



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

RODRIGO RIBEIRO DE CAMARGO

**Avaliação da resposta inflamatória local em ratos fumantes
passivos com periodontite apical submetidos a terapia
adjuvante sistêmica de Ômega-3**

**Araçatuba – SP
2024**

RODRIGO RIBEIRO DE CAMARGO

**Avaliação da resposta inflamatória local em ratos fumantes
passivos com periodontite apical submetidos a terapia
adjuvante sistêmica de Ômega-3**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Eloi Dezan Junior

**Araçatuba – SP
2024**

Dedico este trabalho, pelo qual tanto me dediquei e me orgulho muito, aos meus pais, Eduardo de Camargo Neto e Elizabeth Coelho Ribeiro de Camargo, aos meus irmãos, Pedro Ribeiro de Camargo e Gabriel Ribeiro de Camargo, e à minha namorada e companheira, Gabriela Favaretto Baldesserra, que são as pessoas mais importantes da minha vida e têm grande participação em todas as minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem e ao vice-diretor Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa, Processo nº 2022/13553-7.

*Aos meus pais, **Eduardo de Camargo Neto e Elizabeth Coelho Ribeiro de Camargo**, por tudo que sempre fazem e fizeram por mim e também pelos meus irmãos. Obrigado por todo esforço para que eu chegasse até aqui e por sempre demonstrarem que a minha felicidade é a felicidade de vocês dois também. Nada disso seria possível sem o carinho, amor, incentivo e apoio de vocês.*

*Aos meus irmãos, **Pedro Ribeiro de Camargo e Gabriel Ribeiro de Camargo**, que são duas pessoas extraordinárias e que tenho orgulho de tê-los como irmãos. Sou muito grato por todas as coisas que vocês já fizeram por mim, além de todo o amor, companheirismo e irmandade que vocês transmitem. Além de tudo isso, tenho vocês como inspiração profissional por serem extremamente qualificados e dedicados naquilo que fazem.*

*À minha namorada, **Gabriela Favaretto Baldesserra**, por todos esses quase 7 anos da relação mais doce pela qual eu já pude experimentar. Eu sou muito feliz ao seu lado, pois além de ser maravilhosa por fora, também é maravilhosa por dentro. Sou muito grato por você ter me dado a oportunidade de crescer ao seu lado e de viver momentos tão incríveis juntos. Estar com você torna as coisas muito*

mais leves e fáceis de lidar por você sempre demonstrar tanto amor e carinho.

*A **Deus**, por ter abençoado o meu caminho desde a escolha em fazer essa faculdade até o momento em que encerro este ciclo. Esse período foi maravilhoso e não poderia ter sido de outra maneira.*

*Ao meu orientador e professor, **Eloi Dezan Junior**, pelo qual tenho enorme gratidão por tudo que me proporcionou. Muito obrigado, professor, por sempre se esforçar em compartilhar seus ensinamentos e conselhos nas clínicas, por me presentear com sua amizade e também por, além de ter me aceitado como aluno de iniciação científica, me proporcionou a minha maior conquista da graduação, que foi a bolsa internacional na Universidade de Coimbra, a qual tanto sonhei. Me sinto realizado e honrado em ter tido o senhor como meu professor/orientador e o levarei para sempre como inspiração profissional.*

*À minha coorientadora, **Ana Claudia Rodrigues da Silva**, por ter confiado em mim e ter me dado a oportunidade de fazer parte da sua equipe de pesquisa. Ana, te considero como uma grande amiga e sou muito grato pela sua amizade. Muito obrigado por estar a disposição para me ajudar em todas as etapas da iniciação científica, sendo sempre muito solícita e muito atenciosa. Agradeço eternamente por você também ter se esforçado tanto para que conseguíssemos conquistar a bolsa internacional que me levou para Coimbra. Foi muito gratificante todo esse tempo que trabalhamos juntos e tenha a certeza que você é uma inspiração para mim.*

*A todos meus professores, que foram essenciais para a construção do profissional que me tornarei futuramente, através de todo o conhecimento e ensinamento transmitidos. Em especial, agradeço ao professor e membro da minha banca avaliadora **Aldiéris Alves Pesqueira** e ao professor **Juliano Milanezi de Almeida**, que foram*

mestres que marcaram muito a minha graduação, pois além do prazer de aprender com os senhores, tive a honra de construir uma relação de amizade com ambos. Levo-os como grandes referências e sempre serei muito grato por todas as oportunidades proporcionadas.

*Ao meu orientador na Universidade de Coimbra, **João Miguel Marques dos Santos**, por ter aceitado me orientar, além da simpatia e acolhimento que sempre demonstrou com minha pessoa. Professor, sou muito grato por conhecê-lo e agradeço de coração por todas as oportunidades que o senhor me deu durante esse período. Em Coimbra, além da pesquisa, pude participar dos laboratórios de Endodontia, aprendendo mais sobre outras filosofias de ensino, além de ter a oportunidade de participar de congressos e de conhecer tantas figuras importantes da Odontologia que são consideradas referências.*

*À equipe de pesquisa pela qual participei, em especial **Ana Maria Veiga Vasques** e **Gustavo Ramos Schiavetti**, pessoas muito queridas que vou levar comigo para sempre. Muito obrigado, Ana, pela parceria e por sempre se dedicar em compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos dentro da iniciação científica. Muito obrigado, Gustavo, por toda a irmandade e por você me ajudar a fazer parte desta equipe maravilhosa. Foi um prazer enorme ter a companhia de vocês durante todo este período.*

*À minha família de Araçatuba, **César Fuziy**, **Vitor Cavalini**, **Pedro Faneco** e **Yasmine Parischi**. Quando eu penso em todos os momentos maravilhosos que vivi durante esses anos de graduação, em todos vocês se fazem presentes. Muito obrigado a cada um de vocês por tudo que construímos ao longo desses anos. Levo vocês com enorme carinho no meu coração para sempre.*

*Aos meus **amigos de Araçatuba**. Sempre lembrarei, com muito carinho, de todas as histórias que criamos juntos, seja nas festas, ou*

mesmo dentro da faculdade. Tenho uma gratidão enorme por cada um e sentirei saudades da convivência diária.

*Aos meus **amigos de Assis**, os quais também considero minha família, que mesmo não morando na mesma cidade, se fizeram presentes em muitos momentos durante esses anos. Apesar da distância, a relação com vocês nunca mudou, mas sim se tornou cada vez mais forte.*

*À minha dupla em todas as disciplinas clínicas da faculdade, **Vitor Cavalini**, por me ajudar e também me dar a oportunidade de te auxiliar. Acredito que nossa parceria foi fundamental para meu crescimento durante todos esses anos de atendimento. Foi muito gratificante ter uma pessoa que considero como irmão também ser minha dupla de faculdade.*

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

CAMARGO, R. R. **Avaliação da resposta inflamatória local em ratos fumantes passivos com periodontite apical submetidos a terapia adjuvante sistêmica de Ômega-3.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência da suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e periodontite apical (PA) induzida em ratos na resposta inflamatória local. Sessenta e quatro animais foram divididos em 8 grupos (n=8): C (controle, ratos sem PA e sem exposição ao cigarro); PA (ratos com periodontite apical induzida); F (ratos expostos à fumaça do cigarro); FPA (ratos com periodontite apical induzida e expostos à fumaça do cigarro); PA+O (ratos com periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3); F+O (ratos expostos à fumaça do cigarro suplementados com Ômega-3); FPA+O (ratos com periodontite apical induzida expostos à fumaça do cigarro e suplementados com Ômega-3); C+O (ratos sem PA, sem exposição ao cigarro e suplementados com Ômega-3). Para inalação da fumaça do cigarro, os animais (F, FPA, F+O, FPA+O) foram colocados em câmara de tabagismo por oito minutos, três vezes ao dia por 20 dias antes da indução da PA. O mesmo procedimento foi realizado em animais não fumantes (C, PA, C+O, PA+O), porém sem a presença da fumaça do cigarro. No 5º dia de inalação, os animais dos grupos C+O, PA+O, F+O, FPA+O iniciaram a suplementação profilática com Ômega-3 durante 15 dias e os animais controle (C, PA, F, FPA) receberam água destilada pelo mesmo período. No dia 20º, os animais tiveram a polpa dos primeiros molares inferiores direito expostas ao meio oral para a indução da lesão periapical (PA), e permaneceram abertas por um período de 30 dias. Nesse período, os animais continuaram inalando fumaça do cigarro associados a suplementação terapêutica, por mais 30 dias, totalizando 50 dias de protocolo de inalação da fumaça e 45 dias de suplementação com Ômega-3. No momento da eutanásia, as mandíbulas foram removidas e processadas para as análises histopatológicas, semi-quantitativa do infiltrado inflamatório e imuno-histoquímica TNF- α e IL-10. Na análise do infiltrado inflamatório, os grupos com lesão periapical apresentaram menor infiltrado inflamatório na presença do Ômega-3, o qual o grupo PA apresentou um moderado infiltrado inflamatório (score 3) em comparação ao

