

VITOR CAVALINI GOMES

**Avaliação da reabsorção óssea na periodontite apical
induzida em ratos fumantes passivos suplementados ou
não com Ômega-3: Análise histométrica e
microtomográfica (Micro-CT)**

VITOR CAVALINI GOMES

**Avaliação da reabsorção óssea na periodontite apical
induzida em ratos fumantes passivos suplementados ou
não com Ômega-3: Análise histométrica e
microtomográfica (Micro-CT)**

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

Orientador: Prof. Dr. Eloi Dezan Junior

Araçatuba – SP
2024

Dedico esse trabalho a minha mãe, ***Tânia Regina Cavalini Gomes***, a meu pai, ***Antônio Flávio Gomes Sanches***, e aos meus irmãos ***Vinicius Cavalini Gomes*** e ***Flávio Henrique Cavalini Gomes***, pessoas essas que foram e são a base de toda minha jornada percorrida, com todo apoio, amor e alegria que pude receber, e que com muita felicidade e carinho venho retribuir.

Dedico esse trabalho a minha amada namorada ***Sthefanie Cerretti***, minha companheira com quem compartilho a vida e que desde então me trouxe mais alegria, motivação e sabedoria para conclusão dessa jornada.

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 2022/13526-0*

*Agradeço aos meus pais, **Antônio Flávio Gomes Sanches e Tânia Regina Cavalini Gomes** por tudo que fizeram e fazem por mim e meus irmãos. Obrigado por todo apoio e cuidado que sempre tiveram e por permitirem que essa etapa fosse concluída da melhor forma possível. Vocês são exemplos na minha vida em todos os sentidos, amo vocês.*

*Agradeço aos meus irmãos **Flávio Henrique Cavalini Gomes e Vinicius Cavalini Gomes** por todo companheirismo e amizade. Vocês são referências para atitudes em minha vida e tenho orgulho de ser irmão de vocês. Muito obrigado, amo vocês.*

*Agradeço a minha namorada **Sthefanie Cerretti**, meu melhor presente da graduação e a quem tenho o prazer e felicidade de compartilhar a vida e futuramente nossa profissão. Obrigado por todos os momentos juntos, por todo apoio e alegria proporcionados, e por toda ajuda sempre que preciso. Você é minha maior alegria e minha motivação para continuar nessa jornada. Te amo muito, Lemora.*

*Agradeço também, e não menos importante, ao meu gato **Bixiga**. Há 13 anos, desde o dia 14/12/2010, presente em minha vida e trazendo alegrias para nossa casa. Sua presença faz toda diferença trazendo mais felicidade no nosso dia a dia. À **Sombra, Magrelinha e Rivaldo** também, outros três gatos que fazem do nosso ambiente o melhor.*

*Agradeço também a todos **meus familiares**, que perto ou longe me trouxeram conforto e alegria para essa caminhada com todo suporte que preciso. Todos, sem exceção, foram e são fundamentais em minha vida.*

*Agradeço ao meu orientador e professor **Eloi Dezan Junior**, o qual tenho grande admiração pela pessoa e profissional que é. Agradeço por ter aberto as portas da iniciação científica e ter me dado essa oportunidade, além de todos ensinamentos em clínica. O senhor com certeza*

tem papel fundamental no meu crescimento pessoal e profissional, e é gratificante para mim ter o senhor como referência. Serei eternamente grato a você, meu professor e grande amigo.

*Agradeço a minha grande amiga e co-orientadora, **Ana Claudia Rodrigues da Silva**. Não tenho palavras para definir o quão fundamental foi nessa caminhada, onde sempre proporcionou o melhor ambiente de trabalho possível, fazendo tudo que era possível e impossível. Obrigado por todas oportunidades, ajudas, alegrias, amizade, compreensão. Você é um exemplo que sempre seguirei, e tive a sorte e honra de poder trabalhar com você. Muito obrigado sempre!*

*Agradeço ao meu professor **Juliano Milanezi de Almeida**, por quem sou um admirador de seu trabalho e pessoa. Obrigado por ter aceitado esse convite, e também por todos ensinamentos que compartilhou. Sou grato por todo suporte e oportunidades dadas em clínica. Agradeço por toda amizade construída, o senhor é referência tanto profissional, quanto pessoal.*

*Agradeço também a **todos professores** com que tive contato e possibilidade de aprender mais e me capacitar.*

Cada ensinamento, independente da área, foi e será fundamental para meu crescimento pessoal e profissional.

*Agradeço a **Ana Maria Veiga Vasques e Gustavo Schiavetti**, duas grandes pessoas com quem pude compartilhar experiências na iniciação científica. Muito obrigado por todos momentos, vocês tornaram os momentos de trabalho muito mais leves e alegres. Agradeço imensamente pelas oportunidades fornecidas e levarei cada um de vocês em meu coração. Agradeço também a todas outras pessoas que contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, vocês são essenciais.*

*Agradeço aos meus amigos **Rodrigo Camargo, César Fuziy, Pedro Faneco e Yasmine Parischi (Os pilares)** por todos momentos juntos, noites de estudos, festas, e tudo que vivemos nesses anos de graduação. A amizade de vocês é sem dúvidas um dos maiores e melhores acontecimentos nesses anos, e só tenho a agradecer e ser grato por ter vocês na minha vida. Amo vocês e estaremos juntos para tudo.*

*Agradeço a **todos meus amigos** que fiz e pude conviver por todos esses anos. Vocês sem dúvidas fizeram esses anos melhores e mais felizes. Obrigado pelo companheirismo de sempre, pois sempre que precisei havia alguém para ajudar.*

Levarei cada um de vocês no coração e sentirei muitas saudades.

*Agradeço a **todos funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e do Departamento de Odontologia Preventiva e Restauradora. Esses que são responsáveis por todo funcionamento da instituição e que permitem nos dar a melhor base para trabalhar. Sou extremamente grato por todos serviços prestados.*

*“...A melhor forma de continuarmos vivos,
apesar dessas mortes que vão acontecendo ao
longo da vida, é estar presente nelas...”*

Trecho do livro: “A morte é um
dia que vale a pena viver”, de
Ana Claudia Quintana Arantes.

