



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

BRUNA RAIANY INHÃ AUGUSTO

**INFLUÊNCIAS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NA
BIOCOMPATIBILIDADE E BIOMINERALIZAÇÃO EM
CIMENTOS REPARADORES BIOCERÂMICOS**

Araçatuba - SP
2022

BRUNA RAIANY INHÃ AUGUSTO

**INFLUÊNCIAS DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 NA
BIOCOMPATIBILIDADE E BIOMINERALIZAÇÃO EM
CIMENTOS REPARADORES BIOCERÂMICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “ Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

Dedico à minha mãe e ao meu pai, que me ajudaram a concretizar nosso sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai e minha mãe que, com muito esforço, me ajudaram a concluir esta etapa da minha vida.

À minha tia Josiany Pozzetti, que me incentivou a escolher a odontologia e que sempre me orientou e me ajudou no meu amadurecimento pessoal e ao meu tio Danny Pozzetti por toda ajuda e compreensão, principalmente no primeiro ano da faculdade.

Agradeço ao meu namorado Bruno que me incentiva a não ter medo de aceitar novas oportunidades por mais intimidadoras que pareçam ser e por ser meu ombro amigo nas horas difíceis.

A todos meus familiares, em especial meu avô, minha avó, minha tia Marisa e minha sogra Lourdes que, mesmo distantes, contribuíram para eu conseguir passar pelos momentos de dificuldade.

Agradeço aos meus amigos, Giovana, Amanda, Ana Clara, Ana Caroline, Caroline, Larissa, Natália, Giovani, Vêronica, Gabriel S., Gabriel V., Alana, Barbara, entre outros, que sempre estiveram disponíveis quando precisei de ajuda e que contribuíram para que tudo fosse mais leve.

Ao meu orientador, professor doutor João Eduardo Gomes Filho e ao doutor Renan Dal Fabbro por compreender minha limitada disponibilidade de tempo e por me ajudar neste trabalho de conclusão de curso.

Agradeço a doutora Luiza Paoliello e o ao professor doutor André Bertoz pelas oportunidades que me ofereceram e por todo conhecimento que me passaram.

Aos professores Rogério de Castilho Jacinto e Luciano Tavares Angelo Cintra, por terem aceitado o meu convite para participar da Banca Examinadora.

Agradeço a todos meus professores que me ensinaram o que sabem e que contribuem para que a faculdade de Odontologia de Araçatuba seja referência e a todos que passaram pela minha vida nesses quase oito anos e que contribuíram de alguma forma para realizar esse sonho.

E agradeço a Deus, que por Sua vontade, guiou minhas escolhas e me permitiu chegar até aqui.

*“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos
pensar e aprender ainda mais.”*

Aristóteles

AUGUSTO, B. R. I. Influências dos ácidos graxos Ômega 3 na biocompatibilidade e biomineralização em cimentos reparadores biocerâmicos. 2022. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

Materiais como Agregado Trióxido Mineral (MTA), Biodentine e MTA-HP (MTA high plasticity) são utilizados no tratamento de perfurações radiculares e obturação retrograda. Esses materiais são indicados devido a sua biocompatibilidade e capacidade de promover a deposição de estruturas mineralizadas onde é inserido. O ômega-3 é uma substância anti-inflamatória com capacidade de interferir na mineralização. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de ômega-3 sobre a resposta tecidual de cimentos endodônticos reparadores implantados em tecido subcutâneo de ratos. Foram utilizados 24 ratos Wistar divididos em 4 grupos, com 8 animais para cada grupo. O estudo teve os seguintes grupos: controle (C) e ratos suplementados com ômega-3 (O). Em cada rato foram implantados 4 tubos de polietileno, sendo 1 tubo vazio para controle, e os demais contendo MTA®, Biodentine® e MTA-HP®. Os períodos de avaliação foram de 7 e 30 dias (n=8/tempo). Após a eutanásia, os tubos e o tecido circundante foram removidos e processados para inclusão em resina histológica. Cortes semi seriados na espessura de 3 µm foram utilizados para análise da resposta inflamatória, espessura da cápsula fibrosa e necrose tecidual. Cortes na espessura de 10 µm foram utilizados para análise da mineralização através da coloração por Von Kossa e mantidos sem corar para análise de birrefringência sob luz polarizada. Os dados foram submetidos à análise estatística considerando o nível de significância de 5% (p <0,05). Em 7 e 30 dias, todos os grupos tinham estruturas que eram positivas para a coloração de Von Kossa e birrefringente à luz polarizada para uma dieta regular ou suplementada com ω-3 PUFAs. E os grupos suplementados induziram menos infiltrado inflamatório quando comparado com grupos que não receberam suplementação. Dessa forma, o presente estudo mostrou que a suplementação com ω-3 PUFAs foi capaz de diminuir o infiltrado inflamatório e manter a biomineralização induzida pelo MTA, MTA HP, e BDT.

Palavras-chave: Resposta tecidual. Inflamação. Mineralização. Ômega-3.

