pouco se sabe da sua ação específica no periodonto. Diante da falta de informações na literatura de como a CQ10 atua nas células do periodonto e na reparação tecidual associada à RAR, estudos sobre o reparo tecidual nestas condições mostram-se bastante pertinentes. A partir do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a efetividade da RAR associado à coenzima Q10 administrada localmente e/ou sistemicamente no tratamento da periodontite experimental em ratos tratados sistemicamente com nicotina.

Proposição

2 PROPOSIÇÃO

A proposição do presente projeto de pesquisa foi avaliar a efetividade da raspagem e alisamento radicular associado à coenzima Q10 administrada localmente e/ou sistemicamente no tratamento da periodontite experimental em ratos tratados sistemicamente com nicotina.

Objetivos Gerais

- A. Avaliar a reparação tecidual em ratos não modificados sistemicamente pela nicotina;
- B. Avaliar a reparação tecidual em ratos não modificados sistemicamente pela nicotina que receberão tratamento local e/ou sistêmico com a coenzima Q10.
- C. Avaliar a reparação tecidual em ratos modificados sistemicamente pela nicotina que receberão tratamento sistêmico local e/ou sistêmico com a coenzima Q10.

Objetivos Específicos

Constituem os objetivos específicos do presente estudo, analisar a influência da utilização da coenzima Q10 como coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental em ratos tratados ou não sistemicamente pela nicotina por meio de:

- Análise histométrica da porcentagem de osso na furca (POF)
- Análise histopatológica da região de furca, analisando os seguintes parâmetros:
 - a- intensidade da resposta inflamatória local;
 - b- extensão do processo inflamatório;
 - c- reabsorção radicular externa (cimento e dentina);
 - d- reabsorção alveolar;
 - e- padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca;
 - f- padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.

- Análise imunoistoquímica da região de furca para detecção:
 - a- Fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP: *tartrate-resistant acid phosphatase*), um biomarcador de osteoclastos;

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 128 ratos machos com 3 meses de idade (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*) pesando aproximadamente 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo quatro animais, com ração e água *ad libitum*. Antes dos procedimentos cirúrgicos todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura estável ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) por um período de 5 dias para aclimatização. O estudo foi enviado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP (Processo FOA nº 00302-2020). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e segundo o guia *The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting In Vivo Experiments*.⁷⁹

Cálculo amostral e randomização

O tamanho da amostra foi calculado com base na execução de um estudo piloto, experiência prévia, e respeitando as diretrizes dos NC3Rs (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010).⁸⁰ Sendo assim, $n=8$ foi suficiente para rejeitar a hipótese nula nas análises histológica, histométrica e imunohistoquímica. A estimativa para cada medida de resultado foi realizada para atingir poder de 0,8 e erro alpha de 0,05.

O presente estudo seguiu um modelo controlado, randomizado e cego. Números de 1 a 128 serão marcados na porção superior da cauda dos animais utilizando caneta nankin. A sequência numérica será carregada para o software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) e uma randomização simples (1:1 taxa de distribuição) para os grupos SS-PE-RAR 7 dias, SS-PE-RAR 28 dias, SS-PE-RAR/Q10L 7 dias, SS-PE-RAR/Q10L 28 dias, SS-PE-RAR/Q10S 7 dias, SS-PE-RAR/Q10S 28 dias, SS-PE-RAR/Q10LS 7 dias, SS-PE-RAR/Q10LS 28 dias, NIC-PE-RAR 7 dias, NIC-PE-RAR 28 dias, NIC-PE-RAR/Q10L 7 dias, NIC-PE-RAR/Q10L 28 dias, NIC-PE-RAR/Q10S 7 dias, NIC-PE-RAR/Q10S 28 dias, NIC-PE-RAR/Q10LS 7 dias e NIC-PE-RAR/Q10LS 28 dias será realizada através de uma tabela numérica randômica gerada em computador por uma pessoa externa ao estudo e cega aos tratamentos.

Grupos Experimentais

Grupo SS-PE-RAR (n =16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de SS os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com SS.

Grupo SS-PE-RAR/Q10L (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de SS os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com 1ml solução de CQ10.

Grupo SS-PE-RAR/Q10S (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de SS os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com SS. A partir do dia do tratamento os animais receberam diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120 mg⁶⁵ de CQ10 até o final do experimento.

Grupo SS-PE-RAR/Q10LS (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 0,5 ml de solução de cloreto de sódio 0,9% (SS) durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de SS os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com 1ml solução de CQ10. A partir do dia do tratamento os animais receberam diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120 mg de CQ10 até o final do experimento.

Grupo NIC-PE-RAR (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 3 mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC)⁸¹ durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de NIC os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com SS.

Grupo NIC-PE-RAR/Q10L (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 3 mg/kg de hemissulfato de NIC durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de NIC os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com 1ml de solução de CQ10.

Grupo NIC-PE-RAR/Q10S (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 3 mg/kg de hemissulfato de NIC durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de NIC os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com SS. A partir do dia do tratamento os animais receberam diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120 mg de CQ10 até o final do experimento.

Grupo NIC-PE-RAR/Q10LS (n=16): Os animais receberam duas aplicações subcutâneas diárias de 3 mg/kg de hemissulfato de NIC durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de NIC os animais tiveram a periodontite experimental (PE) induzida nos seus primeiros molares inferiores esquerdos. Quinze dias após a indução, foi realizado o tratamento da PE através de RAR e irrigação subgengival com 1ml solução de CQ10. A partir do dia do tratamento receberam diariamente, via gavagem gástrica, suplementação diária com 120 mg de Q10 até o final do experimento. A organização dos grupos experimentais e períodos de eutanásia podem ser visualizados na Tabela 1.

TABELA 1 - Grupos experimentais. Q10L-tratamento local com Q10; Q10S-tratamento sistêmico com Q10; Q10LS-tratamento local e sistêmico com Q10.

Grupos experimentais		
	Períodos de Eutanásia	
Grupo SS-PE-RAR (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo SS-PE-RAR/Q10L (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo SS-PE-RAR/Q10S (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo SS-PE-RAR/Q10LS (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo NIC-PE-RAR (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo NIC-PE-RAR/Q10L (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo NIC-PE-RAR/Q10S (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento
Grupo NIC-PE-RAR/Q10LS (n=16)	7 dias após tratamento	28 dias após tratamento

Fonte: Autor, 2022

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 indução da PE 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 Okamoto et al.⁸¹ 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.

Sedação e anestesia

Para todos os procedimentos cirúrgicos (indução e tratamento da PE), 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 femorais da pata direita.

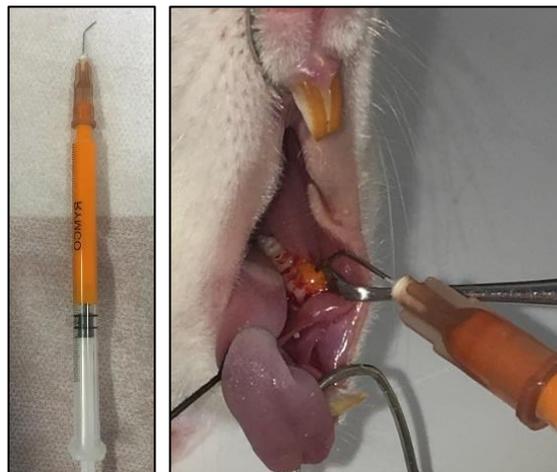
Indução da periodontite experimental

Foi posicionado ao redor dos primeiros molares inferiores esquerdos, um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão n°24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil), mantido em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos, para induzir a PE.^{82,83}

Raspagem e alisamento radicular

O tratamento local com RAR foi realizado com curetas manuais mini – Five 5-6 (Hu-Friedy Co. Inc., Chicago, IL, EUA) através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas interproximais e de furca serão raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais.^{84,85} Após realização dos movimentos de raspagem, os grupos SS-PE-RAR, SS-PE-RAR/Q10S, NIC-PE-RAR, e NIC-PE-RAR /Q10S receberam irrigação subgingival cuidadosa com SS, enquanto os grupos SS-PE-RAR/Q10L, SS-PE-RAR/Q10LS, NIC-PE-RAR/Q10L e NIC-PE-RAR/Q10LS receberam irrigação subgingival com solução de CQ10, representado na figura 1. Os tratamentos locais RAR foram realizados por um mesmo operador experiente e cego aos grupos experimentais.

