

Carolina de Barros Moraes Cardoso

Efeito da suplementação alimentar com o ácido graxo
ômega-3 nos níveis de triglicérides e na reabsorção óssea de
ratos Wistar com infecção endodôntica

ARAÇATUBA-SP

2016

Carolina de Barros Moraes Cardoso

Efeito da suplementação alimentar com o ácido graxo
ômega-3 nos níveis de triglicérides e na reabsorção óssea de
ratos Wistar com infecção endodôntica

Trabalho de Conclusão de Curso como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho".

Orientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

ARAÇATUBA – SP
2016

Agradecimentos

À Deus, aquele que me deu forças para continuar mesmo quando tudo parecia perdido e sem solução. Aquele que acalmou meu coração e o preencheu de amor nos momentos em que senti mais falta da minha família. Tudo isso só foi possível porque Ele se fez presente a minha vida toda, e especialmente nesses últimos 5 anos.

Aos meus pais, Elizabete e Estefani Cardoso, que jamais mediram esforços para me ver feliz, colocaram os meus sonhos à frente dos seus e me apoiaram em todos os momentos. Obrigada por cada palavra de incentivo, por cada palavra de motivação, por todo esforço e pelo amor incondicional que vocês me dedicaram desde que nasci. Isso é por vocês e para vocês. Amor e gratidão eterna por vocês dois.

Ao meu irmão, Estefani Barros, que além de irmão, é meu amigo e minha maior ponte com o passado. Que nunca nos falte companheirismo e união. Um pelo outro até o fim. Obrigada por existir.

À minha avó, Lázara Gentil (em memória) que, com certeza, é a maior saudade que trago em meu coração. Obrigada por ser a melhor avó que alguém poderia e por todo o amor. Espero que esteja orgulhosa, onde quer que esteja. Te amarei e a levarei para sempre em meu coração e nos meus pensamentos.

Ao meu namorado e melhor amigo, Wellington Tomazela, pelo apoio, companheirismo, carinho, bom humor, alegria e por cuidar tão bem de mim mesmo quando distante. Muito obrigada por fazer parte da minha vida e me fazer tão bem!

À todos os professores que fizeram parte da minha graduação. Os ensinamentos de todos vocês me enriqueceram e fizeram com que eu enxergasse a Odontologia com outros olhos. Serei eternamente grata.

Ao meu Professor e Orientador, Luciano Tavares Angelo Cintra, pela honra de ter sido sua orientada, por todo o ensinamento e conhecimento compartilhado. O amor que sente por aquilo que faz é visível e me inspirou. Espero ser tão realizada na profissão como você. Obrigada pela experiência e pela oportunidade, Professor!

À querida doutoranda, Mariane Azuma, pela amizade, ajuda, paciência, boa vontade, incentivo e ensinamento. Minha experiência como IC jamais seria a mesma sem você, Mari! Te admiro muito pelo esforço, dedicação, profissionalismo e bondade. Com certeza será uma professora brilhante. Jamais me esquecerei de você. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas de graduação, Betina Commar, Bruna Egumi, Lara Cervantes, Letícia Capalbo, Luara Colombo, Mariana Pereira e Thayane Businari, pela convivência ao longo desses anos, pelas risadas, conversas, clínicas, festas, estudos e todos os bons momentos que tivemos. Essa experiência só foi única porque foi compartilhada com vocês. Sentirei falta da convivência diária, mas estarei torcendo pelo sucesso de cada uma de vocês. Obrigada por tudo, meus presentinhos da Unesp!

Aos melhores amigos de uma vida inteira, Fábio Dezidério, Isabella Junqueira, Marco Aurélio Piva, Tais Colletti e Tamires Colletti, por vibrarem com minhas conquistas e por me provarem ano após ano que amizades verdadeiras sobrevivem ao tempo e à distância. Obrigada por entenderem minha ausência em momentos importantes e por torcerem por mim. Vocês são especiais e tenho muita sorte de tê-los comigo, Pérolas!

Aos meus colegas e amigos de IC, Camila Pipa, Juliana Fernandes, Jéssica Cordeiro, Marina Ottoni, Taís Gonçalves e Pedro Henrique Chaves, por fazerem parte dessa experiência comigo. Foi um prazer conhecer um pouquinho mais de cada um de vocês. Os levarei com muito carinho em meu coração. Sucesso à todos!

Aos pós-graduandos da disciplina de Endodontia, Diego Valentim, Francine Benetti, Letícia Citelli e Renata Samuel, por me ajudarem prontamente sempre que precisei. Muito obrigada mesmo, de coração! Foi um prazer conviver com vocês!

Às técnicas de laboratório, Neuci e Elaine, por me ensinarem etapas importantes para a conclusão deste trabalho e por me ajudarem sempre que foi necessário.

Ao meu avô, Lauro Moraes, que se tornou uma estrelinha no dia 27/07 deste ano. Achei que fosse impossível sentir um vazio e uma dor tão grande quanto a sua partida me deixou. Jamais me esquecerei do olhar mais amoroso que já vi até hoje e do seu sorriso. Obrigada por todo carinho, amor, atenção e cuidado. Você nos fez muito felizes, Vôzinho.

E, por fim, agradeço especialmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelas bolsas concedidas (Processos n^{os} 2015/03054-0 e 2016/08005-0).

CARDOSO, CBM. **Efeito da suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 nos níveis de triglicérides e na reabsorção óssea de ratos Wistar com infecção endodôntica.** 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Resumo

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram em modelo animal que a infecção endodôntica exerce efeitos sobre a saúde sistêmica (Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014 a; Cintra et al., 2014b; Cintra et al., 2014c), assim como certas alterações sistêmicas são capazes de modular o desenvolvimento da infecção endodôntica (Cintra et al., 2013; 2014abc). Além disso, estudos mais recentes de nosso grupo de pesquisa, demonstraram que a presença de vários focos de infecção endodôntica é capaz de alterar alguns parâmetros sistêmicos, como células inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias (Cintra et al., 2016). Assim, acreditamos ser importante estudar terapias capazes de modular o processo de reabsorção óssea consequente da infecção endodôntica, com o intuito de minimizar seus efeitos sistêmicos. O objetivo deste trabalho foi verificar se a suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 é capaz de diminuir os níveis de triglicérides de ratos com múltiplas periodontites apicais, bem como verificar se o ômega-3 altera o processo de reabsorção óssea dos tecidos periapicais. Foram utilizados 40 ratos divididos em 4 grupos de 10 animais cada: C - ratos controle; C+O - ratos suplementados com ômega-3; IE - ratos com múltiplas infecções endodônticas; IE+O - ratos com múltiplas infecções endodônticas suplementados com ômega-3. A suplementação com ômega-3 foi feita por meio de gavagem, durante 15 dias antes da indução da infecção endodôntica e durante 30 dias depois da indução, totalizando 45 dias de suplementação. A infecção endodôntica foi induzida por meio de exposição pulpar dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito de cada animal. Após 30 dias, foram coletados o sangue, as maxilas e as mandíbulas. As peças foram processadas para análise histológica e histométrica da periodontite apical. Os resultados das diferentes análises e a correlação entre os achados

locais e sistêmicos foram analisados por testes estatísticos específicos para cada caso ($p < 0,05$). A análise do sangue foi realizada em todos os ratos com 30 dias de pós-operatório. Os níveis de triglicérides totais foram estatisticamente mais elevados no grupo IE quando comparado com os grupos C ($p = 0,025$) e IE + O ($p = 0,017$). Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada nos níveis de triglicérides dos grupos IE + O e C ($p = 0,918$). Nas análises histométrica e histológica das periodontites apicais realizadas, foi possível observar um menor infiltrado inflamatório, bem como uma menor área de reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais no grupo IE + O, quando comparado ao grupo IE. Os resultados mostraram que a presença de múltiplos focos de periodontite apical aumenta os níveis de triglicérides em ratos, e que, a suplementação alimentar com ácido graxo ômega-3 é capaz de reduzir esses níveis de triglicérides, assim como a reabsorção óssea decorrente da infecção endodôntica.

Palavras-chave: Periodontite apical, ômega-3, infecção endodôntica.