AUGUSTO, B. R. I. **Influence of Omega 3 Fatty Acids on biocompatibility and biomineralization in bioceramic repair cements**. 2022. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

Materials such as Mineral Trioxide Aggregate (MTA), Biodentine and MTA-HP (MTA high plasticity) are used in the treatment of root perforations and retrograde obturation. These materials are indicated due to their biocompatibility and ability to promote the deposition of mineralized structures where it is inserted. Omega-3 is an anti-inflammatory substance with the ability to interfere with mineralization. The aim of this study was to evaluate the influence of omega-3 supplementation on the tissue response of endodontic repair cements implanted in rat subcutaneous tissue. Twenty-four Wistar rats divided into 4 groups with 8 animals for each group were used. The study had the following groups: control (C) and rats supplemented with omega-3 (O). Four polyethylene tubes were implanted in each rat, 1 empty for control, and the others containing MTA®, Biodentine® and MTA-HP®. The evaluation periods were 7 and 30 days (n=8/time). After euthanasia, the tubes and surrounding tissue were removed and processed for inclusion in histology resin. Semi-serial sections at 3 µm thickness were used for analysis of the inflammatory response, fibrous capsule thickness, and tissue necrosis. Cuts in the thickness of 10 µm were used for analysis of mineralization by Von Kossa staining and kept without staining for birefringence analysis under polarized light. The data were submitted to statistical analysis considering a significance level of 5% (p <0.05). At 7 and 30 days, all groups had structures that were positive for Von Kossa staining and birefringent to polarized light for regular diet or supplemented with ω-3 PUFAs. And the groups supplemented induced less inflammatory infiltrate when compared to groups that did not receive supplementation. Thus, the present study showed that supplementation with ω-3 PUFAs was able to decrease the inflammatory infiltrate and maintain the biomineralization induced by MTA, MTA HP, and BDT.

Keywords: Tissue response. Inflammation. Mineralization. Omega-3.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografias mostrando a resposta inflamatória na coloração H&E 18
- Figura 2 - Fotomicrografias mostrando estruturas positivas para coloração Von Kossa. 19
- Figura 3 - Fotomicrografias mostrando estruturas birrefringentes à luz polarizada 20

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Quinase Ativada por AMP
BD	Biodentine
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
DHA	Ácido Docosahexaenóico
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
GMA	Metacrilato de Glicol
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
MTA	Agregado Mineral Trióxido
MTA-HP	Agregado Mineral Trióxido de Alta Plasticidade
PGE2	Prostaglandina E2
SIRT1	Regulador de Informação Silencioso
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
ω -3 PUFAs	Ácidos Graxos Polinsaturados Omega-3

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO.....	13
3 METODOLOGIA.....	15
3.1 Delineamento experimental.....	14
3.2 Suplementação com PUFA's u-3	14
3.3 Implante subcutâneo	14
3.4 Análise estatística	15
4 RESULTADOS	17
5 DISCUSSÃO	22
6 CONCLUSÃO.....	25
REFERÊNCIAS.....	26
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

Os tratamentos endodônticos tiveram resultados adequados e ganharam expressão na comunidade científica¹⁻⁴. De fato, e quando devidamente indicados, procedimentos tais como o capeamento pulpar, a pulpotomia, o vedamento das perfurações de furca/raiz e a apexificação mantêm o dente na cavidade oral, melhorando não só a estética, mas também permitindo a mastigação. Quando estes procedimentos são indicados, é necessária a inserção de um material biocompatível, pois podem promover a diferenciação celular, induzir uma barreira de tecido mineralizado, proteger a região de microinfiltração e promover o processo de cicatrização¹⁻⁵.

O agregado mineral trióxido (MTA), o Biodentine (BDT), e o MTA de alta plasticidade (MTA Repair HP) são materiais reparadores à base de silicato de cálcio com indicações semelhantes tais como a pulpotomia, enchimento retrógrado, vedamento de perfuração radicular ou de furca e apexificação^{1,3-8}. O MTA, BDT e, MTA Repair HP são biocompatíveis, contudo inicialmente induzem uma resposta inflamatória pronunciada e mais tarde contribuem para propiciar um ambiente favorável levando à deposição de uma barreira de tecido mineralizado⁹.

Os ácidos graxos polinsaturados Omega-3 (ω -3 PUFAs), tais como o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) são ácidos graxos essenciais não sintetizados pelo humano¹⁰. Devido às suas propriedades anti-inflamatórias, os PUFAs ω -3 têm sido utilizados como adjuvantes no tratamento de doenças inflamatórias como a artrite reumatóide¹¹, doença coronária¹² e diabetes¹³. Além disso, estes ácidos também demonstraram efeitos benéficos no tratamento de doenças orais tais como estomatite recorrente, gengivite, periodontite e periodontite apical¹⁴.

Estudos anteriores envolvendo terapia endodôntica demonstram que a saúde sistêmica influencia a patologia endodôntica, mas também a suplementação dietética sistêmica pode influenciar de forma benéfica o processo da saúde/doença, atenuando o processo inflamatório local e sistêmico, bem como a reabsorção óssea patológica¹⁵⁻¹⁹. Portanto, a literatura enfatiza que as estratégias nutricionais podem ser aplicadas para controlar o processo inflamatório. No entanto, nenhum destes

estudos investigou o efeito de ω -3 PUFAs na biocompatibilidade dos cimentos de reparação endodôntica.

2 OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar se a suplementação sistêmica com ω -3 PUFAs pode modular positivamente o processo inflamatório e a biomineralização do MTA, do Biodentine e do MTA Repair HP, utilizando a metodologia de implante subcutâneo de tecido de rato.

3 METODOLOGIA

No presente estudo foram utilizados 32 ratos Wistar com 2-3 meses de idade, pesando 250-280g foram utilizados. Os animais foram alojados em salas com temperatura controlada e receberam água e comida à vontade. O tratamento dos animais foi realizado após a aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA/UNESP (Processo CEUA FOA nº 2018-0432).