FIGURA 1 - Irrigação subgingival após o tratamento periodontal nos grupos PE-RAR/Q10L, PE-RAR/Q10LS, NIC-PE-RAR/Q10L e NIC-PE-RAR/Q10LS com solução de CQ10



Fonte: Autor, 2022

Preparo e administração da Coenzima Q10

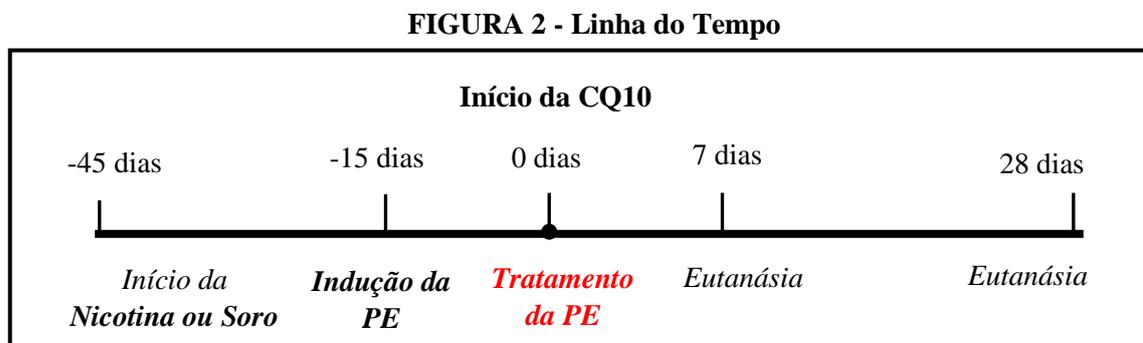
A solução de coenzima Q10 foi preparada utilizando glicerina vegetal como veículo. A concentração final do produto foi de 120 mg de Q10/ ml de glicerina.^{65,75} Sendo assim, os

animais dos grupos SS-PE-RAR/Q10S, SS-PE-RAR/Q10LS, NIC-PE-RAR/Q10S e NIC-PE-RAR/Q10LS receberam, via gavagem gástrica, suplementação diária com 1ml de solução contendo 120 mg de CQ10 a partir do dia do tratamento periodontal. A mesma solução de 120 mg/ml de CQ10 foi utilizada para fazer irrigação subgingival após o tratamento periodontal nos grupos SS-PE-RAR/Q10L, SS-PE-RAR/Q10LS, NIC-PE-RAR/Q10L e NIC-PE-RAR/Q10LS.

Períodos experimentais e obtenção das amostras

Para a realização das análises propostas, os animais foram eutanasiados pela administração de Tiopental (Cristália, Ltda., Itapira, SP, Brasil) na dose letal de 150 mg/kg de peso corporal aos 7 e 28 dias após o tratamento. A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes no plano mediano, e as hemi-mandíbulas esquerdas serão fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% por um período de 48 horas.

Linha do Tempo



Fonte: Autor, 2022

Processamento Laboratorial

Após fixação, as 128 amostras (08 espécimes por grupo/período) foram lavadas em água corrente e desmineralizadas em solução de EDTA 10%, com trocas semanais, por um período médio de 8 semanas. Após processamento histológico convencional e inclusão em parafina, cortes semi-seriados (4µm) foram obtidos em progressão de vestibular para lingual.

Após exclusão do primeiro e do último corte histológico, nos quais a região de furca foi evidente, cinco cortes equidistantes de cada espécime foram corados com hematoxilina e eosina para análise histológica e histométrica. Outros dez cortes foram submetidos ao processamento imunoistoquímico pela técnica de imunoperoxidase indireta para detecção fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

Processamento Imunoistoquímico

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 decloaker, 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 bovino 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 quatro lotes, e cada lote foi incubado com anticorpos primários 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 realizada a contracoloração com hematoxilina de Harris, desidratados em etanol, diafanizados em xilol e, recobertos com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

Análise dos Resultados

Análise histométrica da POF

Para a determinação da Porcentagem de Osso na Furca (POF) foi utilizado um sistema de análise de imagem *software* ImageJ. Foi mensurada a área total da furca (AF) e em seguida

a área ocupada por osso (AO), ambas em mm². A AF foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A partir desta linha seguiu todo o contorno da superfície externa do cimento situado entre as raízes. A AO teve o mesmo limite apical da AF e partir deste seguiu todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. Foi calculado a POF multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF ($POF = (AO \times 100) / AF$). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes, em três dias diferentes, pelo mesmo examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais.

Análise histopatológica dos tecidos periodontais

Foi efetuada em microscopia óptica de luz avaliando-se, compreendendo os tecidos interproximais e o interior da furca, os seguintes parâmetros: 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) reabsorção radicular externa (cimento e dentina); 4) reabsorção alveolar; 5) padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca; 6) padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.

Análise imunoistoquímica

A imunomarcção foi definida como aquela de coloração castanho escuro confinada ao citoplasma em TRAP. A região de interesse (ROI) para a análise imuno-histoquímica foi uma área de 2000 µm x 2000 µm dentro da furca. Seu limite coronal foi a crista óssea alveolar, de onde se estendeu 2000 µm apicalmente. A marcação imunológica do TRAP foi avaliada contando células positivas para TRAP com aumento de 200 ×.

Análise Estatística

Os dados histométricos foram analisados usando o software BioStat (BioStat version 5.0, Belém, PA, Brazil). A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram analisadas através do teste Shapiro-Wilk, posteriormente, os mesmos foram submetidos ao teste paramétrico Anova: doiscritério (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

Resultados

4 RESULTADOS

Análise histopatológica dos tecidos periodontais

No período de **7 dias** o **grupo SS-PE-RAR** a região de furca exibiu presença focal de epitélio circundada por moderado infiltrado inflamatório mononuclear, resultando em espessamento do ligamento periodontal e discreta desorganização associada à área de inflamação. Observou-se discretas áreas de reabsorção cementária na região de furca e cimento-dentinária nas porções cervicais radiculares. Notou-se discreto aplainamento das cristas ósseas alveolares. Na área do col gengival, observou-se revestimento por fino epitélio com moderada exocitose por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos.

Aspecto histopatológico distinto foi observado no **grupo SS-PE-RAR-Q10L**. No mesmo período, este grupo apresentou extensa área na região de furca com exuberante infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofilico, associado a fragmento ósseo não viável e focos de material hialino, caracterizando abscesso e ocupando cerca de 2/3 desta região. Havia presença de biofilme bacteriano aderido à superfície óssea, bem como à superfície cementária. Observou-se ainda, reabsorção cementária e dentinária nas regiões de furca e radiculares, levando à perda de inserção conjuntiva.

Os **grupos SS-PE-RAR-Q10S** e **SS-PE-RAR-Q10LS** exibiram similaridade ao grupo SS-PE-RAR, considerando-se o tecido gengival e região de furca, com exceção de áreas de reabsorções pontuais no cimento inter-radicular e nas regiões cervicais radiculares.

Quando da associação da nicotina nos animais, não foram observadas alterações importantes nos grupos **NIC-PE-RAR**, **NIC-PE-RAR-Q10L** e **NIC-PE-RAR-Q10LS**, sendo que os tecidos periodontais apresentaram aspecto de normalidade, com discretas áreas de reabsorção cementária na região de furca e cementária e dentinárias cervical; porém, com preservação do epitélio juncional e inserção conjuntiva. No entanto, no grupo **NIC-PE-RAR**, chamou a atenção pelas discretas áreas de perda do ligamento periodontal e invasão do tecido ósseo subjacente, configurando anquilose focal. Já os animais do grupo **NIC-PE-RAR-Q10S** apresentaram alterações nos tecidos periodontais, como invasão do tecido epitelial na região de furca e reabsorção cementária ativa associada à discreto infiltrado mononuclear, perda de inserção conjuntiva com discreta reabsorção dentinárias cervical, que por vezes alcançou o terço médio radicular, bem como eventual achatamento da crista inter-radicular. Nas ocasiões de achatamento da crista inter-radicular, as fibras do ligamento periodontal se dispunham horizontalmente, e não mais obliquamente.

No período de **28 dias**, observou-se comprometimento importante do periodonto de inserção do **grupo SS-PE-RAR**. Notou-se intensa reabsorção externa radicular e lesão de furca caracterizada pela presença de tecido epitelial e fragmentos de sequestros ósseos apresentando espessos biofilmes bacterianos. Um exuberante infiltrado inflamatório neutrofilico circundava estas estruturas, causando importante reabsorção da crista óssea inter-radicular e alterando a organização das fibras do ligamento periodontal, formando espessos feixes posicionados horizontalmente, paralelas à superfície da furca.

Aspecto histopatológico semelhante foi observado nos **grupos SS-PE-RAR-Q10L e SS-PE-RAR-Q10S**, aparentemente, em menor intensidade, porém, indicando poucas mudanças com relação ao observado aos 7 dias. A maioria dos animais do grupo exibia reabsorção cementária e dentinárias nas regiões de furca e nas regiões cervicais, estendendo-se para os terços médio e eventualmente apical das raízes. Observou-se também, perda de inserção conjuntiva até a altura do terço médio das raízes pela ausência do cimento e reabsorção dentinárias e também pela reabsorção das cristas ósseas alveolares, onde as fibras colágenas apresentavam-se dispostas paralelas ao longo eixo da raiz. Em alguns animais, já foi possível observar presença de epitélio na região de furca, isoladamente ou subjacente a sequestros ósseos com biofilme associados a intenso infiltrado neutrofilico, resultando em reabsorção óssea importante e alterando a organização das fibras colágenas local.

