

LETÍCIA TAMI ALMEIDA AMORIM IKEJIRI

**Suplementação sistêmica com Coenzima Q10 no
periodonto de ratos tratados com nicotina: análise
qualitativa das fibras colágenas e quantitativa de
fibroblastos**

Araçatuba

2023

LETÍCIA TAMI ALMEIDA AMORIM IKEJIRI

**Suplementação sistêmica com Coenzima Q10 no
periodonto de ratos tratados com nicotina: análise
qualitativa das fibras colágenas e quantitativa de
fibroblastos**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como
parte dos requisitos para a obtenção do título
de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de
Almeida

Araçatuba

2023

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, seus docentes, toda a equipe de funcionários que se dedicam para que tenhamos um campus funcional, desde à limpeza à manutenção dos equipos clínicos, em especial à Jane e à Lu, que fizeram todas as minhas clínicas da graduação mais felizes através dos apelidos, risadas e carinho que me foram dados ao longo de toda a minha graduação.

Ao **Departamento de Diagnóstico e Cirurgia** da FOA-UNESP.

Ao **Departamento de Ciências básicas** da FOA-UNESP.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pelo financiamento e apoio designado ao projeto de pesquisa através da concessão de Auxílio (Processo Nº 2021/11309-9).

A todos os **alunos orientados do Prof. Dr. Juliano Milanezi**, que sempre estiveram dispostos a me ensinar e auxiliar em todos os momentos que precisei. Obrigada por me acolherem tão bem e criarem um ambiente de trabalho tão maravilhoso. Um agradecimento especial ao **Henrique Rinaldi Matheus**, que foi a primeira pessoa com quem eu conversei quando me interessei em entrar na Periodontia e, desde então, tornou-se um grande colega de trabalho e amigo. Obrigada por sempre me ajudar, principalmente no micrótomo, e por todas as noites de muita risada e desabafos.

Aos **meus pais**, a quem devo absolutamente tudo o que eu sou. Obrigada por acreditarem tanto em mim, por sempre propiciarem o melhor para mim e para nossa família. Eu sou eternamente grata por ter vocês comigo, não existiriam pessoas melhores para serem meus pais. Espero um dia conseguir retribuir um pouco de tudo que vocês me proporcionam diariamente.

À minha **irmã**, que é mais nova só no papel. Obrigada por cuidar tão bem de mim e me apoiar incondicionalmente. O universo foi muito generoso comigo me presenteando você como irmã. Você é um pedaço de mim, o melhor de todos. Eu te amo infinitamente e escolheria ser sua irmã nessa e em todas as outras vidas.

Ao meu **namorado**, que é meu parceiro, protetor, melhor amigo. Obrigada por todas as vezes em que eu pude contar com você, principalmente quando me faltou confiança e coragem. Obrigada por ser tão perfeito para mim.

Ao meu **orientador Prof. Dr. Juliano Milanezi**, pelo qual eu tenho enorme carinho e admiração. Obrigada por me permitir ter o privilégio de ser sua orientada. Fazer parte da sua equipe foi uma experiência maravilhosa, que vai sempre me fazer sentir orgulho e felicidade. Obrigada por toda ajuda e todo o conhecimento transmitido dentro da sala de aula, nas clínicas, nos laboratórios, na monitoria. Meu enorme respeito pelo profissional que é. Pode ter certeza que a nossa convivência gerou grande parte das melhores risadas que eu dei na faculdade.

À **Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto**, que dá vontade de colocar num potinho! Marca a vida de todo aluno que passa pela FOA com seu jeitinho único. Obrigada pelo carinho que tem com tudo e todos ao seu redor, minha admiração vem desde 2018. Obrigada por ter aceito fazer parte da minha banca, é muito especial tê-la nesse momento. Feliz com todos os encontros que tivemos, seja dentro da foa, seja fora dela (na dely, no shopping). Minha enorme admiração pela mulher, professora, pesquisadora, amiga que é.

À **Elisa Mara de Abreu Furquim**, que foi um presente que a vida me deu. Obrigada por tanta ajuda, suporte e aprendizado, pelas incontáveis vezes que recebeu meus pedidos de socorro e me tranquilizou. Obrigada por me permitir tê-la como colega de pesquisa, duplinha de karaokê, companhia de muita comilança, parceira dos inúmeros surtos, amiga e confidente. Serei para sempre sua iczinha. Te amo absurdamente.

A todas as **minhas amigas**, especialmente: Julia Izepe. Gabriela Berejanski, Victoria Rocha e Rafaela Farto, que mesmo a mais de 500km de distância se fazem presentes no meu dia a dia. Encontrar vocês pelo menos uma vez ao ano me renova e me faz ter a certeza de que eu tenho as melhores comigo. Obrigada por me acompanharem nos melhores e piores momentos da minha vida. Minhas irmãs de alma, de quem eu sinto saudade todos os dias. Obrigada por serem tão maravilhosas.

À minha amiga e dupla de apartamento, **Laís Ventura Barroti**, pela companhia principalmente nesses últimos três anos, por dividir tantos momentos e comemorar cada conquista junto comigo. Você é um exemplo de garra e determinação. Obrigada por toda ajuda e cumplicidade durante todo o nosso caminho até aqui.

A todos(as) os(as) meus(as) **tios(as) e primos(as)**, por estarem sempre dispostos a me ajudar. Sou extremamente sortuda por fazer parte dessa grande família (74 pessoas não é para qualquer um) e eternamente grata por tudo que fizeram e fazem por mim.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para minha jornada até esse dia, muito obrigada.

IKEJIRI, LTAA. **Suplementação sistêmica com Coenzima Q10 no periodonto de ratos tratados com nicotina: análise qualitativa das fibras colágenas e quantitativa de fibroblastos.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O propósito do estudo foi avaliar qualitativamente as fibras colágenas periodontais e quantitativamente os fibroblastos no periodonto de ratos tratados com nicotina submetidos à suplementação sistêmica com Coenzima Q10. Sessenta e quatro ratos machos (*Wistar*) foram divididos em 4 grupos (n=16). Durante todo o período experimental, os animais receberam duas injeções subcutâneas diárias de 3mg/kg de hemissulfato de nicotina (NIC) ou solução salina (SS) na região dorsal, com 12 horas de intervalo entre elas, iniciando-se 30 dias antes do início da administração sistêmica de coenzima Q10 (CQ10) ou glicerina vegetal. As soluções foram administradas via gavagem gástrica diária, de acordo com os grupos: **SS-S e NIC-S:** gavagem gástrica diária de 1 ml de glicerina vegetal; **SS-Q10 e NIC-Q10:** gavagem gástrica diária com 120 mg de CQ10. As eutanásias foram realizadas aos 7 e 28 dias após o início da administração sistêmica com CQ10 ou glicerina vegetal. As peças coletadas foram processadas com desmineralização para a análise histopatológica, análise qualitativa através do método de polarização com Picrosírus-red e análise quantitativa de fibroblastos. Após análise de normalidade e homocedasticidade os dados foram submetidos aos testes mais adequados com significância de 5% ($p \leq 0,05$). A raspagem e alisamento radicular (RAR) associada à coenzima Q10 utilizada sistemicamente no tratamento da periodontite da experimental em ratos tratados sistemicamente com nicotina foram efetivas mostrando resultados favoráveis nas análises histopatológica, histométrica e imunoistoquímica.

Palavras- chaves: Periodonto; nicotina; coenzima Q; fibroblastos.

