



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina
Departamento de Cirurgia
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia

RADAMÉS BEZERRA MELO

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9,
6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO
ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 APÓS EXODONTIA EM RATOS**

FORTALEZA

2014

RADAMÉS BEZERRA MELO

**AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA
9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO
ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 APÓS EXODONTIA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

**FORTALEZA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M528

Melo, Radamés Bezerra

Ação antiinflamatória e antioxidante do mix de óleos ômega 9, 6 e 3 de baixa relação ômega-6 / ômega-3 e elevada relação ômega-9 / ômega-6 após exodontia em ratos/ Radamés Bezerra Melo. - 2014.

40 f.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, Departamento de Cirurgia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

1. Cirurgia Oral. 2. Inflamação. 3. Estresse Oxidativo. 4. Ácidos Graxos. 5. Metabolismo. I. Vasconcelos, Paulo Roberto Leitão de, *orient.* II. Universidade Federal do Ceará. III. Título.

CDD: 617

RADAMÉS BEZERRA MELO

AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 APÓS EXODONTIA EM RATOS.

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação Strictu Sensu em Cirurgia do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: 24/10/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho
Unichristus

Dedico este trabalho aos meus pais, JOSÉ ULISSES DE SOUZA MELO e VALÉRIA MAGALHÃES BEZERRA MELO, aos meus irmãos RAINUS BEZERRA MELO e RADUÁN BEZERRA MELO, meus avós FRANCISCO IRAN BEZERRA DE OLIVEIRA (em memória – julho 2014) e IRLES DE MAGALHÃES BEZERRA, à minha noiva ANA PAULA MENDES CARNEIRO CERQUEIRA, e a todos os meus familiares e amigos próximos.

PAI, obrigado por tudo que me ensinaste desde o começo de minha formação com exemplos, conhecimentos, ensinamentos e virtudes imprescindíveis para o meu crescimento profissional e vida em sociedade, amo você.

MÃE, agradeço por todas as lições que me deste e todo o esforço que tiveste para minha educação e zelo tido em minha formação, sendo sempre o melhor abrigo nos momentos de dificuldade e felicidade, amo você.

RAINUS e RADUÁN, obrigado pelo convívio, pelas discussões e lições de vida que já foram dadas a mim por vocês. Vocês são meus melhores amigos e com quem eu sempre poderei contar até o fim da vida, amo vocês.

IRAN (em memória – julho 2014) e IRLES, sou grato a vocês pelo carinho, pela bondade, pelos ensinamentos, pela unidade familiar, e por toda a esperança de continuidade familiar que a mim é repassada, meus avós queridos e amados.

ANA PAULA, agradeço a paciência, a força e o apoio, sendo uma parceira em todos os momentos, ao seu lado alcancei e comemorei, alcançarei e comemorarei as minhas maiores vitórias com a força do seu companheirismo, amo você.

VOCÊS SÃO MINHA VIDA!

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, Coordenador do Programa de Pós graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade a mim dada, disponibilidade, atenção, e orientação precisa.

Ao Professor Doutor Sérgio Botelho Guimarães, Coordenador do Laboratório de Cirurgia Experimental e professor do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela revisão crítica do artigo '*Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats*', artigo esse que faz parte dessa dissertação de mestrado.

Ao Professor Doutor Reinaldo Barreto Oriá, Coordenador do Laboratório da Biologia da Cicatrização, Ontogenia e Nutrição de Tecidos (LABICONTE) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelas boas sugestões, por todo o apoio na análise deste trabalho e pela contribuição crítica prestada como membro da banca de qualificação dessa dissertação de mestrado

Ao Prof. Dr. José Ulisses de Souza Melo, Professor da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição crítica prestada como membro da banca de qualificação dessa dissertação de mestrado e por todos os esclarecimentos ao longo da confecção dessa dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. Renato Luiz Maia Nogueira, Professor da Universidade Federal do Ceará, pela contribuição crítica prestada como membro da banca de defesa dessa dissertação de mestrado.

Ao Prof. Dr. Abrahão Cavalcante Gomes de Souza Carvalho, Professor da Faculdade Christus, pela contribuição crítica prestada como membro da banca de defesa dessa dissertação de mestrado.

Ao Professor Mestre Sormani Bento de Fernandes de Queiroz, Professor da Faculdade Católica Rainha do Sertão, pela contribuição crítica prestada como membro da qualificação de defesa dessa dissertação de mestrado.