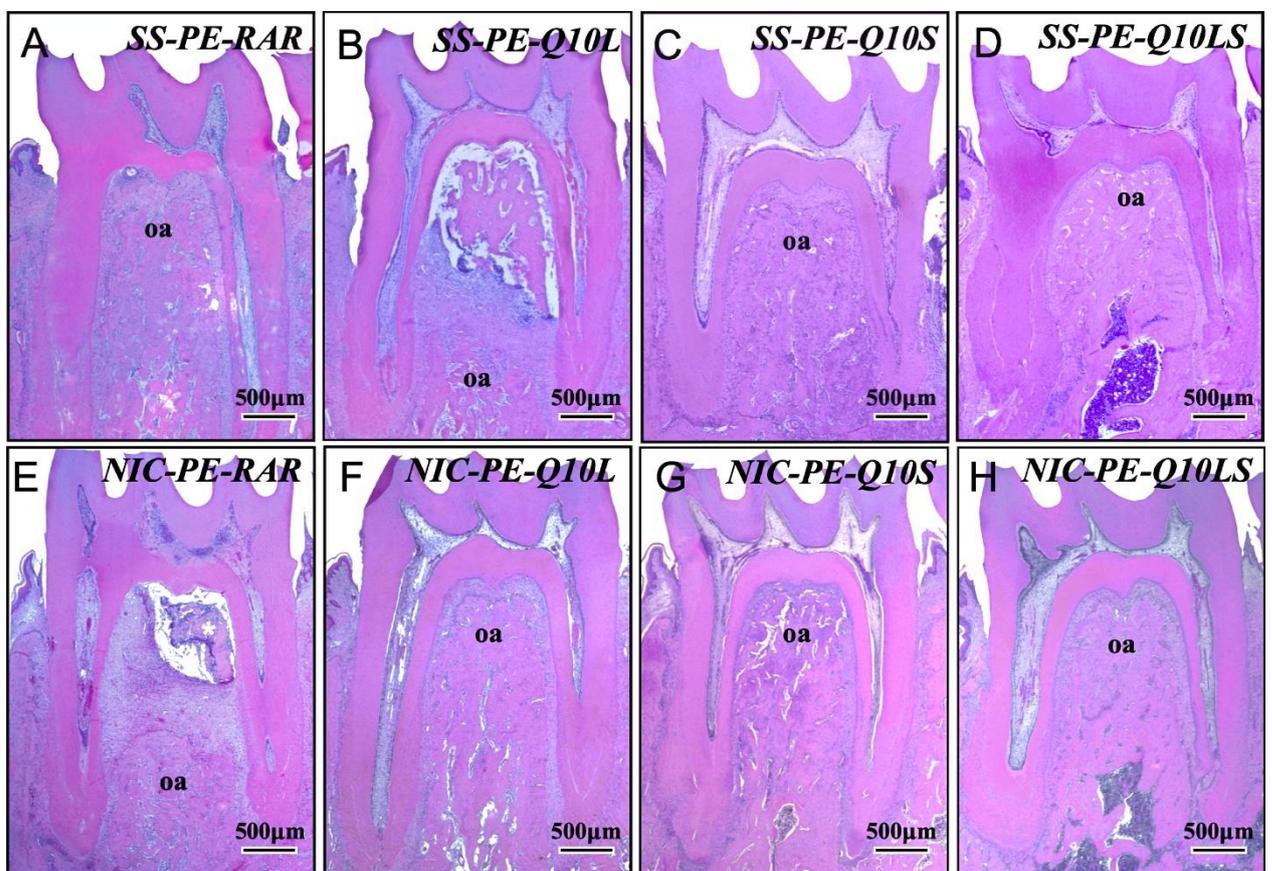
A associação local e sistêmica da CQ10 (**grupo SS-PE-RAR-Q10LS**) resultou em aspecto histopatológico semelhante ao exibido aos 7 dias, uma vez que a presença das reabsorções cementária e dentinária nas regiões de furca e radiculares se mantiveram, levando à perda de inserção conjuntiva e reabsorção do tecido ósseo inter-radicular e das cristas ósseas alveolares.

Os grupos **NIC-PE-RAR e NIC-PE-RAR-Q10S** apresentaram quadro histopatológico com predomínio de formação de abscesso inter-radicular constituído por exuberante infiltrado inflamatório neutrofilico, sequestros ósseos e espessos biofilmes bacterianos, causando reabsorção da crista óssea. Detectou-se também, reabsorção da crista óssea alveolar, cementária e radicular, por vezes alcançando o terço apical das raízes, levando à perda de inserção conjuntiva.

De modo interessante, observou-se que nos animais do grupo **NIC-PE-RAR-Q10L** não houve formação de abscessos, mas as reabsorções cementária e dentinárias ainda podiam ser visualizadas. No entanto, a reabsorção das cristas ósseas alveolares se mostraram mais discretas

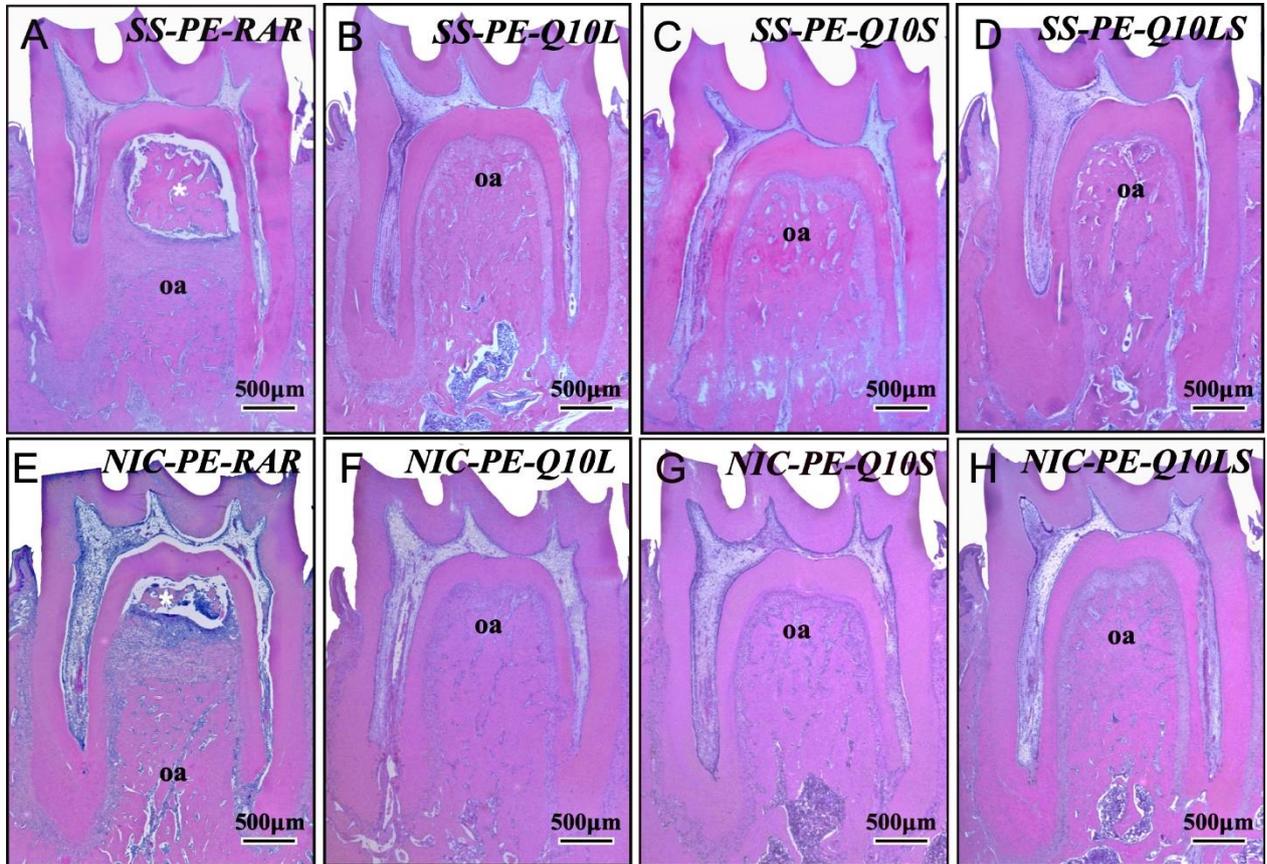
que os demais grupos. Os animais do grupo **NIC-PE-RAR-Q10LS**, por sua vez, exibiram áreas de reabsorção cementária e dentária radicular, também causando perda de inserção conjuntiva predominantemente no terço cervical, com região de furca preservada. Os resultados da análise histopatológica estão ilustrados na Figura 3 e 4.