3.1 Delineamento experimental

O tamanho da amostra foi estimado com base em dados de um estudo anterior, mas utilizando uma amostra de potência de 90%, o que é corroborado por estudos anteriores^{1,2,8,9} e considerando um erro alfa de 0,05 para reconhecer uma diferença significativa, foi necessário um número mínimo de oito ratos/período de análise. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (8 ratos/grupo): grupo controle de ratos não tratados (C 7 dias e C 30 dias) e ratos tratados com ω -3 PUFAs (O, 7 dias e O, 30 dias).

3.2 Suplementação com PUFAs ω -3

Os ratos do grupo ω -3 PUFAs receberam via oral, por procedimento de gavagem, ω -3 PUFAs (Omega 3 Catarinense-Laboratorio Catarinense S.A, Joinville, SC, Brasil) (solução de água, 40 mg/kg; 60% EPA e 40% DHA), uma vez por dia^{20,21}, enquanto que os ratos do grupo de controle receberam água destilada de controle. Todos os animais receberam os tratamentos uma vez por dia durante 15 dias antes da implantação dos tubos de polietileno (administração profilática) e até ao último dia de cada período experimental.

3.3 Implante subcutâneo

Os tubos de polietileno (Abbott Labs do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) com 1,0 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo, e 10,0 mm de comprimento²² foram enchidos com MTA branco (Angelus™), BDT (Septodont™) e

MTA-HP (Angelus™) preparados de acordo com as recomendações do fabricante; os tubos vazios foram utilizados como controle. O procedimento cirúrgico foi realizado com base em estudos anteriores^{1,2,8,9}. Os ratos foram anestesiados com cetamina (87 mg / kg Francotar; Virbac do Brasil Ind e Com Ltda, Roseira, Brasil) e xilazina (13 mg / kg Rompum, Bayer S A, São Paulo, Brasil) administrada por via intramuscular, o dorso foi raspado, a pele desinfetada com solução de iodo a 5% e uma incisão de 2 cm foi feita numa orientação cabeça-a-cauda com uma lâmina Bard-Parker #15 (BD, Franklin Lakes, NJ). A pele foi defletida para criar 2 bolsas no lado direito e 2 bolsas no lado esquerdo da incisão. Após os tubos terem sido implantados aleatoriamente nas bolsas, subseqüentemente identificados de acordo com o material recebido, a pele foi fechada com suturas de seda 4-0^{1,2,8,9}.

Nos 7 e 30 dias após a implantação, os animais foram eutanasiados por uma overdose de anestésico (Thiopentax, Cristalia Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., São Paulo, Brasil), os tubos com tecido circundante foram removidos e fixados em solução de formol a 10% (pH = 7,0). Os tubos foram então cortados transversalmente, e ambas as metades foram novamente cortadas longitudinalmente com o uso de uma lâmina afiada para permitir que as superfícies fossem prontamente mantidas em contato com as soluções de processamento². As amostras foram processadas para o metacrilato de glicol (GMA)^{9,23}. Secções em série de 3 mm de espessura foram coradas com hematoxilina-eosina, enquanto secções de 10 mm foram processadas por coloração Von Kossa ou diretamente examinadas sob luz polarizada^{1,9}.

O tecido em contato com o material na abertura do tubo foi avaliado da seguinte forma: 1, nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação; 2, menos de 25 células e reação suave; 3, entre 25 e 125 células e reação moderada; 4, 126 ou mais células e reação grave¹. Todas as análises foram realizadas utilizando uma ampliação de 400x no centro sobre a abertura do tubo. As estruturas Von Kossa positivas ou estruturas birrefringentes sob luz polarizada foram registradas como presentes ou ausentes¹. Todos os dados foram analisados por um único operador calibrado cegamente sob microscopia de luz (DM 4000 B; Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha).

3.4 Análise estatística

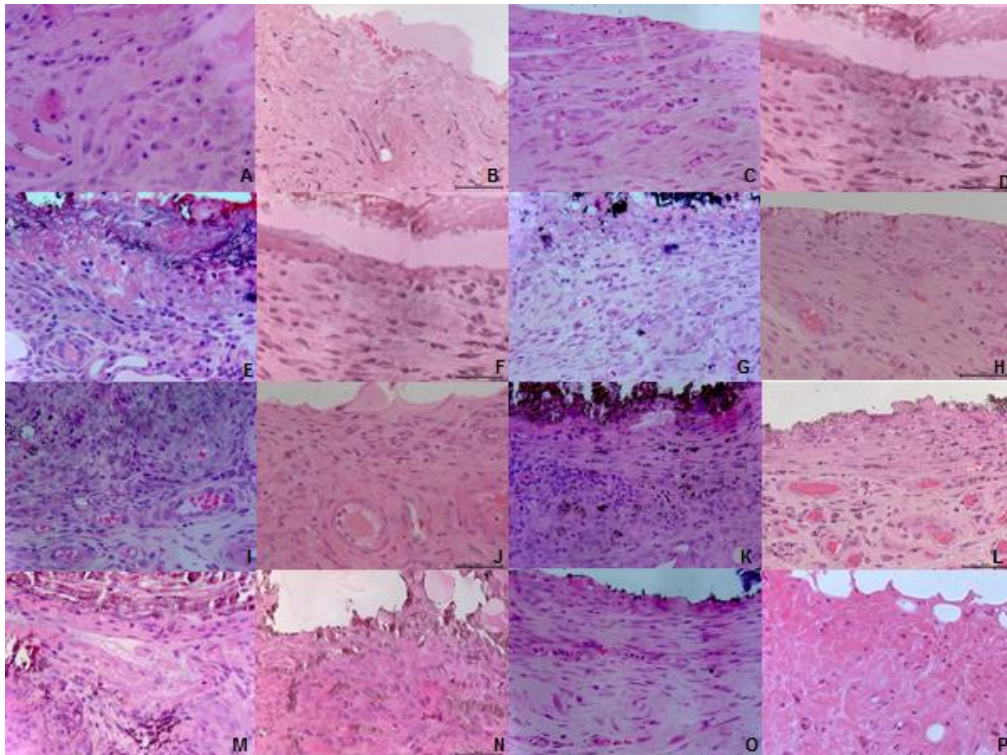
O teste Mann-Whitney foi realizado com $p < 0,05$, utilizando o software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA).