CARDOSO, CBM. **Effect of dietary supplementation with omega-3 in triglyceride levels and bone resorption Wistar rats with endodontic infection.** 2016. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Abstract

Previous studies from our research group (FAPESP No. 2012 / 02083-8 and No. 2012 / 02565-2; PROPe-UNESP 005/2011) demonstrated in an animal model that endodontic infection has effects on systemic health (Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014;.. Cintra et al., 2014b; Cintra et al., 2014c), and certain systemic diseases can modulate the development of endodontic infection (Cintra et al., 2013; 2014abc). In addition, more recent studies by our group have demonstrated that the presence of multiple foci of endodontic infection is able to change some systemic parameters such as inflammatory cells, proinflammatory cytokines and triglyceride levels (Cintra et al., 2016). Thus, we believe it is important to study therapies able to modulate the resulting bone resorption process of endodontic infection, in order to minimize its systemic effects. The aim of this study was to determine whether dietary supplementation with omega-3 fatty acids can reduce the rat triglyceride levels with multiple periodontitis apical and verify that the omega-3 changes the process of bone resorption of the periapical tissues. 40 rats were divided into 4 groups of 10 animals each: C - control rats; C + O – rats supplemented with omega-3; EI - rats with endodontic infection; EI + O – rats with endodontic infection supplemented with omega-3. The supplementation with omega-3 was made by gavage for 15 days before induction of endodontic infections and for 30 days after the induction, total of 45 days of supplementation. The endodontic infection was induced by pulp exposure of the first and upper second molars and lower right of each animal side. After 30 days, they collected blood, the jaws and the mandible. The pieces were processed for histological and histometric analysis of apical periodontitis. The results of the different analyzes and the correlation between local and systemic findings were analyzed by statistical tests specific for each case ($p < 0.05$). The blood analysis was performed in all rats

30 days after surgery. The total triglyceride levels were significantly higher in the IE group compared with C group ($P = 0.025$) and IE + O ($p = 0.017$). No statistically significant difference was found in triglyceride levels of IE + O and C groups ($p = 0.918$). In histometric and histological analysis of the apical periodontitis conducted, we observed a lower inflammatory infiltrate and a smaller area of bone resorption with the periapical tissues in IE + O group, when compared to IE group. The results showed that the presence of multiple apical periodontitis foci increases triglyceride levels in rats, and that dietary supplementation with omega -3 can reduce these levels of triglycerides, as well as bone resorption resulting from endodontic infection.

Keywords: apical periodontitis, omega 3, endodontic infection.

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	11
2 -	PROPOSIÇÃO	13
3 -	MATERIAL E MÉTODOS	13
4 -	RESULTADOS	20
5 -	DISCUSSÃO	35
6 -	CONCLUSÃO	37
7 -	REFERÊNCIAS	37
8 -	ANEXOS	42

1 Introdução

Uma das consequências da infecção endodôntica é o desenvolvimento da periodontite apical (Colic et al., 2010) que é caracterizada histologicamente por um tecido granulomatoso infiltrado por diferentes tipos de células inflamatórias (Lukic et al., 2008). Tais lesões são formadas devido à resposta do hospedeiro ao estímulo antigênico contínuo oriundo dos canais radiculares infectados (Zhang et al., 2005; Xiong et al., 2009). A resposta do hospedeiro envolve o recrutamento de diferentes células inflamatórias e a participação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos, incluindo a produção de citocinas (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010). Sabe-se que estas citocinas são sintetizadas em resposta à presença de bactérias e seus produtos, os quais induzem e mantêm a resposta inflamatória (Xiong et al., 2009; Colic et al., 2010; Fan et al., 2011), que se mostram associadas à degradação da matriz extracelular e posteriormente à reabsorção óssea (Nair, 2004; Graves et al., 2011).

Estudos epidemiológicos realizados em todo o mundo mostraram que a periodontite apical está presente em 22-65% dos dentes tratados endodonticamente (Siqueira et al., 2005; Dugas et al., 2003). Além disso, a população brasileira apresentou uma média de 2,7 periodontites apicais presentes por indivíduo (Marota et al., 2012), denotando ser comum a presença de mais de um foco de infecção em um mesmo paciente.

A influência da infecção endodôntica na saúde sistêmica tem sido alvo de intensos estudos de nosso grupo de pesquisa (Astolphi et al., 2013; Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014 a; Cintra et al., 2014b; Cintra et al., 2014c). Em um primeiro estudo observamos que apenas um dente portador de periodontite apical não foi capaz de alterar o nível de triglicérides ou colesterol de forma isolada (Cintra et al., 2013). Entretanto, quando associada a doença periodontal observamos a potencialização dos efeitos locais sobre os níveis sistêmicos de triglicérides (Cintra et al., 2013).

Em estudo posterior, (Processo Fapesp 2013/23358-8), observamos que a presença de quatro focos de infecção endodôntica se mostrou capaz de influenciar diferentes parâmetros sanguíneos que até então não eram possíveis de ser

observados quando da manifestação de apenas um foco de infecção (Cintra et al., 2016). Em um outro estudo (Processo Fapesp 2013/26390-0), verificamos que a suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 foi capaz de diminuir a quantidade de células inflamatórias presentes no sangue de ratos com quatro focos de infecção endodôntica. Assim, julgamos importante avaliar, também, se a suplementação com o ácido graxo ômega-3 é capaz de diminuir os níveis de triglicérides de ratos com infecção endodôntica.

Neste sentido, o ácido graxo ômega-3, possui efeitos positivos e tem sido relatado em vários modelos animais de doenças ósseas (Li et al., 1999; Watkins et al., 2000), assim como em estudos em humanos referentes a osteoporose senil (Kruger et al., 1998), além do efeito positivo comprovado para o tratamento coadjuvante da doença periodontal (Vardar, 2004; Kesavalu, 2000; Iwasaki et al., 2010; El-Sharkawy et al., 2010). Tendo em vista que o mecanismo imunológico da doença periodontal é semelhante ao da periodontite apical (Rupf et al. 2000) e que as vias biológicas que fazem a ligação entre a doença periodontal crônica e desordens sistêmicas são as mesmas que podem ligar a periodontite apical crônica e a saúde geral (Silva et al., 2007), acreditamos ser de grande importância estudar os efeitos sistêmicos da suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 em ratos com periodontite apical.

O óleo de peixe é a principal fonte do ácido graxo ômega-3, que é o maior ácido graxo poliinsaturado, que tem como componentes o ácido eicosapentanoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). EPA e DHA competem com o ácido araquidônico nas vias lipoxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX), o que resulta na redução da síntese de metabólitos pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (Kragballe et al., 1987; Kragballe et al., 1989). Assim, o ômega-3 mostra efeitos anti-inflamatórios, anti-trombótico, anti-arritmico, hipolipemiantes e vasodilatadores. Devido a essas propriedades, é indicado no tratamento de algumas doenças anti-inflamatórias crônicas, como artrite reumatoide e psoríase (Bittiner et al., 1988; Ariza et al., 1998).

Uma abrangente revisão da literatura mostrou que a utilização do ácido graxo ômega -3 na prevenção secundária de hipertrigliceridemias é forte (Lewis et

al., 2004). Além disso, a evidência atual sugere que o ômega-3 é uma adição útil para as opções de tratamento disponíveis para pacientes com hipertrigliceridemia grave (Blair et al., 2014). Tais estudos evidenciam que a dieta com ômega-3 leva à diminuição dos níveis de triglicérides (Lewis et al., 2014; Blair et al., 2014). Assim, a proposta do presente estudo visa avaliar se a administração de ômega-3 pode reduzir os níveis de triglicérides de ratos Wistar com ou sem periodontite apical, bem como se é capaz de minimizar o processo de reabsorção óssea, dos tecidos periapicais, decorrente da infecção endodôntica.

2 Proposição

- Verificar a influência da suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 sobre os níveis de triglicérides em ratos com ou sem periodontite apical.
- Verificar a influência da suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 no processo de reabsorção óssea dos tecidos periapicais de ratos com infecção endodôntica.

3 Material e métodos

3.1 Material

Foram utilizados 40 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar), pesando aproximadamente 250g, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP. Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco-Monte Mor, São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, quatro ratos por gaiola, alimentados durante todo o período experimental com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 24 horas após intervenção. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo foram aprovados pela comissão de conduta e ética no uso de animais em experimentação (CEUA – 2014-00550 FOA/Unesp).