IKEJIRI, LTAA. **Systemic supplementation with Coenzyme Q10 in the periodontium of rats treated with nicotine: qualitative analysis of collagen fibers and quantitative analysis of fibroblasts.** Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The aim of this study was to qualitatively evaluate the periodontal collagen fibers and quantitatively the fibroblasts in the periodontium of rats treated with nicotine submitted to systemic supplementation with Coenzyme Q10. Sixty-four male rats (*Wistar*) were divided into 4 groups (n=16). During the entire experimental period, the animals received two daily subcutaneous injections of 3mg/kg of nicotine hemisulfate (NIC) or saline solution (SS) in the dorsal region, with a 12 hour interval between them, starting 30 days before the start of the experiment. systemic administration of coenzyme Q10 (CQ10) or vegetable glycerin. The solutions were administered via daily gastric gavage, according to the groups: **SS-S e NIC-S**: daily gastric gavage of 1 ml of vegetable glycerin; **SS-Q10 e NIC-Q10**: daily gastric gavage of 120mg of CQ10. The euthanasias were performed at 7 and 28 days after the start of systemic administration with CQ10 or vegetable glycerin. The collected pieces were processed with demineralization for histopathological analysis, qualitative analysis through polarization method with Picrosirius-red and quantitative analysis of fibroblasts. After analysis of normality and homoscedasticity, the data were submitted to the most appropriate tests with a significance of 5% ($p \leq 0.05$). Root scaling and planing (RAR) associated with coenzyme Q10 used systemically in the treatment of experimental periodontitis in rats treated systemically with nicotine were effective, showing favorable results in histopathological, histometric and immunohistochemical analyses.

Keywords: Periodontium; nicotine; coenzyme Q; fibroblasts.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Aplicações subcutâneas de solução salina ou hemissulfato de nicotina..	15
Figura 2 – Gavagem gástrica diária com Coenzima Q10 ou glicerina vegetal.....	15
Figura 3 - Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca e dos tecidos interproximais dos primeiros molares inferiores direitos nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 2,5x.....	20
Figura 4 – Análise histopatológica dos interproximais da região distal nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 400x.....	20
Figura 5 – Análise histopatológica dos interproximais da região mesial nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 400x.....	20
Figura 6 – Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da quantificação de fibroblastos para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) intragrupo; β ,diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com grupo SS-S aos 7 dias; *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com grupo NIC-S aos 28 dias.....	21
Figura 7 – Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da quantificação de fibroblastos para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α ,diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) intragrupo; β ,diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com SS-S;NIC-S e NIC-Q10 aos 7 dias; *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-S e NIC-S aos 28 dias.....	22
Figura 8 – Método de polarização com Picrosírius-red das regiões interproximais distais nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Picrosírius-red . Aumento: 400x.....	24

Figura 9 – Método de polarização com Picrosírius-red das regiões interproximais mesiais nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Picrosírius-red . Aumento: 400x.....	24
Figura 10 – Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarela avermelhadas para cada grupo e período na região distal. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α ,diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com SS-S e NIC-Q10 aos 7 dias.....	26
Figura 11 – Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarelas avermelhadas para cada grupo e período na região mesial. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α ,diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com NIC-Q10 aos 7 dias; β ,diferenças estatisticamente ($p \leq 0,05$) com NIC-Q10 aos 7 dias significativa ($p \leq 0,05$) com NIC-Q10 aos 7 dias; *,diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com NIC-S e NIC-Q10 aos 28 dias.nicotina..	26
Figura 12 – Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarelo-esverdeadas para cada grupo e período na região mesial. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) intragrupo; α ,diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com SS-S, NIC-S e NIC-Q10 aos 7 dias; β , diferenças estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-S e NIC-Q10 aos 28 dias.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Grupos experimentais.....	14
Tabela 2 – Média e desvio padrão porcentagem de fibras colágenas amarelo-avermelhadas e amarelo-esverdeadas em todos os grupos e períodos na região interproximal distal.....	23
Tabela 3 - Média e desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas amarelo-avermelhadas e amarelo-esverdeadas em todos os grupos e períodos na região interproximal mesial	23

LISTA DE ABREVIATURAS

ROS	Espécies reativas de oxigênio
MMPs	Metaloproteinases da matriz
CQ10	Coenzima Q10
RAR	Raspagem e alisamento radicular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAL E MÉTODO.	12
2.1 Animais.....	12
2.2 Cálculo amostral e randomização.....	13
2.3 Grupos Experimentais	13
2.4 Protocolo de administração de nicotina ou solução de cloreto de sódio	14
2.5 Preparo e administração da Coenzima Q10.....	15
2.6 Períodos experimentais e obtenção das amostras.....	15
2.7 Linha do Tempo do Período Experimental	16
2.8 Processamento Laboratorial	16
2.9 Análise dos Resultados.....	16
2.10 Análise Estatística.....	17
3. RESULTADOS	18
4. DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29
ANEXO.....	33

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^{1,2,3}. Dentre os componentes do tabaco encontra-se a nicotina, principal alcaloide da folha do tabaco, que possui propriedades toxicológicas e é responsável pela dependência química de seus usuários⁴.

Na literatura, já é evidente que o vício de fumar altera negativamente o sistema inflamatório, a resposta humoral, a síntese de colágeno, a proliferação de fibroblastos, o sistema vascular e também a diferenciação de células ósseas como os osteoclastos. Esses efeitos resultam em comprometimentos tanto sistêmicos quanto periodontais⁵⁻¹¹. Ademais, sabe-se que o vício de fumar provoca estresse oxidativo nas células e nos tecidos devido à presença de moléculas oxidantes no cigarro e de produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)^{12,13}.

No periodonto, há estudos que mostram que a administração diária de nicotina influencia na proliferação de fibroblastos⁹ e ainda reduzem a viabilidade celular tanto dos fibroblastos gengivais quanto dos fibroblastos do ligamento periodontal^{14,15}. Altas concentrações de nicotina parecem inibir a proliferação de fibronectina e de colágeno¹⁰ e diminuem a produção de colágeno tipos I e III em culturas de fibroblastos tratados com nicotina¹⁶. Deveci *et al.* (2018) mostraram, em um estudo animal com ratos, que a nicotina diminui a produção das metaloproteinases da matriz (MMPs) e a síntese de colágeno¹⁷.

A Coenzima Q10 (CQ10), também conhecida como ubiquinona, vem sendo estudada pelo seu efeito antioxidante, capacidade de eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)^{18,19}, mostrando resultados favoráveis para doenças cardiovasculares, diabetes e doença de Parkinson. Figueiro *et al.* (2006), em estudo *in vitro*, sugeriram que o efeito catabólico da nicotina pode ser revertido pelo uso de antioxidantes como a CQ10²⁰, observando um aumento nos rendimentos de dihidrotestosterona (DHT), andrógeno que possui influência na estimulação de formação da matriz nas células,²¹ em fibroblastos e osteoblastos em meios tratados com nicotina, sugerindo o papel antioxidante da CQ10²⁰. Além disto, A CQ10 é intrínseca no

tecido humano, inclusive na gengiva, e exerce papel importante na transferência de elétrons na mitocôndria^{22,23}. No entanto, é relatado que existe uma deficiência de CQ10 em tecidos como o coração, a mucosa gástrica e na gengiva²⁴.