FIGURA 3- Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos no período experimental de 7 dias. A- Grupo **SS-PE-RAR** aos 7 dias; B- Grupo **SS-PE-RAR-Q10L** aos 7 dias; C- Grupo **SS-PE-RAR-Q10S** aos 7 dias, D- Grupo **SS-PE-RAR-Q10LS** aos 7 dias. E-Grupo **NIC-PE-RAR** aos 7 dias; F- Grupo **NIC-PE-RAR-Q10L** aos 7 dias; G- Grupo **NIC-PE-RAR-Q10S** aos 7 dias; H-Grupo **NIC-PE-RAR-Q10LS** aos 7 dias. Abreviações: ao: osso alveolar. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala: 500µm.



Fonte: Autor, 2022.

FIGURA 4- Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca dos primeiros molares inferiores esquerdos no período experimental de 28 dias. A- Grupo SS-PE-RAR aos 28 dias; B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 28 dias; C- Grupo SS-PE-RAR-Q10S aos 28 dias, D- Grupo SS-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. E-Grupo NIC-PE-RAR aos 28 dias; F- Grupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 28 dias; G- Grupo NIC-PE-RAR-Q10S aos 28 dias; H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. Abreviações: ao: osso alveolar. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barra de escala: 500µm.



Fonte: Autor, 2022.

Análise histométrica da POF

Em relação à análise histométrica de porcentagem de osso na furca (POF), pode-se observar aos 7 dias maior POF ($p \leq 0,05$) nos grupos SS-PE-RAR-Q10S ($77,88 \pm 5,21$), NIC-PE-RAR-Q10S ($78,31 \pm 5,75$), SS-PE-RAR-Q10LS ($74,42 \pm 6,50$) e NIC-PE-RAR-Q10LS ($81,68 \pm 7,09$), quando comparados ao grupo SS-PE-RAR ($67,67 \pm 2,55$).

No período experimental de 7 dias também pode-se observar maior POF ($p \leq 0,05$) nos grupos NIC-PE-RAR-Q10L ($78,25 \pm 8,30$), SS-PE-RAR-Q10S ($77,88 \pm 5,21$), NIC-PE-RAR-Q10S ($78,31 \pm 5,75$), SS-PE-RAR-Q10LS ($74,42 \pm 6,50$) e NIC-PE-RAR-Q10LS ($81,68 \pm 7,09$), quando comparados ao grupo NIC-PE-RAR ($61,63 \pm 5,71$).

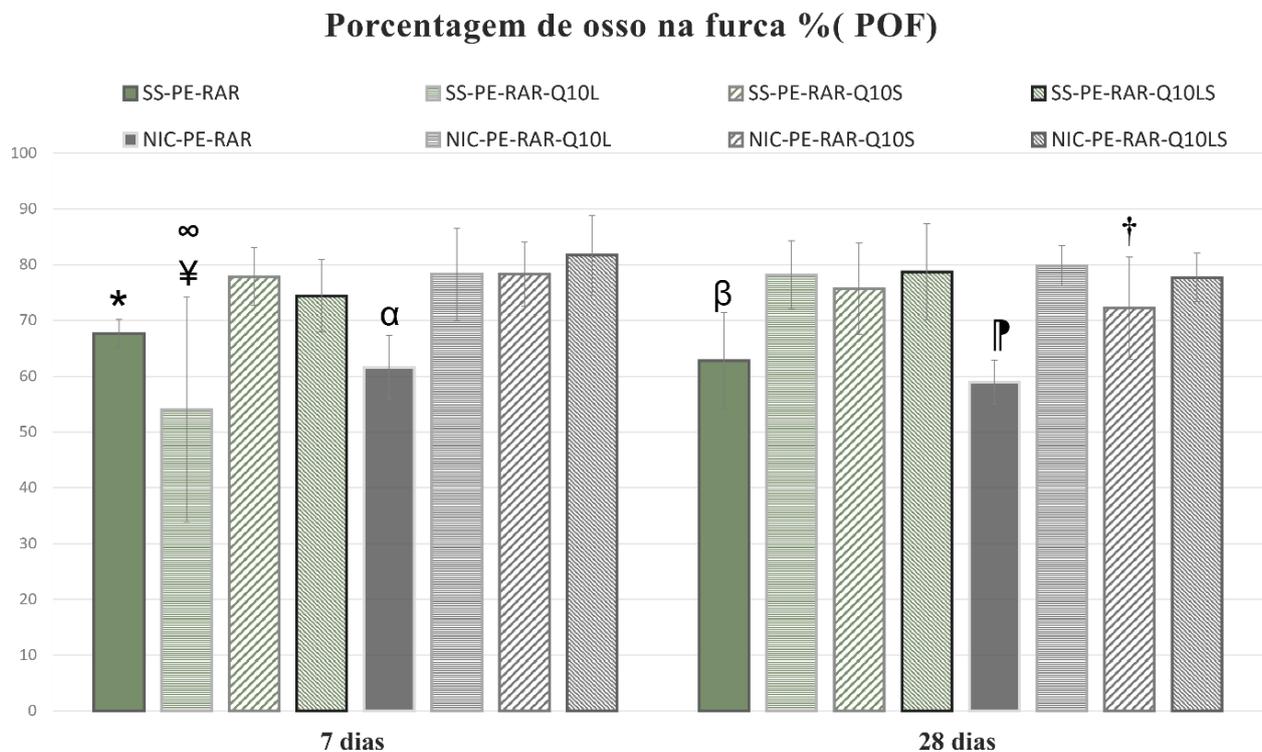
Ainda no período experimental de 7 dias, pode-se observar maior POF ($p \leq 0,05$) nos grupos NIC-PE-RAR-Q10L ($78,25 \pm 8,30$), SS-PE-RAR-Q10S ($77,88 \pm 5,21$), NIC-PE-RAR-Q10S ($78,31 \pm 5,75$), SS-PE-RAR-Q10LS ($74,42 \pm 6,50$) e NIC-PE-RAR-Q10LS ($81,68 \pm 7,09$), quando comparados com o grupo SS-PE-RAR-Q10L ($54,09 \pm 20,18$). Na análise intragrupo referente ao grupo SS-PE-RAR-Q10L, pode-se observar aos 28 dias ($78,15 \pm 6,12$) maior POF ($p \leq 0,05$) em relação ao 7 dias ($54,09 \pm 20,18$).

No que se refere ao período experimental de 28 dias, pode-se observar maior POF ($p \leq 0,05$) nos grupos SS-PE-RAR-Q10L ($78,15 \pm 6,12$), NIC-PE-RAR-Q10L ($79,84 \pm 3,59$), SS-PE-RAR-Q10S ($75,71 \pm 8,15$), SS-PE-RAR-Q10LS ($78,71 \pm 8,62$), NIC-PE-RAR-Q10LS ($77,72 \pm 4,39$) em comparação com o grupo SS-PE-RAR ($62,82 \pm 8,61$).

Do mesmo modo, aos 28 dias pode-se observar maior POF ($p \leq 0,05$) nos grupos SS-PE-RAR-Q10L ($78,15 \pm 6,12$), NIC-PE-RAR-Q10L ($79,84 \pm 3,59$), SS-PE-RAR-Q10S ($75,71 \pm 8,15$), NIC-PE-RAR-Q10S ($72,20 \pm 9,18$), SS-PE-RAR-Q10LS ($78,71 \pm 8,62$) e NIC-PE-RAR-Q10LS ($77,72 \pm 4,39$), quando comparadas com o grupo NIC-PE-RAR ($58,91 \pm 3,97$).

Além do mais, pode-se observar aos 28 dias maior POF ($p \leq 0,05$) no grupo NIC-PE-RAR-Q10L ($79,84 \pm 3,59$), quando comparado com o grupo NIC-PE-RAR-Q10S ($72,20 \pm 9,18$) do mesmo período. Os resultados da análise de porcentagem de osso na furca estão representados na Figura 5.

FIGURA 5- Gráfico mostrando a quantificação (Médias \pm Desvio Padrão) da porcentagem de osso na furca (POF) para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. †, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS, NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. ∞, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com o grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 28 dias. α, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 7 dias. β, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. ¶, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS e NIC-PE-RAR-Q10LS aos 28 dias. †, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com o grupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 28 dias.



Fonte: Autor, 2022.