Ao amigo Professor Mestre Paulo Goberlânio de Barros Silva, doutorando do Programa de Pós graduação *Strictu Sensu* em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, pelas ajudas decisivas nessa dissertação.

À Sra. Aline Matos Cunha, Nutricionista da empresa Nutrimed, pelo preparo das misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 empregadas no experimento e a extrema delicadeza em prestar esclarecimentos, sempre que necessário.

Às Senhoras Maria Luciene Vieira de Oliveira e Magda Maria Gomes Fontenele, secretárias do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pela dedicação e auxílio constantes.

Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, assistente técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, pelo zelo, ajuda e atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

*“A sinceridade não é dizer tudo o que se
pensa, mas crer em tudo o que se diz.”*

(Tito Livio)

RESUMO

AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIOXIDANTE DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 APÓS EXODONTIA EM RATOS.

RADAMÉS BEZERRA MELO. Pós-Graduação Stricto-Sensu do Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). SETEMBRO, 2014. Orientador Prof. Dr. PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

Os ácidos graxos insaturados ômega-3 e ômega-9 possuem ação anti-inflamatória e antioxidante, enquanto o ômega-6 possui ação pró-inflamatória. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ação antioxidante e anti-inflamatória do mix de óleos em concentrações nutracêuticas com alta razão ômega-9: ômega-6, favorecendo ação antioxidante, e baixa razão ômega-6:ômega-3, favorecendo ação anti-inflamatória no terceiro dia pós exodontia em ratos. Foram utilizados trinta e dois ratos Wistar jovens com 270-310g distribuídos aleatoriamente em quatro grupos de 8 animais: Grupo Sham, Grupo Solução Salina, Grupo mix isolipídico e Mix Teste. Os animais receberam NaCl 0,9%, Grupo Sham e Grupo Solução Salina, ou mix isolipídico, (ácido alfa-linoléico - ALA) mistura contendo ômega-6:ômega-3 óleos (relação de 8:01) e ômega-9:ômega-6 (relação 0,4:1), Grupo Isolipídico, ou Mix Teste (ácido alfa-linolênico - ALA, ácido docosahexaenóico - DHA, ácido eicosapentaenóico - EPA) de ômega-6:ômega-3 (relação 1,4:1) e ômega-9:ômega-6 (3,4:1 relação), Grupo Teste, receberam por gavagem 1,2g da solução correspondente a cada grupo por kg/dia durante quatro dias antes e três dias após a exodontia do primeiro molar inferior esquerdo. Foi realizada a avaliação do edema gerado pelo procedimento cirúrgico e coletada a mucosa perialveolar ao sítio da extração dental e o próprio alvéolo dental para análises laboratoriais: mieloperoxidase, contagem de osteoclastos, expressão do TNF- α e IL-1 β , glutationa (GSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O Mix Teste induziu uma diminuição significativa na atividade da mieloperoxidase, no edema pós operatório, na contagem de osteoclastos, na GSH plasmática e do tecido, nas concentrações plasmáticas e do tecido de TBARS, na expressão do TNF- α , mas não mostrou diferença significativa na expressão de IL-1 β no terceiro dia pós-operatório. A administração por gavagem do Mix Teste demonstrou uma redução da resposta inflamatória e oxidante, atuando como anti-inflamatório e antioxidante, após exodontia em ratos.

Palavras Chave: Cirurgia Oral. Inflamação. Estresse Oxidativo. Ácidos Graxos. Metabolismo.

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTION OF OIL MIXES OF OMEGA 9, 6 AND 3 WITH LOW RATIO OMEGA-6:OMEGA-3 AND HIGH RATIO OMEGA-9:OMEGA-6 AFTER DENTAL EXTRACTION IN RATS.

RADAMÉS BEZERRA MELO. Stricto Sensu post-graduation. Department of Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará (Degree of Master of Surgery). SETEMBRO, 2014. Advisor: PAULO ROBERTO LEITÃO DE VASCONCELOS.