3.2 Métodos

3.2.1 Suplementação alimentar

Os ratos (grupos C+O e IE+O) receberam, por meio de gavagem, o ácido graxo ômega-3, na proporção de 40mg/kg (60% EPA + 40%DHA), 15 dias antes da exposição pulpar e 30 dias depois, totalizando 45 dias de suplementação.

3.2.2 Indução das lesões periapicais

Para a indução das lesões periapicais, 20 ratos (grupos IE e IE+O) foram anestesiados, via intra-muscular, com uma associação do sedativo Dopaser, à base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo), na dosagem de 10mg/kg de peso corporal e o anestésico Vetanarcol, à base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 80mg/kg de peso corporal. As polpas dos primeiros e segundos molares superiores e inferiores do lado direito foram expostas, por meio de uma broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck- Maillefer, Dentsply) dotada de uma esfera na extremidade com 0,1mm de diâmetro. Desta forma, todas as exposições pulpares foram padronizadas com 0,1mm de diâmetro (Cintra et al., 2012) e as polpas ficaram expostas na cavidade bucal por um período de 30 dias, momento da eutanásia.

3.2.3 Divisão em grupos

Os 40 ratos em estudo foram divididos em quatro grupos experimentais, contendo 10 animais cada grupo, assim compostos:

- Ratos controle (C): ratos sem exposição pulpar e sem suplementação com ômega-3;

- Ratos controle + suplementação alimentar (C+O): ratos sem exposição pulpar com suplementação com ômega-3;
- Ratos com exposição pulpar realizada há 30 dias (IE): ratos portadores de periodontite apical sem suplementação com ômega-3;
- Ratos com exposição pulpar realizada há 30 dias + suplementação alimentar (IE+O): ratos portadores de periodontite apical com suplementação com ômega-3

3.2.4 Coleta de Material para análise

Coleta de sangue

Após 30 dias, os animais foram eutanaziados com uma sobredose de solução anestésica (tiopental via intraperitoneal). Para determinar o perfil lipídico do soro, amostras de sangue venoso (50 ul) foram coletadas através de punção cardíaca após um jejum de 8-12h dos ratos. As amostras de sangue foram centrifugadas imediatamente após a coleta, a 1.800 x g durante 15 min a 4 ° C para se obter o plasma. Os níveis de colesterol total e triglicérides plasmáticos foram medidos enzimaticamente usando um kit comercial (colesterol e triglicérides Liquiform Labtest® Liquiform Labtest®, respectivamente Labtest Diagnóstica - Ind. E Com. Ltda, Lagoa Santa , MG, Brasil), como descrito por Trinder.

Os valores totais avaliados foram tabulados para cada grupo experimental e foram submetidos ao teste Análise de variância (ANOVA Two Way), e para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Tukey com nível de significância de 5%.

A análise do sangue foi realizada em todos os ratos com 30 dias de pós-operatório. O efeito do ômega-3 sobre o perfil lipídico plasmático de ratos com periodontite apical (grupo IE + O) foi investigado, e, em seguida, comparado com os resultados correspondentes aos ratos normais, sem suplementação alimentar

com ômega-3 (grupo C) e ratos com periodontite apical sem suplementação (grupo IE).

Coleta da maxila e mandíbula

Após a eutanásia, toda a pele correspondente à face direita do animal foi removida e foram realizados dois cortes, realizados com tesoura, no ângulo da boca, separando a maxila da mandíbula. Foi realizada uma incisão, com lâmina de bisturi intercambiável número 15, em profundidade no palato do animal, com localização no plano sagital mediano acompanhando a sutura intermaxilar, separando a maxila esquerda da direita. Separadas as maxilas, com o auxílio de uma tesoura, foi realizado outro corte com localização tangente a face distal dos molares superiores direito e esquerdo, possibilitando a obtenção da hemi-maxila direita, contendo os dentes posteriores, objeto do estudo. A hemi-mandíbula direita, contendo os dentes posteriores, também foi separada para o estudo.

3.2.5. Processamento histológico

As hemi-maxilas direitas foram colocadas imediatamente em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 18 horas e depois lavadas em água corrente por um período de 12 horas para a remoção de toda a solução de fixação. Após a fixação, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA a 10%. Posteriormente, as hemi-maxilas foram lavadas em água corrente por 24 horas, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos primeiros molares inferiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal. Após a inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 5 µm de espessura, realizados em micrômetro (Leica- RM 2045).

3.2.6. Forma de análise dos resultados

Quantificação de triglicérides

A avaliação da dosagem de triglicérides e colesterol permitiu avaliar a quantidade de gordura no sangue de ratos normais. Nessa dosagem foi utilizado o método Enzimático de Trinder.

Para a determinação dos triglicérides foi empregado o kit de Triglicérides Liquiform Labtest®. A lipoproteína lipase promoveu a hidrólise dos triglicérides liberando glicerol, que foi convertido, pela ação da gliceroquinase, em glicerol-3-fosfato. Este foi oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença da glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorreu uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 540 nm. A intensidade da cor vermelha formada foi diretamente proporcional à concentração dos triglicérides na amostra.

Para a dosagem de colesterol foi empregado o kit de Colesterol Liquiform Labtest (Labtest Diagnóstica Ind. e Com. Ltda, Lagoa Santa, MG, Brazil). Os ésteres do colesterol são hidrolisados pela colesterol esterase (CHE) formando colesterol livre que após oxidação pela colesterol oxidase (CHOD) forma peróxido de hidrogênio. Este, reagindo com o fenol e 4-aminoantipirina, através de copulação oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), produz uma quinonimina de cor vermelha. A absorbância do complexo formado, medida em 500 nm, é diretamente proporcional à concentração de colesterol da amostra.

Análise histológica e histométrica das lesões periapicais

Para a análise histológica foram empregadas 5 lâminas com 3 cortes teciduais cada, preparadas e coradas com hematoxilina e eosina (Lillie, 1954). A análise histológica foi necessária para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (Cintra et al., 2013c). Os resultados foram expostos por meio de duas análises, sendo uma descritiva e outra quantitativa. As lâminas contendo os

cortes representativos de cada espécime foram avaliadas sob a microscopia óptica e utilizadas na análise descritiva. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Cintra et al., 2013c).

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada e da análise histométrica das estruturas do periodonto apical (Cintra et al. 2013c). As variáveis estudadas foram: infiltrado inflamatório quanto à sua intensidade e extensão; presença de reabsorções radiculares e perda de estrutura óssea periapical. Foram atribuídos escores para os critérios intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e para a presença de reabsorções radiculares. Para a perda de estrutura óssea foi realizada a mensuração linear e por área, respectivamente, empregando programa de imagens específico (Leica QWin Plus - Leica Microsystems, Nussloch – Germany).

Os critérios considerados para cada análise foram:

- **Intensidade do infiltrado inflamatório**

A intensidade do processo inflamatório foi analisada em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário (**Quadro A**).

Quadro A – Escores para o critério intensidade do infiltrado inflamatório

Escore 1	Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
Escore 2	Infiltrado inflamatório discreto (menos de 10 células por campo);
Escore 3	Infiltrado inflamatório moderado (entre 10 e 25 células por campo);
Escore 4	Infiltrado inflamatório intenso (mais que 25 células por campo).

- **Extensão do infiltrado inflamatório**

A extensão do infiltrado inflamatório foi estabelecida em função da alteração do tecido periapical (**Quadro B**).

Quadro B – Escores para o critério extensão do infiltrado inflamatório

Escore 1	Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível;
Escore 2	Células inflamatórias ocupando extensão de até 300µm do ápice radicular;
Escore 3	Células inflamatórias ocupando extensão de até 600µm do ápice radicular;
Escore 4	Células inflamatórias ocupando extensão maior que 600µm do ápice radicular.

- **Presença de reabsorções radiculares**

A presença de reabsorções radiculares foi analisada em conformidade com o número médio de lacunas de reabsorção presentes em diferentes campos, de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário (**Quadro C**).