Sabe-se que a nicotina é um agente oxidante que ocasiona prejuízos no periodonto mesmo com a ausência de placa bacteriana como demonstrado por de Almeida *et al* (2007)⁹. É de extrema importância que profissionais da saúde, principalmente cirurgiões dentistas, realizem a motivação para controle e interrupção do tabagismo²⁵. No entanto, é de conhecimento que o vício, dentre eles o vício em fumar causado pela nicotina, é definido como o uso compulsivo de algo e está associado à dependência e abstinência. Dados demonstram que apesar de um número grande de tabagistas optarem por parar de fumar, a maioria deles apresentam recaídas e voltam ao vício por crises de abstinência²⁶, não apresentando controle psicológico e físico de suas decisões para interrupção do vício²⁷, demonstrando o caráter de doença crônica que a dependência causada pela nicotina exerce^{27,28}. Diante desta condição clínica, em que houve motivação para a interrupção do tabagismo, mesmo assim o indivíduo encontra-se no vício, estudos sobre drogas que pudessem auxiliar na manutenção de um periodonto saudável e na manutenção de dentes na cavidade oral em pacientes fumantes mostram-se bastantes pertinentes, contribuindo para dar suporte à literatura sobre o tema e ser o ponto de início para futuros estudos clínicos para auxiliar e direcionar tratamentos na rotina clínica. A partir do exposto, o propósito do estudo será avaliar qualitativamente as fibras colágenas periodontais e quantitativamente os fibroblastos no periodonto de ratos tratados com nicotina submetidos à suplementação sistêmica com Coenzima Q10.

MATERIAL E MÉTODO

Animais

Foram utilizados 64 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. Todos os protocolos descritos foram enviados para Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP e foi aprovado e homologado (Processo FOA nº 00302-2020) (anexo). 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*²⁹.

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)³⁰. Sendo assim, n=8 foi suficiente para rejeitar a hipótese nula nas análises histológica e análise qualitativa através do método de polarização com Picrosírus-red. A estimativa para cada medida de resultado foi realizada para atingir poder de 0,8 e erro alpha análise qualitativa através do método de polarização com Picrosírus-red e análise quantitativa de fibroblastos. 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 64 foram marcados na porção superior da cauda dos animais utilizando caneta nankin. A sequência numérica foi 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-S 7 dias, SS-S 28 dias, SS-Q10 7 dias, SS-Q10-28 dias, NIC-S 7 dias, NIC-S 28 dias, NIC-Q10 7 dias e NIC-Q10 28 dias foi realizada através de uma tabela numérica randômica gerada em computador por uma pessoa externa ao estudo e cega aos tratamentos.

Grupos Experimentais

Grupo SS-S (n=16): Os animais foram submetidos a 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, deu-se início a administração diária de 1 ml de glicerina vegetal, via gavagem gástrica, até o final do experimento.

Grupo SS-Q10 (n=16): Os animais foram submetidos a 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, deu-se início a suplementação diária com 120 mg³¹ de CQ10, via gavagem gástrica, até o final do experimento.

Grupo NIC-S (n=16): Os animais foram submetidos a 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, deu-se início a administração diária de 1 ml de glicerina vegetal, via gavagem gástrica, até o final do experimento.

Grupo NIC-Q10 (n=16): Os animais foram submetidos a duas aplicações subcutâneas diárias de 3 mg/kg de hemissulfato de NIC³¹ durante todo o período experimental. Após 30 dias do início das aplicações de NIC, deu-se início a suplementação diária com 120 mg de CQ10, via gavagem gástrica, até o final do experimento.

Tabela 1- Grupos experimentais

GRUPOS EXPERIMENTAIS		
Períodos de Eutanásia		
SS-S (n=16)	7 dias após início da gavagem	28 dias após início da gavagem
SS-Q10 (n=16)	7 dias após início da gavagem	28 dias após início da gavagem
NIC-S (n=16)	7 dias após início da gavagem	28 dias após início da gavagem
NIC-Q10 (n=16)	7 dias após início da gavagem	28 dias após início da gavagem

Protocolo de administração de nicotina ou solução de cloreto de sódio

A cada 12 horas os animais foram submetidos a injeções subcutâneas de nicotina ou solução salina na região dorsal em horário pré-estabelecido, com início 30 dias antes do início da administração sistêmica de coenzima Q10 (CQ10) ou glicerina vegetal. 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* (1994)³¹. 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.

Figura 1- Aplicações subcutâneas de solução salina ou hemissulfato de nicotina.



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 120mg de Q10/ml de glicerina vegetal³²⁻³⁴. Sendo assim, os animais dos grupos SS-Q10 e NIC-Q10 receberam, via gavagem gástrica, suplementação diária com 1ml de solução contendo 120mg de CQ10 a partir do 30º. dia do período experimental. Os animais dos grupos SS-S e NIC-S receberam, diariamente, 1ml de glicerina vegetal, via gavagem gástrica, para simular o estresse a que os animais do grupo teste estavam expostos.

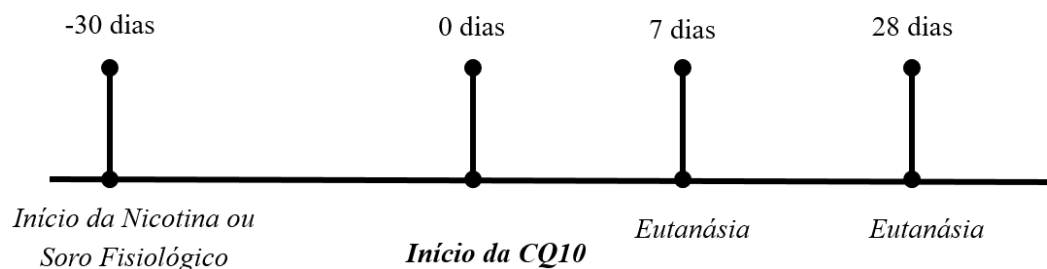
Figura 2. Gavagem gástrica diária com Coenzima Q10 ou glicerina vegetal.



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 150mg/kg de peso corporal aos 7 e 28 dias após o início da administração sistêmica de coenzima Q10 (CQ10) ou glicerina vegetal. A mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes no plano mediano, e as hemi-mandíbulas direitas foram fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% por um período de 48 horas.

Linha do Tempo do Período Experimental



Processamento Laboratorial

Após fixação, as 64 amostras (08 espécimes por grupo/período) foram lavadas em água corrente e foram submetidas ao processo de desmineralização em solução de EDTA 10% com trocas semanais. 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 cinco cortes foram corados com picrosírius-red para análise das fibras colágenas.

Análise dos Resultados

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) reabsorção radicular externa (cimento e dentina); 3) reabsorção alveolar; 4) padrão de estruturação do tecido conjuntivo; 5) padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar.

Análise Histométrica- Quantificação dos fibroblastos

Os cortes seriados foram selecionados e analisados na face mesial e distal (interproximal) do tecido gengival do primeiro molar inferior. Após a exclusão da primeira e das últimas secções em que o tecido gengival é evidente, foram selecionados cinco cortes histológicos equidistantes de cada espécime. Cinco áreas do tecido conjuntivo adjacente ao epitélio gengival, acima da crista

óssea alveolar (aumento original 400x), foram capturados por uma câmera digital conectada a um microscópio óptico - e então transferidos para um computador. A contagem de células do tipo fibroblasto foi repetida três vezes em cada área por um único examinador previamente calibrado, cego para os grupos experimentais. Os fibroblastos foram identificados por sua forma fusiforme característica quando seccionados paralelamente ao eixo longitudinal ou pela presença de uma cauda nuclear em corte transversal. Essa contagem foi realizada com software de análise de imagem ImageJ. Os resultados foram expressos como o número de células por área de tecido conjuntivo.