grupo PA+O (escore 2) ($P < 0,05$). Assim como o grupo FPA (escore 4) e FPA+O (escore 3) ($P < 0,05$). Na análise imuno-histoquímica TNF- α , houve diferenças significantes entre PA (escore 2) e FPA (escore 3) ($P < 0,05$). Na análise imuno-histoquímica IL-10, entre os grupos PA (escore 1) e PA+O (escore 3) ($P < 0,05$). Conclui-se que, a suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e PA induzida em ratos promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório local. A fumaça do cigarro aumentou a expressão de TNF- α na lesão periapical, e a presença de dois agentes agressores no mesmo hospedeiro (PA e fumo) dificultou a resposta anti-inflamatória (IL-10) quando comparado aos grupos PA e PA+O.

Palavras-chave: fumantes; inflamação; osso; periodontite periapical; ômega-3.

ABSTRACT

CAMARGO, R. R. **Evaluation of the local inflammatory response in passive smoking rats with apical periodontitis submitted to systemic adjuvant Omega-3 therapy.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

The objective of the present study was to investigate the influence of systemic Omega-3 supplementation on the association between smoking and apical periodontitis (AP) induced in rats in the local inflammatory response. Sixty-four animals were divided into 8 groups (n=8): C (control, rats without AP and without exposure to cigarettes); PA (rats with induced apical periodontitis); F (rats exposed to cigarette smoke); FPA (rats with induced apical periodontitis and exposed to cigarette smoke); PA+O (rats with induced apical periodontitis supplemented with Omega-3); F+O (rats exposed to cigarette smoke supplemented with Omega-3); FPA+O (rats with induced apical periodontitis exposed to cigarette smoke and supplemented with Omega-3); C+O (rats without AP, without exposure to cigarettes and supplemented with Omega-3). For cigarette smoke inhalation, the animals (F, FPA, F+O, FPA+O) were placed in a smoking chamber for eight minutes, three times a day for 20 days before AP induction. The same procedure was performed in non-smoking animals (C, PA, C+O, PA+O), but without the presence of cigarette smoke. On the 5th day of inhalation, the animals in the groups C+O, PA+O, F+O, FPA+O started prophylactic supplementation with Omega-3 for 15 days and the control animals (C, PA, F, FPA) received distilled water for the same period. On the 20th day, the animals had the pulp of the right lower first molars exposed to the oral environment to induce the periapical lesion (AP), and they remained open for a period of 30 days. During this period, the animals continued inhaling cigarette smoke associated with therapeutic supplementation for another 30 days, totaling 50 days of smoke inhalation protocol and 45 days of Omega-3 supplementation. At the time of euthanasia, the mandibles were removed and processed for histopathological, semi-quantitative analysis of the inflammatory infiltrate and TNF- α and IL-10 immunohistochemistry. In the analysis of the inflammatory infiltrate, the groups with periapical lesion showed less inflammatory infiltrate in the presence of Omega-3, with the PA group showing a moderate inflammatory infiltrate (score 3) compared to the

PA+O group (score 2) ($P < 0.05$). As well as the FPA group (score 4) and FPA+O (score 3) ($P < 0.05$). In the TNF- α immunohistochemical analysis, there were significant differences between PA (score 2) and FPA (score 3) ($P < 0.05$). In the IL-10 immunohistochemical analysis, between the PA (score 1) and PA+O (score 3) groups ($P < 0.05$). It is concluded that systemic supplementation with Omega-3 in the association between smoking and AP induced in rats promoted a reduction in the local inflammatory infiltrate. Cigarette smoke increased the expression of TNF- α in the periapical lesion, and the presence of two offending agents in the same host (AP and tobacco) hampered the anti-inflammatory response (IL-10) when compared to the PA and PA+O groups.

Keywords: smokers; inflammation; bone; periapical periodontitis; omega 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara de exposição com divisória menor para acomodação dos cigarros e maior para acomodação dos ratos, com presença de exaustor para troca de ar e tampa de vidro temperado 23

Figura 2 - Aspectos histológicos da região periapical (HE) dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 10x e 40x) 28

Figura 3 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica TNF- α da região periapical dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 100x) 29

Figura 4 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica IL-10 da região periapical dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 100x) 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Escores medianos e intervalos interquartis dos achados histológicos e imuno-histoquímicos TNF- α e IL-10	27
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
µm	Micrometros
AA	Ácido aracdônico
C	Grupo controle
C+O	Grupo controle suplementados com Ômega-3
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
COX-2	Cicloxygenase-2
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
F	Grupo de ratos fumantes
F+O	Grupo de ratos fumantes e suplementados com Ômega-3
FPA	Grupo de ratos fumantes com periodontite apical induzida
FPA+O	Grupo de ratos fumantes, com periodontite apical induzida e suplementação com Ômega-3
g	Gramas
IL	Interleucina
LOX-5	5-Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
LTs	Leucotrienos
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo
ml	Mililitros
NK	Natural Killer
nº	Número
°C	Graus Celsius
PA	Periodontite apical; grupo de ratos com periodontite apical induzida

PA+O Ômega-3	Grupo de ratos com periodontite apical induzida e suplementação com Ômega-3
PC	Periodontite crônica
PGs	Prostaglandinas
TGF	Fator de Transformação do Crescimento
Th	Célula T auxiliar
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tr	Célula T reguladora
Tx	Tromboxanos
x	Vezes
α	Alfa
β	Beta
ω -3 PUFAs	Ômega-3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais	20
Objetivos específicos	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Cálculo do tamanho da amostra	21
3.3 Divisão dos grupos	21
3.4 Protocolo de Tabagismo	22
3.5 Drogas empregadas	23
3.6 Suplementação sistêmica com Ômega-3	23
3.7 Indução da periodontite apical	24
3.8 Coleta das mandíbulas	24
3.9 Análise Histopatológica	24
3.10 Análise do infiltrado inflamatório	24
3.11 Análise de imuno-histoquímica	25
3.12 Análises estatísticas	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Análise Histopatológica	26
4.2 Análise do infiltrado inflamatório	26
4.3 Análise de imuno-histoquímica TNF- α e IL-10	27
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

A infecção endodôntica ocorre pela exposição da cavidade pulpar a cárie, trauma ou desgaste dentário¹. Em seguida, bactérias e seus produtos adentram no interior do sistema de canais radiculares induzindo uma resposta imune inflamatória intensa com consequente necrose pulpar e destruição dos tecidos perirradiculares, desenvolvendo a periodontite apical (PA)^{1,2}. Dentre as células que estão presentes na resposta inflamatória periapical, encontram-se os macrófagos, neutrófilos, células T, mastócitos, citocinas, quimiocinas³⁻⁵ que atuam no desenvolvimento e progressão da lesão periapical⁶⁻⁹.

