

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 18/02/2025.



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

**HALEF DIEGO TURINI**

**Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia  
preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada  
ao uso de zoledronato**

**Araçatuba – SP  
2023**

**HALEF DIEGO TURINI**

**Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia  
preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada  
ao uso de zoledronato**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Edilson Ervolino

**Araçatuba – SP  
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Turini, Halef Diego.  
T938a Avaliação da suplementação com ômega-3 como  
terapia preventiva a ocorrência de osteonecrose dos  
maxilares  
associada ao uso de zoledronato / Halef Diego  
Turini. – Araçatuba, 2023  
60 f.: il.; tab., graf.

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

1. Periodontite 2. Osteonecrose 3. Difosfonatos I.T.

Black D6  
CDD 617.64

*A Deus, por ser tão bom e misericordioso para comigo. Muito obrigado Senhor, por estar sempre ao meu lado, me dando forças e coragem para os dias de luta. Somente Tu sabes das minhas dores existenciais e renúncias diárias. Sem Ti nada disso seria possível, por isso te louvo, agradeço e dou graças. Tu és o meu melhor amigo e confidente, o meu Bom Pastor. Muito obrigado por me acalantar nos momentos de tristeza. Devo a minha vida a Ti e vivo os Teus propósitos. Gratidão!*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, *Marina e Urubatã*, por sempre acreditarem em mim e viverem os meus sonhos. Sei que muitas vezes vocês deixaram os seus planos de lado, em prol dos meus. Vocês são os meus maiores exemplos de trabalho, amor, carinho, honestidade, sinceridade, companheirismo, meu Porto Seguro e melhores amigos. Não existem palavras que possam expressar a minha gratidão nesse momento. Essa conquista também é de vocês. Se algum dia eu a for metade do que vocês são, estarei feliz. Meus sinceros agradecimentos e amo vocês infinitamente. Muito, muito obrigado, de coração. Vocês são os melhores pais do mundo!

A minha querida irmã, *Beatriz*, na qual tenho uma conexão muito forte e indestrutível. Você foi um presente que a vida me deu. Muito obrigado pela amizade sincera, companheirismo e todo o amor. Minha amiga de todas as horas e confidente. Não existem palavras capazes de descrever o que sinto por você. Tenho muito orgulho e torço muito por você. Seja feliz! Amo você!

A minha avó, *Geni*, por todo o carinho e preocupação para comigo. Você é um exemplo de amor sincero. Minha segunda mãe, amiga e confidente. Obrigado pelos conselhos e por sempre me socorrer com prontidão, através de uma palavra de conforto. Nossa conexão é eterna. Amo você imensamente!

Ao meu avô, *Antônio (in memoriam)*, por todo amor e carinho. O senhor foi um exemplo de homem trabalhador, honesto, amoroso e brincalhão. Infelizmente não nos despedimos, mas tenho certeza de que estaremos juntos em breve. Cuide de mim aí de cima. Amo você!

Aos meus avós, *Hélio e Doraci*, por todo amor, carinho e hospitalidade. Vocês são incríveis e possuem uma energia contagiante. Amo vocês!

Aos meus tios, *Ana Keila e Evertom*, a minha segunda família. Vocês são pessoas especiais e iluminadas, que moram no meu coração. Exemplos de amor, carinho, alegria, companheirismo, trabalho e honestidade. Nossa conexão é intensa, de outras vidas, e sou grato por isso. Muito obrigado por sempre me receberem de braços abertos. Quando estou com vocês, me sinto em casa. Amo vocês!

A minha irmã de coração e alma, *Déborah*, você é especial e sabe disso. Nossa conexão é inexplicável. Muito obrigado por diversas vezes deixar as suas dores de lado para acolher as minhas. Minha melhor amiga e confidente. Você é um dos melhores presentes que a vida me deu. Não existem palavras capazes de descrever o que sinto por você. Exemplo de trabalho, honestidade, comprometimento, amor, empatia e alegria. O seu coração é gigante e você é o meu orgulho. Amo você infinitamente!

A minha prima e irmã de coração, *Victória*, por todo amor e carinho. Você é uma pessoa incrível e guerreira, que admiro imensamente. Obrigado por estar sempre ao meu lado, me ouvindo e aconselhando. Amo você!

Aos meus primos, *Maria Clara, Ângelo e Maria Eduarda*, por toda a torcida e energias positivas durante o meu trajeto. Amo vocês!

Aos meus tios, *Welitom, Sônia, Wiliam, Viviane, Ana Cláudia e Luiz*, pela torcida, amor e carinho. Vocês são especiais. Gratidão, amo vocês!

As minhas primas, *Nayra, Isabela, e Pamela*, pelas boas energias e vibrações. Vocês são pessoas singulares, na qual tenho um imenso carinho. Obrigado pela amizade sincera, amor e companheirismo. Amo vocês!

A minha amiga, *Karina*, pela amizade sincera, amor e companheirismo diário, mesmo que distante. Você foi um presente que a graduação me deu e sou muito feliz por tê-la em minha vida. Obrigado pelos conselhos, por sempre me ouvir, pelas risadas e por sua alegria contagiante. Muito obrigado! Amo você!