Quadro C – Escores para o critério presença de reabsorções radiculares

Escore 1	Ausência de Lacunas de reabsorção;
Escore 2	Presença discreta de lacunas de reabsorção cementária (menos de 3 lacunas por campo);
Escore 3	Presença moderada de lacunas de reabsorção cementária e reabsorção dentinária ao acaso (mais de 3 e menos que 6 lacunas por campo);
Escore 4	Presença intensa de lacunas de reabsorção cementária e

reabsorção dentinária (mais que 6 lacunas por campo).

- **Perda de estrutura óssea**

Foram selecionados cortes representativos de cada espécime dos grupos com suplementação com ômega-3 (Grupo IE + O) e com periodontite apical e sem suplementação com ômega-3 (Grupo IE) para a verificação se houve diferença na perda óssea de ratos que fizeram ou não o uso de ômega-3. Foi empregado o software Leica QWin Plus (Leica Microsystems, Nussloch – Germany) e os valores foram expressos em micrometro quadrado (μm^2) obtidos em medidas de área.

4 Resultados

4.1 Análise do perfil lipídico

As alterações na concentração de lipídeos no plasma dos ratos podem ser observadas na tabela 1 e figura 1. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de colesterol entre nenhum grupo ($p > 0,05$).

Os níveis de triglicérides foram, estatisticamente, mais elevados no grupo IE quando comparado com os grupos C ($P = 0,025$) e IE + O ($P = 0,017$). Nenhuma diferença estatística foi encontrada nos níveis de triglicérides dos grupos IE + O e C ($p = 0,918$).

Figura 1. Média e desvio padrão (média $\pm$ DP) valores dos níveis de colesterol e triglicérides no sangue (em miligramas por decilitro) dos ratos dos quatro grupos.

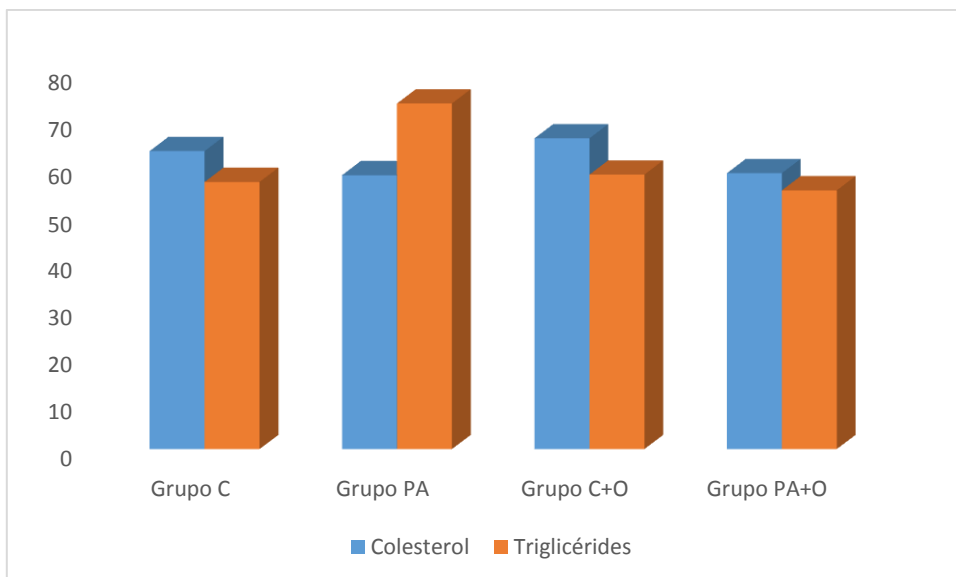


Tabela 1. Médica e desvio padrão (médica ± DP) valores dos perfis lipídicos dos ratos dos quatro grupos

Grupos	Perfil Lipídico (médica±DP)*	
	Níveis de Colesterol	Níveis de Triglicérides
C	63.3 ± 10.10 ^a	56.78 ± 13.89 ^a
C+O	66±7,86 ^a	58,33±17,82 ^a
IE	58.2 ± 6.86 ^a	73.38 ± 19.60 ^b
IE+O	58.63 ± 3.96 ^a	55.0 ± 8.54 ^a

* Letras iguais nas colunas indicam a ausência de diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$).

4.2 Análise histológica

GRUPO 1 – Controle

Observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. As estruturas pré-dentinária e dentinária apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou polpa jovem com potencial de reparo. O cimento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual. Este grupo serviu de parâmetro para a análise dos demais onde o comprometimento das estruturas dentárias, de suporte ou sustentação foi avaliado.

Tabela 2 – Escores e valores atribuídos ao grupo 1 em função dos critérios de análise

		Intensidade da Inflamação				Extensão da Inflamação				Perda de Estrutura óssea	Reabsorções radiculares			
		1	2	3	4	1	2	3	4	µm	1	2	3	4
E s p é c i m e s	1	X				X				0000,0	X			
	2	X				X				0000,0	X			
	3	X				X				0000,0	X			
	4	X				X				0000,0	X			
	5	X				X				0000,0	X			
	6	X				X				0000,0	X			
	7	X				X				0000,0	X			
	8	X				X				0000,0	X			
	9	X				X				0000,0	X			
	10	X				X				0000,0	X			

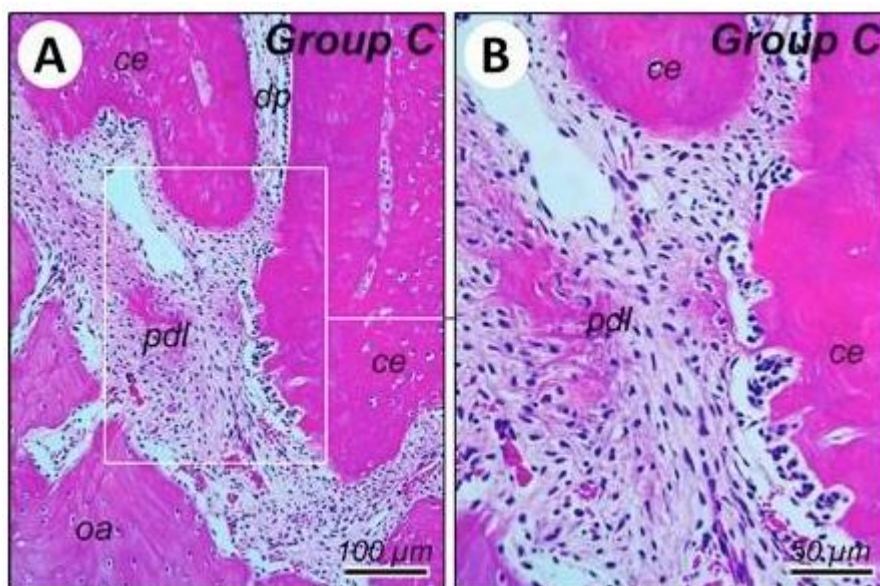


Figura 2 - Imagem representativa de espécime do grupo 1: Aspecto panorâmico do elemento dentário murinho evidenciando normalidade nos tecidos pulpare e periapicais. Observa-se também, epitélio juncional, inserção conjuntiva, ligamento periodontal e crista óssea alveolar com aspectos de normalidade e integridade tecidual [10x - H.E.].

GRUPO 2 – ratos suplementados com ômega-3

Assim como no grupo C, observou-se tecido pulpar com aspectos de normalidade denotando homeostasia pulpar. As estruturas pré-dentinária e dentinária apresentaram-se íntegras e dispostas em continuidade com a camada de odontoblastos, também organizada. Poucas células inflamatórias estavam dispersas e, ao acaso, caracterizando ausência de inflamação. Os vasos sanguíneos apresentavam-se congestionados e a densidade do fibrosamento caracterizou pulpa jovem com potencial de reparo. O cemento, ligamento e osso alveolar apresentaram-se íntegros e isentos de processo inflamatório ou reabsorção. A inserção conjuntiva e o epitélio juncional demonstraram aspectos de normalidade e integridade tecidual.