Análise imunoistoquímica

Quantificação das células TRAP positivas

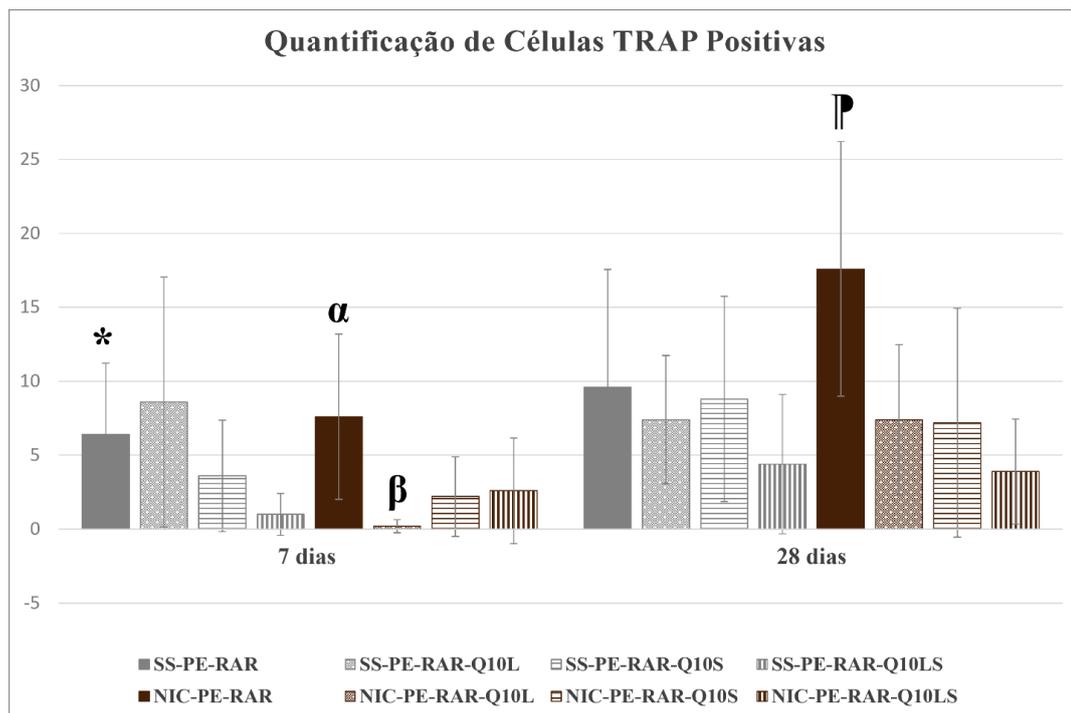
Em relação à imunomarcagem para TRAP, pode-se observar menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) aos 7 dias nos grupos NIC-PE-RAR-Q10L ($0,2 \pm 0,45$) e SS-PE-RAR-Q10LS ($1 \pm 1,41$), quando comparados com o grupo SS-PE-RAR ($6,4 \pm 4,83$).

Além disto, aos 7 dias, pode-se observar menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) nos grupos NIC-PE-RAR-Q10L ($0,2 \pm 0,45$) e SS-PE-RAR-Q10LS ($1 \pm 1,41$), quando comparados ao grupo NIC-PE-RAR ($7,6 \pm 5,59$).

Ainda aos 7 dias, observou-se menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) no grupo NIC-PE-RAR-Q10L ($0,2 \pm 0,45$), quando comparado com os grupos SS-PE-RAR-Q10L ($8,6 \pm 8,44$). Além disto, na análise intragrupo NIC-PE-RAR-Q10L aos 7 dias, apresentou menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) ($0,2 \pm 0,45$), quando comparado aos 28 dias ($7,4 \pm 5,08$).

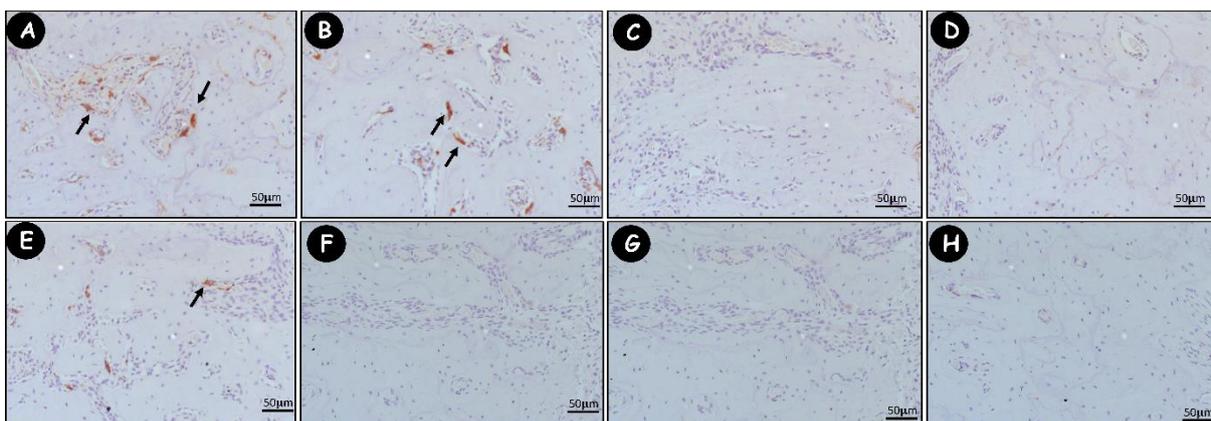
Já no período experimental de 28 dias, pode-se observar menor número de células TRAP positivas ($p \leq 0,05$) nos grupos SS-PE-RAR-Q10L ($7,4 \pm 4,34$), SS-PE-RAR-Q10-LS ($4,4 \pm 4,72$) e NIC-PE-RAR-Q10LS ($3,9 \pm 3,54$), quando comparados com o grupo NIC-PE-RAR ($17,6 \pm 8,62$). Os resultados da quantificação das células TRAP positivas estão representadas na Figura 6 e ilustrados na Figura 7 e 8.

FIGURA 6- Gráfico mostrando a quantificação (Médias \pm Desvio Padrão) da quantificação de células TRAP positivas para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L e SS-PE-RAR-Q10LS. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-PE-RAR-Q10L e SS-PE-RAR-Q10LS. β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L e NIC-PE-RAR-Q10L. ρ , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10-LS e NIC-PE-RAR-Q10LS.



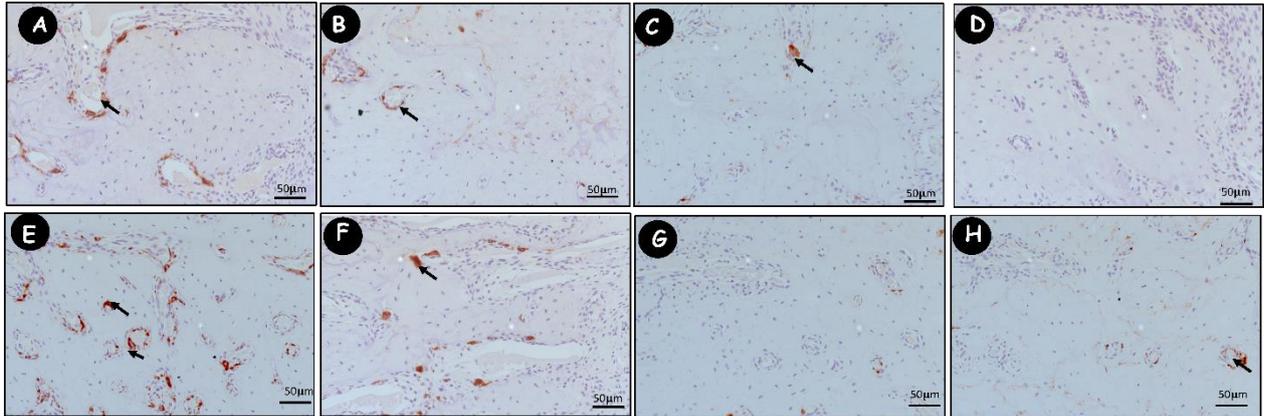
Fonte: Autor, 2022.

Figura 7- Padrão de imunomarcacão de células TRAP positivas no período experimental de 7 dias. A- Grupo SS-PE-RAR, B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L, C-Grupo SS-PE-RAR-Q10S, D-Grupo SS-PE-RAR-Q10LS, E-Grupo NIC-PE-RAR, F-GRUPO NIC-PE-RAR-Q10L, G-Grupo NIC-PE-RAR-Q10S e H-Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS. Setas indicando imunomarcacão positiva. Aumento original de 200x. Barra de escala de 50 μ m. Contra-colocacão Hematoxilina de Harris.



Fonte: Autor, 2022.

Figura 8- Padrão de imunomarcção de células TRAP positivas no período experimental de 28 dias. A- Grupo SS-PE-RAR, B- Grupo SS-PE-RAR-Q10L, C-Grupo SS-PE-RAR-Q10S, D-Grupo SS-PE-RAR-Q10LS, E-Grupo NIC-PE-RAR, F-GRUPO NIC-PE-RAR-Q10L, G-Grupo NIC-PE-RAR-Q10S e H- Grupo NIC-PE-RAR-Q10LS. Setas indicando imunomarcção positiva. Aumento original de 200x. Barra de escala de 50µm. Contra-colocaração *Hematoxilina de Harris*.