Aos meus amigos, *Natan, Karine, Nicolly e Debora*, companheiros de Residência e presentes que a vida me deu. Sou muito grato e feliz por tê-los comigo. Obrigado por toda a energia positiva, amizade sincera e companheirismo. Vocês são incríveis! Amo vocês!

Aos meus professores, *Maria Beatriz Bergonse Pereira Pedriali, Fernanda Akemi Nakanishi Ito, Luciana Prado Maia Andraus, Alberto João Zortéa, Evelise Ono, Jefferson Tanaka, Cecília Luiz Pereira Stábile, Eloisa Helena Aranda Garcia de Souza e Elisa Emi Tanaka Carloto*. Vocês são excepcionais,

minhas inspirações diárias. Exemplos de docentes comprometidos com o ensino. Obrigado por todo o conhecimento transmitido. Admiro vocês!

A minha querida professora e amiga, *Priscila Paganini Costa Tiozzi*, pelo aceite em compor a banca avaliadora do meu Mestrado, e não somente por isso... Professora você é um exemplo de docente, possui uma didática incrível e um coração enorme. Muito obrigado por me acompanhar desde o terceiro ano da graduação, bem como, durante a minha Residência em Periodontia. Agradeço por todos os seus ensinamentos e conselhos, você é uma de minhas inspirações diárias. Gratidão! Admiro você imensamente!

A minha eterna casa, *Universidade Estadual de Londrina – UEL e a Clínica Odontológica Universitária - COU*, por me receberem de braços abertos, onde pude adquirir todo o meu conhecimento profissional e evoluir como ser humano. Gratidão por todas as oportunidades. Vocês moram no meu coração!

A minha segunda casa, *Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA*, pelo acolhimento, oportunidades e subsídios para a realização da minha pós-graduação. Carrego você em meu coração!

Ao meu orientador, *Prof. Juliano Milanezi de Almeida*, por me receber em sua equipe e em seu laboratório de braços abertos, além de todo o conhecimento transmitido. Professor, o senhor é um docente incrível, com uma didática singular. Sempre preocupado com os seus alunos. Muito obrigado por toda a orientação e paciência para comigo durante a minha pós-graduação. Se todos os professores fossem como o senhor, o mundo acadêmico seria muito melhor. Você possui a minha admiração e é uma de minhas inspirações. Muito obrigado pela oportunidade única. Sem o senhor não teria conseguido. Gratidão!

Ao meu co-orientador, *Prof. Edilson Ervolino*, por me receber em sua sala e em seu laboratório de forma única. O senhor nasceu para a docência, possui uma didática maravilhosa. Muito obrigado pela paciência, pela prontidão em me atender, por acolher e me ajudar com os processos laboratoriais, com análise dos resultados e por sempre me estender a mão nos momentos de dificuldade. Você é realmente incrível e admiro o senhor grandemente. Você é uma de minhas inspirações diárias. Gratidão!

Ao professor, *Francisley Ávila Souza*, por deixar os seus afazeres de lado para contribuir com a minha formação, através do meu Exame Geral de Qualificação (EGQ) e da minha defesa do Mestrado. Professor, muito obrigado pelo acolhimento singular e pela prontidão de sempre. O senhor possui a minha admiração. Gratidão!

As professoras, *Daniela Ponzoni, Roberta Okamoto e Mariza Akemi Matsumoto* pela prontidão em me acolher, deixando os seus afazeres de lado, para contribuir com a minha formação, seja através do meu Exame Geral de Qualificação (EGQ) ou da minha defesa. Vocês possuem a minha admiração. Muito obrigado!

Ao meu amigo, *Otávio Augusto Pacheco Vitória*, companheiro de todas as horas durante a minha pós-graduação. Você é uma pessoa de personalidade singular, que admiro muito. Agradeço por toda a ajuda e prontidão. Você foi essencial na minha formação e em todos os processos realizados. Muito obrigado! Amo você!

A minha amiga, *Bianca Rafaeli Piovezan*, companheira de todas as horas e minha “tutora”. Agradeço a amizade sincera e todo o carinho para comigo. Tenho enorme admiração por você. Muito obrigado por toda ajuda e todos os conselhos. Dona do melhor brownie e bolo de cenoura. Com você o meu trajeto se tornou mais leve e agradável. Gratidão! Amo você!

A *Elisa Mara de Abreu Furquim*, por me acolher antes mesmo do início do meu Mestrado. Muito obrigado por toda a ajuda e colaboração. Seja feliz! Admiro você!

A minha amiga, *Giovanna Fortunato*, minha companheira. Agradeço imensamente pela sua amizade sincera e todo o carinho para comigo. Você é um presente que a FOA/UNESP me deu. A sua companhia e a sua ajuda foram fundamentais durante a minha pós-graduação. Você tem uma luz, uma energia e um coração incrível. Amo você!

A minha amiga, *Gabriela Carrara Simionato e família*, que me acolheram com tanto carinho no Natal de 2021. Gabi, você é incrível, empática, tem uma energia tremenda e um coração do tamanho do mundo. Agradeço imensamente a sua amizade, a sua companhia e toda a ajuda durante o meu Mestrado. Você mora no meu coração e torço muito por ti. Amo você!

Aos demais colegas de equipe, *Henrique Rinaldi Matheus e Luiz Guilherme Fiorin*, por toda ajuda e prontidão. Muito obrigado!