Tabela 3 – Escores atribuídos ao grupo 2 em função dos critérios de análise

		Intensidade da Inflamação				Extensão da Inflamação				Perda de Estrutura óssea	Reabsorções dentárias			
		1	2	3	4	1	2	3	4	μm	1	2	3	4
E s p é c i m e s	1	X				X				0000,0	X			
	2	X				X				0000,0	X			
	3	X				X				0000,0	X			
	4	X				X				0000,0	X			
	5	X				X				0000,0	X			
	6	X				X				0000,0	X			
	7	X				X				0000,0	X			
	8	X				X				0000,0	X			
	9	X				X				0000,0	X			
	10	X				X				0000,0	X			

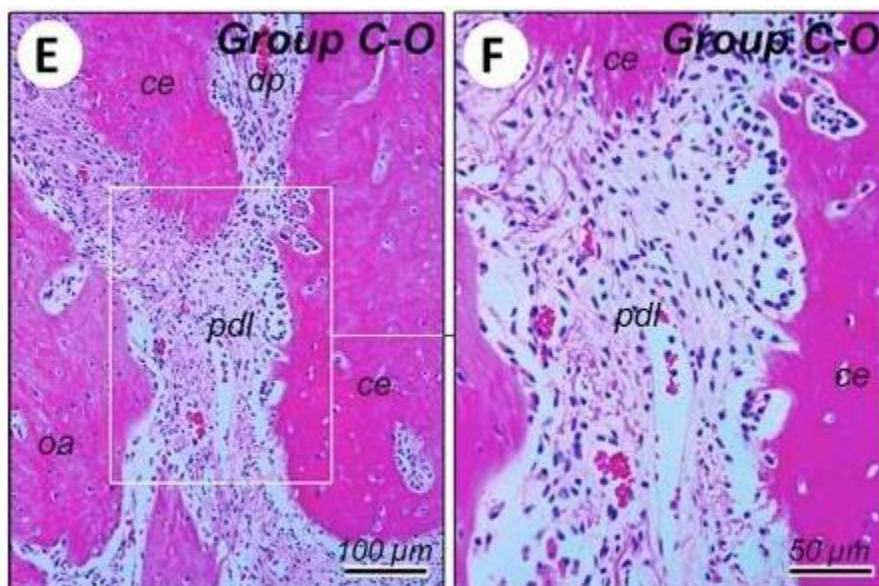


Figura 3 - Imagem representativa de espécime do grupo 2: Aspecto panorâmico do elemento dentário murinho evidenciando normalidade nos tecidos pulpare e periapicais. Observa-se também, epitélio juncional, inserção conjuntiva, ligamento

periodontal e crista óssea alveolar com aspectos de normalidade e integridade tecidual [10x - H.E.].

GRUPO 3 – ratos com infecção pulpar - IE

Pôde-se observar em todos os espécimes analisados presença de tecido necrosado em toda a cavidade pulpar com extensão ao periápice dentário. Observou-se a predominância de infiltrado inflamatório do tipo crônico de característica severa em 6 dos 10 espécimes. Em 4 casos evidenciou-se inflamação moderada. Em 6 espécimes pôde-se observar a presença de reabsorção cementária, dentinária e óssea de grande extensão, e, 4 espécimes com moderada perda de estruturas. A região do ligamento periodontal, junto ao vértice apical, apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação subjacente em todos os casos. Todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical com origem devido à necrose pulpar. O periodonto lateral apresentou-se integro em todos os espécimes.

Tabela 4 – Escores e medidas atribuídas ao grupo 3 em função dos critérios de análise

		Intensidade da Inflamação				Extensão da Inflamação				Perda de Estrutura óssea	Reabsorções dentárias			
		1	2	3	4	1	2	3	4	μm^2	1	2	3	4
E s p é c i m e s	1			X					X	0778968,7			X	
	2				X				X	0612112,4			X	
	3				X			X		0960682,2			X	
	4			X				X		0917341,1				X
	5				X				X	1561302,6				X
	6				X				X	0802734,6				X
	7			X					X	0337514,0				X
	8				X				X	0789354,0			X	
	9			X					X	0876590,0				X
	10				X			X		0845612,5				X

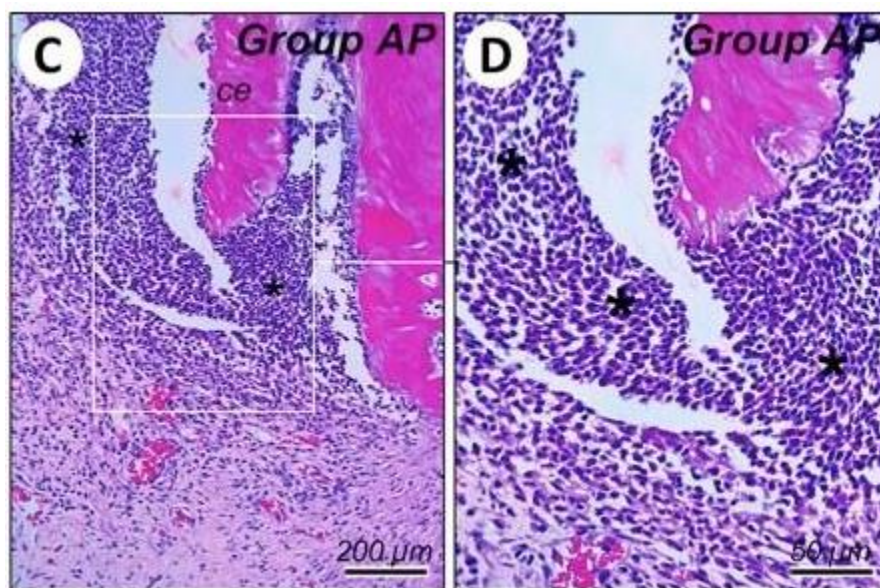


Figura 4 - Imagens representativas de espécime do grupo 3: **(A)** Aspecto microscópico panorâmico do periápice dentário evidenciando presença de inflamação, desorganização do ligamento periodontal e extensa área de

reabsorção óssea [50x - H.E.]; **(B)** Periápice dentário evidenciando presença de infiltrado inflamatório moderado de predominância crônico [100x - H.E.].

GRUPO 4 – ratos com infecção pulpar suplementados com ômega 3

De forma semelhante ao grupo 3, observou-se em todos os espécimes, tecido necrosado em toda a cavidade pulpar, e canal radicular, estendendo-se ao periápice dentário. Junto ao periápice evidenciou-se a predominância de infiltrado inflamatório do tipo crônico de intensidade moderada em 6 espécimes e leve em 4. A extensão da inflamação foi leve na maioria dos casos (8 espécimes). Em todos eles, observou-se a presença de reabsorção cementária e dentinária na superfície apical e em regiões de ramificações radiculares, tendo 8 espécimes reabsorções moderadas, um espécime apresentando uma leve reabsorção e o outro uma severa reabsorção. Junto ao tecido ósseo foram encontradas lacunas de reabsorção ativa em toda a periferia do granuloma. A região do ligamento periodontal e região óssea subjacente apresentou-se desorganizada, com presença de tecido necrosado e inflamação em todos os casos. Assim como observado no grupo 3, todas as lesões encontradas foram de características compatíveis com granuloma periapical.

Tabela 5 – Escores atribuídos ao grupo 4 em função dos critérios de análise

		Intensidade da Inflamação				Extensão da Inflamação				Perda de Estrutura óssea	Reabsorções dentárias			
		1	2	3	4	1	2	3	4	μm^2	1	2	3	4
E s p é c i m e s	1			X			X			0553935,3			X	
	2		X				X			0388453,8			X	
	3			X			X			0853147,9			X	
	4			X			X			0487069,7		X		
	5		X					X		0451895,2			X	
	6			X				X		0174695,7			X	
	7			X			X			0563327,8			X	
	8		X				X			0461895,2				X
	9		X				X			0399469,3			X	
	10			X			X			0324649,7			X	