Método de polarização com Picrosírus-red – Análise Qualitativa

O método de polarização com Picrosírus-red foi utilizada para avaliar a maturação das fibras colágenas sob microscopia de luz polarizada. Os cortes seriados foram analisados em microscópio de luz polarizada a fim de se avaliar a organização, maturação e quantidade de feixes de fibras colágenas considerando-se a intensidade de birrefringência da matriz colagenosa³⁵⁻³⁹. Foi utilizado o software LAS (400× magnification, Leica LAS, Leica Microsystems), que permite a definição dos espectros de cor para cada fibra colágena no tecido. Após a seleção da cor, o programa calculou automaticamente a porcentagem de fibras na área marcada. Sendo que fibras amarelo-esverdeadas foram consideradas imaturas, desorganizadas e delgadas. Já as fibras amarelas avermelhadas foram consideradas maduras, organizadas e espessas.

Análise Estatística

Os dados histométricos de quantificação de fibroblastos e os dados obtidos nos métodos de polarização com Picrosírus-red 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: um critério (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Análise Histopatológica dos tecidos periodontais

Grupo SS-S

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos interproximais da região distal* do primeiro molar inferior, apresentaram tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, que se apresentava de forma estruturada, bem como a matriz extracelular organizada e presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos. Os *tecidos interproximais da região mesial* do primeiro inferior, apresentaram tecido conjuntivo não estruturado, com matriz extracelular desorganizada, com presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos e presença de restos epiteliais de Malassez.

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos no interior de furca*, apresentaram tecido conjuntivo organizado, moderado infiltrado inflamatório, presença de vasos sanguíneos e região de furca preenchida por tecido ósseo vital repleto de osteócitos.

Grupo SS-Q10

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos interproximais da região distal* do primeiro molar inferior, apresentaram tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, que se apresentava de forma estruturada e espessa, bem como a matriz extracelular organizada e presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos. No período de 7 dias os *tecidos interproximais da região mesial* do primeiro inferior, apresentaram tecido conjuntivo não estruturado, com matriz extracelular desorganizada, com presença de grande quantidade de capilares sanguíneos. Já aos 28 dias observou-se um tecido conjuntivo frouxo mais estruturado, com a matriz extracelular parcialmente organizada e com fibras colágenas espessas, com aumento da quantidade dos capilares sanguíneos e de fibras colágenas.

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos no interior de furca*, apresentaram tecido conjuntivo organizado, moderado infiltrado inflamatório, presença de vasos sanguíneos e região de furca preenchida por tecido ósseo vital repleto de osteócitos.

Grupo NIC-S

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos interproximais da região distal* do primeiro molar inferior, apresentaram tecido conjuntivo rico em fibras colágenas mais

delgadas, que se apresentava de forma estruturada, bem como a matriz extracelular organizada e presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos. Aos 7 e 28 dias, os *tecidos interproximais da região mesial* do primeiro inferior, apresentaram tecido conjuntivo não estruturado, com matriz extracelular desorganizada, com presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos.

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos no interior de furca*, apresentaram tecido conjuntivo organizado, moderado à alto infiltrado inflamatório, presença de vasos sanguíneos e região de furca preenchida por tecido ósseo vital repleto de osteócitos, no entanto com espaço medulares mais amplos.

Grupo NIC-Q10

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos interproximais da região distal* do primeiro molar inferior, apresentaram tecido conjuntivo rico em fibras colágenas espessas, que se apresentava de forma estruturada, bem como a matriz extracelular organizada e presença de quantidade moderada de capilares sanguíneos. No período de 7 dias os *tecidos interproximais da região mesial* do primeiro inferior, apresentaram tecido conjuntivo parcialmente estruturado, com matriz extracelular desorganizada, com presença de pouca quantidade de capilares sanguíneos e além da presença de restos epiteliais de Malassez. Já aos 28 dias observou-se um tecido conjuntivo frouxo mais estruturado com fibras colágenas espessas, com a matriz extracelular organizada, com aumento da quantidade dos capilares sanguíneos e fibras colágenas.

Aos 7 e 28 dias, os *tecidos no interior de furca*, apresentaram tecido conjuntivo organizado, moderado infiltrado inflamatório, presença de vasos sanguíneos e região de furca preenchida por tecido ósseo vital repleto de osteócitos e com espaços medulares reduzidos.

As imagens representativas do interior da furca e nas regiões interproximais distal e mesial estão ilustradas na figura 3, 4 e 5.

Figura 3- Análise histopatológica dos tecidos periodontias da região de furca e dos tecidos interproximais dos primeiros molares inferiores direitos nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 2,5x.

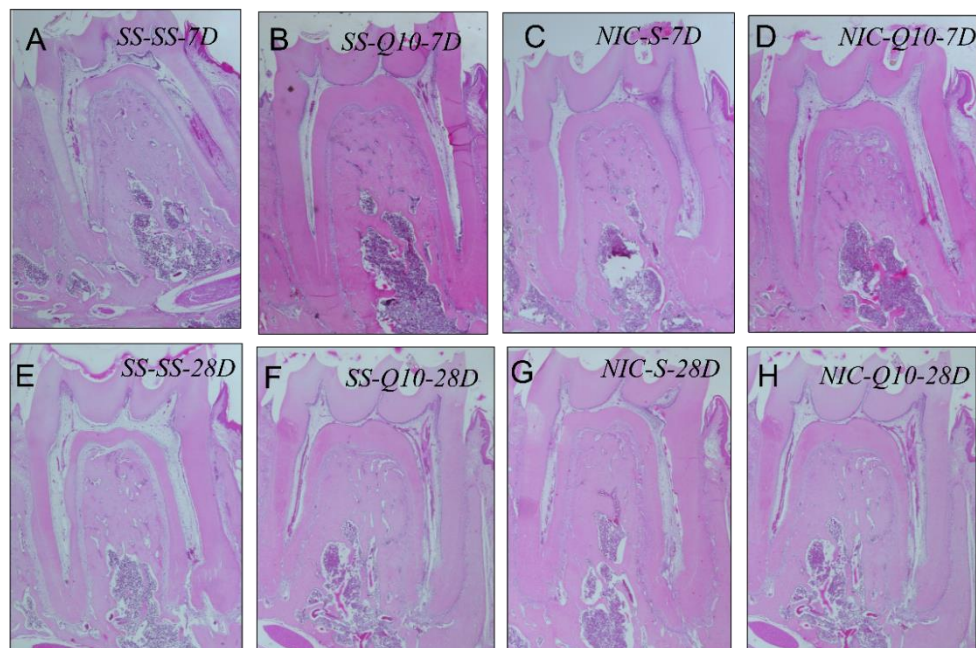


Figura 4- Análise histopatológica dos interproximais da região distal nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 400x.