4 RESULTADOS

Os ratos estavam saudáveis quando os tubos foram removidos para processamento posterior e análise histológica. Os resultados da análise histológica são fornecidos na Tabela e nas Figuras. A maioria das amostras apresentou infiltrado inflamatório moderado sete dias após a implantação dos tubos, principalmente neutrófilos, linfócitos e macrófagos. Em sete dias, os grupos MTA, MTA HP, BDT, e controle suplementado com ω -3 PUFAs induziram menos infiltrado inflamatório quando comparado com grupos que não receberam suplementação ($p < 0,05$). No geral, após trinta dias de implantação, a resposta inflamatória induzida pelos materiais foi menor e mais fibroblastos estavam presentes na cápsula fibrosa. No trigésimo dia, os grupos MTA, MTA-HP, e BDT também causaram uma resposta inflamatória menor com uma diferença estatística entre suplementada e não suplementada ($p < 0,05$); no grupo de controle (tubos vazios), a suplementação não alterou a resposta do tecido ($p < 0,05$).

Nos dias 7 e 30, todos os tubos contendo biomateriais tinham estruturas que eram positivas para a coloração de Von Kossa (Figura 2) e birrefringente à luz polarizada para uma dieta regular ou suplementada com ω -3 PUFAs (Figura 3); tais estruturas não ocorreram nos tubos vazios. Estas estruturas positivas foram observadas principalmente dispersas no tecido conjuntivo da cápsula fibrosa, mas alguns espécimes mostraram a positividade presente na região de abertura dos tubos. Estas características foram observadas tanto para as estruturas positivas Von Kossa, que têm coloração escura nas secções histológicas, como para as estruturas birrefringentes analisadas sob luz polarizada (Tabela 1).

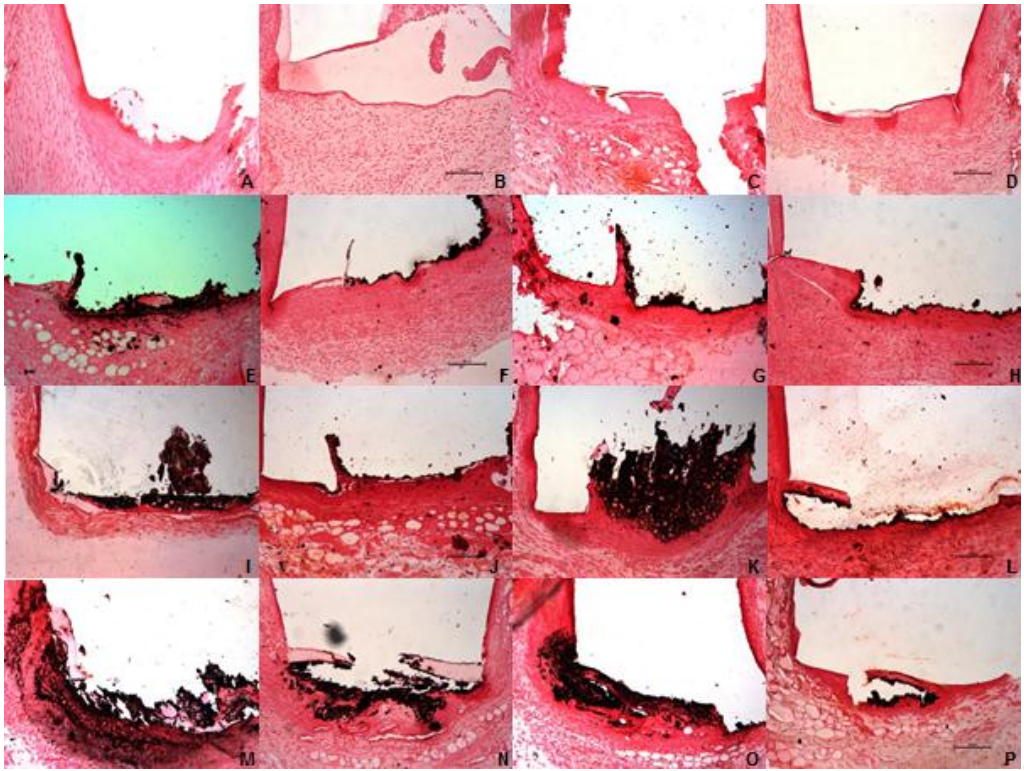
Figura 1 - Fotomicrografias mostrando a resposta inflamatória na coloração H&E.