Outros componentes celulares também participam do processo inflamatório como o fator de necrose tumoral (TNF- α), que apresenta atividade pró-inflamatória, e a interleucina 10 (IL-10) com função anti-inflamatória. O TNF- α é secretado por macrófagos, monócitos, células NK¹⁰ e participa de eventos inflamatórios como: atividade osteoclástica (reabsorção óssea) metabolismo dos fibroblastos (através da ativação e proliferação dos mesmos, o que gera, por consequência, uma maior produção de colágeno) e neovascularização^{6,11-12}. Em contrapartida, a IL-10 secretada por macrófagos M2, células T auxiliares tipo 2 (Th2), células T reguladoras (Tr1, Th1 e Th17), células T CD8 +, além de monócitos, eosinófilos e mastócitos, possui atividade reparadora, participando do processo cicatricial à restrição dos mecanismos inflamatórios e atenuação da injúria/dano tecidual^{7,13-14}.

Devido a resposta inflamatória local intensa, um estudo avaliou a atuação de uma ou mais periodontites apicais induzidas em ratos, e notou-se que o aumento no número de PA em um mesmo hospedeiro contribuiu para o aumento dos níveis séricos de citocinas inflamatórias liberadas na corrente sanguínea, como TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-23, confirmando a hipótese de que as infecções endodônticas podem afetar negativamente a saúde sistêmica do hospedeiro¹⁵. Nesse sentido, outros trabalhos foram desenvolvidos a fim de investigar a associação da PA com as doenças sistêmicas. Ratos com periodontite apical associada a fibrose hepática induzida apresentaram um infiltrado inflamatório mais intenso, com níveis de citocinas pró-inflamatórias elevados, além de maior reabsorção óssea periapical quando comparados a ratos com periodontite apical sem a doença¹⁶. Na associação Diabetes Mellitus e periodontite apical, observou-se que em ratos diabéticos, o

infiltrado inflamatório e a reabsorção óssea alveolar foram maiores e mais intensos em comparação a ratos normoglicêmicos¹⁷. Ainda, encontrou-se trabalhos que investigaram a relação entre tabagismo e periodontite apical, mostrando que o tabagismo afeta o desenvolvimento da periodontite apical¹⁸⁻²⁰.

Foi demonstrado que pacientes fumantes apresentaram maior prevalência de periodontite apical e de tratamento endodôntico¹⁹. Uma revisão sistemática apresentou resultados semelhantes, no qual os dentes obturados apresentaram maior prevalência de lesões periapicais em pacientes fumantes quando comparados a não fumantes. Além disso, os resultados do estudo sugerem que há uma maior possibilidade de insucesso no tratamento endodôntico em pacientes tabagistas²⁰.

O cigarro é composto por milhares de substâncias químicas²¹ das quais provocam efeitos negativos na saúde sistêmica (câncer, alterações pulmonares, alterações cardiovasculares, baixo peso ao nascimento)²². Na saúde bucal, o tabaco está intimamente ligado ao câncer de cabeça e pescoço²³. Além disso, a inalação da fumaça do cigarro pode reduzir a qualidade óssea ao redor de implantes instalados em ratos²⁴ e interferir no crescimento e estrutura óssea²⁵. Na periodontite apical, estudos sugerem que o tabagismo pode agravar a resposta inflamatória imune e reduzir o suprimento sanguíneo, no qual pode influenciar no reparo dos tecidos perirradiculares²⁶.

A fumaça do cigarro está associada ao aumento da expressão de citocinas pró- inflamatórias, como interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e TNF- α no fluido crevicular gengival, as quais apresentam associação com a progressão da doença periodontal e com a perda óssea alveolar quando presentes em níveis elevados¹⁸. Hapidin *et al.*²⁷ obteve resultados negativos ao relacionar nicotina e citocinas pró- inflamatórias em ratos, com a nicotina promovendo o aumento das IL-1 e IL-6 e, conseqüentemente, causando prejuízos ao metabolismo ósseo.

Neste contexto, resultados de estudos anteriores^{28,29} investigaram a ação do tabagismo frente a periodontite apical induzida em ratos e demonstraram que a fumaça do cigarro aumentou a severidade da inflamação da periodontite apical, com intensa marcação imuno-histoquímica de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) e presença de macrófagos M1 (iNOS). Também observaram alterações sistêmicas, com um desequilíbrio nas séries branca e vermelha nas análises

sanguíneas laboratoriais. Diante dessas evidências, viu-se a necessidade de mais investigação a fim de buscar terapias adjuvantes que auxiliem na redução do processo inflamatório exacerbado²⁸.

O Ômega-3 (ω -3 PUFA) vem sendo estudado, dentro da Odontologia, como terapia adjuvante no tratamento de diversas patologias presentes no meio bucal, como a periodontite³⁰ e a gengivite³¹. Dentre as investigações a respeito do mecanismo de ação do Ômega-3, destaca-se sua ação na produção de eicosanoides, através da competição com o ácido araquidônico (AA) para atividade de fosfolipase A2, diminuindo a ação das enzimas Cicloxigenase-2 e 5-Lipoxigenase, e a produção de seus produtos como as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX) e os leucotrienos (LTs), respectivamente³².

Um estudo avaliou a periodontite apical induzida em ratos com suplementação de Ômega-3, e os autores demonstraram que o óleo de peixe promoveu uma diminuição dos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-17 e IL-1 β , e em contrapartida aumentou a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, modulando a resposta inflamatória³³. No tabagismo, dado interessante também foi encontrado, onde pacientes fumantes pesados (que fumam mais de um maço de cigarro por dia) foram submetidos a terapia diária com Ômega-3 em alta doses por um período de 3 meses, apresentando ao final do experimento redução do desejo por cigarro, assim como houve redução da dependência de nicotina e do estresse oxidativo³⁴.

Sendo assim, o objetivo do presente estudo é investigar a influência da suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e periodontite apical induzida em ratos na resposta inflamatória local.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo do presente estudo foi analisar a inflamação local em ratos tabagistas com periodontite apical induzida tratados sistemicamente com Ômega-3.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar, por meio das colorações de Hematoxilina e Eosina (HE), a severidade do perfil inflamatório periapical através de análises histopatológicas.
- Avaliar a expressão das interleucinas pró-inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10 por meio da técnica de imuno-histoquímica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), com cerca de 45 dias de idade, pesando aproximadamente 250-280g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, cinco animais por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”. Os animais ficaram em quarentena para adaptação ao novo habitat e foi administrado, nesse período, o vermífugo Ivermectina 1% via oral (0,3 ml dissolvidos em 1 litro de água) por um período de 5 dias.

Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram previamente autorizados pelo comitê de conduta ética no uso de animais em experimentação (CEUA), Processo FOA nº 0399-2022.

3.2 Cálculo do tamanho da amostra

A estimativa do tamanho da amostra foi baseada em dados de um estudo anterior³⁵. Considerando o erro α de 0,05 e poder de 95% para reconhecer uma diferença significativa, considerou-se necessário sete animais por grupo. Levando em consideração as possíveis mortes de animais, foi adicionado mais um animal em cada grupo, resultando em oito animais por grupo, totalizando 64 animais.

3.3 Divisão dos grupos

Os animais foram divididos em 8 grupos (n=8):

- **C:** ratos controle (sem exposição a fumaça do cigarro, sem indução da PA e sem suplementação de Ômega-3)
- **F:** ratos tabagistas (exposto somente a fumaça do cigarro)
- **PA:** ratos com periodontite apical induzida

- **FPA**: ratos tabagistas com periodontite apical induzida
- **C+O**: ratos controle com suplementação de Ômega-3
- **F+O**: ratos tabagistas com suplementação de Ômega-3
- **PA+O**: ratos com periodontite apical induzida e suplementação de Ômega-3
- **FPA+O**: ratos tabagistas com periodontite apical induzida e suplementação de Ômega-3.

3.4 Protocolo de Tabagismo

Os animais tabagistas (F, FPA, F+O e FPA+O) inalaram a fumaça dos cigarros por meio de uma câmara de exposição de corpo inteiro (Figura 1), simulando um fumante passivo^{24,36,37}. O protocolo consiste na inalação da fumaça de 10 cigarros, pelo tempo de 8 minutos, 3 vezes ao dia, 7 dias da semana.