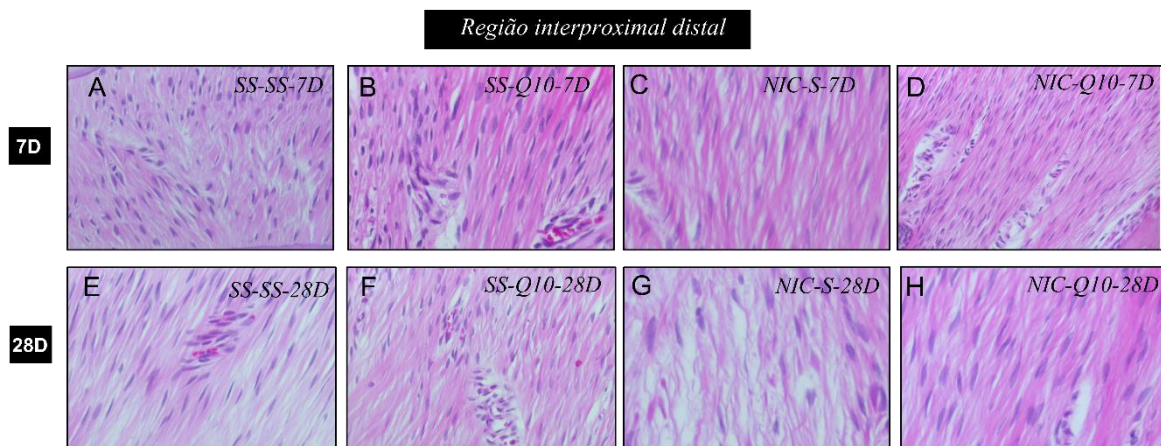
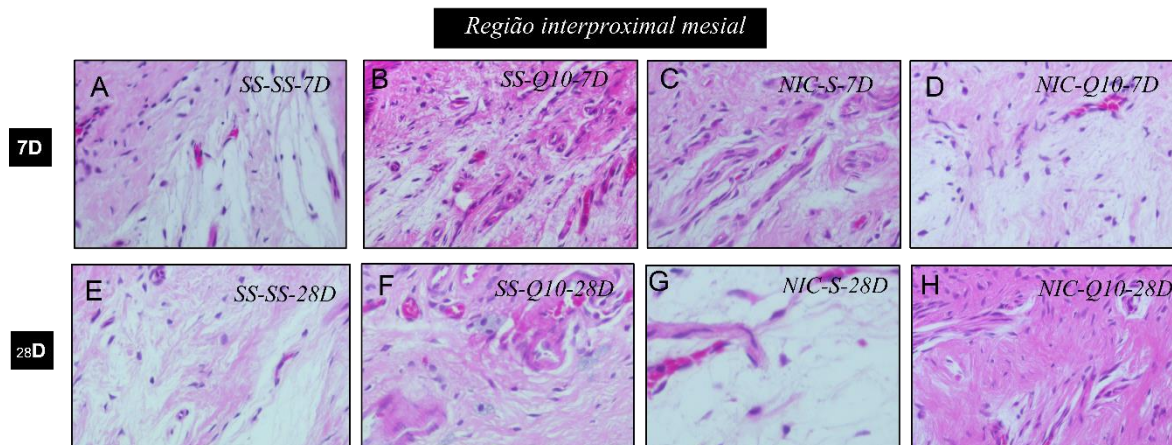


Figura 5- Análise histopatológica dos interproximais da região mesial nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Aumento: 400x.



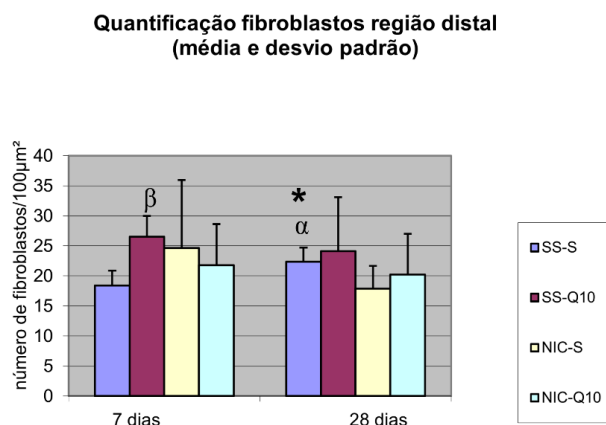
Análise Histométrica- Quantificação dos fibroblastos

Tecidos interproximais da região distal

Na análise histométrica de quantificação de fibroblastos, em relação à análise intragrupo, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-S** ($22,375 \pm 2,326094213$) aos 28 dias em comparação ao período experimental de 7 dias ($18,375 \pm 2,503568881$).

No que tange às análises intergrupos, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-Q10-7 dias** ($26,5 \pm 3,464101615$) em comparação com o grupo **SS-S-7 dias** ($18,375 \pm 2,503568881$). Além disto, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-S-28 dias** ($22,375 \pm 2,326094213$) em comparação com o grupo **NIC-S-28 dias** ($17,875 \pm 3,796144661$). Os resultados da análise da quantificação dos fibroblastos estão representados na Figura 6.

Figura 6- Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da quantificação de fibroblastos para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) intragrupo; β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com grupo SS-S aos 7 dias; *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com grupo NIC-S aos 28 dias.



Tecidos interproximais da região mesial

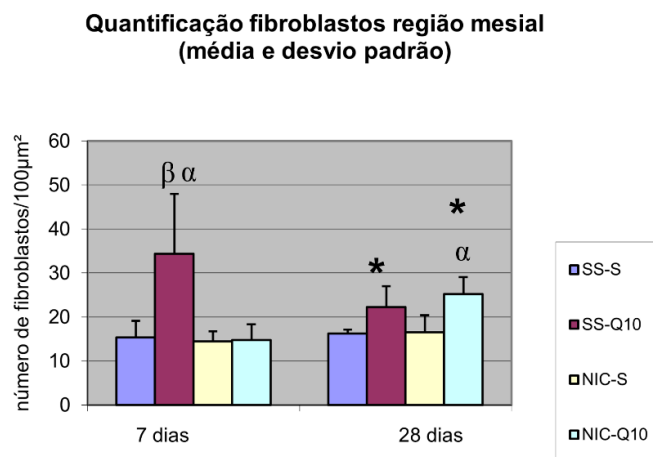
Na análise histométrica de quantificação de fibroblastos, em relação à análise intragrupo, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo SS-Q10 ($34,375 \pm 13,64799828$) aos 7 dias em comparação ao período experimental de 28 dias ($22,25 \pm 4,773438413$). Por outro lado, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo NIC-Q10 aos 28 dias ($25,25 \pm$

3,770183777) em comparação com o período experimental de 7 dias ($14,75 \pm 3,575711717$).

No que tange às análises intergrupos, no período experimental de 7 dias, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo SS-Q10 ($34,375 \pm 13,64799828$) em comparação com os grupos SS-S ($15,375 \pm 3,777281713$), NIC-S ($14,5 \pm 2,267786838$) e NIC-Q10 ($14,75 \pm 3,575711717$).

No que se refere ao período experimental de 28 dias, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo SS-Q10 ($22,25 \pm 4,773438413$) em comparação com os grupos SS-S ($16,25 \pm 0,88640526$) e NIC-S ($16,5 \pm 3,927922024$). Além disto, pode-se observar maior número de fibroblastos ($p \leq 0,05$) no grupo NIC-Q10 ($25,25 \pm 3,770183777$) em comparação com os grupos SS-S ($16,25 \pm 0,88640526$) e NIC-S ($16,5 \pm 3,927922024$). Os resultados da análise de quantificação dos fibroblastos estão representados na Figura 7.

Figura 7- Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da quantificação de fibroblastos para cada grupo e período. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) intragrupo; β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com SS-S; NIC-S e NIC-Q10 aos 7 dias; *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos SS-S e NIC-S aos 28 dias.