Legenda: **A.** Dieta regular com tubo vazio, após 7 dias. **B.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 7 dias. **C.** Dieta regular com tubo vazio, após 30 dias. **D.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 30 dias. **E.** Dieta regular com MTA, após 7 dias. **F.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 7 dias. **G.** Dieta regular com MTA, após 30 dias. **H.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 30 dias. **I.** Dieta regular com MTA HP, após 7 dias. **J.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 7 dias. **K.** Dieta regular com MTA HP, após 30 dias. **L.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 30 dias. **M.** Dieta regular com BDT, após 7 dias. **N.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 7 dias. **O.** Dieta regular com BDT, após 30 dias. **P.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 30 dias.

Fonte: Bruna R. I. Augusto, 2022.

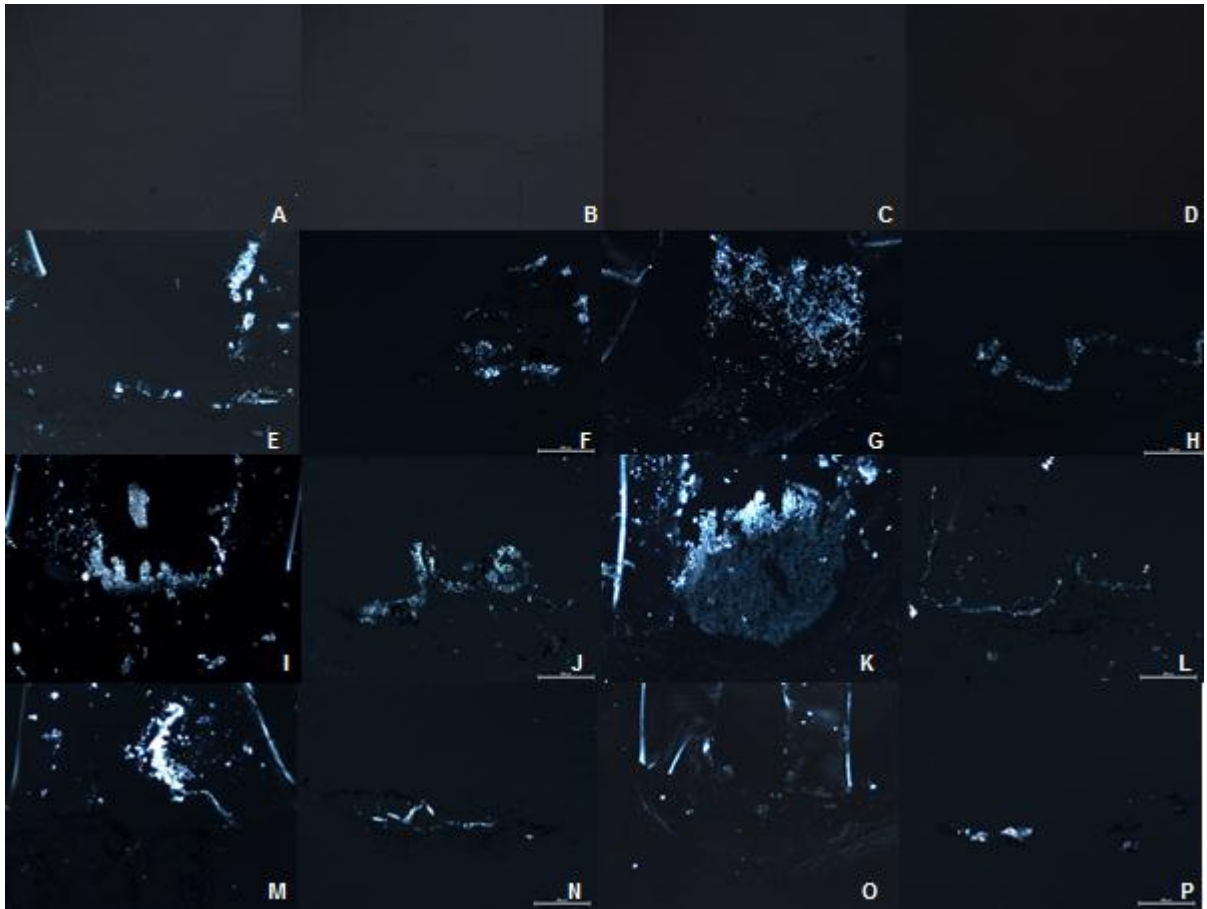
Figura 2- Fotomicrografias mostrando estruturas positivas para coloração Von Kossa.



Legenda: **A.** Dieta regular com tubo vazio, após 7 dias. **B.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 7 dias. **C.** Dieta regular com tubo vazio, após 30 dias. **D.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 30 dias. **E.** Dieta regular com MTA, após 7 dias. **F.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 7 dias. **G.** Dieta regular com MTA, após 30 dias. **H.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 30 dias. **I.** Dieta regular com MTA HP, após 7 dias. **J.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 7 dias. **K.** Dieta regular com MTA HP, após 30 dias. **L.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 30 dias. **M.** Dieta regular com BDT, após 7 dias. **N.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 7 dias. **O.** Dieta regular com BDT, após 30 dias. **P.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 30 dias.

Fonte: Bruna R. I. Augusto, 2022;

Figura 3- Fotomicrografias mostrando estruturas birrefringentes à luz polarizada.