RESUMO

GOMES, V. C. **Avaliação da reabsorção óssea na periodontite apical induzida em ratos fumantes passivos suplementados ou não com Ômega-3: Análise histométrica e microtomográfica (Micro-CT).** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

O objetivo do presente estudo foi investigar a influência da suplementação sistêmica Ômega-3 na associação entre tabagismo passivo e periodontite apical induzida em ratos no processo de reabsorção óssea. Foram utilizados 64 ratos 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 suplementados com Ômega-3); C+O (ratos sem PA sem exposição ao cigarro 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. 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, fixadas em formaldeído a 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e acondicionadas em álcool 70º para o escaneamento em Micro-CT, em seguida as peças foram processadas para as análises histopatológicas e histométricas por coloração em Hematoxilina e Eosina (HE). Na análise de Micro-CT, o nível de reabsorção óssea (1.933 ± 0.705) em ratos com periodontite apical associada ao fumo e suplementados com Ômega-3 (FPA+O) foi menor, com diferença estatisticamente

significante ($p=0.026$), em relação a reabsorção óssea (2.827 ± 0.460) do grupo dos ratos com periodontite apical associada ao fumo (FPA). Dados semelhantes foram observados na análise histométrica, o qual FPA+O (2.718 ± 0.391) obteve menor reabsorção óssea em relação ao grupo FPA (3.468 ± 0.423). Na análise histopatológica, os grupos com PA apresentaram áreas de reabsorção, sendo mais intensa no grupo FPA. Porém, na presença de Ômega-3, o grupo FPAO apresentou maior preservação de tecido ósseo. Conclui-se a suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e periodontite apical induzida em ratos promoveu a diminuição da reabsorção óssea local nas análises microtomográficas e histométricas.

Palavras-chave: fumantes; osso; periodontite apical; ômega-3.

ABSTRACT

GOMES, V. C. **Assessment of bone resorption in apical periodontitis induced in passive rats supplemented or not with ômega-3: Histometric and microtomographic analysis (Micro-CT).** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, 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 passive smoking and apical periodontitis induced in rats in the process of bone resorption. We used 64 rats 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 supplemented with Omega-3); C+O (rats without AP without exposure to cigarettes 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. 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 (PA), 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, fixed in 4% formaldehyde for 48 hours, washed in running water for 12 hours and placed in 70° alcohol for Micro-CT scanning, then the pieces were processed for histopathological analysis. and histometric by Hematoxylin and Eosin (HE) staining. In the Micro-CT analysis, the level of bone resorption (1.933 ± 0.705) in rats with apical periodontitis associated with smoking and supplemented with Omega-3 (FPA+O) was lower, with a statistically significant difference ($p=0.026$), in relation to bone resorption ($2.827 \pm$

0.460) in the group of rats with smoking-associated apical periodontitis (APF). Similar data were observed in the histometric analysis, which FPA+O (2.718 ± 0.391) obtained lower bone resorption compared to the FPA group (3.468 ± 0.423). In the histopathological analysis, the groups with AP showed areas of resorption, being more intense in the FPA group. However, in the presence of Omega-3, the FPAO group showed greater preservation of bone tissue. It is concluded that systemic supplementation with Omega-3 in the association between smoking and apical periodontitis induced in rats promoted a decrease in local bone resorption in microtomographic and histometric analyses.

Keywords: smokers; bone; apical periodontitis; ômega-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 24

Figura 2 - Imagens da Micro-CT, pela vista sagital, do primeiro molar inferior direito dos grupos experimentais A: Controle, B: Fumante, C: PA: periodontite apical induzida, D: FPA: tabagistas com periodontite apical induzida, E: C+O: controle suplementados com Ômega-3, F: F+O, tabagistas suplementados com Ômega-3, G: PA+O, periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3, H: FPA+O, tabagistas com periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3 28

Figura 3 - Imagens da histometria pela coloração de Hematoxilina e Eosina. C: Controle; F: Fumante; PA: periodontite apical induzida; FPA: tabagistas com periodontite apical induzida; C+O: controle suplementados com Ômega-3; F+O: tabagistas suplementados com Ômega-3; PA+O: periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3; FPA+O: tabagistas com periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3 32

Figura 1 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão do volume total do espaço poroso (Po.V (tot) (reabsorção óssea na PA) da micro-CT e histometria em relação a suplementação com Ômega-3 30

Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão do volume total do espaço poroso (Po.V (tot) (reabsorção óssea na PA) da micro-CT e histometria em relação a periodontite apical induzida 31

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
<	Menor
°C	Graus Celsius
AA	Ácido Araquidônico
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
BV	Volume Ósseo Alveolar
C + O	Grupo Controle suplementados com Ômega-3
C	Grupo Controle
CEUA	Cômite de conduta ética no uso de animais em experimentação
cm	Centímetros
DHA	Ácido docosahexaenóico
EPA	Ácido eicosapentaenóico
F	Grupo fumante
F+O	Grupo fumante suplementados com ômega-3
FPA	Grupo fumante induzido a lesão periapical
FPA+O	Grupo fumante induzido a lesão periapical suplementado com ômega-3
g	Gramas
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN- γ	Interferons γ
IL	Interleucinas
Kv	Quilovoltagem
LTs	Leucotrienos
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo
Micro-CT	Microtomografia Computadorizada
ml	Mililitro
ms	Milisegundos
Ng/ml	Nanogramas por mililitro
OCN	Atividade osteoblástica
PA	Grupo induzido a periodontite apical
PA+O	Grupo induzido a periodontite apical e suplementados com ômega-3

PGs	Prostaglandinas
TNFalfa	Fator de necrose tumoral Alfa
TRAP	Atividade osteoclástica
TV	Volume tecidual
TX	Tromboxanos
μA	Microampere
μm ²	Micrometros quadrados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Animais	22
3.2 Cálculo amostral e randomização	22
3.3 Divisão dos grupos	23
3.4 Protocolo de Tabagismo	23
3.5 Drogas empregadas	25
3.6 Suplementação sistêmica com Ômega-3	25
3.7 Indução da periodontite apical	25
3.8 Coleta das mandíbulas	25
4 ANÁLISE DOS RESULTADOS	26
4.1 Análise em Micro-CT	26
4.2 Análise Histopatológica	26
4.3 Análise Histométrica	26
4.4 Análises estatísticas	27
5 RESULTADOS DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)	28
6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	29
7 ANÁLISE HISTOMÉTRICA	30
8 DISCUSSÃO	33
9 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical é caracterizada por um processo inflamatório e consequente reabsorção óssea dos tecidos periapicais. Pode ser desenvolvida após a contaminação do sistema de canais radiculares originada da exposição da polpa dentária por cárie, trauma ou desgaste dentário¹. Quando a infecção se instaura nos tecidos perirradiculares induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α ² que ativam a proliferação celular³ e contribuem para a reabsorção óssea⁴. O processo de reabsorção óssea ocorre devido à quebra da homeostase dos sistemas reguladores da inflamação, como células inflamatórias, sistema RANK/RANKL/OPG, citocinas inflamatórias, hormônios calciotrópicos, estradiol, além dos produtos do ácido araquidônico^{5,6}.