Método de polarização com Picrosírus-red – Análise Qualitativa

Pode-se observar através do método de polarização com Picrosírus-red maior porcentagem de fibras amarelas avermelhadas ($p \leq 0,05$) em comparação com as fibras amarelo-esverdeadas em todos os grupos e período tanto na região distal como na mesial, com exceção do grupo SS-S aos 7 dias na região distal que não apresentou diferenças estatisticamente significante. A

porcentagem de fibras amarelas avermelhadas e amarelo-esverdeadas em cada grupo e período estão demonstradas na tabela 2 e 3 e ilustradas na figura 8 e 9.

Tabela 2- Média e desvio padrão porcentagem de fibras colágenas amarelo-avermelhadas e amarelo-esverdeadas em todos os grupos e períodos na região interproximal distal.

Grupos	Fibras amarelo-avermelhadas	Fibras amarelo-esverdeadas
SS-S-7d	32,83675 ± 6,6435831	21,99075 ± 13,47179
SS-S-28d	38,818 ± 11,56416	21,827 ± 15,54795
SS-Q10-7d	51,22275 ± 13,82432536	11,18713 ± 8,82732
SS-Q10-28d	46,361375 ± 17,28075638	14,098625 ± 5,7425813
NIC-S-7d	42,7 ± 17,02878245	19,8385 ± 9,420067315
NIC-S-28d	39,44675 ± 11,1707484	13,65575 ± 5,987711
NIC-Q10-7d	34,2485 ± 12,7249253	18,86125 ± 12,10078
NIC-Q10-28d	35,27875 ± 10,478924	20,7915 ± 9,09914

Tabela 3- Média e desvio padrão da porcentagem de fibras colágenas amarelo-avermelhadas e amarelo-esverdeadas em todos os grupos e períodos na região interproximal mesial

Grupos	Fibras amarelo-avermelhadas	Fibras amarelo-esverdeadas
SS-S-7d	42,66575 ± 11,437316	8,711125 ± 3,815614
SS-S-28d	48,50633 ± 7,373838	5,587 ± 3,827831
SS-Q10-7d	46,93175 ± 18,4919398	2,7782 ± 2,270953
SS-Q10-28d	34,797875 ± 15,39904034	8,075375 ± 3,2309111
NIC-S-7d	33,1856 ± 12,82779581	9,0828 ± 4,938009645
NIC-S-28d	27,8005 ± 7,49392314	8,311375 ± 1,904938
NIC-Q10-7d	31,064 ± 12,1786155	11,86863 ± 4,112158
NIC-Q10-28d	30,165875 ± 13,020391	8,410875 ± 2,034695

Figura 8- Método de polarização com Picrosírius-red das regiões interproximais distais nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Picrosírius-red . Aumento: 400x

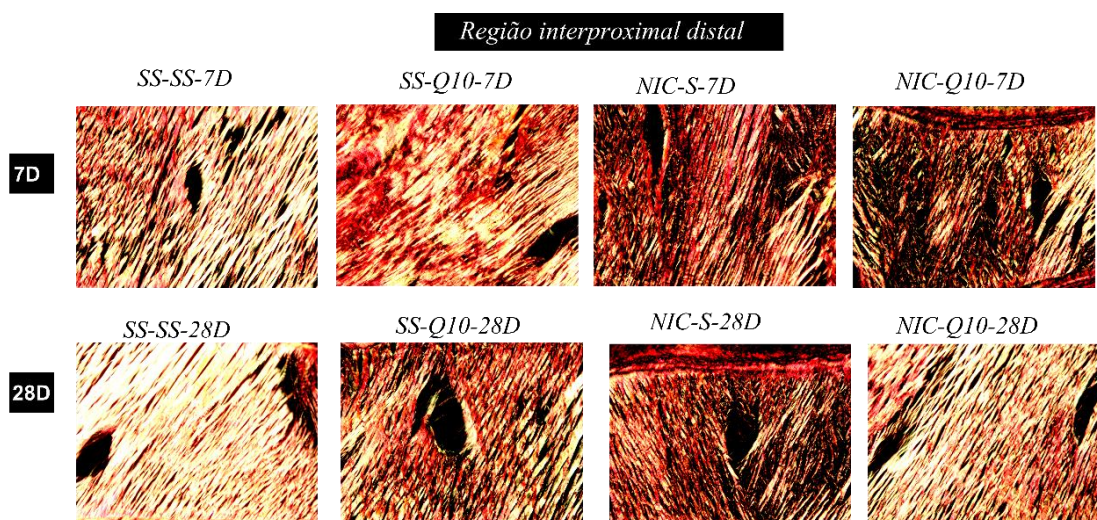
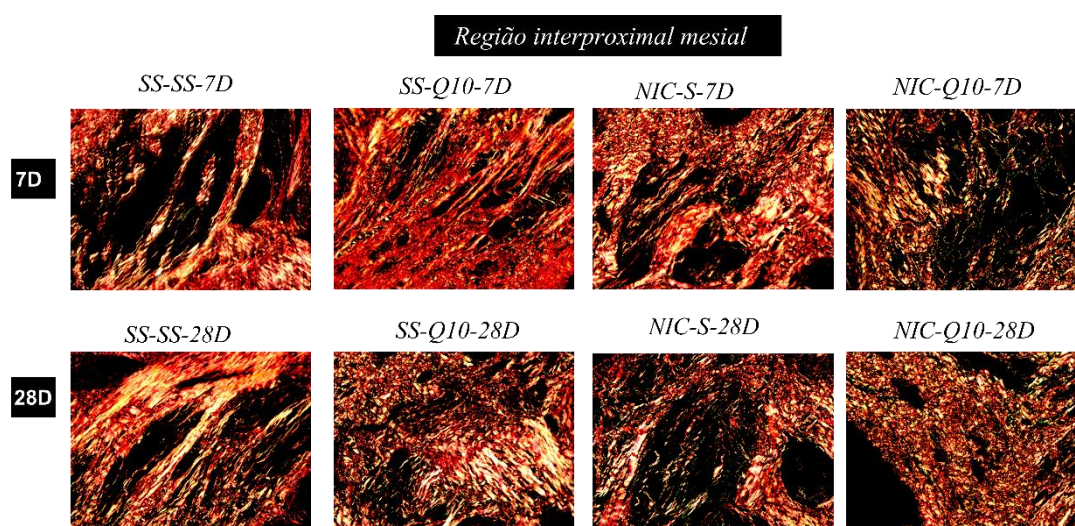


Figura 9- Método de polarização com Picrosírius-red das regiões interproximais mesiais nos períodos experimentais de 7 e 28 dias. Coloração: Picrosírius-red . Aumento: 400x



Fibras amarelas avermelhadas

No que se refere ao parâmetro das fibras amarelas avermelhadas na *região interproximal distal*, pode-se observar aos 7 dias maior porcentagem de fibras colágenas amarelo avermelhadas ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-Q10** ($51,22275 \pm 13,82432536$) em comparação com os grupos **SS-S** ($32,83675 \pm 6,6435831$) e **NIC-Q10** ($34,2485 \pm 12,7249253$). Já na *região interproximal mesial*, pode-se observar aos 7 dias maior porcentagem de fibras colágenas amarelo avermelhadas ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-S** ($42,66575 \pm 11,437316$) em comparação com o grupo **NIC-Q10** ($31,064 \pm 12,1786155$). Ainda no período de 7 dias, pode-se observar maior

porcentagem de fibras colágenas amarelos avermelhadas ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-Q10** ($46,93175 \pm 18,4919398$) em comparação ao grupo **NIC-Q10** ($31,064 \pm 12,1786155$). Aos 28 dias, pode-se observar maior porcentagem de fibras colágenas amarelos avermelhadas ($p \leq 0,05$) no grupo **SS-Q10** ($34,797875 \pm 15,39904034$) em comparação com os grupos **NIC-S** ($27,8005 \pm 7,49392314$) e **NIC-Q10** ($30,165875 \pm 13,020391$). Os resultados da análise das fibras colágenas amarelas avermelhadas estão representados na Figura 10 e 11.