Os animais não tabagistas (C, PA, C+O, PA+O) foram submetidos ao dispositivo de exposição (Figura 1) pelo mesmo protocolo descrito para os tabagistas, porém sem a fumaça dos cigarros³⁸.

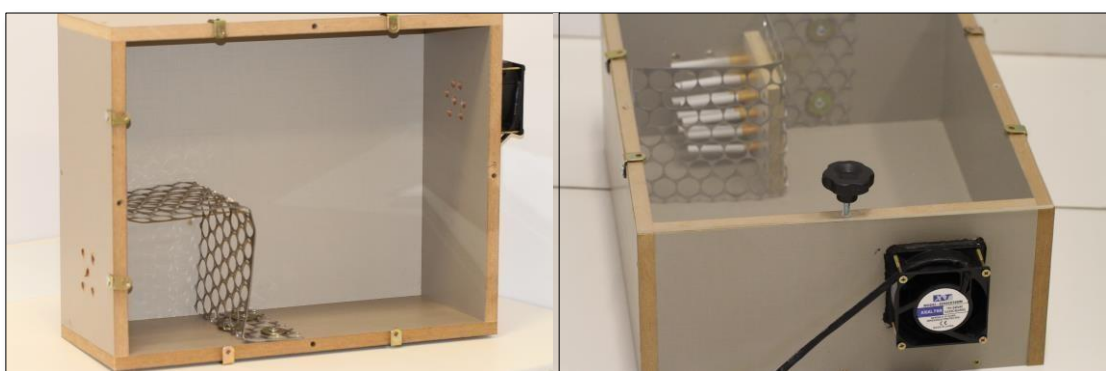
Os animais tabagistas ficaram alojados separadamente dos animais não tabagistas. Assim como a câmara de tabagismo também foi separada para que não houvesse contaminação com a nicotina.

A câmara de tabagismo foi confeccionada em madeira medindo 40 x 33 x 17 cm com tampa de vidro temperado para observação dos animais e dividida em dois compartimentos por uma tela perfurada. O compartimento maior foi usado para alojar os animais, cinco por vez, e o menor para os cigarros, que foram acoplados em uma base de madeira. Em uma das paredes externas da câmara foi instalado um ventilador e na parede oposta foram realizadas algumas perfurações para ventilação, gerando assim um fluxo de ar contínuo dentro da câmara de tabagismo (Figura 1).

Os animais foram submetidos a um período de adaptação gradual. Inicialmente, inalaram a fumaça de 10 cigarros uma vez ao dia, sendo no primeiro dia pelo tempo de 5 minutos, no segundo dia por 6 minutos e no terceiro dia por 7

minutos^{39,40}. Após a adaptação, foi seguido o protocolo de fumante passivo no qual animais inalaram a fumaça de 10 cigarros, por 8 minutos, três vezes ao dia, 7 dias da semana³⁶. O cigarro utilizado foi o Marlboro (Phillips Morris, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil)^{41,42} que contém 10 mg de alcatrão, 10 mg de monóxido de carbono e 0.8 mg de nicotina. Os animais dos grupos fumantes (F, FPA, F+O, FPA+O) inalaram a fumaça dos cigarros 20 dias antes da indução da periodontite apical (PA) e nos outros 30 dias subsequentes, totalizando 50 dias de inalação.

Figura 1 - Câmara de exposição com divisória menor para acomodação dos cigarros e maior para acomodação dos ratos, com presença de exaustor para troca de ar e tampa de vidro temperado



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

3.5 Drogas empregadas

Para anestesia dos animais foi utilizado, via intramuscular, um sedativo a base de Xilazina 2% (Dopasere, Calier S.A – Barcelona, Espanha- 10mg/kg) e um anestésico a base de cloridrato de Ketamina a 5% (Vetanarcol, Konig SA – Avellaneda, Argentina – 25mg/kg).

3.6 Suplementação sistêmica com Ômega-3

Os ratos dos grupos Ômega-3 (C+O, PA+O, F+O e FPA+O) receberam, por gavagem, uma dose diária de Ômega-3 de 40mg/kg (60% EPA + 40% DHA) diluída

em 1ml de água por 15 dias antes da indução da PA (administração profilática) e 30 dias depois (administração terapêutica). Aqueles nos grupos sem a suplementação com Ômega-3 (C, PA, F e FPA) receberam água destilada sobre o mesmo período, totalizando 45 dias de suplementação⁴³⁻⁴⁵.

3.7 Indução da periodontite apical

A indução das lesões periapicais foi realizada sob anestesia geral (conforme descrito no item 3.5) nos animais dos grupos com lesão periapical (PA, FPA, PA+O e FPA+O). A polpa dentária do primeiro molar inferior direito foi exposta ao meio bucal com auxílio de uma broca de aço carbono – Ln Long Neck (Dentsply / Maillefer, Ballaigues, Suíça) pelo tempo de 30 dias⁴⁶.

3.8 Coleta das mandíbulas

Após a eutanásia, as mandíbulas foram removidas e fixadas em solução formaldeído a 4%, em pH neutro por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e desmineralizadas em solução de EDTA 10% tamponado com Ph 7. Após a desmineralização, as peças foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para as análises morfológicas.

3.9 Análise Histopatológica

A análise qualitativa dos espécimes foi feita em todos os cortes corados em Hematoxilina e Eosina, sendo considerados os parâmetros de reabsorção óssea, atividade osteoclástica e/ou osteoblástica, biofilme microbiano e infiltrado inflamatório.

3.10 Análise do infiltrado inflamatório

Na análise do infiltrado inflamatório na região periapical foram atribuídos escores, de acordo com a intensidade da inflamação a partir de fotomicrografias

obtidas através do microscópio Leica LAS X (Leica Microsystems, Nussloch – Alemanha), no aumento de 400x. Os escores são: sem inflamação (escore 1: 0 ou poucas células inflamatórias), inflamação leve (escore 2: < 25 células inflamatórias), inflamação moderada (escore 3: 25 – 125 células inflamatórias) e inflamação intensa (escore 4: > 125 células inflamatórias)⁴⁶. A raiz mesial do primeiro molar inferior direito foi padronizada para todas as análises.

3.11 Análise de imuno-histoquímica

Para as análises inflamatórias através das marcações de interleucinas foram confeccionados cortes na espessura de 3µm para serem incubados com anticorpo anti- TNF- α de cabra (1: 100 SC 1348; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) e anti-IL-10 de cabra (1: 100 SC 1783, Santa Cruz Biotechnology). Na sequência, os anticorpos secundários biotinizados foram aplicados por 2 horas seguido por um conjugado de estreptavidina-peroxidase de rábano por 1 hora (kit universal de estreptavidina-biotina marcado com Dako; Dako Laboratories, Carpinteria, CA), corados com Tetrahidrocloro de cromogênio 3,30 diaminobenzidina (DAB Chromogen Kit, Dako Laboratories) e contra-corados com Hematoxilina Harris.

A imunorreatividade positiva foi definida como uma cor acastanhada no citoplasma das células e em sua matriz extracelular. Foi realizada uma análise semi-quantitativa para avaliar a intensidade das células e a marcação da matriz extracelular para a interleucina pró-inflamatória TNF- α e anti-inflamatória IL-10²⁹. Dessa forma, seguintes escores foram atribuídos: escore 1: <20% - células imunorreativas e baixa marcação da matriz extracelular; escore 2: >40% e <60% – células imunorreativas e baixa marcação da matriz extracelular; escore 3: >60% e <80% – células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular.