Visto que a periodontite apical é capaz de promover uma resposta inflamatória local, Cintra *et al.*⁷ investigaram as alterações que a PA induzida em ratos poderia influenciar sistemicamente. No estudo, observaram que o aumento de infecções endodônticas (PA) em um mesmo hospedeiro, aumentaram os níveis séricos de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- α) concluindo que a PA é capaz de atuar sistemicamente, alterando a homeostase das células inflamatórias na corrente sanguínea⁷.

Seguindo o mesmo caminho da medicina periodontal⁸, outros trabalhos foram desenvolvidos a fim de investigar a associação de PA *versus* doenças sistêmicas e obtiveram os seguintes resultados, 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 normoglicêmicos⁹. Alterações também foram encontradas na associação PA e aterosclerose em ratos Wistar, no qual observou-se que a PA aumentou os níveis séricos de triglicerídeos e a espessura da artéria carótida¹⁰. Além disso, outros estudos investigaram a relação entre o tabagismo e a periodontite apical¹¹⁻¹³, constatando que a fumaça do cigarro poderia interferir na infecção endodôntica, no qual as respostas inflamatórias alteradas nesses indivíduos dificultariam o processo de reparo tecidual¹³.

BinShabaib *et al.*¹¹ avaliaram o fluído crevicular gengival de pacientes com doença periodontal crônica e observaram um aumento de citocinas pró-

inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α associado ao fumo em comparação aos pacientes não-fumantes¹¹. Outro trabalho avaliando exposição de furca em ratos Wistar tratados com nicotina, observou que a região demonstrou redução de fibras colágenas e aumento da reabsorção óssea¹⁴. Além disso, o sistema RANK/RANKL/OPG, principal regulador de osteoclastos, parece sofrer influência da fumaça do cigarro, aumentando sua osteoclastogênese¹⁵⁻¹⁷. Um estudo demonstrou que a inalação da fumaça do cigarro pode reduzir a qualidade óssea ao redor de implantes instalados em ratos¹⁸ e interferir no crescimento e estrutura óssea¹⁹.

Um estudo de caso-controle²⁰ avaliou radiograficamente, a associação do tabagismo com presença de lesões periapicais, e observou uma forte relação com a presença de pelo menos uma lesão periapical detectável por radiografia em pacientes que faziam uso do tabaco. Ainda, Segura-Egea *et al.*²¹ através de análises radiográficas periapicais sugeriram que o tabagismo estaria associado a uma maior frequência de tratamento de canal radicular e ao aumento da prevalência de periodontite apical²¹. Em contrapartida, Balto *et al.*²² através de análise tomográficas relataram que não há diferenças significativas entre fumantes e não fumantes em relação a prevalência e tamanho da periodontite apical²².

Neste contexto, estudos anteriores^{23,24} investigaram a ação do tabagismo frente a periodontite apical induzida em ratos e demonstraram que a fumaça do cigarro aumentou alterações no tecido ósseo avaliados por meio de análises de Micro-CT, histométricas, além de análises imuno-histoquímica (OPG e RANKL), sendo mais intenso o processo de reabsorção óssea nos animais expostos a inalação da fumaça do cigarro associado à PA. Além disso, foi realizado a avaliação sistêmica de nicotina e cotinina e observou-se que os valores foram indetectáveis para não fumantes (C e PA). Em contrapartida, nos grupos fumantes (F e FPA) os valores foram de $26,24 \pm 9,58$ ng/mL e $28,97 \pm 7,04$ ng/mL, respectivamente, para a nicotina e de $294,06 \pm 64,86$ ng/mL e $332,71 \pm 35,34$ ng/mL, respectivamente, para a cotinina. Nesse contexto, Jain²⁵ avaliou a concentração sérica de cotinina em diferentes etnias com diferentes tipos de cigarro, constatando que os usuários de cigarro apresentavam uma concentração sérica de cotinina em média de 159,4 ng/mL, sendo classificados como fumante pessoas que apresentam níveis séricos de cotinina acima de 3,3 ng/mL. Ainda, o protocolo de inalação de fumaça de cigarro utilizado neste estudo²⁶ produziu níveis séricos de nicotina e cotinina similares aos

níveis encontrados em fumantes humanos ativos, que consomem em média de 10 a 20 cigarros por dia²⁷.

A fim de reduzir os danos causados na associação PA e tabagismo, como demonstrados nos estudos anteriores^{23,24} terapias coadjuvantes vêm sendo indicadas para auxiliar o tratamento endodôntico convencional (instrumentação dos canais, associado a soluções irrigadoras e medicação intracanal), dentre elas, o ácido graxo Ômega-3, apresentou efeitos benéficos no que se refere à inflamação e processo de reparo ósseo^{28,29}.

Na periodontite apical, um estudo *in vivo* demonstrou que o Ômega-3 modulou a inflamação em PA, diminuindo produção de interleucinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6, IL-1 β e aumentando a expressão de interleucinas antiinflamatória IL-10²⁵. No tecido ósseo, evidenciou que a imunomarcção de OCN (atividade osteoblástica) aumentou frente a suplementação sistêmica com ômega-3 e em contrapartida, reduziu imunomarcção de TRAP (atividade osteoclástica)²⁴.

No tabagismo, observou-se que a suplementação com Ômega-3 reduziu níveis de dependência de nicotina³⁰. Resultados semelhantes foram encontrados em outro estudo que avaliou fumantes ativos submetidos a terapia diária com Ômega-3 em alta doses por 3 meses, no qual houve redução do desejo por cigarro, assim como, sua dependência de nicotina e o estresse oxidativo³¹.

O Ômega-3 possui propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias que resultam de sua incorporação em fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (fosfolipídios mais abundantes da membrana celular)³² através de microdomínios específicos para ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaheptaenóico (DHA), que promovem a redução da fluidez celular³³. Com isso, ocorrerá alterações no esqueleto de actina celular, e redução da fagocitose de microrganismos por macrófagos e células apresentadoras de antígenos (APCs)³⁴. Além disso, atua 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, as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TX) e os leucotrienos (LTs), respectivamente³².