Fonte: Autor, 2022.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O tratamento convencional da periodontite consiste na raspagem e alisamento radicular (RAR) das superfícies radiculares com a finalidade de remoção de placa bacteriana e cálculo dental,⁶⁰ apesar do sucesso do tratamento algumas limitações são apresentadas com ocorrência de progressão da doença, levando ao insucesso do tratamento periodontal.^{86,87} Como é o caso de dentes multirradiculares afetados pela periodontite com envolvimento de furca, representam um desafio clínico diante de sua anatomia que dificulta o acesso e a RAR com eficácia, dificultando assim o processo de reparo e sucesso do tratamento periodontal na região.⁸⁸⁻⁹¹ Outra limitação da RAR encontra-se em pacientes fumantes, que apresentam um comprometimento sistêmico que leva a progressão da periodontite e influência também na resposta do tratamento, levando assim à recidivas e ao insucesso da RAR.^{92,61-63} Ademias é crescente o uso de cigarros eletrônicos ou vapes, principalmente entre os jovens que contém nicotina e flavorizantes,⁹³ sendo que sua concentração de nicotina pode variar de 0 a 87.2 mg/m,⁹⁴ ressaltando que além do tabagismo outro vício crescente está associado à nicotina e seus efeitos deletérios.

Tais dados da literatura sobre as limitações clínicas da RAR corroboram com os achados histopatológicos dos grupos SS-PE-RAR e NIC-PE-RAR. O grupo SS-PE-RAR apesar de apresentar bons resultados aos 7 dias, chega aos 28 dias com progressão da doença. Já o grupo NIC-PE-RAR mantém uma característica desfavorável na análise histopatológica e histométrica em ambos os períodos experimentais.

Diante destes desafios clínicos, lança-se mão de alternativas terapêuticas para que se atinjam melhores resultados no tratamento periodontal.⁹⁵ Uma das alternativas consiste no tratamento coadjuvante associado à RAR, como o uso de antioxidantes.^{64,65} Além disto, é evidenciado que o estresse oxidativo é um dos efeitos nos tecidos decorrentes do tabagismo.⁹⁶ É sabido que a CQ10 age como um antioxidante intracelular através da redução da produção de

radicais livres e espécies reativas de oxigênio.⁷² Com essa finalidade propomos o estudo do uso local e/ou sistêmico como tratamento coadjuvante associado à RAR em ratos tratados sistemicamente com nicotina.

Diante dos achados deste estudo, os resultados referentes ao grupo NIC associado ao uso coadjuvante da CQ10 chamou a atenção, devido aos seus resultados similares ao grupo SS, ou seja, sem um tratamento sistêmico de influência na progressão da periodontite como a nicotina. Na análise histopatológica, podemos observar aos 7 dias que a utilização da CQ10 local e local/sistêmica nos grupos tratados com nicotina, que os tecidos periodontais apresentaram aspecto de normalidade, com preservação do epitélio juncional e inserção conjuntiva. Os mesmos grupos aos 28 dias apresentaram região de furca preservada e ausência de abscessos. Além disto, de modo interessante, pode-se observar também que os grupos tratados com nicotina com a utilização da CQ10 sistêmica e local/sistêmica apresentaram maior POF aos 7 dias quando comparado com o grupo SS-PE-RAR. Já aos 28 dias todas as terapias coadjuvantes com CQ10 demonstraram maior POF em relação ao grupo SS-PE-RAR.

Tais resultados encontrados no grupo NIC-PE-RAR-Q10L e NIC-PE-RAR-Q10LS diferem dos resultados do grupo realizado apenas a RAR (NIC-PE-RAR), que foi observado aos 7 dias discretas áreas de perda do ligamento periodontal e invasão do tecido ósseo subjacente, configurando anquilose focal. Além disto aos 28 dias, observou-se formação de abscesso inter-radicular constituído por exuberante infiltrado inflamatório neutrofílico, sequestros ósseos e espessos biofilmes bacterianos, causando reabsorção da crista óssea, além de perda de inserção conjuntiva. Tais achados histopatológicos corroboram com os resultados histométricos, que pode-se observar maior POF nos grupos NIC-PE-RAR-Q10L, NIC-PE-RAR-Q10S e NIC-PE-RAR-Q10LS quando comparados ao grupos NIC-PE-RAR em ambos os períodos experimentais. Tais dados de menor POF no grupo NIC-PE-RAR corroboram com os achados da literatura, que demonstraram maior perda óssea em molares com periodontite

experimental induzida em ratos tratados com nicotina.^{92,97} E ainda sugerem o resultado interessante e favorável que a CQ10 teve no quesito perda óssea nos grupos tratados sistemicamente pela nicotina.

Além disto, na análise imunoistoquímica para quantificação de células TRAP positivas, pode-se observar aos 7 dias menor número no grupo NIC-PE-RAR-Q10L quando comparado ao grupo NIC-PE-RAR, já aos 28 dias observou-se menor número de células TRAP Positivas no grupo NIC-PE-RAR-Q10LS quando comparado ao grupo NIC-PE-RAR.

Os achados das células TRAP positivas mostram menor número de células TRAP nos grupos local e local/sistêmico aos 7 dias e 28 dias respectivamente quando comparados com o NIC-PE-RAR, tais achados podem justificar os resultados mais favoráveis da análise histopatológica bem como da análise histométrica. Além disto o maior número de células TRAP positivas NIC-PE-RAR corroboram com os achados de Garcia et al. (2018)⁵⁷ e ainda sugerem o benefício da terapia coadjuvante local e local/sistêmica frente aos desafios terapêuticos do tabagismo diante do uso da CQ10 local ou local/sistêmica.

De modo curioso, a CQ10 atuou de forma desfavorável na análise histopatológica e histométrica no grupo SS-PE-RAR-Q10L aos 7 dias, com infiltrado inflamatório polimorfonuclear, abscessos, além de perda de inserção e menor POF quando comparado aos 28 dias e aos grupos NIC-PE-RAR-Q10L, SS-PE-RAR-Q10S, NIC-PE-RAR-Q10S, SS-PE-RAR-Q10LS E NIC-PE-RAR-Q10L.

O uso da CQ10 local no grupo SS mostrou-se desfavorável em um período experimental, no entanto no grupo tratado sistemicamente com a nicotina o uso local ou local associado ao uso sistêmicos apresentaram os melhores resultados em ambas as análises do presente trabalho, sugerindo que o efeito antioxidante da CQ10 frente ao estresse oxidativo ocasionado pela nicotina dos tecidos periodontais permitiu um reparo favorável de dentes

multirradiculares com envolvimento de furca comprometidos pela periodontite, com preservação de inserção conjuntiva, área de furca preservada, além de maior porcentagem de osso na região, bem como menor número de células TRAP positivas.

Os resultados do uso da CQ10 localmente bem como local/sistemicamente no grupo nicotina corroboram com o resultado do estudo clínico randomizado e controlado de Raut et al. (2019)⁷⁵, que demonstrou que o uso local da CQ10 em bolsas periodontais de pacientes fumantes resultou em benefícios usado coadjuvante à RAR como melhores resultados de profundidade de sondagem e inserção clínica nos grupos testes. Além de corroborar com os resultados do estudo in vitro de Figueiro et al. (2006),⁷³ que sugeriu que a CQ10 poderia trazer melhoras adjunta ao tratamento periodontal em pacientes fumantes.

Já o uso da CQ10 de forma sistêmica na análise histopatológica mostrou-se desfavorável nos grupos tratados com nicotina, porém apresentaram maior POF quando comparada ao grupo NIC-PE-RAR aos 7 e 28 dias. Além disto também apresentou maior POF quando comparado com o grupo SS-PE-RAR aos 7 dias. Por outro lado, o uso da CQ10 sistemicamente nos ratos não tratados com nicotina demonstrou resultados favoráveis na análise histopatológica bem como na análise histométrica, nos grupos SS-PE-RAR-Q10S e SS-PE-RAR-Q10LS. Tal comportamento dual diante do tipo de tratamento sistêmico gerou lacunas que precisam ser elucidadas com mais estudos in vivo e posteriormente clínicos.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que raspagem e alisamento radicular associado à coenzima Q10 utilizada local e local/sistemicamente no tratamento da periodontite experimental em ratos tratados sistemicamente com nicotina foram efetivas mostrando resultados favoráveis nas análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica. Já o uso apenas sistêmico da Coenzima Q10 em ratos tratados sistemicamente pela nicotina mostrou lacunas a serem elucidadas com novos estudos in vivo.