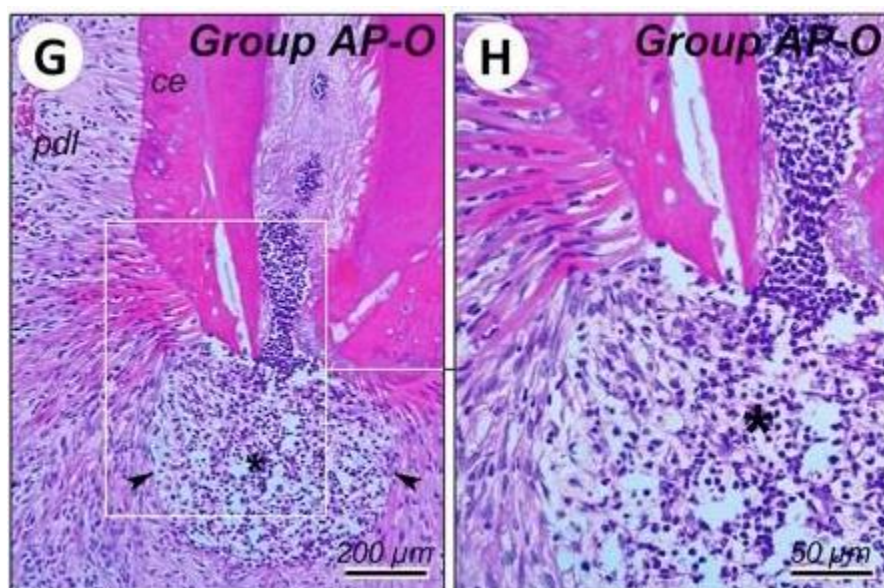


Figura 5 - Imagens representativas de espécime do grupo 4: **(A)** Aspecto panorâmico do periápice dentário evidenciando intensa concentração celular inflamatória junto ao forame principal, desorganização do ligamento periodontal e

área de reabsorção óssea [50x - H.E.]; **(B)** Em maior aumento, infiltrado inflamatório junto ao periápice dentário [100x - H.E.].

4.2 Análise Estatística

Com relação à intensidade do infiltrado inflamatório realizou-se o teste estatístico de Kruskal Wallis entre os grupos C, O, IE e IE+O e observou-se que ambos os grupos com infecção apresentaram diferenças em relação ao controle e ao grupo O (ômega sem infecção) ($p < 0,05$). Entretanto, apesar de apresentarem medianas 4 (IE) e 3 (IE+O) os grupos experimentais não foram diferentes entre si quanto a este critério (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste não paramétrico de Kruskal Wallis para os grupos C, O, IE e IE+O considerando o critério intensidade do processo inflamatório

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	N. de valores
g1	1.00000000	105.000000	10.5000000	10
g2	1.00000000	105.000000	10.5000000	10
g3	4.00000000	343.000000	34.3000000	10
g4	3.00000000	267.000000	26.7000000	10

Hc = 36.68052 Quiquadrado com 3 graus de liberdade
 Probabilidade = 0.000000

Teste de Dunn para comparações individuais
 Nível de significância = 0.05

Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação
g1 X g2	0.00000000	13.4316952	Não signific.

g1 X g3	-23.800000	13.4316952	SIGNIFICANTE
g1 X g4	-16.200000	13.4316952	SIGNIFICANTE
g2 X g3	-23.800000	13.4316952	SIGNIFICANTE
g2 X g4	-16.200000	13.4316952	SIGNIFICANTE
g3 X g4	7.60000000	13.4316952	Não signific.

Diante deste resultado, optou-se em realizar o teste de Mann Whitney isolando apenas os grupos portadores de infecção (IE e IE+O), observando diferença entre eles quanto ao critério intensidade do infiltrado inflamatório ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Teste de Mann Whitney para os grupos IE e IE+O quanto ao critério intensidade do infiltrado inflamatório

Grupo	Média	Mediana	Soma de postos	Posto médio	Número
g3	3.60000000	4.000000	143.0	14.3	10
g4	2.60000000	3.000000	67.0	6.7	10

U = 12.0000000 Probab. exata = 0.002880

Aproximação normal: Z = 3.13026698

Probabilidade = 0.00174647

Hipótese alternativa : $g3 < g4$

Diante deste teste que restringe 2 grupos pode-se inferir que a suplementação com o ácido graxo ômega-3 minimizou a intensidade do processo inflamatório decorrente da exposição da infecção pulpar.

Com relação à extensão do infiltrado inflamatório realizou-se o teste estatístico de Kruskal Wallis entre os grupos C, O, IE e IE+O e observou-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,00\dots$). O grupo controle (C), assim como o grupo ômega (O), foram semelhantes entre si e diferentes dos grupos IE e IE+O ($p<0,05$). Entretanto, apesar de medianas 4 e 2, respectivamente para os grupos IE e IE+O, não observou-se diferença significativa entre eles (Tabela 8).

Tabela 8 - Teste não paramétrico de Kruskal Wallis para os grupos C, O, IE e IE+O considerando o critério extensão do processo inflamatório

Grupo	Mediana	Soma de postos	Posto médio	n
g1	1.00000000	105.000000	10.5000000	10
g2	1.00000000	105.000000	10.5000000	10
g3	4.00000000	352.000000	35.2000000	10
g4	2.00000000	258.000000	25.8000000	10
Hc = 37.78194 Quiquadrado com 3 graus de liberdade				
Probabilidade = 0.000000				
Teste de Dunn para comparações individuais Nível de significância = 0.05				
Comparação	Diferença	Valor crítico	Interpretação	
g1 X g2	0.00000000	13.4316952	Não signific.	
g1 X g3	-24.700000	13.4316952	SIGNIFICANTE	
g1 X g4	-15.300000	13.4316952	SIGNIFICANTE	
g2 X g3	-24.700000	13.4316952	SIGNIFICANTE	
g2 X g4	-15.300000	13.4316952	SIGNIFICANTE	
g3 X g4	9.40000000	13.4316952	Não signific.	

Diante deste resultado, optou-se em realizar o teste de Mann Whitney isolando apenas os grupos portadores de infecção (IE e IE+O), observando diferença entre eles quanto ao critério extensão do infiltrado inflamatório ($p < 0,05$) (Tabela 9).

Tabela 9 - Teste de Mann Whitney para os grupos IE e IE+O quanto ao critério extensão do infiltrado inflamatório

Grupo	Média	Mediana	Soma de postos	Posto médio	Número
g3	3.70000000	4.000000	152.0	15.2	10
g4	2.20000000	2.000000	58.0	5.8	10

U = 3.00000000 Probab. exata = 0.000076

Aproximação normal: Z = 3.78801528

Probabilidade = 0.00015185

Hipótese alternativa : g3 <> g4

Diante deste teste que restringe 2 grupos pode-se inferir que a suplementação com ômega-3 minimizou a extensão do processo inflamatório decorrente da exposição da infecção pulpar.

Com relação à perda de estrutura óssea, realizou-se o teste estatístico “t” de Student entre os grupos que foram induzidos à infecção endodôntica (IE e IE+O), sendo excluídos os grupos controle e ômega da análise estatística por não apresentarem valores neste critério. O grupo IE obteve média de perda óssea no valor de $848221.2 \mu\text{m}^2$, enquanto o grupo IE+O apresentou média de $465853.9 \mu\text{m}^2$. Quando submetidos à análise estatística, foi observado diferença significativa entre os 2 grupos experimentais ($p = 0,003$). (Tabela 10). Diante deste

resultado pode-se confirmar que a suplementação com ômega-3 minimizou a perda de estrutura óssea periapical decorrente da infecção pulpar.

Tabela 10 - Teste "t" de Student - (Duas amostras independentes) para os grupos IE e IE+O considerando a perda de estrutura óssea periapical

Grupo	Média	Desvio padrão	Número de valores
g3	848221.2	307972.0	10
g4	465853.9	177334.0	10
Diferença de medias = 382367.2 Desvio padrão da dif. = 112380.6			
Valor de "t" = 3.40242893			
Graus de liberdade = 18			
Probabilidade = 0.003174 Hipótese alternativa : g3 <> g4			

Os resultados das análises estatísticas, bem como as medianas e o número de escores por critério de análise e as médias da análise histométrica, além da interpretação do teste estatístico, apresentam-se resumidos na tabela 11.