Acerca do conhecimento dos efeitos negativos que o tabagismo promove na periodontite apical, além do conhecimento dos benefícios do Ômega-3, esse

trabalho tem como objetivo analisar através da microtomografia computadorizada (Micro CT) e análise histométrica, o processo de reabsorção óssea em ratos tabagistas com periodontite apical suplementados com Ômega-3.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo do presente estudo foi analisar a reabsorção óssea periapical em ratos fumantes passivos com periodontite apical induzida tratados sistemicamente com Ômega-3.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar por meio das colorações de Hematoxilina e Eosina (HE) a reabsorção óssea através de análises histopatológicas e histométricas.
- Avaliar o volume total do espaço poroso (Po.V (tot) (reabsorção óssea na PA), por meio da microtomografia computadorizada (Micro-CT).

3 MATERIAIS 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 ratos 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 foram 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).

3.2 Cálculo amostral e randomização

O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no website: <http://www.openepi.com/SampleSize/SSMean.htm>, baseado em dados de um estudo anterior com análises de microtomografia computadorizada (Micro-CT)³⁵. Considerando o erro alfa de 0,05 e poder ($1 - \beta$) de 0,95 para reconhecer uma diferença significativa, considerou-se necessário seis animais por grupo. Levando em consideração as possíveis mortes de animais, foi adicionado mais dois animais em cada grupo, resultando em oito animais por grupo, totalizando 64 animais.

O presente estudo seguiu um modelo controlado, randomizado e cego. Números de 1 a 64 foram marcados na porção superior da cauda dos animais utilizando caneta nanquin. A sequência numérica foi carregada para o software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) e uma randomização simples (1:1 taxa de distribuição) para os grupos C, F, PA, FPA, C+O, F+O, PA+O, FPA+O foi realizada através de uma tabela numérica randômica gerada em computador por uma pessoa externa ao estudo e cega aos tratamentos.

3.3 Divisão dos grupos

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

- **C:** ratos controle (sem exposição a fumaça do cigarro e sem indução da PA)
- **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^{18,26,36}. Entretanto, o protocolo de inalação de fumaça de cigarro utilizado²⁶ produz níveis séricos de nicotina e cotinina similares aos níveis encontrados em fumantes humanos ativos²⁷. 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 cigarros¹⁶.

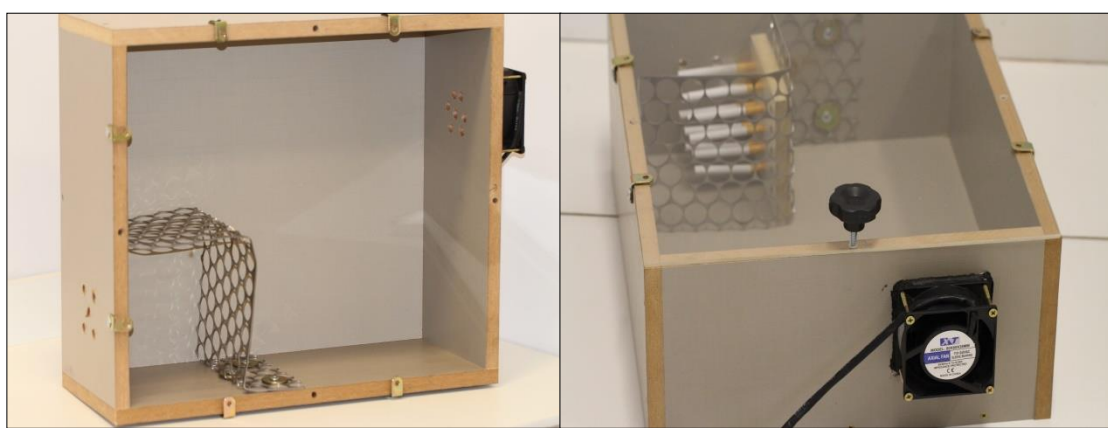
Os animais tabagistas ficaram alojados separadamente dos animais não tabagistas. Assim como a câmara de tabagismo também foi separada para que não houvesse contaminação com a nicotina.

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^{37,38}. 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 semana²⁶. O cigarro utilizado foi o Marlboro (Phillips Morris, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil)^{19,39} 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 dias 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: elaborada 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 Omêga-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 suplementação^{28,40,41}.

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 dias⁴².

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 acondicionados em Álcool 70° para o escaneamento em Micro-CT. Após o escaneamento, as peças foram 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.

4 ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Análise em Micro-CT

Após obtenção dos espécimes, estes foram acondicionados em um frasco e posicionados com o incisivo voltado para cima. As amostras foram digitalizadas com as seguintes configurações: 70 kV, 167 μ A, passo de rotação de 0,5°, 2100ms de exposição, 3 médias de quadros, 12 por imagem de pixel e 9 por pixel de tamanho de câmera. Um filtro de alumínio de 0,5 mm foi usado durante as varreduras, e uma correção polinomial também foi utilizada para reduzir os efeitos de endurecimento do feixe durante as reconstruções. Posteriormente, foram reconstruídas e analisadas por meio do software CTAnalyzer (SkyScan), considerando o volume tecidual (TV) e o volume ósseo alveolar (BV)³⁵.

4.2 Análise Histopatológica

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

4.3 Análise Histométrica

Após inclusão das peças, cortes histológicos semi-seriados no sentido longitudinal foram realizados em micrótomo (RM 2045, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) na espessura de 5 μ m para coloração com Hematoxilina e Eosina (HE). A análise histométrica foi realizada para verificar se há diferença na perda de estrutura óssea na região periapical nos grupos PA, PA+O, FPA e FPA+O. A área da lesão periapical foi calculada considerando a superfície externa do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Foi utilizado o microscópio Leica LAS X (Leica Microsystems, Nussloch – Alemanha) e os valores foram expressos em micrômetros quadrados (μ m²) como medidas da área da lesão periapical⁴³.