Legenda: **A.** Dieta regular com tubo vazio, após 7 dias. **B.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 7 dias. **C.** Dieta regular com tubo vazio, após 30 dias. **D.** Dieta ω -3 PUFAs com tubo vazio, após 30 dias. **E.** Dieta regular com MTA, após 7 dias. **F.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 7 dias. **G.** Dieta regular com MTA, após 30 dias. **H.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA, após 30 dias. **I.** Dieta regular com MTA HP, após 7 dias. **J.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 7 dias. **K.** Dieta regular com MTA HP, após 30 dias. **L.** Dieta ω -3 PUFAs com MTA HP, após 30 dias. **M.** Dieta regular com BDT, após 7 dias. **N.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 7 dias. **O.** Dieta regular com BDT, após 30 dias. **P.** Dieta ω -3 PUFAs com BDT, após 30 dias.

Fonte: Bruna R. I. Augusto, 2022.

Tabela 1 - Resposta inflamatória e biomineralização no controle (dieta regular) e ω -3 PUFAs (dieta suplementar) no grupo controle (tubo vazio), Agregado Mineral Trióxido (MTA), MTA de alta plasticidade (MTA HP) e Biodentine (BDT) aos 7 e 30 dias.

	7 dias		30 dias	
	Controle	ω -3 PUFAs	Controle	ω -3 PUFAs
Resposta Inflamatória - H&E				
Tubo vazio	3 ^A	2 ^B	2 ^A	1 ^A
MTA	4 ^A	2 ^B	3 ^A	2 ^B
MTA HP	4 ^A	2 ^B	3 ^A	2 ^B
BDT	3 ^A	2 ^B	2 ^A	1 ^B
Biomineralização – VK/LP				
Tubo Vazio	0%	0%	0%	0%
MTA	100%	100%	100%	100%
MTA HP	100%	100%	100%	100%
BDT	100%	100%	100%	100%

* Diferentes letras na mesma linha indicam diferença estatística entre o mesmo material em diferentes grupos: controle (dieta regular) e ω -3 PUFAs (dieta suplementar) ($p < 0.05$).

Fonte: Bruna R. I. Augusto, 2022.

5 DISCUSSÃO

A medicina endodôntica, área da endodontia que estuda a relação entre as condições sistêmicas e as patologias endodônticas, tem mostrado que a suplementação dietética pode interferir no processo da doença^{14,17}. Assim, o presente estudo utilizou a suplementação com ω -3 PUFAs para avaliar esta correlação entre a saúde sistêmica e a biocompatibilidade dos cimentos de silicato de cálcio. No presente estudo, a suplementação sistêmica com ω -3 PUFAs foi responsável pela diminuição do processo inflamatório induzido pelo MTA, MTA-HP e BDT no tecido subcutâneo de ratos.

Segundo a Norma Internacional ISO 10993-6.25²² e a literatura^{1,2,8,23}, a metodologia de implante de tubos de polietileno contendo materiais dentários é bem aceita. Isto se deve às características do tubo, o que limita a área de dispersão do material no tecido subcutâneo, facilitando a área de análise². Além disso, é um método de avaliação preliminar in vivo da resposta do tecido induzida pelos materiais¹.

Uma inflamação inadequada, excessiva ou descontrolada contribui para uma série de doenças humanas. Envolve uma multiplicidade de tipos celulares, mediadores químicos e interações²⁴. Sabe-se que os cimentos de reparação utilizados neste estudo não são inertes, ou seja, induzem uma resposta inflamatória onde estão inseridos^{2,5,7}. Contudo, não devem causar uma resposta inflamatória exacerbada no tecido, e, além disso, devem promover um ambiente que favoreça a cura dos tecidos em que serão inseridos. Estudos anteriores demonstram que o MTA, MTA-HP e BDT são biocompatíveis e induzem a deposição de estruturas mineralizadas⁹. Contudo, processos inflamatórios de ordem sistêmica podem alterar esta biocompatibilidade e, além disso, complementar a dieta com algum composto que reduza a inflamação sistêmica pode ser benéfico^{9,17}.

A composição do ω -3 PUFAs utilizado neste estudo foi 60% de Ácido Eicosapentaenóico (EPA) + 40% de Ácido Docosahexaenóico (DHA). Estudos mostram que o aumento da ingestão destes componentes pode atenuar a inflamação, uma vez que o EPA demonstrou diminuir a expressão da proteína da ciclo-oxigenase 2 (COX-2), bem como uma diminuição da prostaglandina E2 (PGE2)²⁵⁻²⁷. O DHA tem também propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes.

Sabe-se que os efeitos do DHA incluem a ativação de vias antioxidantes como as resolvinas e as proteínas, além de inibir as citocinas pró-inflamatórias²⁸.

Neste estudo, a reação inflamatória causada pelo MTA, MTA-HP e BDT, aos 7 e 30 dias, foi menor quando o animal recebeu a suplementação com ω -3 PUFAs. Este fato pode ser explicado porque os ácidos graxos (ω -3 PUFAs) são responsáveis pela modulação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) ou pela sinalização celular mediada pelo regulador de informação silencioso 1 (SIRT1)²⁹. Sabe-se que o SIRT1 pode levar à desativação do fator nuclear de kappa B (NFkB) e também à inibição do ácido araquidônico, que por sua vez está diretamente relacionada com a conversão de moléculas com atividade pró-inflamatória, tais como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 beta (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6)³⁰. Sugere que ω -3 PUFAs influenciam as vias de sinalização que controlam a expressão genética nas células inflamatórias. Além disso, foi relatado um aumento na expressão da citocina anti-inflamatória interleucina 10 (IL-10)^{29,30}.