A todos *os alunos de iniciação científica ou não do Departamento de Periodontia e aos alunos da graduação*. Muito obrigado por contribuírem com a minha formação, por acreditarem em mim, pela colaboração e ajuda durante as etapas do meu projeto de pesquisa. Vocês foram fundamentais e não teria conseguido sem vocês.

A todos os *técnicos-administrativos* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA, vocês foram fundamentais e, sem vocês, não teria conseguido.

Por fim, agradeço a *todos* que participaram da minha caminhada de forma direta ou indireta. Muito obrigado!

*O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001. Gratidão!*

***Muito obrigado!***

*“É preciso força pra sonhar e perceber que a estrada vai além do que se vê”.*

*(Los Hermanos)*

Turini HD. Avaliação da suplementação com ômega-3 como terapia preventiva a ocorrência de osteonecrose dos maxilares associada ao uso de zoledronato [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

## RESUMO

Foi feita a seleção de 60 ratas ovariectomizadas que foram distribuídas seguindo uma tabela gerada por um programa computacional. Consistiu em apenas 01 grupo, com periodontite experimental induzida (PE) (n=60), subdividido em 04 subgrupos que receberam: Grupo Veículo (VEI) (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Zoledronato (ZOL) (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a administração de VEI via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da administração de VEI via gavagem gástrica. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Ômega-3 (VEI/ $\omega$ 3) (n=15): quatro semanas após início da administração de VEI via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Grupo Zoledronato/ $\omega$ 3 (ZOL/ $\omega$ 3) (n=15): quatro semanas após início da terapia com ZOL via intraperitoneal, os animais tiveram a PE induzida no primeiro molar inferior esquerdo. Quatorze dias após indução, foi iniciada a suplementação com  $\omega$ 3 via gavagem gástrica (diária). A exodontia foi realizada 01 dia após início da suplementação com  $\omega$ 3. A eutanásia ocorreu no 35º dia após a exodontia. Todas as aplicações de ZOL foram feitas com um intervalo de três dias, entretanto, a suplementação de  $\omega$ 3 ou VEI foram diárias, durante dez semanas e 36 dias respectivamente. Após 35 dias da exodontia, os animais foram submetidos a eutanásia pela administração de dose letal de tiopental (150 mg/kg). As mandíbulas coletadas foram divididas em duas partes e processadas de acordo com as análises propostas. As hemimandíbulas esquerdas foram utilizadas para processamento histológico para as análises histométrica, onde foi avaliado a porcentagem de tecido ósseo vital neoformado e a porcentagem de tecido ósseo não-vital. Análises imunoistoquímicas dos biomarcadores na região de alvéolo dentário (TRAP, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ,

entre outros) foram realizados. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística ( $p < 0,05$ ) em programa computacional especializado (Bioestat® 5.0). A suplementação com  $\omega 3$  parece ser benéfica frente a osteonecrose dos maxilares associada ao uso de ZOL, diminuindo a severidade dessa condição.

**Palavras-chave:** Periodontite. Osteonecrose. Difosfonatos.

Turini HD. Evaluation of supplementation with omega-3 as a preventive therapy for the occurrence of osteonecrosis of the jaws associated with the use of zoledronate [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia; 2023.

## **ABSTRACT**

A selection of 60 ovariectomized rats was selected and distributed according to a table generated by a computer program. It consists of only 01 group, with experimentally induced periodontitis (EP) (n=60), subdivided into 04 subgroups that received: Vehicle Group (VEI) (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal administration of VEI, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, administration of VEI via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the beginning of the administration of VEI via gastric gavage. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Zoledronate (ZOL) group (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal ZOL therapy, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, administration of VEI via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the beginning of the administration of VEI via gastric gavage. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Omega-3 group (VEI/ $\omega$ 3) (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal administration of VEI, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, supplementation with  $\omega$ 3 via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the start of supplementation. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. Zoledronate/omega-3 (ZOL/ $\omega$ 3) group (n=15): four weeks after the start of intraperitoneal ZOL therapy, the animals had PE induced in the lower left first molar. Fourteen days after induction, supplementation with  $\omega$ 3 via gastric gavage (daily) was initiated. The extraction was performed 01 day after the start of supplementation with  $\omega$ 3. Euthanasia occurred on the 35th day after tooth extraction. All ZOL applications were performed with an interval of three days, however,  $\omega$ 3 or VEI supplementation were daily, for ten weeks and 36 days respectively. After 35 days of extraction, the animals were euthanized with the administration of a lethal dose of thiopental (150 mg/kg). The collected mandibles were divided into two parts and processed according to the proposed analyses. The left hemimandibles were used for histological processing for histometric analysis, where the percentage of newly formed vital bone tissue and the percentage of non-vital bone tissue were evaluated. Immunohistochemical analyzes of biomarkers in the tooth socket region (TRAP, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , among others) were performed. The data obtained were submitted to statistical analysis ( $p < 0.05$ ) in a

specialized computer program (Bioestat® 5.0). Supplementation with  $\omega 3$  appears to be beneficial in the face of osteonecrosis of the jaws associated with the use of ZOL, reducing the severity of this condition.