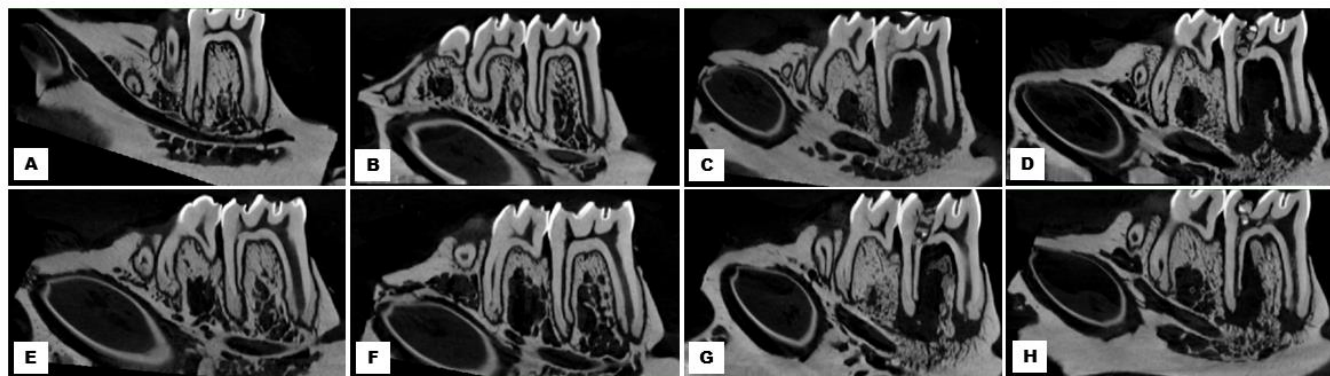
4.4 Análises estatísticas

Os resultados obtidos nas análises de Micro-CT e histometria foram processados no programa estatístico Sigma-Plot. Os dados foram submetidos ao teste de distribuição de normalidade Shapiro-Wilk. Dados paramétricos foram submetidos ao *t-test*.

5 RESULTADOS DA MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA (MICRO-CT)

Os grupos C e C+O e F e F+O não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si ($p= 0.055$) (Figura 2- A,B,E,F e Tabela 1). Nos grupos com lesão periapical, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PA e PA+O ($P = 0.055$) (Figura 2- C,G e Tabelas 1,2). Em contrapartida, foram observadas diferenças significantes nas comparações PA e FPA ($P=0.010$), o qual FPA apresentou maior volume de reabsorção óssea em relação ao grupo PA (Tabela 2), caracterizada pela imagem hipodensa entre as raízes distal e mesial do primeiro molar inferior (Figura 2-C,D). Os grupos PA+O e FPA+O ($p= 0.469$) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si. (Figura 2- G,H e Tabela 2). Por outro lado, nas comparações entre os grupos FPA e FPA+O, o grupo FPA apresentou imagem hipodensa entre as raízes distal e mesial do primeiro molar inferior maior do que o grupo suplementado com Ômega-3 (FPA+O) (Figura 2- D,H), apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p= 0.026$) (Tabelas 1,2).

Figura 2 - Imagens da Micro-CT, pela vista sagital, do primeiro molar inferior direito dos grupos experimentais A: Controle, B: Fumante, C: PA: periodontite apical induzida, D: FPA: tabagistas com periodontite apical induzida, E: C+O: controle suplementados com Ômega-3, F: F+O, tabagistas suplementados com Ômega-3, G: PA+O, periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3 H: FPA+O, tabagistas com periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3



6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Na região apical da raiz mesial do primeiro molar superior direito, os grupos C, C+O e F, F+O apresentaram 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. Os grupos PA e PA+O apresentam degeneração pulpar resultando em lesão periapical. Observa-se área ocupada por intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear. O cemento apresenta áreas de reabsorção, bem como o tecido ósseo alveolar. Os grupos FPA e FPA+O também apresentam degeneração pulpar em continuidade a intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear. 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.

7 ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Os grupos C e C+O (p= 0.347), F e F+O (p=0.548) possuíam integridade do espaço do ligamento periodontal e preservação da lâmina dura (Figura 3 e Tabela 1). Nos grupos com lesão periapical, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos PA e PA+O (P = 0.071) e PA+O e FPA+O (p= 0.334) (Figura 3, Tabela 1 e 2). Em contrapartida, foram observadas diferenças significantes nas comparações PA e FPA (p= <0.001), o qual FPA apresentou maior reabsorção óssea em relação ao grupo PA (Figura 3, Tabela 2). O mesmo foi observado nas comparações entre os grupos FPA e FPA+O, o grupo FPA apresentou maior reabsorção óssea em comparação ao grupo suplementado com Ômega-3 (FPA+O) (Figura 3), apresentando diferenças estatisticamente significantes (p= 0.005) (Tabelas 1,2).

Tabela 1 - Valores da média e desvio padrão do volume total do espaço poroso (Po.V (tot) (reabsorção óssea na PA) da micro-CT e histometria em relação a suplementação com Ômega-3

Grupos Experimentais	Micro-CT Po.V (tot)	Análise Estatística t-test	Histométrico	Análise Estatística
C	0.446 ± 0.00459	p= 0.055	1.142 ± 0.123	p= 0.347
C+O	0.481 ± 0.00476		1.203 ± 0.109	
F	0.465 ± 0.00319	p= 0.260	1.208 ± 0.127	p= 0.548
F+O	0.429 ± 0.0747		1.251 ± 0.155	
PA	2.209 ± 0.141	P = 0.055	2.601 ± 0.285	p=0.071
PA+O	2.152 ± 0.0927		2.901 ± 0.306	
FPA	2.827 ± 0.460 ^a	p= 0.026	3.468 ± 0.423 ^a	p= 0.005
FPA+O	1.933 ± 0.705 ^b		2.718 ± 0.391 ^b	

* Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística p<0.050
Fonte: elaborada pelo autor, 2024