MTA, MTA-HP e BDT são biomateriais à base de silicato de cálcio. O MTA tradicional é composto por um pó que, depois de manipulado, se transforma numa consistência arenosa, o que torna difícil a inserção deste material na cavidade⁹. Por outro lado, o MTA-HP e o BDT têm maior plasticidade e, conseqüentemente, são mais fáceis de manusear e de inserir. Quando em contato com o tecido, os materiais libertam íons cálcio e hidroxila, aumentando o pH, desencadeando uma resposta inflamatória que tende a ser transitória. Além disso, os íons de cálcio reagem com o dióxido de carbono dos tecidos, originando estruturas calcificadas^{1,2,7,8}. A literatura relata que estas estruturas calcificadas podem estimular o processo de biomineralização e que podem ser detectadas através do método Von Kossa e também através de estruturas birrefringentes de luz polarizada^{1,2,7,8}.

Estudos correlacionam o consumo de ω -3 PUFAs com a otimização da saúde e massa óssea. De fato a investigação animal demonstrou que há mais formação de osteoblastos, aumento da força e densidade óssea, bem como inibição da formação de células osteoclásticas^{31,32}. Não só estudos com animais, mas também estudos com humanos demonstraram um efeito positivo na formação e metabolismo ósseo, o que poderia representar uma estratégia nutricional suplementar³³.

Neste estudo foram detectadas estruturas calcificadas pelo método Von Kossa e por estruturas de luz polarizada tanto no grupo com dieta regular como no

grupo que teve a sua dieta complementada com ω -3 PUFAs. A técnica Von Kossa é um método histológico utilizado para identificar estruturas calcificadas e a birrefringência de luz polarizada identifica materiais cristalinos em secções histológicas sem o uso de corantes. Benetti et al. (2019) e Cosme-Silva et al. (2020) também observaram estruturas positivas no tecido subcutâneo de ratos quando utilizaram estas técnicas^{1,8}. Além disso, estruturas calcificadas no tecido subcutâneo de ratos, ou seja, o sítio ectópico, demonstram a osteoindução destes materiais².

Este tipo de estudo é o primeiro a demonstrar que os suplementos alimentares podem ser benéficos para a biocompatibilidade dos cimentos endodônticos à base de silicato de cálcio. Tal como nos estudos pré-clínicos, os resultados do presente estudo devem ser analisados com cautela, uma vez que a utilização de animais nos permite avaliar a correlação sistémica e a biocompatibilidade num ambiente controlado, mas pode não retratar com precisão as condições em seres humanos.

6 CONCLUSÃO

A suplementação com ω -3 PUFAs foi capaz de diminuir o infiltrado inflamatório e não interferir na biomineralização induzida pelo MTA, MTA HP, e BDT.

REFERÊNCIAS

1. BENETTI, F. *et al.* Cytotoxicity, biocompatibility and biomineralization of a new ready-for-use bioceramic repair material. **Braz. Dent. J.**, v. 30, n. 4, p. 325-332, jul. 2019. doi.org/10.1590/0103-6440201902457.
2. COSME-SILVA, L. *et al.* Biocompatibility and immunohistochemical evaluation of a new calcium silicate-based cement, Bio-C Pulpo. **Int. Endod. J.**, v. 52, n. 5, p. 689-700, May 2019. doi.org/10.1111/iej.13052.
3. SILVA, L. L. C. *et al.* Comparison between calcium hydroxide mixtures and mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy: a randomized controlled trial. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 27, 2019. doi.org/10.1590/1678-7757-2018-0030.
4. ARAÚJO, L. B. *et al.* Effects of mineral trioxide aggregate, Biodentine TM and calcium hydroxide on viability, proliferation, migration and differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 26, Feb 2018. doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0629.
5. JUNQUEIRA, M. A. *et al.* Clinical, radiographic and histological evaluation of primary teeth pulpotomy using MTA and ferric sulfate. **Braz. Dent. J.**, v. 29, n. 2, p. 159-165, Mar 2018. doi.org/10.1590/0103-6440201801659.
6. PESKERSOY, C.; LUKARCANIN, J.; TURKUN, M. Efficacy of different calcium silicate materials as pulp-capping agents: Randomized clinical trial. **J. Dent. Sci.**, v. 16, n. 2, p. 723-731, Mar 2021. doi.org/10.1016/j.jds.2020.08.016.
7. HOLLAND, R. *et al.* Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. **J. Endod.**, v. 25, n. 3, p. 161-166, Mar 1999. doi.org/10.1016/S0099-2399(99)80134-4.