Referências

REFERÊNCIAS

1. WHO. Report on the global tobacco epidemic: the MPOWER package. Geneva: World Health Organization, 2008.
2. WHO. Global Status Report on Noncommunicable Diseases 2014. Geneva: UN General Assembly, 2014.
3. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380(9859):2224–60.
4. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. A review of the literature. *J Periodontol*. 1986;57(10):617-24.
5. Genco RJ, Löe H. The role of systemic conditions and disorders in periodontal disease. *Periodontol 2000*. 1993;2:98-116.
6. Crofton J, Bjartveit K. Smoking as a risk factor for chronic airways disease. *Chest*. 1989;96(3 Suppl):307S-12S.
7. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJ; Comparative Risk Assessment Collaborating Group. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002;360(9343):1347-60.
8. Services USDoHaH. How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2010.
9. McGorrian C, Yusuf S, Islam S, Jung H, Rangarajan S, Avezum A, Prabhakaran D, Almahmeed W, Rumboldt Z, Budaj A, Dans AL, Gerstein HC, Teo K, Anand SS; INTERHEART Investigators. Estimating modifiable coronary heart disease risk in multiple regions of the world: the INTERHEART Modifiable Risk Score. *Eur Heart J*. 2011;32(5):581-9.
10. Lubin JH, Gaudet MM, Olshan AF, Kelsey K, Boffetta P, Brennan P, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-

- Filho V, Franceschi S, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Lissowska J, Mates IN, Matos E, McClean M, Menezes A, Morgenstern H, Muscat J, Eluf Neto J, Purdue MP, Rudnai P, Schwartz SM, Shangina O, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn D, Zhang ZF, Hashibe M, Hayes RB. Body mass index, cigarette smoking, and alcohol consumption and cancers of the oral cavity, pharynx, and larynx: modeling odds ratios in pooled case-control data. *Am J Epidemiol.* 2010;171(12):1250-61.
11. Warnakulasuriya S, Dietrich T, Bornstein MM, Casals Peidr o E, Preshaw PM, Walter C, Wennstr om JL, Bergstr om J. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. *Int Dent J.* 2010;60(1):7-30.
 12. Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases *Periodontol 2000.* 2002;29:177-206.
 13. Gelskey SC. Cigarette smoking and periodontitis: methodology to assess the strength of evidence in support of a causal association. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1999;27(1):16-24.
 14. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):54-64.
 15. Pindborg JJ. Tobacco and gingivitis; correlation between consumption of tobacco, ulceromembranous gingivitis and calculus. *J Dent Res.* 1949;28(5):460-3.
 16. Arno A, Waerhaug J, Lovdal A, Schei O. Incidence of gingivitis as related to sex, occupation, tobacco consumption, toothbrushing, and age. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1958;11(6):587-95.
 17. Bergstr om J, Preber H. Tobacco use as a risk factor. *J Periodontol.* 1994;65(5 Suppl):545-50.
 18. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS, Mealey BL, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti MS. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S1-8.
 19. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest.* 2007;131(5):1557-66.

20. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):111-26.
21. Van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J*. 2000;15(5):915-21.
22. Gerrard JW, Heiner DC, Ko CG, Mink J, Meyers A, Dosman JA. Immunoglobulin levels in smokers and non-smokers. *Ann Allergy*. 1980;44(5):261-2.
23. Milanezi de Almeida J, Bosco AF, Bonfante S, Theodoro LH, Nagata MJ, Garcia VG. Nicotine-induced damage affects gingival fibroblasts in the gingival tissue of rats. *J Periodontol*. 2011;82(8):1206-11.
24. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995;66(12):1056-64.
25. Rothem DE, Rothem L, Dahan A, Eliakim R, Soudry M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone*. 2011;48(4):903-9.
26. Yarnell JW, Sweetnam PM, Rumley A, Lowe GD. Lifestyle factors and coagulation activation markers: the Caerphilly Study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001;12(8):721-8.
27. Kim WD, Kim WS, Koh Y, Lee SD, Lim CM, Kim DS, Cho YJ. Abnormal peripheral blood T-lymphocyte subsets in a subgroup of patients with COPD. *Chest*. 2002;122(2):437-44.
28. Miller LG, Goldstein G, Murphy M, Ginns LC. Reversible alterations in immunoregulatory T cells in smoking. Analysis by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Chest*. 1982;82(5):526-9.
29. Rohde LE, Hennekens CH, Ridker PM. Survey of C-reactive protein and cardiovascular risk factors in apparently healthy men. *Am J Cardiol*. 1999;84(9):1018-22.
30. Fröhlich M, Sund M, Löwel H, Imhof A, Hoffmeister A, Koenig W. Independent association of various smoking characteristics with markers of systemic inflammation in men. Results from a representative sample of the general population (MONICA Augsburg Survey 1994/95). *Eur Heart J*. 2003;24(14):1365-72.

31. Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United. *Ann Intern Med.* 2003;138(11):891-7.
32. Helmersson J, Larsson A, Vessby B, Basu S. Active smoking and a history of smoking are associated with enhanced prostaglandin F(2alpha), interleukin-6 and F2-isoprostane formation in elderly men. *Atherosclerosis.* 2005;181(1):201-7.
33. Bermudez EA, Rifai N, Buring JE, Manson JE, Ridker PM. Relation between markers of systemic vascular inflammation and smoking in women. *Am J Cardiol.*2002;89(9):1117-9.
34. Kamma JJ, Giannopoulou C, Vasdekis VG, Mombelli A. Cytokine profile in gingival crevicular fluid of aggressive periodontitis: influence of smoking and stress. *J Clin Periodontol.* 2004;31(10):894-902.
35. Barbieri SS, Zacchi E, Amadio P, Gianellini S, Mussoni L, Weksler BB, Tremoli E. Cytokines present in smokers' serum interact with smoke components to enhance endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res.* 2011;90(3):475-83.
36. Szmítko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.
37. Yamaguchi Y, Haginaka J, Morimoto S, Fujioka Y, Kunitomo M. Facilitated nitration and oxidation of LDL in cigarette smokers. *Eur J Clin Invest.* 2005;35(3):186-93.
38. Wannamethee SG, Lowe GD, Shaper AG, Rumley A, Lennon L, Whincup PH. Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2005;26(17):1765-73.
39. Woodward M, Rumley A, Tunstall-Pedoe H, Lowe GD. Associations of blood rheology and interleukin-6 with cardiovascular risk factors and prevalent cardiovascular disease. *Br J Haematol.* 1999;104(2):246-57.
40. Saldanha JB, Pimentel SP, Casati MZ, Sallum EA, Barbieri D, Moreno HJ, Nociti FH. Guided bone regeneration may be negatively influenced by nicotine administration: a histologic study in dogs. *J Periodontol.* 2004;75(4):565-71.

41. Riebel GD, Boden SD, Whitesides TE, Hutton WC. The effect of nicotine on incorporation of cancellous bone graft in an animal model. *Spine*. 1995;20(20):2198-202.
42. Wei W, Kim Y, Boudreau N. Association of smoking with serum and dietary levels of antioxidants in adults: NHANES III, 1988-1994. *Am J Public Health*. 2001;91(2):258-64.
43. Schectman G, Byrd JC, Gruchow HW. The influence of smoking on vitamin C status in adults. *Am J Public Health*. 1989;79(2):158-62.
44. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):50-60.
45. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.
46. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Yang LC, Chou MY. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures in vitro. *J Periodontal Res*. 2002;37(4):279-85.
47. Lallier TE, Moylan JT, Maturin E. Greater Sensitivity of Oral Fibroblasts to Smoked Versus Smokeless Tobacco. *J Periodontol*. 2017;88(12):1356-65.
48. Yin L, Morita A, Tsuji T. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res*. 2000;292(4):188-94.
49. Deveci B, Ayna B, Tacir IH, Deveci E, Tuncer MC, Pala A. Effects of nicotine administration in rats on MMP2 and VEGF levels in periodontal membrane. *Folia Morphol*. 2018;77(3):471-477.
50. Ge X, Liu YF, Wong Y, Wu LZ, Tan L, Liu F, Wang XJ. Impact of nicotine on the interplay between human periodontal ligament cells and CD4+ T cells. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35(9):983-90.
51. Boström L, Linder LE, Bergström J. Smoking and crevicular fluid levels of IL-6 and TNF-alpha in periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1999;26(6):352-7.