3.12 Análises estatísticas

Os dados foram tabulados e analisados no programa estatístico Sigma Plot (V12.0 SystatSoftware Inc.). Os dados não paramétricos foram submetidos ao teste Mann–Whitney, com nível de significância de $p < 0,050$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise Histopatológica

Na região apical da raiz mesial do primeiro molar superior direito, os grupos C, C+O e F, F+O possuem características histológicas semelhantes, com a presença de ligamento periodontal íntegro, tecido conjuntivo constituído por feixes de fibras colágenas organizadas, células fibroblásticas e vasos sanguíneos. Adjacente ao ligamento periodontal apical, observam-se cemento celular e osso alveolar em processo de remodelação. Notam-se Fibras de Sharpey inseridas no cemento e no osso alveolar, além de restos epiteliais de Malassez próximos ao cemento. Por outro lado, os grupos PA e PA+O apresentam degeneração pulpar resultando em lesão periapical. Em continuidade com o canal radicular, observa-se área ocupada por intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Adjacente, o infiltrado polimorfonuclear torna-se disperso em meio a leucócitos mononucleares. O cemento apresenta áreas de reabsorção, bem como o tecido ósseo alveolar. Há presença de biofilme bacteriano no interior do canal radicular apical e na superfície externa desta região. Os grupos FPA e FPA+O apresentam degeneração pulpar em continuidade a intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Em continuidade, notam-se delicados feixes de fibras colágenas permeados por infiltrado inflamatório mononuclear e numerosos vasos sanguíneos. O cemento e o osso alveolar encontram-se em processo de reabsorção, porém no grupo FPA+O de forma menos intensa, com maior preservação do tecido ósseo localizado na região de furca.

4.2 Análise do infiltrado inflamatório

Nos grupos C, C+O, F e F+O foram observadas eventuais células inflamatórias, sendo atribuído a eles o escore 1. Por outro lado, nos grupos com lesão periapical, nota-se presença de infiltrado inflamatório variando de leve a intenso na região periapical. O grupo PA apresentou um moderado infiltrado inflamatório (escore 3), e o grupo PA+O um leve infiltrado inflamatório, com diferenças significantes ($P < 0,05$). Assim como, nas comparações entre os grupos PA (escore 3) e FPA (escore 4) ($P < 0,05$), e no grupo FPA (escore 4) e FPA+O (escore 3) ($P < 0,05$) (Figura 2/ Tabela 1).

4.3 Análise de imuno-histoquímica TNF-α e IL-10

Na análise da citocina pró-inflamatória TNF-α e anti-inflamatória IL-10, nos grupos C, C+O, F e F+O foram observadas eventuais células imunorreativas e baixa marcação da matriz celular, sendo atribuído a eles o escore 1.

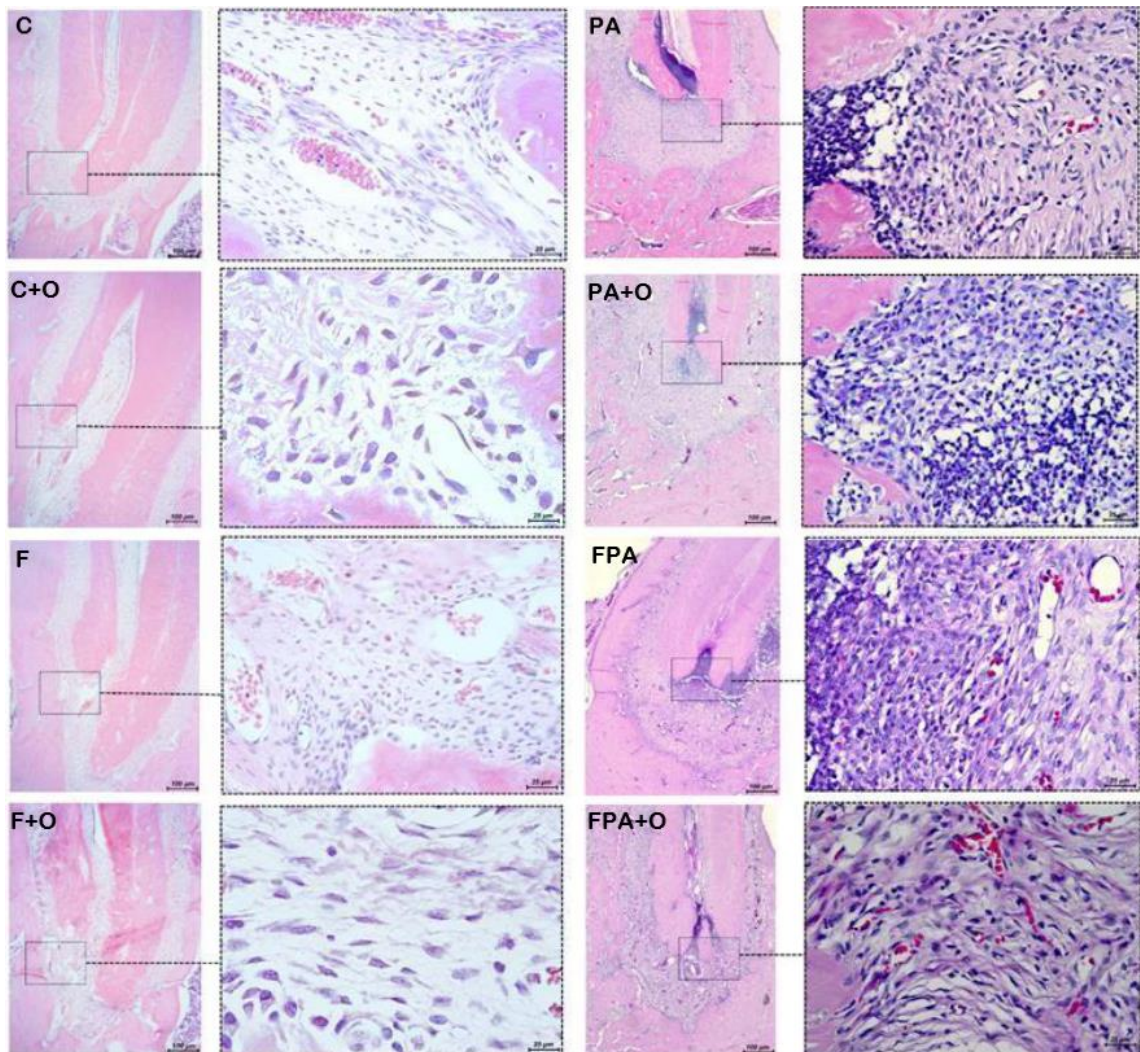
Na imunomarcação pró-inflamatória (TNF-α), os grupos PA e PA+O não apresentaram diferença estatisticamente significantes, sendo atribuídos a eles o escore 2. Isso foi observado no grupo FPA+O (escore 2), o qual não apresentou diferenças entre os grupos avaliados (P <0,05). Em contrapartida, na avaliação entre os grupos PA (escore 2) e FPA (escore 3), nota-se diferenças significantes entre si (P <0,05) (Figura 3/ Tabela 1). Na imunomarcação anti-inflamatória (IL-10), os grupos PA (escore 1) e PA+O (escore 3) apresentaram diferença estatisticamente significantes (P <0,05). Enquanto os grupos FPA (escore 2) e FPA+O (escore 2), não apresentaram diferenças entre si (Figura 4/ Tabela 1).

Tabela 1 – Escores medianos e intervalos interquartis dos achados histológicos e imuno-histoquímicos TNF-α e IL-10

Critérios histológicos	Grupos experimentais								Análise estatística Mann-Whitney
	C	C+O	F	F+O	PA	PA+O	FPA	FPA+O	
Infiltrado inflamatório	1(1-1)	1 (1-1)	1(1-1)	1 (1-1)	3(2-3) ^a	2(2-3) ^{b,c}	4(3-4) ^b	3 (2-3) ^{a,c}	P <0,05
Imuno-histoquímica									
TNF-α	1(1-1)	1 (1-1)	1(1-1)	1 (1-1)	2 (2-3) ^a	2(2-3) ^{a,b}	3 (3-4) ^b	2 (2-3) ^{a,b}	P <0,05
IL-10	1(1-1)	1 (1-1)	1(1-1)	1 (1-1)	1(1-2) ^a	3(2-3) ^b	2 (2-3) ^{a,b}	2 (2-3) ^{a,b}	P <0,05