8. COSME-SILVA, L. *et al.* Cytotoxicity, inflammation, biomineralization, and immunoexpression of IL-1 β and TNF- α promoted by a new bioceramic cement. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 28, 2020. doi.org/10.1590/1678-7757-2020-0033.
9. COSME-SILVA, L. *et al.* Hypertension affects the biocompatibility and biomineralization of MTA, High-plasticity MTA, and Biodentine®. **Braz. Oral Res.**, v. 33, 2019. doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0060.
10. PRENTICE, A.; BATES, C. J. Adequacy of dietary mineral supply for human bone growth and mineralisation. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 48, Suppl 1, p. S161-76; discussion S177, Feb 1994.
11. RAAD, T. *et al.* Dietary interventions with or without omega-3 supplementation for the management of rheumatoid arthritis: A systematic review. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3506, Oct 2021. doi.org/10.3390/nu13103506.
12. KHAN, S. U. *et al.* Effect of omega-3 fatty acids on cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis. **EClinicalMedicine**, v. 38, p. 100997, Aug 2021. doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.100997.
13. MA, M. *et al.* Omega-3 index and type 2 diabetes: Systematic review and meta-analysis. **Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids**, v. 174, p. 102361, Nov 2021. doi.org/10.1016/j.plefa.2021.102361.
14. AZUMA, M. M. *et al.* The use of omega-3 fatty acids in the treatment of oral diseases. **Oral Dis.**, v. 28, n. 2, p. 264-274, Oct 2022. doi.org/10.1111/odi.13667.
15. COSME-SILVA, L. *et al.* Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. **Int. Endod. J.**, v. 53, n. 8, p. 1084-1092, Aug 2020. doi.org/10.1111/iej.13311.
16. DAL-FABBRO, R. *et al.* Excessive caffeine intake increases bone resorption associated with periapical periodontitis in rats. **Int. Endod. J.**, v. 54, n. 10, p. 1861-1870, Oct 2021. doi.org/10.1111/iej.13578.

17. CINTRA, L. T. A. *et al.* Evolution of endodontic medicine: a critical narrative review of the interrelationship between endodontics and systemic pathological conditions. **Odontology**, v. 109, n. 4, p. 741-769, Oct 2021. doi.org/10.1007/s10266-021-00636-x.
18. DAL-FABBRO, R. *et al.* Effect of red wine or its polyphenols on induced apical periodontitis in rats. **Int. Endod. J.**, v. 54, n. 12, p. 2276-2289, Dec 2021. doi.org/10.1111/iej.13633.
19. AZUMA, M. M. *et al.* Omega-3 Fatty Acids Alter Systemic Inflammatory Mediators Caused by Apical Periodontitis. **J. Endod.**, v. 47, n. 2, p. 272-277, Feb 2021. doi.org/10.1016/j.joen.2020.11.015.
20. VARDAR, S. *et al.* Therapeutic versus prophylactic plus therapeutic administration of omega-3 fatty acid on endotoxin-induced periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 75, n. 12, p. 1640-1646, Dec 2004. doi.org/10.1902/jop.2004.75.12.1640.
21. AZUMA, M. M. *et al.* Omega 3 Fatty Acids Reduce Bone Resorption While Promoting Bone Generation in Rat Apical Periodontitis. **J. Endod.**, v. 43, n. 6, p. 970–6, Jun. 2017. doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.006.
22. ISO. Standardization, International Organization ISO 10993-6:2016: Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation.
23. GOMES-FILHO, J. E. *et al.* Glycol methacrylate: an alternative method for embedding subcutaneous implants. **J. Endod.**, v. 27, n. 4, p. 266-268, Apr. 2001. doi.org/10.1097/00004770-200104000-00005.
24. BENNETT, J. M. *et al.* Inflammation—nature's way to efficiently respond to all types of challenges: implications for understanding and managing “the epidemic” of chronic diseases. **Front. Med.**, v. 5, p. 316, Nov. 2018. doi.org/10.3389/fmed.2018.00316.

25. CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 45, n. 5, p. 1105-1115, Oct. 2017. doi.org/10.1042/BST20160474.
26. YAQOUB, P.; CALDER, P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cell. Immunol.**, v. 163, n. 1, p. 120-128, Jun. 1995. doi.org/10.1006/cimm.1995.1106.
27. CHAPKIN, R. S.; AKOH, C. C.; MILLER, C. C. Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis. **J. Lipid Res.**, v. 32, n. 7, p. 1205-1213, Jul. 1991.
28. CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutrients**, v. 2, n. 3, p. 355-374, Mar 2010. doi.org/10.3390/nu2030355.
29. XUE, B. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids antagonize macrophage inflammation via activation of AMPK/SIRT1 pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e45990, Oct. 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0045990.
30. HU, C. *et al.* Effects of omega-3 fatty acids on markers of inflammation in patients with chronic kidney disease: A controversial issue. **Ther. Apher. Dial.**, v. 22, n. 2, p. 124-132, Apr. 2018. doi.org/10.1111/1744-9987.12611.
31. WATKINS, B. A. *et al.* 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.**, v. 130, n. 9, p. 2274-2284, Sep. 2000. doi.org/10.1093/jn/130.9.2274.
32. SUN, D. *et al.* Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, n. 7, p. 1206-1216, Jul. 2003. doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.7.1206.

33. GRIEL, A. E. *et al.* An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. **Nutr. J.**, v. 6, n. 1, p. 1-8, Dec. 2007. doi.org/10.1186/1475-2891-6-2.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO 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 Relatório Final do trabalho intitulado "**Influência da suplementação de Ômega-3 sobre a resposta tecidual de cimentos endodônticos reparadores**", Processo FOA nº 2018-0432, sob responsabilidade de João Eduardo Gomes Filho e colaboração de Leopoldo Cosme Silva, Alana Sant'Ana do Prado e Bruna Raiany Inhá Augusto foi aprovado pela CEUA em 28 de Março de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Influence of Omega-3 supplementation on the tissue response of repairing endodontic cements**", Process FOA nº 2018-0432, under the supervision of João Eduardo Gomes Filho and collaboration of Leopoldo Cosme Silva, Alana Sant'Ana do Prado and Bruna Raiany Inhá Augusto had its the Final Report approved by the CEUA on March 28, 2022.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br