**Keywords:** Periodontitis. Osteonecrosis. Diphosphonates.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Esquema ilustrando o delineamento experimental durante todo o período de execução da pesquisa 22
- Figura 02 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 28
- Figura 03 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 29
- Figura 04 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de OCN no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 30
- Figura 05 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de VEGF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 31
- Figura 06 – Gráfico evidenciando o padrão de imunomarcção de TRAP no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Análise de Variância de Kruskal-Wallis e pós-teste de Student-Newman-Keuls 32
- Figura 07 – Gráfico evidenciando a porcentagem de TONF no sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey 33
- Figura 08 – Gráfico evidenciando a porcentagem de TONV nas adjacências do sítio de extração dental nos grupos VEI, ZOL, VEI/ $\omega$ 3 e ZOL/ $\omega$ 3. Teste estatístico: Teste de Normalidade de Shapiro-Wilk; Análise de Variância (ANOVA); Pós-teste de Tukey 34
- Figura 09 – Imunomarcção de TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TNF- $\alpha$  no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 35
- Figura 10 – Imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para IL-1 $\beta$  no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 36

- Figura 11 – Imunomarcção para OCN no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para OCN no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 38
- Figura 12 – Imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para VEGF no sítio de extração dental 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 30 $\mu$ m 39
- Figura 13 – Imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando o padrão de imunomarcção para TRAP no sítio de extração dental 25 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. 1000x. 15 $\mu$ m 40
- Figura 14 – Aspecto histológico do interior do sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do(s) tecido(s) que preenche(m) o interior dos alvéolos dentais aos 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI- $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. 200x. 100 $\mu$ m 42
- Figura 15 – Aspecto histológico do tecido ósseo imediatamente adjacente ao sítio de extração dental aos 35 dias pós-operatório. (a – d) Fotomicrografias mostrando as características histológicas do tecido ósseo nas imediações do alvéolo dental aos 35 dias pós-operatório em VEI (a), ZOL (b), VEI/ $\omega$ 3 (c) e ZOL/ $\omega$ 3 (d). Coloração: HE. 200x. 100 $\mu$ m 43

## LISTA DE SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
ALA	Ácido alfa-linolênico
ARRIVE	<i>Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments</i>
AT	Área total
BP	Bisfosfonato(s)
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
DAB	Tetracloridrato de diaminobenzidina
DHA	Ácido docosa-hexaenóico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPA	Ácido eicosapentaenóico
g	Gramas
GL	Gay Lussac
HE	Hematoxilina e eosina
HRP	Estreptavidina conjugada com a peroxidase endógena
IL-1 $\beta$	Interleucina um beta
IR	Imunomarcção
JAK/STAT	Transdutor de sinal tirosina quinase janus e ativador de transcrição
kg	Quilo
LCn3PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ( $\omega$ 3)
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno(s)
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MaR	Maresina(s)
MaR1 e MaR2	Maresina 1 e 2
MCTR1, MCTR2 e MCTR3	Conjugados de maresinas para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
mg	Miligrama
ml	Mililitros
NF-k $\beta$	Fator nuclear kappa beta
OCN	Osteocalcina

OMS	Organização mundial da saúde
ONM	Osteonecrose dos maxilares
ONM-BPs	Osteonecrose dos maxilares associada a terapia com bifosfonatos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCTR1, PCTR2 e PCTR3	Conjugados de protectinas para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
PE	Periodontite experimental
PG	Prostaglandina(s)
PGE2/PGE3/PGE5	Prostaglandina E2, E3 e E5
pH	Potencial de hidrogênio
PLA2	Fosfolipase A2
PTC/PD1/PDX	Protectina, subtipo D1 e subtipo DX
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa
RANK/RANKL/OPG	Sistema receptor ativador do fator nuclear kappa ligante a osteoprotegerina
Rv	Resolvina(s)
RvD1 – D6/ RvE1 – E3	Resolvinas grupo D1 – D6 e resolvinas grupo E1 – E3
RvTR1, RvTR2 e RvTR3	Conjugados de resolvina para a regeneração de tecidos 1, 2 e 3
TMH	Terapia modulatória do hospedeiro
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TONF	Porcentagem de tecido ósseo vital neoformado
TONV	Porcentagem de tecido ósseo não-vital
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
TX	Tramboxano(s)
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEI	Veículo
ZOL	Zoledronato
$\mu\text{m}$	Micrômetro
$\omega\text{3}$	Ômega-3

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1 Animais	21
2.2 Cálculo amostral	21
2.3 Grupos e períodos experimentais	21
2.4 Delineamento experimental	22
2.5 Sedação e anestesia	22
2.6 Ovariectomia	23
2.7 Verificação do ciclo estral	23
2.8 Protocolo de administração de ZOL ou VEI	23
2.9 Indução da PE	24
2.10 Protocolo de administração de $\omega 3$ ou VEI	24
2.11 Exodontia	24
2.12 Eutanásia e coleta das amostras	24
2.13 Processamento tecidual	25
2.14 Colorações	25
2.15 Processamento imunoistoquímico	25
2.16 Análise dos resultados	26
2.17 Análise histométrica de TONF e TONV	26
2.18 Análise imunoistoquímica	26
2.19 Análise estatística	27
3 RESULTADOS	28
3.1 TNF- $\alpha$ no sítio de extração dental	28
3.2 IL-1 $\beta$ no sítio de extração dental	29
3.3 ONC no sítio de extração dental	30
3.4 VEGF no sítio de extração dental	31
3.5 TRAP no sítio de extração dental	32
3.6 Porcentagem de TONF no sítio de extração dental	33
3.7 Porcentagem de TONV nas adjacências sítio de extração dental	33
4 DISCUSSÃO	45
5 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50



## 1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BPs) são uma classe de drogas utilizadas em uma gama ampla de especialidades da área da saúde como a oncologia, ortopedia e a odontologia. Normalmente são prescritos para o tratamento de doenças como osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, mieloma múltiplo, ou para controle da progressão de metástases ósseas, hipercalcemia e dor óssea em neoplasias malignas osteotrópicas, tais como tumores de mama, próstata, pulmão e rim (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008).