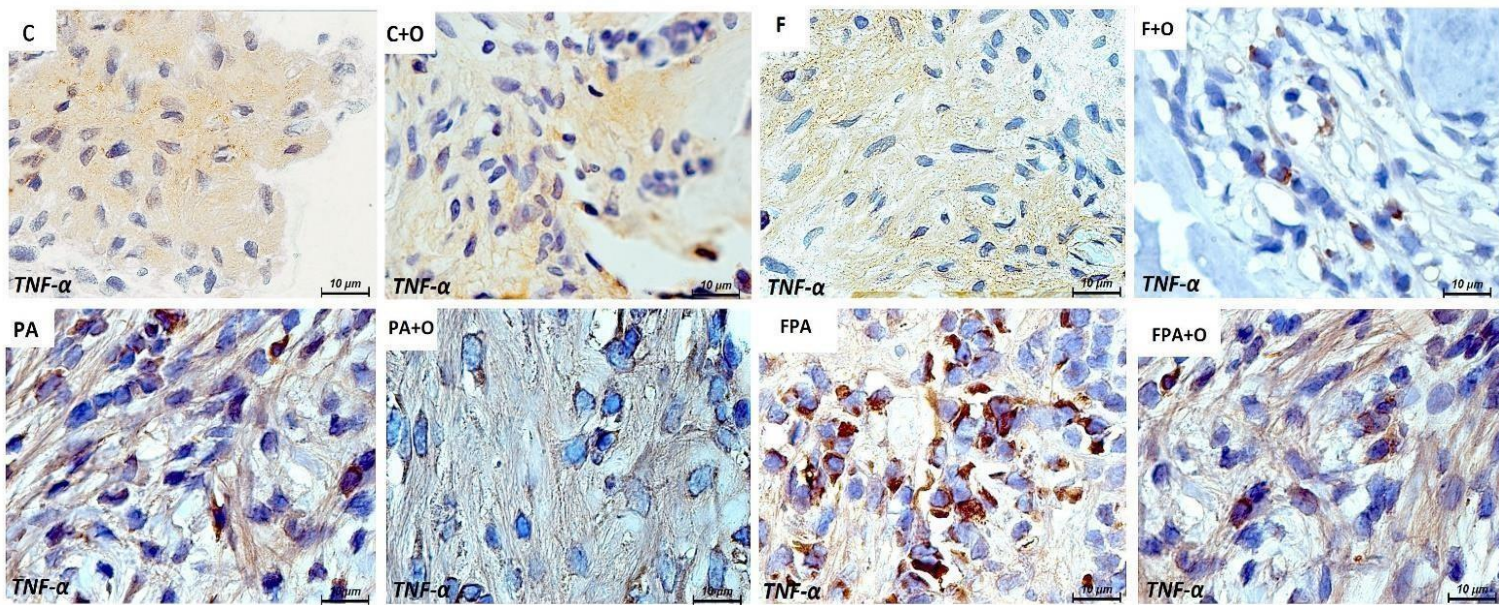
* Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística entre os grupos.
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 2 – Aspectos histológicos da região periapical (HE) dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 10x e 40x)



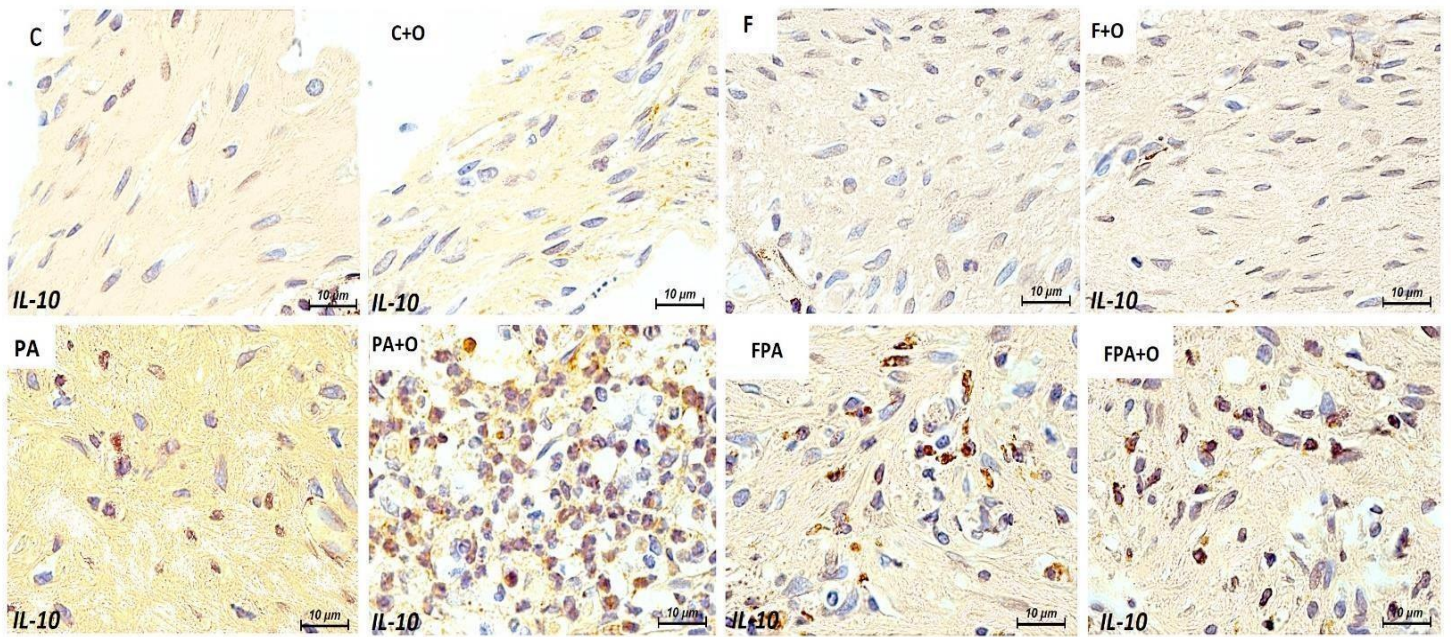
Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 3 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica TNF- α da região periapical dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 100x)



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

Figura 4 - Imagens representativas da análise imunohistoquímica IL-10 da região periapical dos grupos: C (controle); C+O (controle + suplementação com Ômega-3); F (expostos à fumaça do cigarro); F+O (expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3); PA (periodontite apical); PA+O (periodontite apical + suplementação com Ômega-3); FPA (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro); FPA+O (periodontite apical + expostos à fumaça do cigarro + suplementação com Ômega-3) (aumento de 100x)



Fonte: Elaborado pelo autor (2024)

5 DISCUSSÃO

Resultados de projetos anteriores^{28,29} demonstraram que a exposição à fumaça do cigarro potencializou a resposta inflamatória local e sistêmica na severidade da lesão periapical, com intensa marcação imuno-histoquímica de citocinas pró- inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α) e presença de macrófagos M1 (iNOS), assim como alterações nas séries branca e vermelha do hemograma. Neste estudo avaliamos a resposta inflamatória local da influência da suplementação sistêmica com Ômega-3 em ratos tabagistas com periodontite apical.

Na análise do infiltrado inflamatório, os grupos C, C+O, F e F+O apresentaram eventuais células inflamatórias, manutenção da integridade do ligamento periodontal e osso alveolar, assim como observado em estudos anteriores^{28,29,33}. Já o grupo PA e FPA apresentaram diferenças significantes entre si ($P < 0,05$), o qual a presença da fumaça do cigarro agravou o processo inflamatório ocasionado pela periodontite apical^{28,29}. Em contrapartida, na presença do Ômega-3, observou-se uma diminuição do infiltrado inflamatório no grupo PA+O em comparação com o grupo PA ($P < 0,05$), assim como, FPA+O em comparação ao grupo FPA ($P < 0,05$). Azuma et al., (2021) avaliaram lesões periapicais de ratos suplementados ou não com Ômega-3, e observaram uma redução do infiltrado inflamatório nos grupos suplementados, corroborando com os achados do presente estudo⁴⁷. Uma possível explicação para a ocorrência de uma diminuição do processo inflamatório seria o fato do Ômega-3 apresentar mecanismos anti-inflamatórios⁴⁸⁻⁴⁹.