Oil fatty acids omega-3 and omega-9 have anti-inflammatory and antioxidant activities, while the omega-6 has pro-inflammatory action. The aim of this study was to evaluate the presence of antioxidant and anti-inflammatory effects with high nutraceutical ratio of omega-9: omega-6, antioxidant properties, and low ratio omega-6: omega-3, anti-inflammatory properties three days after tooth extraction in rats. Thirty-two young Wistar rats with 270-310g were randomly divided into four groups of 8 animals: Group Sham, Saline Group, Isolipid Group, and Mix Test Group. The animals received 0.9% NaCl, Sham Group and Salina Group, or Isolipid Mix (alpha-linolenic acid - ALA) mixture containing omega-6: omega-3 oils (ratio 8:01) and omega-9: omega-6 (ratio 0.4:1), Isolipid group, or Mix Test (alpha-linolenic acid - ALA, docosahexaenoic acid - DHA, eicosapentaenoic acid - EPA) omega-6: omega-3 (ratio 1.4: 1) and omega-9: omega -6 (3.4:1 ratio), Mix Text Group by gavage 1.2g solutions for kg/day for four days before and three days after the extraction of the left mandibular first molar. Evaluation of edema generated by the surgical procedure and collected the perialveolar the site of tooth extraction and dental alveolar mucosa itself for laboratory testing were performed: myeloperoxidase, osteoclast count, concentrations of TNF- α and IL-1 β , glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The Mix Test induced a significant decrease on post-operative edema, myeloperoxidase , osteoclasts count , GSH in blood and tissue, on tissue and plasma TBARS and on the TNF- α concentration, but did not show significant difference on the IL-1 β concentration at the third post-operative day. The gavage with the Mix Test showed anti-inflammatory and antioxidant actions after molar tooth extraction in rats.

Keywords: Oral Surgery. Inflammation. Oxidative Stress. Fatty Acids. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Grupos experimentais	19
Figura 2: Composição do Mix de óleos teste e isolipídico.....	19
Figura 3: Desenho do Estudo.....	20
Figura 4: Identificação do 1º molar inferior do rato após anestesia.....	21
Figura 5: Realização da sindesmotomia com a utilização de um explorador clínico para descolamento da gengiva inserida.....	21
Figura 6: Início da luxação para avulsão do 1º molar inferior esquerdo com instrumental 3s.....	22
Figura 7: Alvéolo dental do 1º molar inferior pós exodontia.....	22
Figura 8: Mensuração da espessura do músculo masseter com a utilização de um espécímetro.....	23
Figura 9: Dosagem de MPO (A), Edema de Masseter (B) e Contagem de osteoclastos (C).....	29
Figura 10: Imagem representativa da análise microscópica do sítio de exodontia, três dias após a extração do primeiro molar inferior esquerdo.....	30
Figura 11: Imagem representativa da análise da expressão TNF- α e (A) IL-1 β (B).....	31
Figura 12: TNF- α e (A) IL-1 β (B).....	31
Figura 13: TBARS no sangue (A). TBARS no Tecido (B). Concentração de Glutaciona no Sangue (C). Concentração de Glutaciona no Tecido.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

- AG – Ácidos graxos
- AGMI – Ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI- Ácido graxo poli-insaturado
- AA – Ácido araquidônico
- ALA – Alfa linolênico
- AL- Ácido linoléico
- COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- COX – Ciclooxygenase
- D – Dia
- DHA – Docosahexaenóico
- EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
- EPA – Eicosapentaenóico
- ERO – Espécie Reativa de Oxigênio
- ETA - Ácido eicosatrienóico
- Et al – e colaboradores
- DHA – Docosahexaenóico
- GSH - Glutathiona
- HE – Hematoxilina eosina
- ICAM-1 – Molécula de aderência intracelular-1
- IFN – Interferon
- IL - Interleucina
- ω – Ômega
- LABCEX– Laboratório de Cirurgia Experimental
- LT – Leucotrieno
- LOX – Lipoxigenase
- MDA –Dialdeído malônico
- MPO – Mieloperoxidase
- NF-KB – Fator nuclear Kappa B
- NPD1 – Neuroprotectina D1
- PBS – Solução tamponada de fosfato
- PG – Prostaglandina
- P – Nível de significância estatística