O zoledronato (ZOL) têm emergido e esse fármaco altera o metabolismo ósseo atuando pela inibição da via do mevalonato, através de sua interação e consequente inativação da enzima farnesil difosfato sintase (DUNFORD *et al.*, 2001). Dessa forma, não há a formação de farnesil difosfato e geranyl difosfato, sendo essenciais para prenilação de proteínas denominadas Ras, Rho e Rac, que atualmente são tidas como os alvos do efeito dessa classe de BPs (LUCKMAN *et al.*, 1998).

Essas proteínas estão relacionadas com a inibição da osteoclastogênese (ABE *et al.*, 2012), com a indução de apoptose prematura em osteoclastos ativos, especialmente com significativas alterações na dinâmica do citoesqueleto dessas células, impossibilitando a formação da zona clara e da zona pregueada nos osteoclastos, as quais são essenciais para a interação da célula com a matriz óssea e para a formação do microambiente propício para o início da atividade reabsortiva (COXON; ROGERS, 2003; ORY *et al.*, 2008). A reação adversa ocasionada pelo uso dos BPs, com destaque na odontologia, é a osteonecrose dos maxilares associada a terapia com BPs (ONM-BPs) (OTTO *et al.*, 2011).

A ONM-BPs é definida como a presença de osso exposto na região maxilofacial por um período maior que oito semanas, em pacientes que faziam ou fazem uso de BPs e que não possuíam/possuem história prévia de radioterapia nos maxilares. Em pacientes que fazem uso do ZOL pela via intravenosa, ou sua associação com outros BPs, prescritos para complementação da terapia oncológica, a incidência da ONM-BPs atinge de 01 a 12% dos pacientes e, como os BPs têm efeito cumulativo, essa incidência pode atingir 21% dos pacientes após o terceiro ano de uso desse tipo de fármaco (GÓMEZ FONT; MARTÍNEZ GARCÍA; OLMOS MARTÍNEZ, 2008).

A ONM-BPs acomete com maior frequência o gênero feminino (73%), com idade avançada (em média 66 anos e uma variação entre 42 e 90 anos de idade – pós menopausa),

que fazem ou fizeram uso crônico de BPs administrados pela via intravenosa (96,8%), especificamente o ZOL (47,6%) ou este em associação com outros BPs (24,6%). Há uma predileção pela ocorrência na mandíbula, especificamente na região dos pré-molares e molares (70,6%). A extração dentária ou a combinação de exodontia com procedimentos endodônticos ou periodontais (63,6%) estão entre os potentes fatores desencadeantes da ONM-BPs (OTTO *et al.*, 2011).

Os possíveis fatores etiopatológicos que atualmente são apontados como os desencadeantes da ONM-BPs são: a potente supressão da atividade reabsortiva dos osteoclastos; o efeito citotóxico dos BPs sobre as células dos tecidos que compõem a mucosa bucal; o potente efeito antiangiogênico dos BPs; e o favorecimento a infecção induzida pelos BPs (ALLEN; BURR, 2009; MIGLIORATI *et al.*, 2011; SHANNON *et al.*, 2011; SIDDIQI; PAYNE; ZAFAR, 2009). Estudos clínicos têm mostrado que a exodontia de dentes com comprometimento periodontal e/ou periapical é o principal fator de risco local para a ONM-BPs (KANG *et al.*, 2013; RUGGIERO *et al.*, 2014).

O tratamento da ONM-BPs tem sido efetuado por diferentes abordagens: estadiamento clínico da doença, compreendendo desde bochechos com digluconato de clorexidina 0,12%, antibioticoterapia, até desbridamento cirúrgico da lesão, que em alguns casos pode consistir em mandibulectomia ou maxilectomia parcial (BAGAN *et al.*, 2006; BERENSON *et al.*, 1998; PIRES *et al.*, 2005; WOO; HELLSTEIN; KALMAR, 2006).

A terapia modulatória do hospedeiro (TMH) consiste na utilização de medicamentos sistêmicos ou locais como adjuntos a terapia convencional. A TMH tem por objetivo diminuir a inflamação e a destruição tecidual, favorecendo a saúde e a possível regeneração. Uma opção de TMH é a utilização sistêmica de óleos de peixes. Os óleos de peixes são ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs), em especial o  $\omega 3$  (LCn3PUFAs). O  $\omega 3$  é constituído pelos ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosa-hexaenóico (DHA) e alfa-linolênico (ALA) (BHATAVADEKAR; WILLIAMS, 2009; SALVI; LANG, 2005; WILLIAMS, 2008).