Os ácidos graxos Ômega-3 são da família de ácidos graxos poliinsaturados. Os ácidos graxos de cadeia mais longa incluem o ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3), ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5n-3) e ácido docosaheptaenóico (DHA; 22:6n-3)⁵⁰. Os compostos EPA e DHA podem produzir as resolvinas⁵⁰. As resolvinas E1 e D1 podem inibir a migração transendotelial de neutrófilos, impedindo a chegada deles no local da inflamação⁵¹. Já a resolvina D2 pode induzir células inflamatórias polimorfonucleares, como os neutrófilos, a sofrerem apoptose, e aumentar o fenômeno de eferocitose de macrófagos⁴⁸⁻⁴⁹. Além disso, podem atuar na produção de eicosanoides, através da competição com o ácido araquidônico (AA) para atividade de fosfolipase A2, diminuindo a ação das enzimas Ciclooxigenase-2

(COX-2) e 5-Lipoxigenase (5-LOX) e a produção de seus produtos, as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX) e os leucotrienos (LTs), respectivamente³², e podem se incorporar nos fosfolípidios da membrana celular⁵⁰.

Na análise imuno-histoquímica observamos um aumento do TNF- α nos grupos PA e FPA, com diferenças estatísticas significantes ($P < 0,05$). Esse resultado condiz com o encontrado em nossos estudos anteriores²⁹. O TNF- α é secretado por macrófagos, monócitos, células NK¹⁰ e participa de eventos inflamatórios como: atividade osteoclástica (reabsorção óssea), metabolismo dos fibroblastos (através da ativação e proliferação dos mesmos, o que gera, por consequência, uma maior produção de colágeno) e neovascularização^{6,11-12}. No presente estudo, a suplementação de Ômega-3 não foi capaz de reduzir significativamente a presença da citocina pró-inflamatória TNF- α . Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores avaliando periodontite apical³³, gengivite³¹ e nível sérico de citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 β , TNF- α , TGF- β e LTB4) em fumantes pesados ou com histórico de tabagismo (≥ 30 anos)⁵². De fato, em lesões periapicais, o estímulo da produção de mediadores inflamatórios, como o TNF- α , é aumentado em função da presença de bactérias no local⁵³ e seus subprodutos, como lipopolissacarídeo (LPS)⁵⁴. Além disso, na presença da fumaça do cigarro, citocinas inflamatórias podem ser exacerbadas, como demonstrado em um estudo avaliando o nível de citocinas no fluido crevicular gengival em periodontites¹⁸.

Em outro estudo foi avaliado citocinas inflamatórias sistêmicas de 130 pacientes com periodontite crônica (PC), PC e diabetes mellitus, e PC e tabagismo, os resultados demonstraram que pacientes tabagistas com PC apresentavam níveis elevados de proporções de TNF- α /IL-4 e TNF- α /IL-5 em comparação ao grupo PC⁵⁵. Ainda, outro estudo demonstrou que a suplementação com Ômega-3 não alterou níveis séricos de TNF- α e IL-17 em ratos com múltiplos focos de periodontite apical⁴⁷.

A citocina anti-inflamatória IL-10 é secretada por macrófagos M2, células T auxiliares tipo 2 (Th2), células T reguladoras (Tr1, Th1 e Th17), células T CD8 +, monócitos, eosinófilos e mastócitos^{7,13-14}. No presente estudo observamos que não houve diferenças entre os grupos sem lesão periapical (C, C+O, F, F+O), assim como em resultados anteriores^{33,53}. Por outro lado, nos grupos com lesão periapical, uma diferença significativa foi observada entre o grupo PA e PA+O ($P < 0,05$),

demonstrando que na presença da suplementação com Ômega-3 houve uma redução da resposta inflamatória local, caracterizado pela imunorreatividade aumentada da IL-10 no grupo PA+O. A IL-10 possui atividade reparadora, participando do processo cicatricial à restrição dos mecanismos inflamatórios e atenuação da injúria/dano tecidual^{7,13-14}. Um estudo avaliando a PA isolada e a PA com suplementação de Ômega-3 demonstrou que os animais que foram suplementados apresentaram maiores marcações de IL-10³³. Nos grupos FPA e FPA+O não foi observado diferenças estatísticas. Uma possível explicação para este resultado é devido a presença de dois agentes agressores, representados localmente pela PA e sistemicamente pelo tabagismo, no mesmo hospedeiro. A presença de bactérias no local promove a liberação de citocinas inflamatórias constantemente⁵⁶⁻⁵⁷, impedindo o processo de reparo. Além disso, um estudo demonstrou que a fumaça do cigarro prejudicou a resposta imune de camundongos contra bactérias após infecção pulmonar, diminuindo os níveis de citocinas Th1 e Th2 e aumentando a IL-17, associada a manutenção da inflamação crônica⁵⁸.

Tais resultados evidenciam a importância da investigação de interações entre doenças bucais e sistêmicas. Pois na presença de alterações sistêmicas como o tabagismo, pode levar a uma alteração na resposta imune⁵⁵, gerando assim uma resposta inflamatória local mais exacerbada.

6 CONCLUSÃO

A suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e periodontite apical induzida em ratos promoveu a diminuição do infiltrado inflamatório local. A fumaça do cigarro aumentou a expressão de TNF- α na lesão periapical, e a presença de dois agentes agressores no mesmo hospedeiro (PA e fumo) dificultou a resposta anti-inflamatória (IL-10) quando comparado aos grupos PA e PA+O.

REFERÊNCIAS

1. ZALECKIENE, V. *et al.* Traumatic dental injuries: etiology, prevalence and possible outcomes. **Stomatologija**, v. 16, n. 1, p. 7–14, 2014.
2. NAIR, P. N. R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, n. 6, p. 348–381, nov. 2004.
3. SILVA, T. A. *et al.* Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 310–316, out. 2005.
4. BRACKS, I. V. *et al.* Distribution of mast cells and macrophages and expression of interleukin-6 in periapical cysts. **J. Endod.**, v. 40, n. 1, p. 63–68, jan. 2014.
5. HUANG, G. T. *et al.* Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 92, n. 1, p. 83–88, jul. 2001.
6. BRAZ-SILVA, P. H. *et al.* Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. **Acta Odontol. Scand.**, v. 77, n. 3, p. 173–180, abr. 2019.
7. ARAUJO-PIRES, A. C. *et al.* Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 22, n. 4, p. 336–346, jul-ago. 2014.
8. GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 12, p. 1349–1363, dez. 2010.
9. MENEZES, R. *et al.* Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **J. Endod.**, v. 34, n. 8, p. 932–938, ago. 2008.
10. JURISIC, V. *et al.* The concentration of TNF- α correlate with number of inflammatory cells and degree of vascularization in radicular cysts. **Oral Dis.**, v. 14, n. 7, p. 600–605, out. 2008.
11. SALLES, A.G. *et al.* Association between apical periodontitis and TNF- α -308 G>A gene polymorphism: a systematic review and meta-analysis. **Braz. Dent. J.**, v. 28, n. 5, p. 535–542, set-out 2017.
12. ANDRADE, A. L. *et al.* Immunoexpression of interleukin 17, transforming growth Factor β 1, and forkhead box P3 in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular Cysts. **J. Endod.**, v. 39, n. 8, p. 990–994, ago. 2013.
13. COLIC, M. *et al.* Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 39, n. 9, p. 690–696, out. 2010.