TBARS–Substâncias reativas ao Ácido tiobarbitúrico

TNF – Fator de necrose tumoral

VCAM-1–Molécula de aderência endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 OBJETIVO.....	17
3 MÉTODO.....	18
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	18
3.2 ANIMAIS.....	18
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	18
3.3.1 Fluxograma experimental.....	19
3.3.2 Técnica Anestésica.....	20
3.3.3 Procedimento cirúrgico (Exodontia)	21
3.3.4 Sacrifício dos animais.....	23
3.3.5 Análise do edema de boca de rato.....	23
3.3.6 Análises Laboratoriais.....	24
3.3.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica.....	24
3.3.6.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH)....	25
3.3.6.3 Determinação da mieloperoxidase da mucosa alveolar.....	26
3.3.7 Análise histológica e Histomorfométrica (contagem de osteoclastos)....	26
3.3.8 Análise Western Blot (<i>TNF-α</i> e <i>IL-1β</i>)	27
3.3.9 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS.....	28
4.1 DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NA MUCOSA ALVEOLAR.	28
4.2 DETERMINAÇÃO DO EDEMA EM REGIÃO MASSETÉRICA.....	28
4.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: CONTAGEM DE OSTEOCLASTOS.....	28

4.4 WESTERN BLOT PARA TNF-A E IL-1B.....	31
4.5 TBARS E GLUTATIONA.....	32
5 DISCUSSÃO.....	33
6 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE.....	45

1 INTRODUÇÃO

A cicatrização é um fenômeno biofisiológico, que se inicia logo após uma lesão tecidual, quer seja acidental ou operatória, e que tem por finalidade reconstituir o tecido da maneira mais fiel possível. A capacidade de um tecido lesado reparar-se é uma resposta inata à própria vida, pois uma ferida que por ventura não cicatrize poderá resultar na morte do organismo. Deve ficar claramente entendido que a cicatrização de uma lesão não é um fenômeno isolado, solitário e local, mas uma série complexa de eventos biológicos (SHAFER; MUHLER, 1953; SANCHES *et. al.*, 1993).

Os nutrientes têm sido tradicionalmente vistos como fontes de calorías básicas para a homeostase celular, e os aminoácidos para a síntese de proteínas. Atualmente, evidências sólidas apoiam o conceito de que o aporte de nutrientes com um foco específico pode melhorar os resultados finais por modular a resposta imune e metabólica (ALEXANDER, 1988; STABLES; GILROY, 2011; LI *et. al.*, 2012)

Nutrientes terapêuticos ou “nutracêuticos” são nutrientes isolados ou combinados que, em doses farmacológicas, modificam a resposta biológica do hospedeiro. Os nutracêuticos mais comumente estudados são os ácidos graxos ω -3 (EPA, eicosapentaenoico e DHA, docosahexaenóico), glutamina, arginina e nucleotídeos. (STABLEFORTH; THOMAS; LEWIS, 2009).

Os ácidos graxos são utilizados de maneira seletiva na síntese de fosfolipídios de membranas celulares e de suas organelas citoplasmáticas. Os ácidos graxos essenciais podem determinar alterações estruturais e funcionais da membrana fosfolipídica, inclusive de células do sistema imune, modificando sua permeabilidade, atividade de receptores e enzimas, o transporte, funções regulatórias e o metabolismo celular (CALDER; DECKELBAUM, 1999). Além disso, ativam rotas sinalizadoras intracelulares pela formação de moléculas biologicamente ativas que agem como mensageiros secundários. Dessa forma, podem interferir em eventos fisiológicos relacionados à hemodinâmica, oxigenação, inflamação e defesa orgânica (CALDER; GRIMBLE, 2002).

Os mamíferos são capazes de sintetizar os ácidos graxos insaturados da série ω -9, mas não podem sintetizar os ácidos linoléico (ω -6) e α -linolênico (ω -3). Com isso, estes são considerados ácidos graxos essenciais, sendo adquiridos somente por meio da alimentação, tal fato ocorre porque as duplas ligações, situadas no terceiro e sexto átomos de carbono, não podem ser produzidas pelo organismo humano (SUAREZ-MAHECHA *et al.*, 2002;

MESQUITA *et al.*, 2011). O organismo humano não possui as enzimas dessaturases especificamente responsáveis por adicionar uma dupla ligação antes do nono carbono a partir da extremidade metil (distal), enzimas essas responsáveis pela síntese de ω -6 e de ω -3. As enzimas necessárias para essa finalidade são as delta-9 e delta-15 dessaturases. Essas enzimas são capazes de transformarem o ácido oléico (ω -9) em ácido linoléico (ω -6) ou em ácido α -linolênico (ω -3) (WAITZBERG, 2008).