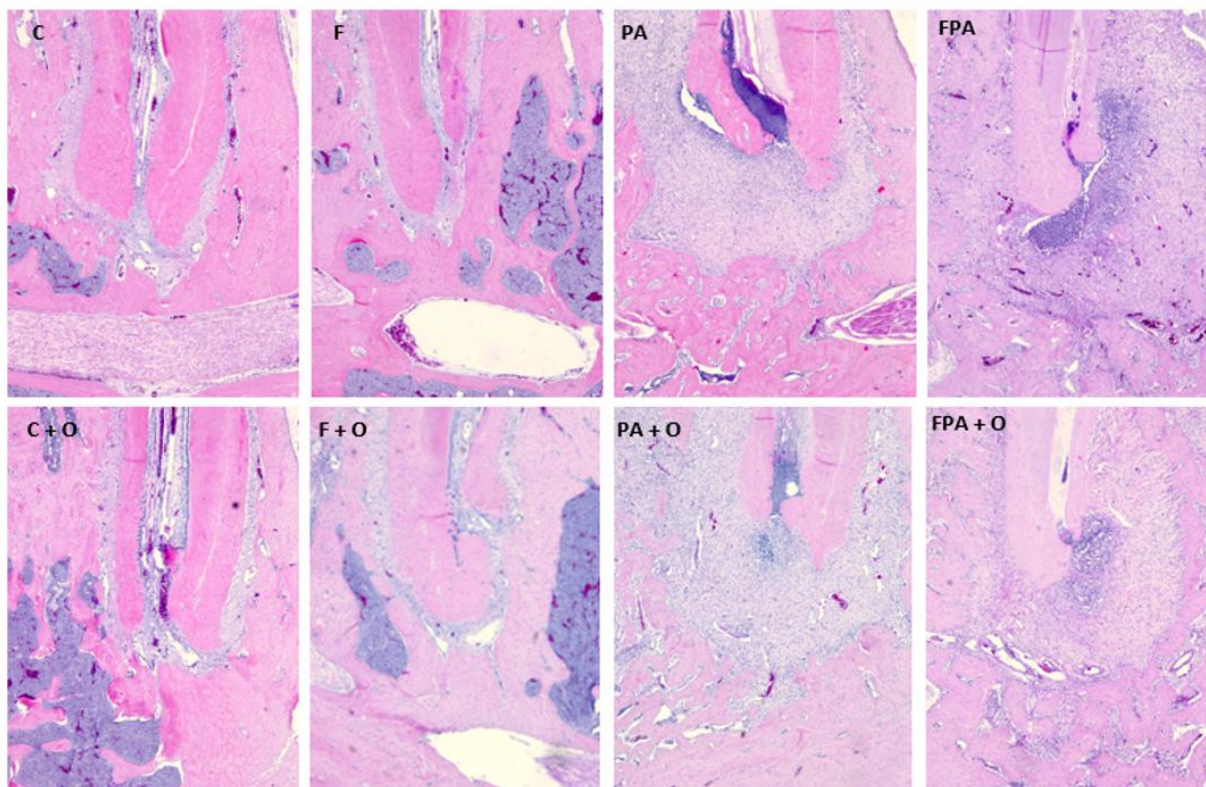
Tabela 2 - Valores da média e desvio padrão do volume total do espaço poroso (Po.V (tot) (reabsorção óssea na PA) da micro-CT e histometria em relação a periodontite apical induzida

Grupos Experimentais	Micro-CT Po.V (tot)	Análise Estatística <i>t-test</i>	Histométrico	Análise Estatística
PA	2.209 ± 0.141 ^a	p= 0.010	2.601 ± 0.285 ^a	p= 0.001
FPA	2.827 ± 0.460 ^b		3.468 ± 0.423 ^b	
FPA+O	1.933 ± 0.705	p= 0.469	2.901 ± 0.306	p= 0.334
PA+O	2.152 ± 0.0927		2.718 ± 0.391	
PA	2.209 ± 0.141	P = 0.055	2.601 ± 0.285	p=0.071
PA+O	2.152 ± 0.0927		2.901 ± 0.306	
FPA	2.827 ± 0.460 ^a	p= 0.026	3.468 ± 0.423 ^a	p= 0.005
FPA+O	1.933 ± 0.705 ^b		2.718 ± 0.391 ^b	

* Letras sobrescritas diferentes representam diferença estatística p<0.050.

Fonte: elaborada pelo autor, 2024

Figura 3 - Imagens da histometria pela coloração de Hematoxilina e Eosina. C: Controle; F: Fumante; PA: periodontite apical induzida; FPA: tabagistas com periodontite apical induzida; C+O: controle suplementados com Ômega-3; F+O: tabagistas suplementados com Ômega-3; PA+O: periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3; FPA+O: tabagistas com periodontite apical induzida suplementados com Ômega-3



Fonte: elaborada pelo autor, 2024

8 DISCUSSÃO

A periodontite apical é caracterizada por um processo inflamatório e consequente reabsorção óssea dos tecidos periapicais. Alguns estudos avaliaram forte relação entre o tabagismo e a periodontite apical¹¹⁻¹³, o qual os efeitos adversos no metabolismo ósseo facilitaria a destruição do tecido ósseo periapical, assim como prejudicaria os processos de cura e reparo^{20,44}. Afim de buscar um tratamento coadjuvante que reduzisse essa destruição intensa causada pela associação tabagismo *versus* periodontite apical, este presente estudo investigou a suplementação com Ômega-3.

Na avaliação histométrica, observa-se que os grupos controles não apresentaram diferenças estatisticamente significantes, apresentando características de normalidade, como a presença de ligamento periodontal íntegro, cemento celular e osso alveolar em processo de remodelação. Em contrapartida, os grupos com PA apresentaram reabsorção óssea e destruição do ligamento periodontal. Os presentes achados confirmam que a periodontite apical (PA) (2.601 ± 0.285) foi agravada na presença da fumaça de cigarro, o qual o grupo FPA (3.468 ± 0.423) apresentou maior reabsorção óssea em comparação ao grupo PA. De fato, os compostos presentes na fumaça do cigarro tem capacidade de reduzir a atividade osteoblástica⁴⁵, além de aumentar a presença de macrófagos M1²³ e exacerbar a resposta inflamatória local²⁴, resultando assim em uma maior área de destruição óssea. Por outro lado, na presença da suplementação de Ômega-3, o grupo FPA+O (2.718 ± 0.391) apresentou menor reabsorção em comparação ao grupo FPA (3.468 ± 0.423).

Resultados semelhantes foram encontrados na análise de micro-CT. A micro-CT é considerada padrão ouro para avaliação de lesões periapicais em ratos^{46,47}, pois suas imagens de alta resolução permitem que a área da lesão seja avaliada em diferentes planos. O grupo FPA (2.827 ± 0.460) apresentou maior volume de reabsorção óssea em relação ao grupo PA (2.209 ± 0.141), corroborando com o estudo realizado por Pinto *et al.* (2020), o qual observaram destruição óssea através de microtomografia em ratos nicotínicos associados com a PA⁴⁸. Em humanos, um estudo de caso-controle²⁰ avaliou radiograficamente, a associação do tabagismo com presença de lesões periapicais, e observou uma forte relação com a presença

de pelo menos uma lesão periapical detectável por radiografia em pacientes que faziam uso do tabaco. Ainda, Segura-Egea *et al.*²¹ através de análises radiográficas periapicais sugeriram que o tabagismo estaria associado a uma maior frequência de tratamento de canal radicular e ao aumento da prevalência de periodontite apical. Por outro lado, um estudo avaliou a presença de PA em pacientes fumantes e não fumantes através da Tomografia Computadorizada de Feixe Cônico e não encontram diferença significativa no que diz respeito a prevalência e tamanho das lesões periapicais²².