Tabela 11 – Escores, medianas e medidas atribuídas aos diferentes grupos considerando os parâmetros de análise histológica

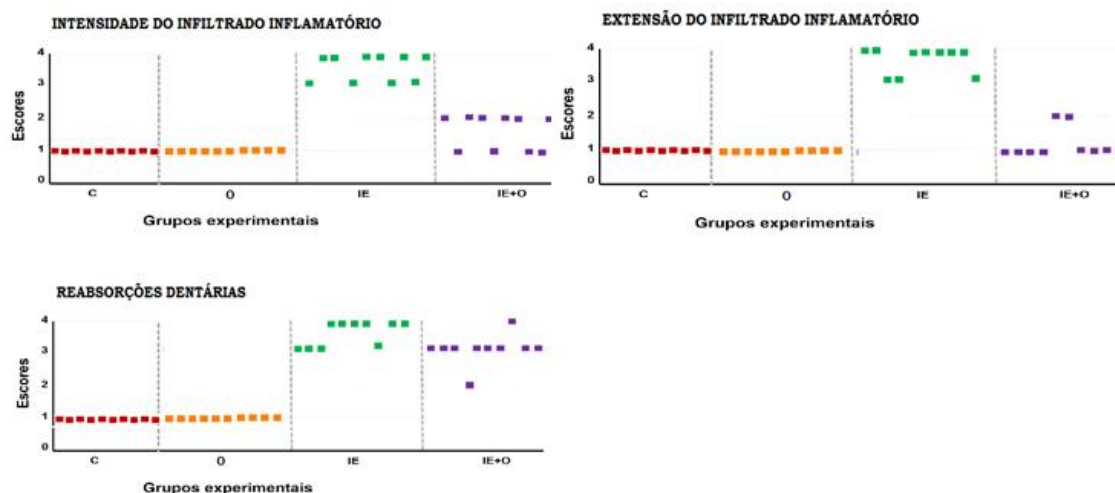
Parâmetros histológicos		Grupos				Análise estatística
		C	O	IE	IE + O	
Intensidade do processo inflamatório	1 - Ausente	10/10	10/10	0/10	0/10	Kruskal Wallis C x IE x IE+O $p = 0,000...$
	2 – Discreto	0/10	0/10	0/10	4/10	
	3 - Moderado	0/10	0/10	4/10	6/10	
	4 - Intenso	0/10	0/10	6/10	0/10	
	Mediana	1 ^A	1 ^A	4 ^{Ba}	3 ^{Bb}	Mann Whitney IE x IE+O: $p = 0.001$

Extensão do processo inflamatório	1 - Ausente	10/10	10/10	0/10	0/10	Kruskal Wallis C x IE x IE+O <i>p</i> = 0,000...
	2 - até 300µm	0/10	0/10	0/10	8/10	
	3 - até 600µm	0/10	0/10	3/10	2/10	
	4 - + 600µm	0/10	0/10	7/10	0/10	Mann Whitney IE x IE+O: <i>p</i> = 0.000...
	Mediana	1 ^A	1 ^A	4 ^{Ba}	2 ^{Bb}	
Presença de reabsorções dentárias	1 - Ausente	10/10	10/10	0/10	0/10	Mann Whitney IE x IE+O: <i>p</i> = 0.003
	2 - menos de 3	0/10	0/10	1/10	0/10	
	3 - entre 3 e 6	0/10	0/10	8/10	4/10	
	4 - acima de 6	0/10	0/10	1/10	6/10	
	Mediana	1	1	3	4	
Histometria da Lesão periapical (×10.000 µm ²)		-	84,82 ± 30,79 ^a	46,58 ± 17,73 ^b	“t” de Student <i>p</i> = 0.028	

* letras diferentes, em maiúsculo sobrescritas, representam diferença estatística entre os grupos para os testes de Kruskal Wallis

* letras diferentes, em minúsculo sobrescritas, representam diferença estatística entre os grupos para os testes de Mann Whitney e "t de Student

Figura 6 – Escores atribuídos aos critérios em análise



5 Discussão

A periodontite apical foi induzida através da exposição pulpar de molares de ratos, permitindo uma posterior infecção bacteriana a partir do ambiente oral

(Cintra et al., 2013; Cintra et al., 2014). Esta exposição teve a duração de 30 dias, pois é um período de tempo suficiente para observar o desenvolvimento da periodontite apical e necrose pulpar completa (Cintra et al., 2014). Os ratos receberam tanto a administração profilática (15 dias antes da indução da IE) quanto a terapêutica de ômega-3 (30 dias após) (Vadar et al., 2003; Vadar et al., 2006), que de acordo com estudos anteriores, mostraram resultados mais positivos relacionados com a reabsorção óssea durante a doença periodontal. A administração profilática de ômega-3 durante duas semanas proporciona aumento máximo dos níveis de EPA e DHA em membranas celulares (Croft et al., 1987), que mantém a estabilidade da membrana e fluidez no estado fisiológico.

A hipercolesterolemia induz manifestações patológicas, tais como a diminuição da densidade capilar miocárdica e aumento de dano endotelial (Stapleton et al., 2010). Os pacientes que desenvolvem doenças periodontais têm mostrado um aumento dos níveis de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade e triglicérides (Katz et al., 2007; Yamamoto et al., 2011). Por outro lado, um estudo anterior realizado no modelo do rato mostrou que uma periodontite apical não alterou os níveis de colesterol em ratos (Cintra et al., 2013), o que está de acordo com os nossos resultados, onde a presença de quatro focos de periodontite apical não alterou o nível de colesterol total em ratos.

A hipertrigliceridemia está associada com o risco de doenças cardiovasculares de acordo com vários estudos epidemiológicos (Nordestgaard et al., 2007; Freiberg et al., 2008; Labreuche et al., 2009). Além disso, a diminuição de cada 1 mmol / L (88 mg / dl) nos níveis de triglicérides foi associada com uma diminuição do risco de doença cardíaca coronária em 14% dos homens e 37% das mulheres (Hokanson et al., 1996). Estudos anteriores mostraram que a presença e a gravidade de doenças periodontais alteraram os níveis de triglicérides em humanos, o que está de acordo com este estudo, em que foi observado um aumento nos níveis de triglicérides no soro de ratos na presença de quatro periodontites apicais (Lee et al., 2013; Penumarthy et al., 2013; Flores et al., 2014), mostrando que as infecções endodônticas podem influenciar na saúde

sistêmica. Por outro lado, outro estudo mostrou que apenas uma periodontite apical não alterou os níveis de triglicérides em rato (Cintra et al., 2013). Por conseguinte, a alteração sistêmica pode ser proporcional à quantidade de focos de infecção, mostrando que a presença de 4 focos de infecções endodônticas são capazes de causar tal alteração.

Neste estudo, a suplementação com ácido graxo ômega-3 reduziu os níveis de triglicérides em ratos com infecções endodôntica, o que pode ser explicado pelo fato de que o principal mecanismo de ação do ômega-3 representa a inibição direta da síntese de triglicérides e redução de lipoproteína de baixa densidade e secreção (Jacobson TA et al., 2008). Portanto, a dieta com o ácido graxo ômega-3 provou ser uma alternativa para reduzir os níveis de triglicérides em indivíduos com periodontite apical.

Na análise histológica, nosso estudo demonstrou que a extensão e a intensidade do infiltrado inflamatório, a reabsorção dentária e a reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais foi menor no grupo que continha infecção endodôntica, mas que foi suplementado com ômega-3, do que no grupo em que foi induzida a lesão periapical, mas que não recebeu tal suplementação. Isso se deve ao fato do óleo de peixe ser a principal fonte do ácido graxo ômega-3, que é o maior ácido graxo poliinsaturado, que tem como componentes o ácido eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). EPA e DHA competem com o ácido araquidônico nas vias lipoxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX), o que resulta na redução da síntese de metabólitos pró-inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos (Kragballe et al., 1987; Kragballe et al., 1989). Desta forma, os mediadores pró-inflamatórios são responsáveis pela ativação dos osteoclastos, porém, como tais mediadores estarão em menor quantidade devido à inibição causada pelo ômega-3, causará uma menor ativação dos osteoclastos e, conseqüentemente, uma menor reabsorção óssea.

6 Conclusão

Em conclusão, os resultados do nosso estudo mostraram que a presença de múltiplos focos de periodontite apical aumenta os níveis de triglicérides em ratos, e que a suplementação alimentar com ômega-3 pode reduzir esses níveis. Além disso, este ácido graxo também é capaz de reduzir o processo de reabsorção óssea junto aos tecidos periapicais causados pela presença da periodontite apical.