O EPA e DHA merecem destaque e são sintetizados em quantidades mínimas pelo organismo humano, sendo a sua suplementação dietética extremamente importante. Alimentos como o salmão, a cavala e frutos do mar são fontes ricas em EPA e DHA (CALDER, 2009; DAWSON *et al.*, 2014; MEYER *et al.*, 2003; YATES; CALDER; ED RAINGER, 2014). O EPA e o DHA apresentam ação anti-inflamatória para diversas doenças. Em ratos, o  $\omega 3$

demonstrou diminuir significativamente os osteoclastos e sua atividade osteoclástica, relacionada a reabsorção óssea alveolar. O  $\omega 3$  age nos fosfolipídios de membrana inibindo a enzima fosfolipase A2 (PLA2), comprometendo a síntese de ácido araquidônico (AA) disponível para as vias ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX), reduzindo dessa forma, os seus produtos pró-inflamação como o leucotrieno B4 (LTB4) e a prostaglandina E2 (PGE2) (BAGGA *et al.*, 2003; CALDER, 2006; KELLEY *et al.*, 1998; PETERSON *et al.*, 1998; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

Além disso, o  $\omega 3$  sintetiza mediadores lipídicos pró-resolução como as resolvinas, lipoxinas, maresinas, protectinas, conjugados de resolvina, conjugados de protectinas e conjugados de maresinas. Estudos apontam que o  $\omega 3$  também compete pelo substrato das vias LOX e COX, inibindo a síntese de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , PGE2 e LTB4, ou seja, moléculas que favorecem a inflamação, além de comprometer vias de sinalização celular como o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$ ), a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), o transdutor de sinal tirosina quinase janus e ativador de transcrição (JAK/STAT) e o sistema receptor ativador do fator nuclear kappa ligante a osteoprotegerina (RANK/RANKL/OPG) (BAGGA *et al.*, 2003; CALDER, 2006; KELLEY *et al.*, 1998; PETERSON *et al.*, 1998; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998).

O  $\omega 3$  circulante é capaz de inibir a diferenciação, ativação e função dos osteoclastos, o que acontece devido ao baixo nível de RANKL disponível, derivado da baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias. O RANKL em quantidades pequenas é impedido de se ligar ao seu receptor RANK pela ação da OPG, não havendo ativação do NF- $\kappa\beta$  e de outras vias de sinalização celular como o MAPK e o JAK/STAT. Com isso, os pré-osteoclastos não se diferenciam em osteoclastos ativos e a reabsorção óssea alveolar fica comprometida (RAHMAN; BHATTACHARYA; FERNANDES, 2008; SUN *et al.*, 2003).

Dentro do contexto da ONM-BPs, não apenas a resposta do hospedeiro pode ser um fator significativo. A presença de micro-organismos é um fator crítico para o desencadeamento da ONM-BPs (BOFF *et al.*, 2014). Recentemente, Ribeiro-Vidal *et al.*, (2020) observou que tanto o DHA quanto o EPA têm atividade antimicrobiana significativa contra as seis espécies bacterianas incluídas no seu modelo para estudo do biofilme. Sendo assim, além da modulação positiva das moléculas chaves relacionadas com a ONM-BPs (mencionadas acima), o  $\omega 3$  tem potencial para atuar reduzindo os patógenos presentes no sítio da extração dentária. Estas características podem ser vislumbradas como potenciais para

atingir equilíbrio molecular e homeostase durante o processo de reparação alveolar, prevenindo a ocorrência de ONM-BPs (RIBEIRO-VIDAL *et al.*, 2020). O propósito do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com o  $\omega$ 3 na prevenção de ONM associada ao uso do ZOL.

## **5 CONCLUSÃO**

A suplementação com  $\omega 3$ , via gavagem gástrica, não preveniu a ocorrência da ONM-BPs. Entretanto, reduziu a expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e área total de TONV, diminuindo assim, severidade dessa condição. Contudo, a suplementação com  $\omega 3$  parece ser benéfica para os pacientes que utilizam o ZOL.

## REFERÊNCIAS

1. Abe K, Yoshimura Y, Deyama Y, Kikuri T, Hasegawa T, Tei K, et al. Effects of bisphosphonates on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med.* 2012;29(6):1007-15. doi: 10.3892/ijmm.2012.952.
2. Allen MR, Burr DB. The pathogenesis of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: so many hypotheses, so few data. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5 Suppl):61-70. doi: 10.1016/j.joms.2009.01.007.
3. Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol.* 2008;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103.
4. Azuma MM, Cardoso CBM, Samuel RO, Pipa CB, Bomfim SRM, Narciso LG, et al. Omega-3 fatty acids alter systemic inflammatory mediators caused by apical periodontitis. *J Endod.* 2021;47(2):272-7. doi: 10.1016/j.joen.2020.11.015.
5. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Hernandez S, Poveda R, Sanchis JM, et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. *Oral Oncol.* 2006;42(3):327-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2005.08.001.
6. Bagga D, Wang L, Farias-Eisner R, Glaspy JA, Reddy ST. Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(4):1751-6. doi: 10.1073/pnas.0334211100.
7. Bannenberg G, Serhan CN. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(12):1260-73. doi: 10.1016/j.bbailip.2010.08.002.
8. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, et al. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *J Clin Oncol.* 1998;16(2):593-602. doi: 10.1200/JCO.1998.16.2.593.
9. Bhatavadekar NB, Williams RC. New directions in host modulation for the management of periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 2009;36(2):124-6. doi: 10.1111/j.1600-051X.2008.01354.x.