Nossos resultados mostraram que a suplementação com Ômega-3 no grupo com periodontite apical e inalação da fumaça do cigarro (FPA+O) apresentou menor volume de reabsorção óssea (1.933 ± 0.705) em comparação ao grupo FPA (2.827 ± 0.460), com diferenças estatisticamente significantes ($p= 0.026$). De fato, a suplementação com Ômega- 3 parece interferir no tecido ósseo. Essa relação foi evidenciada por Azuma *et al.*²⁸, o qual a imunomarcagem de OCN (atividade osteoblástica) foi aumentada na PA em ratos, enquanto a imunomarcagem de TRAP (atividade osteoclástica) foi reduzida frente a suplementação com Ômega-3, além disso, modulou a resposta inflamatório local, diminuindo produção de interleucinas pró-inflamatórias e aumentando a expressão de interleucinas antiinflamatória²⁹. Outro estudo identificou que o ácido docosahexaenóico (DHA), um dos compostos do Ômega-3, pode atuar na supressão da formação de osteoclastos e consequente reabsorção óssea, inibindo vias de sinalização específicas¹, corroborando com resultados obtidos no presente estudo. Haja visto que um fator local (PA) sofreu influência de fatores sistêmicos (tabagismo e ômega-3), fica evidente a importância da investigação de interações entre doenças bucais e sistêmicas.

9 CONCLUSÃO

A suplementação sistêmica com Ômega-3 na associação entre tabagismo e periodontite apical induzida em ratos promoveu a diminuição da reabsorção óssea local nas análises microtomográficas e histométricas.

REFERÊNCIAS

1. Zaleckiene V, Peciuliene V, Brukiene V, Drukteinis S. Traumatic dental injuries: etiology, prevalence and possible outcomes. *Stomatologija*. 2014;16(1):7-14.
2. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Gonçalves LS. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J. Endod*. 2014 Feb;40(2):168-72.
3. Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. 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*. 2014 Jul-Aug;22(4):336-46.
4. Ojima M, Hanioka T. Destructive effects of smoking on molecular and genetic factors of periodontal disease. *Tob Induc Dis*. 2010 Feb 20;8(1):4.
5. Simionato GB, Silva ACR, Oliva AH, Abreu Furquim EM, Couto MCR, Shinohara AL, Bigueti CC, Matsumoto MA. Lack of 5-lipoxygenase in intramembranous and endochondral 129Sv mice skeleton and intramembranous healing. *Arch Oral Biol*. 2021 Nov;131:105266.
6. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int*. 2012 Aug;23(8):2081-92.
7. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod*. 2016 May;42(5):747-51.
8. Segura-Egea JJ, Martín-González J, Castellanos-Cosano L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. *Int Endod J*. 2015 Oct;48(10):933-51.
9. 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 Mar;47(3):228-37.
10. Conti LC, Segura-Egea JJ, Cardoso CBM, Benetti F, Azuma MM, Oliveira PHC, Bomfim SRM, Cintra LTA. Relationship between apical periodontitis and atherosclerosis in rats: lipid profile and histological study. *Int Endod J*. 2020 Oct;53(10):1387-97.
11. BinShabaib M, ALHarthi SS, Akram Z, Khan J, Rahman I, Romanos GE, Javed F. Clinical periodontal status and gingival crevicular fluid cytokine profile among cigarette-smokers, electronic-cigarette users and never-smokers. *Arch Oral Biol*. 2019 Jun;102:212-7.

12. Pinto KP, Ferreira CM, Maia LC, Sassone LM, Fidalgo TKS, Silva EJNL. Does tobacco smoking predispose to apical periodontitis and endodontic treatment need? A systematic review and meta-analysis. *Int Endod J*. 2020 Aug;53(8):1068-83.
13. Cabanillas-Balsera D, Segura-Egea JJ, Bermudo-Fuenmayor M, Martín-González J, Jiménez-Sánchez MC, Areal-Quecuty V, Sánchez-Domínguez B, Montero-Miralles P, Velasco-Ortega E. Smoking and radiolucent periapical lesions in root filled teeth: systematic review and meta-analysis. *J Clin Med*. 2020 Oct 29;9(11):3506.
14. Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM, Luize DS, Nagata MJ, Garcia VG. A histologic and histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. *J Periodontol*. 2007 Mar;78(3):527-32.
15. Yoon V, Maalouf NM, Sakhaee K. The effects of smoking on bone metabolism. *Osteoporos Int*. 2012 Aug;23(8):2081-92.
16. Giorgetti AP, César Neto JB, Ruiz KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Cigarette smoke inhalation modulates gene expression in sites of bone healing: a study in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Oct;110(4):447-52.
17. Junqueira JJM, Lourenço JD, da Silva KR, Jorgetti V, Vieira RP, de Araujo AA, De Angelis K, Correia AT, Alves LHV, Tibério IFLC, Barbosa AP, Lopes FDTQDS. Increased bone resorption by long-term cigarette smoke exposure in animal model. *Heliyon*. 2021 Dec 10;7(12):e08587.
18. Nociti Júnior FH, Cesar Neto JB, Carvalho MD, Sallum EA, Sallum AW. Intermittent cigarette smoke inhalation may affect bone volume around titanium implants in rats. *J Periodontol*. 2002 Sep;73(9):982-7.
19. Rosa RC, Pereira SC, Cardoso FAG, Caetano AG, Santiago HAR, Volpon JB. Second hand tobacco smoke adversely affects the bone of immature rats. *Clinics*. 2017 Dec;72(12):785-9.
20. López-López J, Jané-Salas E, Martín-González J, Castellanos-Cosano L, Llamas-Carreras JM, Velasco-Ortega E, Segura-Egea JJ. Tobacco smoking and radiographic periapical status: a retrospective case-control study. *J Endod*. 2012 May;38(5):584-8.
21. Segura-Egea JJ, Jiménez-Pinzón A, Ríos-Santos JV, Velasco-Ortega E, Cisneros-Cabello R, Poyato-Ferrera MM. High prevalence of apical periodontitis amongst smokers in a sample of Spanish adults. *Int Endod J*. 2008 Apr;41(4):310-6.
22. Balto HA, Alabdulaaly L, Bahammam S, Al-Ekrish AA. Comparative analysis of prevalence of apical periodontitis in smokers and non-smokers using cone-beam computed tomography. *Saudi Dent J*. 2019 Jan;31(1):52-7.
23. Silva ACR. Efeito da fumaça do cigarro na periodontite apical induzida em ratos: análise do perfil inflamatório e imuno-histoquímica macrofágica [dissertação].

Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”; 2022.