Figura 10- Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarela avermelhadas para cada grupo e período na região distal. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com SS-S e NIC-Q10 aos 7 dias.

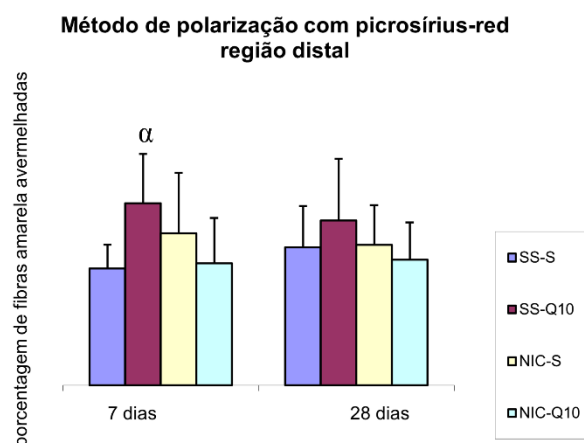
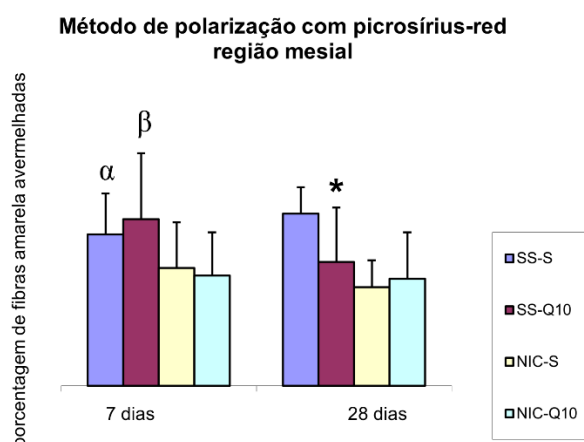


Figura 11- Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarelas avermelhadas para cada grupo e período na região mesial. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com NIC-Q10 aos 7 dias; β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com NIC-Q10 aos 7 dias; *, diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com NIC-S e NIC-Q10 aos 28 dias.

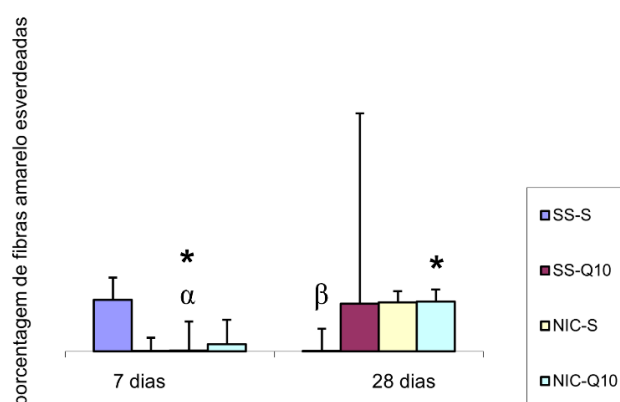


Fibras amarelo-esverdeadas

Na *região interproximal distal*, no que se refere ao parâmetro das fibras amarelo-esverdeadas, não apresentou diferenças estatisticamente significante. Já *região interproximal mesial* aos 7 dias pode-se observar menor porcentagem de fibras colágenas amarelo-esverdeadas no grupo **SS-Q10** ($2,7782 \pm 2,270953$) em comparação com os grupos **SS-S** ($8,711125 \pm 3,815614$), **NIC-S** ($9,0828 \pm 4,938009645$) e **NIC-Q10** ($11,86863 \pm 4,112158$). No período experimental de 28 dias pode-se observar menor porcentagem de fibras colágenas amarelo-esverdeadas no grupo **SS-S** ($5,587 \pm 3,827831$) em comparação com os grupos **NIC-S** ($8,311375 \pm 1,904938$) e **NIC-Q10** ($8,410875 \pm 2,034695$). No que tange a análise intragrupos, pode-se observar menor porcentagem de fibras colágenas amarelo-esverdeadas no grupo **SS-Q10** ($2,7782 \pm 2,270953$) aos 7 dias em comparação ao período experimental de 28 dias ($8,075375 \pm 3,2309111$). De modo contrário, pode-se observar menor porcentagem de fibras colágenas amarelo-esverdeadas no grupo **NIC-Q10** aos 28 dias ($8,410875 \pm 2,034695$) em comparação ao período experimental de 7 dias ($11,86863 \pm 4,112158$). Os resultados da análise das fibras colágenas amarelo-esverdeadas da região interproximal mesial estão representadas na Figura 12.

Figura 12- Gráfico mostrando a quantificação (Médias $\pm$ Desvio Padrão) da porcentagem de fibras amarelo-esverdeadas para cada grupo e período na região mesial. Testes estatísticos usados: ANOVA One-way e pós teste de Tukey. *, diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) intragrupo; α , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com SS-S, NIC-S e NIC-Q10 aos 7 dias; β , diferenças estatisticamente significante ($p \leq 0,05$) com os grupos NIC-S e NIC-Q10 aos 28 dias.

Método de polarização com picrossírius-red



DISCUSSÃO

Os efeitos deletérios, evidentes na literatura científica, acerca dos danos teciduais da nicotina no periodonto são reafirmados no estudo em questão, como fica reafirmado na análise histopatológica, na qual observou-se no grupo NIC-S um tecido conjuntivo mais desorganizado, com presença de fibras colágenas delgadas. Além disso, a presença de espaços medulares mais amplos na área de furca. Em adição, na análise histométrica de quantificação de fibroblastos, pode-se observar que tanto na região distal grupo NIC-S apresentou menor número de fibroblastos em comparação com o grupo SS-S. Tal achado corrobora com o estudo de Milanezi de Almeida *et al.* (2011), que evidenciou que a administração diária de nicotina influencia na proliferação de fibroblastos⁹.

Tendo em mente que a maturação das fibras colágenas é evidenciada pelo método de polarização com Picrosírius-red e que as fibras amarelo-esverdeadas são consideradas imaturas, desorganizadas e delgadas. E de modo contrário, as fibras amarelas avermelhadas são consideradas maduras, organizadas e espessas^{37,38}. Os achados do estudo a respeito da porcentagem de fibras verdes em maior porcentagem no grupo NIC-S em comparação ao grupo SS-S aos 28 dias na região interproximal distal, sugere um possível efeito deletério da nicotina nos fibroblastos e consequentemente da qualidade das fibras colágenas do tecido em questão.

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da suplementação sistêmica com Coenzima Q10 frente ao estresse oxidativo provocado pela nicotina, visto que a Coenzima Q10 está sendo amplamente estudada e utilizada como suplementação sistêmica em indivíduos em condições de saúde e bem como por indivíduos portadores de doenças sistêmicas³²⁻³⁴, pelo seu notório efeito antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio^{18,19}. A suplementação sistêmica com CQ10 demonstrou efeitos favoráveis tanto no grupo que não foi tratado sistemicamente pela nicotina (SS-Q10) e como no grupo que foi tratado sistemicamente com a nicotina (NIC-Q10), um achado importante que ressalta os efeitos favoráveis da CQ10 como observado na análise histopatológica aos 28 dias da região interproximal mesial aos 28 dias dos grupos SS-Q10 e NIC-Q10 que demonstram um tecido conjuntivo bem mais organizado, estruturado, com fibras colágenas espessas e com presença de mais capilares sanguíneos.