7 Referências

1. Ariza-Ariza R, Mestanza-Peralta M, Cardiel MH. Omega- 3 fatty acids in rheumatoid arthritis: An overview. *Semin Arthritis Rheum* 1998;27:366-370.
2. Astolpho RD, Curbete MM, Colombo NH, Shirakashi DJ, Chiba FY, Prieto AK, Cintra LT, Bomfim SR, Ervolino E, Sumida DH. Periapical lesions decrease insulin signal and cause insulin resistance. *J Endod*. 201;39:648-52.
3. Bittiner SB, Cartwright I, Tucker WFG, Blehen SS. A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of fish in psoriasis. *Lancet* 1988;3:378-380.
4. Blair HA, Dhillon S. Omega-3 carboxylic acids (Epanova): a review of its use in patients with severe hypertriglyceridemia. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2014;14:393-400.
5. Cintra LT, da Silva Facundo AC, Azuma MM, Sumida DH, Astolpho RD, Bomfim SR, Narciso LG, Gomes-Filho JE. Pulpal and periodontal diseases increase triglyceride levels in diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2013;17:1595-9.
6. Cintra LT, Facundo ACS, Prieto AKC, Sumida DH, Narciso LG, Bomfim SRM, Silva C, Dezan-Junior E, Gomes-Filho JE. Blood profile and histology in oral infections associated with diabetes. *J Endod*. 2014;40:1139-44. (a)
7. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Ribeiro CP, Narciso LG, de Lima VM, Sumida DH, Coclete GA, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Apical periodontitis and periodontal disease increase serum IL-17 levels in normoglycemic and diabetic rats. *Clin Oral Investig*. 2014;18:2123-8. (b)

8. Cintra LT, Samuel RO, Facundo AC, Prieto AK, Sumida DH, Bomfim SR, Souza JC, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. Relationships between oral infections and blood glucose concentrations or HbA1c levels in normal and diabetic rats. *Int Endod J*. 2014;47:228-37. (c)
9. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *J Endod*. 2016;42(5):747-51.
10. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesion. *Mol Immunol*. 2009;47:101-13.
11. Croft KD, Beilin LJ, Loece FM et al. Effects of diet enriched eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid or prostanoid metabolism in the rat. *Lipids* 1987;22:647-50.
12. Dugas NN, Lawrence HP, Teplitsky PE, Pharoah MJ, Friedman S. Periapical health and treatment quality assessment of root-filled teeth in two Canadian populations. *Int Endod J*. 2003;36:181-92.
13. El-Sharkawy H, Aboelsaad N, Eliwa M, Darweesh M, Alshahat M, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Adjunctive treatment of chronic periodontitis with daily dietary supplementation with omega 3 Fatty acids and low-dose aspirin. *J Periodontol*. 2010;81:1635-43.
14. Fan R, Sun B, Zhang CF, Lü YL, Xuan W, Wang QQ, Yin XZ. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin expression in chronic apical periodontitis: possible association with inflammatory cells. *Chin Med J (Engl)* 2011;124:2162-6.
15. Flores MF, Montenegro MM, Furtado MV et al. Periodontal status affects C-reactive protein and lipids in patients with stable heart disease from a tertiary care cardiovascular clinic. *J Periodontol* 2014;85:545-53.
16. Freiberg JJ, Tybjaerg-Hansen A, Jensen JS et al. Nonfasting triglycerides and risk of ischemic stroke in the general population. *JAMA* 2008;300:2142–52.
17. Graves D T, T. Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol* 2011;17:3.

18. Hokanson JE, Austin MA. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. *J Cardiovasc Risk* 1996;3:213–9.
19. Iwasaki M, Yoshihara A, Moynihan P, Watanabe R, Taylor GW, Miyazaki H. Longitudinal relationship between dietary ω 3 fatty acids and periodontal disease. *Nutrition*. 2010;26:1105-9.
20. Jacobson TA. Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2008;87:1981–90.
21. Katz J, Flugelman MY, Goldberg A et al. Association between periodontal pockets and elevated cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels. *J Periodontol* 2007;73:494–500.
22. Kesavalu L, Bakthavatchalu V, Rahman MM, Su J, Raghu B, Dawson D, Fernandes G, Ebersole JL. Omega3 fatty acid regulates inflammatory cytokine/mediator messenger RNA expression in *Porphyromonas gingivalis*-induced experimental periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22:232-9.
23. Kragballe K, Voorhees JJ, Goetzel E. Inhibition by leukotriene B5 of leukotriene B4-induced activation of human keratinocytes and neutrophils. *J Invest Dermatol* 1987;88:555-558.
24. Kragballe K, Fogh K. A low-fat diet supplemented with dietary fish oil results in the improvement of psoriasis and in formation of leukotriene B5. *Acta Dermatol Venereol* 1989;69:23-28.
25. Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH. Calcium, gamma linolenic acid and eicosapentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging* 1998;10:385-394.
26. Labreuche J, Touboul PJ, Amarenco P et al. Plasma triglyceride levels and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review of the epidemiological studies. *Atherosclerosis* 2009;203:331–45.
27. Lee JB, Yi HY, Bae KH. The association between periodontitis and dyslipidemia based on the Fourth Korea National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol* 2013;40:437-42.

28. Lewis A, Lookinland S, Beckstrand RL, Tiedeman ME. Treatment of hypertriglyceridemia with omega-3 fatty acids: a systematic review. *J Am Acad Nurse Pract.* 2004;16:384-95.
29. Li Y, Seifert MF, Ney DM, et al. Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-1 and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J Bone Miner Res* 1999;14:1153-62.
30. Lukic A, Danilovic V, Petrovic R. Comparative immunohistochemical and quantitative analysis of inflammatory cells in symptomatic and asymptomatic chronic periapical lesions. *Vojnosanit Preg* 2008;65:435–40.
31. Marotta PS, Fontes TV, Armada L, Lima KC, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Type 2 diabetes mellitus and the prevalence of apical periodontitis and endodontic treatment in an adult Brazilian population. *J Endod.* 2012;38:297-00.
32. Nair P N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348-381.
33. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P et al. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 2007;298:299–308.
34. Penumarthy S, Penmetsa GS, Mannem S. Assessment of serum levels of triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, and low-density lipoprotein cholesterol in periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol* 2013;17:30-5.
35. Rupf S, Kannengiesser S, Merte K, Pfister W, Sigusch B, Eschrich K. Comparison of profiles of key periodontal pathogens in periodontium and endodontium. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16:269-75.
36. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Alves FR, Campos LC. Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100:369-74.
37. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007;86:306-19;

38. Stapleton PA, Goodwill AG, James ME et al. Hypercholesterolemia and microvascular dysfunction: interventional strategies. *J Inflamm* 2010;18:7–54.
39. Vardar S, Buduneli E, Türkoğlu O, Berdeli AH, Baylas H, Başkesen A, Atilla G. Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2004;75:1640-6.
40. Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E et al. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein in rats. *J Periodontol* 2006;77:814-20.
41. Watkins BA, Li Y, Allen KG, Hoffmann WE, Seifert MF. Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acids alters the fatty acid composition of bone compartments and biomarkers of bone formation in rats. *J Nutr* 2000;130:2274-84.
42. Xiong H, Wei L, Peng B. Immunohistochemical localization of IL-17 in induced rat periapical lesions. *J Endod*. 2009;35:216-20.
43. Yamamoto T, Tsuneishi M, Furuta M et al. Relationship between decrease of erythrocyte count and progression of periodontal disease in a rural Japanese population. *J Periodontol* 2011;82:106–13.
44. Zhang X, Peng B. Immunolocalization of receptor activator of NF kappa B ligand in rat periapical lesions. *J Endod* 2005;31:574 –7.

8 Anexos



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 local e sistêmica da suplementação alimentar com o ácido graxo ômega-3 em ratos com infecção endodôntica"**, Processo FOA nº 2014-00550, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de Junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 01 de Novembro de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 01 de Dezembro de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Local and systemic influence of dietary supplementation with omega-3 in rats with endodontic infection"**, Protocol FOA nº 2014-00550, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: November 01, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: December 01, 2017.

Prof. Dr. Edison Ervolino
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