24. Vasques AMV, Silva ACR, Bueno CRE, Cury MTS, Ervolino E, Cintra LTA, Dezan Junior E. Inflammatory profile of apical periodontitis exacerbated by cigarette smoke inhalation: Histological and immunohistochemical analysis in rats. *Int Endod J*. 2023 Apr;56(4):465-74.

25. Jain RB. Re-visiting serum cotinine concentrations among various types of smokers including cigarette only smokers: some new, previously unreported results. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Jan;28(3):3149-61.

26. César-Neto JB, Duarte PM, Sallum EA, Barbieri D, Moreno H Jr, Nociti FH Jr. A comparative study on the effect of nicotine administration and cigarette smoke inhalation on bone healing around titanium implants. *J Periodontol*. 2003 Oct;74(10):1454-9.

27. González YM, De Nardin A, Grossi SG, Machtei EE, Genco RJ, De Nardin E. Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J Dent Res*. 1996 Feb;75(2):796-802.

28. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Pipa CB, Cardoso CBM, Andrada AC, Kawai T, Cintra LTA. Omega 3 fatty acids reduce bone resorption while promoting bone generation in rat apical periodontitis. *J Endod*. 2017 Jun;43(6):970-6.

29. Azuma MM, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Cardoso CBM, Pipa CB, Kawai T, Conti LC, Cintra LTA. Omega-3 fatty acids reduce inflammation in rat apical periodontitis. *J Endod*. 2018 Apr;44(4):604-8.

30. Zaparoli JX, Sugawara EK, de Souza AA, Tufik S, Galduróz JC. Omega-3 levels and nicotine dependence: a cross-sectional study and clinical trial. *Eur Addict Res*. 2016;22(3):153-62.

31. 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*. 2018 Sep;32(9):995-1002.

32. Husson MO, Ley D, Portal C, Gottrand M, Hueso T, Desseyn JL, Gottrand F. Modulation of host defence against bacterial and viral infections by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Infect*. 2016 Dec;73(6):523-35.

33. Shaikh SR, Kinnun JJ, Leng X, Williams JA, Wassall SR. How polyunsaturated fatty acids modify molecular organization in membranes: insight from NMR studies of model systems. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Jan;1848(1 Pt B):211-9.

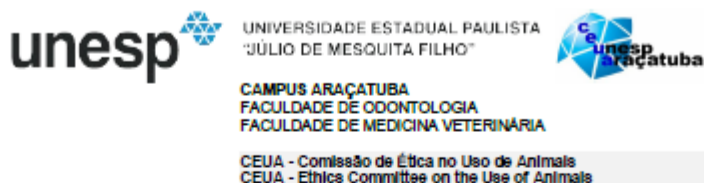
34. McMurray DN, Bonilla DL, Chapkin RS. n-3 Fatty acids uniquely affect anti-microbial resistance and immune cell plasma membrane organization. *Chem Phys Lipids*. 2011 Oct;164(7):626-35.

35. Cosme-Silva L, Dal-Fabbro R, Cintra LTA, Ervolino E, Piazza F, Mogami Bomfim S, Duarte PCT, Junior VEDS, Gomes-Filho JE. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. *Int Endod J*. 2020;53(8):1084-92.
36. Ercan A, Baghaki S, Suleymanov S, Aydın O, Konukoglu D, Cetinkale O. Effects of cigarette smoke on fat graft survival in an experimental rat model. *Aesthetic Plast Surg*. 2019 Jun;43(3):815-25. doi: 10.1007/s00266-019-01327-3.
37. Ferreira CL, Nunes CMM, Bernardo DV, Pedroso JF, Longo M, Santamaria M Jr, Santamaria MP, Jardini MAN. Effect of orthodontic force associated with cigarette smoke inhalation in healthy and diseased periodontium. A histometric and immunohistochemistry analysis in rats. *J Periodontal Res*. 2018 Oct;53(5):924-31.
38. Carvalho MD, Benatti BB, César-Neto JB, Nociti FH Jr, da Rocha Nogueira Filho G, Casati MZ, Sallum EA. Effect of cigarette smoke inhalation and estrogen deficiency on bone healing around titanium implants: a histometric study in rats. *J Periodontol*. 2006 Apr;77(4):599-605.
39. Santiago HA, Zamarioli A, Sousa Neto MD, Volpon JB. Exposure to secondhand smoke impairs fracture healing in rats. *Clin Orthop Relat Res*. 2017 Mar;475(3):894-902.
40. Kesavalu L, Vasudevan B, Raghu B, Browning E, Dawson D, Novak JM, Correll MC, Steffen MJ, Bhattacharya A, Fernandes G, Ebersole JL. Omega-3 fatty acid effect on alveolar bone loss in rats. *J Dent Res*. 2006 Jul;85(7):648-52.
41. Vardar-Sengül S, Buduneli N, Buduneli E, Kardeşler L, Baylas H, Atilla G, Lappin D, Kinane DF. Dietary supplementation of omega-3 fatty acid and circulating levels of interleukin-1beta, osteocalcin, and C-reactive protein in rats. *J Periodontol*. 2006 May;77(5):814-20.
42. Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, 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 May;42(5):747-51.
43. Cantiga-Silva C, Estrela C, Segura-Egea JJ, Azevedo JP, de Oliveira PHC, Cardoso CBM, Pinheiro TN, Ervolino E, Sivieri-Araújo G, Cintra LTA. Inflammatory profile of apical periodontitis associated with liver fibrosis in rats: histological and immunohistochemical analysis. *Int Endod J*. 2021 Aug;54(8):1353-61.
44. Bergström J, Babcan J, Eliasson S. Tobacco smoking and dental periapical condition. *Eur J Oral Sci*. 2004 Apr;112(2):115-20.
45. Laroche M, Lasne Y, Felez A, Moulinier L, Bon E, Cantagrel A, Léophonte P, Mazières B. Ostéocalcine et tabagisme. *Rev Rhum Ed Fr*. 1994 Jun;61(6):433-6.
46. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G. Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. *Int Endod J*. 2017 Apr;50(4):352-66.

47. Kang B, Cheong S, Chaichanasakul T, Bezouglaia O, Atti E, Dry SM, Pirih FQ, Aghaloo TL, Tetradis S. Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. *J Bone Miner Res*. 2013 Jul;28(7):1631-40.
48. Pinto KP, Ferreira CMA, Guimarães AFC, Lima CO, Pires FR, Sassone LM, Silva EJNL. Effects of alcohol and nicotine consumption on the development of apical periodontitis in rats: a correlative micro-computed tomographic, histological and immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2020 Sep;53(9):1238-52.

ANEXOS

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)



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 (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br