Além disso, pode-se observar maior número de fibroblastos nos grupos SS-Q10 em comparação ao grupo SS-S aos 7 e 28 dias na região interproximal mesial e distal. De modo interessante, vale ressaltar que na região interproximal mesial aos 28 dias pode-se observar maior número de fibroblastos no grupo NIC-Q10 em comparação aos grupos SS-S e NIC-S, sugerindo um possível efeito benéfico da CQ10 na proliferação dos fibroblastos em um periodonto com influência sistêmica da nicotina.

Por outro lado, apesar de não ser o objetivo principal do estudo, no método de polarização com Picrosírius-red pode-se observar maior evidência dos resultados, para as porcentagens de fibras amarelas avermelhadas, que são consideradas maduras, organizadas e espessas, no grupo SS-Q10, sugerindo possíveis questionamentos sobre a potencialização do efeito antioxidante em um indivíduo saudável. Vale ressaltar que o objetivo do trabalho em questão foi analisar um periodonto em condições de normalidade, ou seja, sem a instalação da doença periodontal experimental em ratos tratados sistemicamente ou não pela nicotina. Tais achados e questionamentos também geram possíveis perguntas para novos clínicos in vivo e clínicos sobre o efeito do tecido mais organizado e estruturado no desenvolvimento e progressão da doença periodontal.

Dentro das limitações do estudo, o efeito deletério da nicotina no periodonto foi confirmado e pode-se concluir que a Coenzima Q10 demonstrou um efeito positivo nas fibras colágenas periodontais e na quantificação dos fibroblastos tanto nos ratos tratados ou não pela nicotina. No entanto, mais estudos são necessários para afirmar seu efeito específico.

CONCLUSÃO

Dentro das limitações do estudo, o efeito deletério da nicotina no periodonto foi confirmado e pode-se concluir que a Coenzima Q10 demonstrou um efeito positivo nas fibras colágenas periodontais e na quantificação dos fibroblastos tanto nos ratos tratados ou não pela nicotina. No entanto, mais estudos são necessários para afirmar seu efeito específico.

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, 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):2224–2260.
4. Rivera-Hidalgo F. Smoking and periodontal disease. A review of the literature. *J Periodontol*. 1986 Oct;57(10):617-24.
5. Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EF. Systemic effects of smoking. *Chest*. 2007 May;131(5):1557-66.
6. Johannsen A, Susin C, Gustafsson A. Smoking and inflammation: evidence for a synergistic role in chronic disease. *Periodontol 2000*. 2014 Feb;64(1):111-26.doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00456.x.
7. Van Eeden SF, Hogg JC. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking. *Eur Respir J*. 2000 May;15(5):915-21.
8. Gerrard JW, Heiner DC, Ko CG, Mink J, Meyers A, Dosman JA. Immunoglobulin levels in smokers and non-smokers. *Ann Allergy*. 1980 May;44(5):261-2.
9. 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 Aug;82(8):1206-11. doi: 10.1902/jop.2010.100549.Epub 2010 Dec 28.
10. Tipton DA, Dabbous MK. Effects of nicotine on proliferation and extracellular matrix production of human gingival fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1995 Dec;66(12):1056-64.
11. Rothem DE, Rothem L, Dahan A, Eliakim R, Soudry M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. *Bone*. 2011 Apr 1;48(4):903-9. doi:10.1016/j.bone.2010.12.007. Epub 2010 Dec 17.
12. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):50-60.
13. Chapple IL, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000*. 2007;43:160-232.

14. 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 Aug;37(4):279-85.
15. Lallier TE, Moylan JT, Maturin E. Greater Sensitivity of Oral Fibroblasts to Smoked Versus Smokeless Tobacco. *J Periodontol.* 2017 Dec;88(12):1356-1365.
16. Yin L, Morita A, Tsuji T. Alterations of extracellular matrix induced by tobacco smoke extract. *Arch Dermatol Res.* 2000 Apr;292(4):188-94.
17. 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 (Warsz).* 2018;77(3):471-477.
18. Al-Hasso Shahla. Coenzyme Q10: a review. *Hosp Pharm.* 2000;35:51–55.
19. 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 Jun 1;42(11):1723-9. Epub 2007 Mar 15.
20. 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 Dec;71(13-14):1062-72.
21. Vittek J, Rappaport SC, Gordon GG, Munnangi PR, Southren AL. Concentration of circulating hormones and metabolism of androgens by human gingiva. *J Periodontol.* 1979 May;50(5):254-64.
22. 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.
23. 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 Apr;71(4):1456-60.
24. Gaby AR. Nutritional treatments for acute myocardial infarction. *Altern Med Rev.* 2010 Jul;15(2):113-23.
25. Office of the Surgeon General (US); Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2004.
26. Benowitz NL, Henningfield JE. Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. *N Engl J Med.* 1994 Jul 14;331(2):123-5.
27. Cent. Dis. Control Prev. 2002. Cigarette smoking among adults—United States;MMWR. 2000. p.637-660.

28. Steinberg MB, Schmelzer AC, Richardson DL, Foulds J. The case for treating tobacco dependence as a chronic disease. *Ann Intern Med.* 2008 Apr 1;148(7):554-6.
29. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2010 Jun 29;8(6):e1000412.
30. NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. 2010. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *J Physiol.* 588(pt 14) 2519–2521.
31. Okamoto M, Kita T, Okuda H, Tanaka T, Nakashima T. Effects of aging on acute toxicity of nicotine in rats. *Pharmacol Toxicol.* 1994 Jul;75(1):1-6.
32. Manthena 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 Aug;9(8):ZC26-8. doi:10.7860/JCDR/2015/13486.6291. Epub 2015 Aug 1.
33. 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.
34. Omid G, Karimi SA, Rezvani-Kamran A, Monsef A, Shahidi S, Komaki A. Effect of coenzyme Q10 supplementation on diabetes induced memory deficits in rats. *Metab Brain Dis.* 2019 Jun;34(3):833-840. doi: 10.1007/s11011-019-00402-7.
35. Junqueira LC, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.* 1979 Jul;11(4):447-55.
36. Rittié L. Method for Picrosirius Red-Polarization Detection of Collagen Fibers in Tissue Sections. *Methods Mol Biol.* 2017;1627:395-407. doi: 10.1007/978-1-4939-7113-8_26.
37. Junqueira LC, Montes GS, Sanchez EM. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. *Histochemistry.* 1982;74(1):153-6. doi: 10.1007/BF00495061.
38. de Oliveira PHC, Gomes Filho JE, Rodrigues MJDS, da Silva CC, Cardoso CDBM, Cosme daSilva L, Ervolino E, Cintra LTA. Influence of supplement administration of omega-3 on the subcutaneous tissue response of endodontic sealers in Wistar rats. *Int Endod J.* 2022 Oct;55(10):1026-1041.
39. Terayama AM, Benetti F, de Araújo Lopes JM, et al. Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. *Clin Oral Investig.* 2020

Nov;24(11):3911-3921. doi: 10.1007/s00784-020-03258-9.

ANEXO – 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 Julliano 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 DESTES 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 with nicotine", Protocol FOA nº 00302-2020, under the supervision of Julliano 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 Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-080 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br