52. Giannopoulou C, Cappuyns I, Mombelli A. Effect of smoking on gingival crevicular fluid cytokine profile during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol.* 2003;30(11):996-1002.
53. Dietrich T, Bernimoulin JP, Glynn RJ. The effect of cigarette smoking on gingival bleeding. *J Periodontol.* 2004;75(1):16-22.
54. Wu LZ, Duan DM, Liu YF, Ge X, Zhou ZF, Wang XJ. Nicotine favors osteoclastogenesis in human periodontal ligament cells co-cultured with CD4(+) T cells by upregulating IL-1 β . *Int J Mol Med.* 2013;31(4):938-42.
55. Buduneli N, Biyikoğlu B, Sherrabeh S, Lappin DF. Saliva concentrations of RANKL and osteoprotegerin in smoker versus non-smoker chronic periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2008;35(10):846-52.
56. Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WM, Macpherson LM. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol.* 2007;34(4):271-7.
57. Garcia VG, Gualberto EC Júnior, Ervolino E, Nagata MJH, de Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018;22:70-78.
58. Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, Shuid AN, Luke DA, Mohamed N. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. *J Bone Miner Metab.* 2007;25(2):93-8.
59. Kubota M, Yanagita M, Mori K, Hasegawa S, Yamashita M, Yamada S, Kitamura M, Murakami S. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse. *PLoS One.* 2016;11(5):e0155594.
60. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD. A review of longitudinal studies that compared periodontal therapies. *J Periodontol.* 1993;64(4):243-53.
61. Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL. Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. *J Periodontol.* 1993;64(1):16-23.
62. Bergström J. Tobacco smoking and risk for periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2003;30(2):107-13.

63. Papantonopoulos GH. Smoking influences decision making in periodontal therapy: a retrospective clinical study. *J Periodontol.* 1999;70(10):1166-73.
64. Chandra RV, Srinivas G, Reddy AA, Reddy BH, Reddy C, Nagarajan S, Naveen A. Locally delivered antioxidant gel as an adjunct to nonsurgical therapy improves measures of oxidative stress and periodontal disease. *J Periodontal Implant Sci.* 2013;43(3):121-9.
65. Manthana S, Rao MV, Penubolu LP, Putcha M, Harsha AV. Effectiveness of CoQ10 Oral supplements as an adjunct to scaling and root planing in improving periodontal health. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(8):ZC26-8.
66. Martin SF, Burón I, Espinosa JC, Castilla J, Villalba JM, Torres JM. Coenzyme Q and protein/lipid oxidation in a BSE-infected transgenic mouse model. *Free Radic Biol Med.* 2007;42(11):1723-9.
67. Hernández-Camacho JD, Bernier M, López-Lluch G, Navas P. Coenzyme Q(10)Supplementation in aging and disease. *Front Physiol.* 2018;9:44.
68. Nakamura R, Littarru GP, Folkers K, Wilkinson EG. Deficiency of coenzyme Q in gingiva of patients with periodontal disease. *Int J Vitam Nutr Res.*1973;43(1):84-92.
69. Nakamura R, Littarru GP, Folkers K, Wilkinson EG. Study of CoQ10-enzymes in gingiva from patients with periodontal disease and evidence for a deficiency of coenzyme Q10. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(4):1456-60.
70. Gaby AR. Nutritional treatments for acute myocardial infarction. *Altern Med Rev.* 2010;15(2):113-23.
71. Hansen IL, Iwamoto Y, Kishi T, Folkers K, Thompson LE. Bioenergetics in clinical medicine. IX. Gingival and leucocytic deficiencies of coenzyme Q10 in patients with periodontal disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1976;14(4):729-38.
72. Al-Hasso Shahla. Coenzyme Q10: a review. *Hosp Pharm.* 2000;35:51–55.
73. Figuero E, Soory M, Cerero R, Bascones A. Oxidant/antioxidant interactions of nicotine, Coenzyme Q10, pycnogenol and phytoestrogens in oral periosteal fibroblasts and MG63 osteoblasts. *Steroids.* 2006;71(13-14):1062-72.

74. Hornos Carneiro MF, Shin N, Karthikraj R, Barbosa F Jr, Kannan K, Colaiácovo MP. Antioxidant CoQ10 restores fertility by rescuing bisphenol A-Induced Oxidative DNA damage in the *Caenorhabditis elegans* germline. *Genetics*. 2020;214(2):381-95.
75. Raut CP, Sethi KS, Kohale B, Mamajiwala A, Warang A. Subgingivally delivered coenzyme Q10 in the treatment of chronic periodontitis among smokers: a randomized, controlled clinical study. *J Oral Biol Craniofac Res*. 2019;9(2):204-8.
76. Raut CP, Sethi KS. Comparative evaluation of co-enzyme Q10 and *Melaleuca alternifolia* as antioxidant gels in treatment of chronic periodontitis: a clinical study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(3):377-81.
77. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(11):1241-6.
78. Baltacıoğlu E, Yuva P, Aydın G, Alver A, Kahraman C, Karabulut E, Akalın FA. Lipid peroxidation levels and total oxidant/antioxidant status in serum and saliva from patients with chronic and aggressive periodontitis. Oxidative stress index: a new biomarker for periodontal disease? *J Periodontol*. 2014;85(10):1432-41.
79. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.
80. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. 2010. Animal research: Reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *J Physiol*. 588(pt 14) 2519–2521.
81. Okamoto M, Kita T, Okuda H, Tanaka T, Nakashima T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol Toxicol*. 1994;75(1):1-6.
82. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. In vivo effect of photodynamic therapy on periodontal bone loss in dental furcations. *J Periodontol*. 2008;79(6):1081-8.
83. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res*. 1975;10(6):332-45.
84. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Oshiiwa M, Garcia VG. Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2007;78(3):566-75.

85. de Almeida J, Ervolino E, Bonfietti LH, Novaes VC, Theodoro LH, Fernandes LA, Martins TM, Faleiros PL, Garcia VG. Adjuvant therapy with sodium alendronate for the treatment of experimental periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2015;86(10):1166-75.
86. Loos B, Nylund K, Claffey N, Egelberg J. Clinical effects of root debridement in molar and non-molar teeth. A 2-year follow-up. *J Clin Periodontol*. 1989 Sep;16(8):498-504.
87. Nordland P, Garrett S, Kiger R, Vanooteghem R, Hutchens LH, Egelberg J. The effect of plaque control and root debridement in molar teeth. *J Clin Periodontol*. 1987 Apr;14(4):231-6.
88. Al-Shammari KF, Kazor CE, Wang HL. Molar root anatomy and management of furcation defects. *J Clin Periodontol*. 2001 Aug;28(8):730-40. English, French, German.
89. Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):167-88.
90. Svärdröm G, Wennström JL. Furcation topography of the maxillary and mandibular first molars. *J Clin Periodontol*. 1988 May;15(5):271-5.
91. Nibali L, Zavattini A, Nagata K, Di Iorio A, Lin GH, Needleman I, Donos N. Tooth loss in molars with and without furcation involvement - a systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*. 2016 Feb;43(2):156-66.
92. Nociti FH Jr, Nogueira-Filho GR, Primo MT, Machado MA, Tramontina VA, Barros SP, Sallum EA. The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. *J Periodontol*. 2000 Sep;71(9):1460-4. doi: 10.1902/jop.2000.71.9.1460.
93. Cao DJ, Aldy K, Hsu S, McGetrick M, Verbeck G, De Silva I, Feng SY. Review of Health Consequences of Electronic Cigarettes and the Outbreak of Electronic Cigarette, or Vaping, Product Use-Associated Lung Injury. *J Med Toxicol*. 2020 Jul;16(3):295-310. doi: 10.1007/s13181-020-00772-w.
94. Romberg AR, Miller Lo EJ, Cuccia AF, Willett JG, Xiao H, Hair EC, Vallone DM, Marynak K, King BA. Patterns of nicotine concentrations in electronic cigarettes sold

- in the United States, 2013-2018. *Drug Alcohol Depend.* 2019 Oct 1;203:1-7. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.05.029.
95. Jepsen S, Gennai S, Hirschfeld J, Kalemaj Z, Buti J, Graziani F. Regenerative surgical treatment of furcation defects: A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials. *J Clin Periodontol.* 2020 Jul;47 Suppl 22:352-374.
96. Goncalves RB, Coletta RD, Silv_erio KG, Benevides L, Casati MZ, da Silva JS, Nociti FH Jr. Impact of smoking on inflammation: overview of molecular mechanisms. *Inflamm Res*2011; 60: 409–424.
97. Bosco AF, Bonfante S, de Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol.* 2007 Mar;78(3):527-32. doi: 10.1902/jop.2007.060149

Anexos

ANEXO A- Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa Intitulado "Avaliação dos efeitos da coenzima Q10 utilizada como coadjuvante local e/ou sistêmica ao tratamento mecânico da periodontite experimental em ratos tratados com nicotina", Processo FOA nº 00302-2020, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 02 de Outubro de 2020.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Outubro de 2024.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Novembro de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Evaluation of the effects of coenzyme Q10 as local and/or systemic adjuvant to mechanical treatment of experimental periodontitis in rats treated ith nicotine", Protocol FOA nº 00302-2020, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its Implementation was approved by CEUA on October 02, 2020.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: October 02, 2024.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: November 02, 2024.

Prof. Associado Guilherme de Paula Nogueira
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonfácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-060 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br