14. MOSSER, D. M.; ZHANG, X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. **Immunol. Rev.**, v. 226, n. 1, p. 205–218, dez. 2008.
15. CINTRA, L. T. A. *et al.* Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. **J. Endod.**, v. 42, n. 5, p. 747–751, maio. 2016.
16. CANTIGA-SILVA, C. *et al.* Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. **Int. Endod. J.**, v. 54, n. 8, p. 1353–1361, ago. 2021.
17. CINTRA, L. T. A. *et al.* Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. **Int. Endod. J.**, v. 47, n. 3, p. 228–237, mar. 2014.
18. BINSHABAIB, M. *et al.* Clinical periodontal status and gingival crevicular fluid cytokine profile among cigarette-smokers, electronic-cigarette users and never-smokers. **Arch. Oral Biol.**, v. 102, p. 212–217, jun. 2019.
19. PINTO, K. P. *et al.* Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. **Int. Endod. J.**, v. 53, n. 8, p. 1068–1083, ago. 2020.
20. CABANILLAS-BALSERA, D. *et al.* Fumo e lesões periapicais radiolúcidas em Dentes Obturados: Revisão sistemática e Metanálise. **J. Clin. Med.**, v. 9, n. 11, p. 3506, out. 2020.
21. BORGERDING, M.; KLUS, H. Analysis of complex mixtures--cigarette smoke. **Exp. Toxic. Pathol.**, v. 57 Suppl 1, p. 43–73, 1 jul. 2005.
22. SHAJU, J. P. Smoking as a risk factor for periodontitis: a literature review. **Rev. Odonto Ciência**, v. 25, n. 4, p. 406-411, 2010.
23. JETHWA, A. R.; KHARIWALA, S. S. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 36, n. 3, p. 411–423, set. 2017.
24. NOCITI, F. H. *et al.* Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. **J. Periodontol.**, v. 73, n. 9, p. 982–987, set. 2002.
25. ROSA, R. *et al.* Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. **Clinics**, v. 72, n. 12, p. 785–789, dez. 2017.
26. SEGURA-EGEA, J. J. *et al.* Relationship between smoking and endodontic variables in hypertensive patients. **J. Endod.**, v. 37, n. 6, p. 764–767, jun. 2011.
27. HAPIDIN, H. *et al.* Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats. **J. Bone Mine. Metab.**, v. 25, n. 2, p. 93–98, 2007.

28. SILVA, A. C. R. *et al.* Effects of cigarette smoke inhalation on the immune-inflammatory profile of experimental apical periodontitis in rats. **Int. Endod. J.**, v. 56, n. 12, p. 1559–1570, dez. 2023.
29. VASQUES, A. M. V. *et al.* Inflammatory profile of apical periodontitis exacerbated by cigarette smoke inhalation: histological and immunohistochemical analysis in rats. **Int. Endod. J.**, v. 56, n. 4, p. 465–474, abr. 2023.
30. CHEE, B. *et al.* Omega-3 fatty acids as an adjunct for periodontal therapy—a review. **Clin. Oral Investig.**, v. 20, n. 5, p. 879–894, jun. 2016.
31. ARAGHIZADEH, N. *et al.* The efficacy and prophylactic characteristics of omega-3 fatty acids in experimental gingivitis in rats. **Iran. J. Basic Med. Sci.**, v. 17, n. 2, p. 87–92, fev. 2014.
32. HUSSON, M. O. *et al.* Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids. **J. Infect.**, v. 73, n. 6, p. 523–535, dez. 2016.
33. AZUMA, M. M. *et al.* Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. **J. Endod.**, v. 44, n. 4, p. 604–608, abr. 2018.
34. SADEGHI-ARDEKANI, K.; HAGHIGHI, M.; ZARRIN, R. Effects of omega-3 fatty acid supplementation on cigarette craving and oxidative stress index in heavy-smoker males: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **J. Psychopharmacol.**, v. 32, n. 9, p. 995–1002, set. 2018.
35. DAL-FABBRO, R. *et al.* Effect of red wine or its polyphenols on induced apical periodontitis in rats. **Int. Endod. J.**, v. 54, n. 12, p. 2276–2289, dez. 2021.
36. CÉSAR-NETO, J. B. *et al.* A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 10, p. 1454–1459, out. 2003.
37. ERCAN, A. *et al.* Effects of cigarette smoke on fat graft survival in an experimental rat model. **Aesthetic Plast. Surg.**, v. 43, n. 3, p. 815–825, jun. 2019.
38. GIORGETTI, A. P. O. *et al.* Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 110, n. 4, p. 447–452, out. 2010.
39. FERREIRA, C. L. *et al.* Effect of orthodontic force associated with cigarette smoke inhalation in healthy and diseased periodontium. A histometric and immunohistochemistry analysis in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 53, n. 5, p. 924–931, out. 2018.
40. CARVALHO, M. D. *et al.* Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 4, p. 599–605, abr. 2006.

41. SANTIAGO, H. A. *et al.* Exposure to secondhand smoke impairs fracture healing in rats. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 475, n. 3, p. 894-902, mar. 2017.
42. ROSA, R. *et al.* Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. **Clinics**, v. 72, n. 12, p. 785–789, dez. 2017.
43. LAKSHMYYA KESAVALU *et al.* Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 7, p. 648–652, jul. 2006.
44. VARDAR-ŞENGÜL, S. *et al.* Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of Interleukin-1 β , osteocalcin, and C-Reactive protein in rats. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 5, p. 814–820, maio 2006.
45. AZUMA, M. M. *et al.* Omega 3 Fatty Acids Reduce Bone Resorption While Promoting Bone Generation in Rat Apical Periodontitis. **J. Endod.**, v. 43, n. 6, p. 970–976, jun. 2017.
46. CINTRA, L. T. A. *et al.* Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. **J. Endod.**, v. 42, n. 5, p. 747–751, maio 2016.
47. AZUMA, M. M. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Alter Systemic Inflammatory Mediators Caused by Apical Periodontitis. **J. Endod.**, v. 47, n. 2, p. 272–277, fev. 2021.
48. SPITE, M. *et al.* Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1287–1291, out. 2009.
49. CHIURCHIÙ, V. *et al.* Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. **Sci. Transl. Med.**, v. 8, n. 353, ago. 2016.
50. CALDER, P. C. Marine ômega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, abr. 2015.
51. SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 5, p. 349–361, maio 2008.
52. ELISIA, I. *et al.* Omega 3 supplementation reduces C-reactive protein, prostaglandin E2 and the granulocyte/lymphocyte ratio in heavy smokers: An open-label randomized crossover trial. **Front. Nutr.**, v. 9, p. 1051418, dez. 2022.
53. SAMUEL, R. O. *et al.* Th1/Th2/Th17/Treg Balance in Apical Periodontitis of Normoglycemic and Diabetic Rats. **J. Endod.**, v. 45, n. 8, p. 1009–1015, ago. 2019.
54. JOHNSON, G. K.; ORGAN, C. C. Prostaglandin E2 and interleukin-1 concentrations in nicotine-exposed oral keratinocyte cultures. **J. Periodontal Res.**, v. 32, n. 5, p. 447–454, jul. 1997.

55. MIRANDA, T. S. et al. The ratios of pro-inflammatory to anti-inflammatory cytokines in the serum of chronic periodontitis patients with and without type 2 diabetes and/or smoking habit. **Clin. Oral Investig.**, v. 23, n. 2, p. 641–650, fev. 2019.
56. FABRIEK, B. O. et al. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. **Blood**, v. 113, n. 4, p. 887–892, jan. 2009.
57. RIBEIRO, C. M. et al. M2 macrophages coexist with a Th1-driven profile in periapical cysts. **Int. Endod. J.**, v. 51 Suppl 2, p. e87–e93, 1 fev. 2018.
58. LUGADE, A. A. et al. Cigarette Smoke Exposure Exacerbates Lung Inflammation and Compromises Immunity to Bacterial Infection. **J. immunol.**, v. 192, n. 11, p. 5226–5235, jun. 2014.

ANEXOS

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética no Estudo Animal



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 **"Influência da suplementação do Ômega-3 em ratos expostos a fumaça do cigarro associados a periodontite apical induzida. Análise óssea e inflamatória"**, Processo FOA nº 0399-2022, sob responsabilidade de Elói Dezan Júnior apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 30 de Maio de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Dezembro de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Janeiro de 2026.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of Omega-3 supplementation in rats exposed to cigarette smoke associated with induced apical periodontitis. Bone and inflammatory analysis"**, Protocol FOA nº 0399-2022, under the supervision of Elói Dezan Júnior presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 30, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: December 03, 2025.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: January 03, 2026.

Prof. Dr. João Carlos Callera
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: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br