10. Bhattacharya A, Rahman M, Sun D, Fernandes G. Effect of fish oil on bone mineral density in aging C57BL/6 female mice. *J Nutr Biochem*. 2007;18(6):372-9. doi: 10.1016/j.jnutbio.2006.07.002.
11. Boff RC, Salum FG, Figueiredo MA, Cherubini K. Important aspects regarding the role of microorganisms in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws. *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):790-9. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.002.
12. Browning LM, Walker CG, Mander AP, West AL, Madden J, Gambell JM, et al. Incorporation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids into lipid pools when given as supplements providing doses equivalent to typical intakes of oily fish. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(4):748-58. doi: 10.3945/ajcn.112.041343.
13. Calder PC. Eicosanoids. *Essays Biochem*. 2020;64(3):423-41. doi: 10.1042/EBC20190083.
14. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):469-84. doi: 10.1016/j.bbaliip.2014.08.010.
15. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(6 Suppl):1505S-1519S. doi: 10.1093/ajcn/83.6.1505S.
16. Calder PC. n-3 PUFA and inflammation: from membrane to nucleus and from bench to bedside. *Proc Nutr Soc*. 2020:1-13. doi: 10.1017/S0029665120007077.
17. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie*. 2009;91(6):791-5. doi: 10.1016/j.biochi.2009.01.008.
18. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017;9(6):7204-18. doi: 10.18632/oncotarget.23208.
19. Christie WW, Harwood JL. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays Biochem*. 2020;64(3):401-21. doi: 10.1042/EBC20190082.
20. Coxon FP, Rogers MJ. The role of prenylated small GTP-binding proteins in the regulation of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(1):80-4. doi: 10.1007/s00223-002-2017-2.
21. Dawson DR 3rd, Branch-Mays G, Gonzalez OA, Ebersole JL. Dietary modulation of the inflammatory cascade. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):161-97. doi: 10.1111/j.1600-0757.2012.00458.x.

22. Drake MT, Clarke BL, Khosla S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(9):1032-45. doi: 10.4065/83.9.1032.
23. Dunford JE, Thompson K, Coxon FP, Luckman SP, Hahn FM, Poulter CD, et al. Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;296(2):235-42.
24. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, et al. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone.* 2019; 120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014.
25. Gusman DJR, Ervolino E, Theodoro LH, Garcia VG, Nagata MJH, Alves BES, et al. Antineoplastic agents exacerbate periodontal inflammation and aggravate experimental periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2019;46(4):457-69. doi: 10.1111/jcpe.13101.
26. Healy DA, Wallace FA, Miles EA, Calder PC, Newsholm P. Effect of low-to-moderate amounts of dietary fish oil on neutrophil lipid composition and function. *Lipids.* 2000;35(7):763-8. doi: 10.1007/s11745-000-0583-1.
27. nHong S, Gronert K, Devchand PR, Moussignac RL, Serhan CN. Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells. Autacoids in anti-inflammation. *J Biol Chem.* 2003;278(17):14677-87. doi: 10.1074/jbc.M300218200.
28. Isobe Y, Arita M. Identification of novel omega-3 fatty acid-derived bioactive metabolites based on a targeted lipidomics approach. *J Clin Biochem Nutr.* 2014;55(2):79-84. doi: 10.3164/jcbn.14-18.
29. Johnson IH. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J Periodontal Res.* 1975;10(6):332-45. doi: 10.1111/j.1600-0765.1975.tb00042.x.
30. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, et al. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res.* 2013;28(7):1631-40. doi: 10.1002/jbmr.1894.
31. Kang JX. Fat-1 transgenic mice: a new model for omega-3 research. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2007;77(5-6):263-7. doi: 10.1016/j.plefa.2007.10.010.

32. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Mackey BE. Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids*. 1998;33(2):125-30. doi: 10.1007/s11745-998-0187-9.
33. 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. doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
34. Krishnamoorthy N, Abdunour RE, Walker KH, Engstrom BD, Levy BD. Specialized Proresolving Mediators in Innate and Adaptive Immune Responses in Airway Diseases. *Physiol Rev.*;98(3):1335-70. doi: 10.1152/physrev.00026.2017.
35. Luckman SP, Hughes DE, Coxon FP, Graham R, Russell G, Rogers MJ. Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit the mevalonate pathway and prevent post-translational prenylation of GTP-binding proteins, including Ras. *J Bone Miner Res*. 1998;13(4):581-9. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.4.581.
36. Luize DS, Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM. Influence of ovariectomy on healing of autogenous bone block grafts in the mandible: a histomorphometric study in an aged rat model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2008;23(2):207-14.
37. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol*. 2002;62(4A):609-14. doi: 10.1590/s1519-69842002000400008.
38. Martelli SJR, Damian MF, Gomes APN, Schinestsck AR, Silva AER, Vasconcelos ACU. Comparison of effects of zoledronic acid and clodronate on the bone structure: imaginological and histomorphometrical study in vivo. *J Oral Pathol Med*. 2017;46(8):632-636. doi: 10.1111/jop.12546.
39. Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR. Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 2003;38(4):391-8. doi: 10.1007/s11745-003-1074-0.
40. Migliorati CA, Epstein JB, Abt E, Berenson JR. Osteonecrosis of the jaw and bisphosphonates in cancer: a narrative review. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(1):34-42. doi: 10.1038/nrendo.2010.195.
41. Nakanishi A, Iitsuka N, Tsukamoto I. Fish oil suppresses bone resorption by inhibiting osteoclastogenesis through decreased expression of M-CSF, PU.1, MITF and RANK in ovariectomized rats. *Mol Med Rep*. 2013;7(6):1896-903. doi: 10.3892/mmr.2013.1446.

42. Ory S, Brazier H, Pawlak G, Blangy A. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *Eur J Cell Biol.* 2008;87(8-9):469-77. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.03.002.
43. Otto S, Sotlar K, Ehrenfeld M, Pautke C. Osteonecrosis of the jaw as a possible rare side effect of annual bisphosphonate administration for osteoporosis: a case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5:477. doi: 10.1186/1752-1947-5-477.
44. Peterson LD, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids.* 1998;33(2):171-80. doi: 10.1007/s11745-998-0193-y.
45. Pires FR, Miranda A, Cardoso ES, Cardoso AS, Fregnani ER, Pereira CM, et al. Oral avascular bone necrosis associated with chemotherapy and bisphosphonate therapy. *Oral Dis.* 2005;11(6):365-9. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01130.x.
46. Rahman MM, Bhattacharya A, Fernandes G. Docosahexaenoic acid is more potent inhibitor of osteoclast differentiation in RAW 264.7 cells than eicosapentaenoic acid. *J Cell Physiol.* 2008;214(1):201-9. doi: 10.1002/jcp.21188.
47. Rees D, Miles EA, Banerjee T, Wells SJ, Roynette CE, Wahle KW, et al. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. *Am J Clin Nutr.* 2006;83(2):331-42. doi: 10.1093/ajcn/83.2.331.
48. Ribeiro-Vidal H, Sánchez MC, Alonso-Español A, Figuero E, Ciudad MJ, Collado L, et al. Antimicrobial activity of EPA and DHA against oral pathogenic bacteria using an in vitro multi-species subgingival biofilm model. *Nutrients.* 2020;12(9):2812. doi: 10.3390/nu12092812.
49. Sakaguchi K, Morita I, Murota S. Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 1994;50(2):81-4. doi: 10.1016/0952-3278(94)90151-1.
50. Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol.* 2005;32 Suppl 6:108-29. doi: 10.1111/j.1600-051X.2005.00785. x.
51. Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res.* 2008;47(2):147-55. doi: 10.1016/j.plipres.2007.12.004.

52. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):349-61. doi: 10.1038/nri2294.
53. Serhan CN, Chiang N. Resolution phase lipid mediators of inflammation: agonists of resolution. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13(4):632-40. doi: 10.1016/j.coph.2013.05.012.
54. Serhan CN, Levy BD. Resolvins in inflammation: emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *J Clin Invest*. 2018;128(7):2657-69. doi: 10.1172/JCI97943.
55. Serhan CN. Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology. *Mol Aspects Med*. 2017; 58:1-11. doi: 10.1016/j.mam.2017.03.001.
56. Shannon J, Shannon J, Modelevsky S, Grippo AA. Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw. *J Am Geriatr Soc*. 2011;59(12):2350-5. doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03713.x.
57. Siddiqi A, Payne AG, Zafar S. Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a medical enigma? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Sep;108(3): e1-8. doi: 10.1016/j.tripleo.2009.04.027.
58. Silva PG, Ferreira Junior AE, Teófilo CR, Barbosa MC, Lima Júnior RC, Sousa FB, et al. Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Arch Oral Biol*. 2015;60(9):1237-45. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.05.015.
59. Sun D, Krishnan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*. 2003;18(7):1206-16. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.7.1206.
60. Terano T, Salmon JA, Moncada S. Effect of orally administered eicosapentaenoic acid (EPA) on the formation of leukotriene B<sub>4</sub> and leukotriene B<sub>5</sub> by rat leukocytes. *Biochem Pharmacol*. 1984;33(19):3071-6. doi: 10.1016/0006-2952(84)90611-7.
61. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998; 38:97-120. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.
62. Wada M, DeLong CJ, Hong YH, Rieke CJ, Song I, Sidhu RS, et al. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *J Biol Chem*. 2007;282(31):22254-66. doi: 10.1074/jbc.M703169200.

63. Walker CG, West AL, Browning LM, Madden J, Gambell JM, Jebb SA, et al. The pattern of fatty acids displaced by EPA and DHA following 12 months supplementation varies between blood cell and plasma fractions. *Nutrients*. 2015;7(8):6281-93. doi: 10.3390/nu7085285.
64. Williams RC. Host modulation for the treatment of periodontal disease. *Compend Contin Educ Dent*. 2008;29(3):160-8.
65. Woo SB, Hellstein JW, Kalmar JR. Narrative [corrected] review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):753-61. doi: 10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00009.
66. Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest*. 2000;30(3):260-74. doi: 10.1046/j.1365-2362.2000.00623.x.
67. Yates CM, Calder PC, Ed Rainger G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacol Ther*. 2014;141(3):272-82. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.10.010.