Os óleos de peixes marinhos possuem um conteúdo consideravelmente maior de ω -3, principalmente na forma EPA e DHA (ALEXANDER, 1998). Alguns estudos mostram que uma razão ω -6 : ω -3 elevada promovem várias doenças influenciando na produção de fatores inflamatórios (ALLAYEE; ROTH; HODIS, 2009; MELO *et al.*, 2014). Por outro lado, o consumo de quantidades aumentadas de ω -3, ou seja, com uma razão ω -6: ω -3 diminuída, apresenta efeitos opostos.

Os ácidos graxos da família ω -6 são derivados do ácido graxo essencial linoléico (ALA, 18:2) e a família ω -3 é toda derivada do ácido graxo essencial α -linolênico (ALA, 18:3). Uma vez ingeridos, os ácidos graxos essenciais são metabolizados por um sistema enzimático, em que novos carbonos e insaturações são adicionados à cadeia carbônica original, produzindo AGPIs da mesma família (INNIS, 2009). O ALA dá origem a outros dois AGPIs ω -3, o eicosapentaenóico (EPA), C20:5(5,8,11,14,17), e o docosaexaenóico (DHA), C22:6(4,7,10,13,16,19). É importante ressaltar que as duas famílias, ω -3 e ω -6, de ácidos graxos competem pelo mesmo sistema enzimático (FAROOQUI *et al.*, 2007).

A adequação do balanço dietético de lipídios tem motivado inúmeras investigações. Alterações nas respostas metabólicas, equilíbrio entre os lipídios da dieta demonstram-se capazes de influenciar o estresse oxidativo (MELO *et al.*, 2014) e a resposta inflamatória exacerbada por meio da relação entre os tipos de ácidos graxos poli-insaturados ingeridos (CALDER, 2003), que afetam a síntese de eicosanóides, atuando como mensageiros intermediários de fatores de crescimento e controlando o crescimento e a diferenciação de células epiteliais (CAPONE; BAGGA; GLASPY, 1997).

A evolução dotou o organismo humano de mecanismos e sistemas de defesas para garantir a sobrevivência aos danos oxidativos, como atenuar tais efeitos induzidos por uma fração inspirada de oxigênio (FIO_2) de 21% à pressão atmosférica normal e em condições fisiológicas. Os mecanismos de proteção utilizados pelo organismo incluem os antioxidantes não enzimáticos, como a glutatona, vitamina E, vitamina C, β -caroteno, N-acetilcisteína, proteínas de ligação do heme, e EPA/DHA, entre eles. Os sistemas enzimáticos endógenos removedores de resíduos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona

peroxidase, com seus cofatores associados, selênio, zinco, manganês e ferro. A capacidade dos mecanismos endógenos em desintoxicar as ERO (espécies reativas de oxigênio) produzidas pela exposição aos elevados níveis de oxigênio é sobrepujada durante o aporte de uma elevada FIO_2 ventilatória, durante a reperfusão de uma isquemia, em estados de baixo fluxo e em situações de estresses cirúrgicos, assim ERO não eliminadas e outros radicais livres podem produzir danos oxidativos a praticamente todos os componentes celulares, incluindo proteínas, ácidos graxos poli-insaturados, polissacarídeos e ácidos nucléicos, causando a morte celular e danos subsequentes aos órgãos (HEYLAND; DHALIWAL; DAY, 2006).

Os dados de literatura variam muito quanto à melhor combinação de antioxidantes no que se refere a dose, a via de administração, os níveis a serem idealmente atingidos, o melhor momento e a duração de seu aporte no organismo. Ainda não há consenso em relação a todas essas variáveis, mas já se sabe que os antioxidantes administrados geralmente não fazem efeito algum depois de já terem ocorrido danos teciduais. Assim presumivelmente a terapia deve ser instituída antes do estabelecimento da lesão oxidativa (MARTINDALE; ZHOU, 2009).

As famílias de ω -3 e ω -6 utilizam o mesmo sistema enzimático, ocorrendo uma competição por cada enzima (DYEBERG, 1986). Esta competição altera todo o metabolismo de produção dos eicosanóides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (FISCHER, 1989). Os eicosanóides oriundos do metabolismo do ácido graxo poli-insaturado (AGPI) ω -6 são mediadores pró-inflamatórios, enquanto os oriundos do metabolismo de ω -3 são anti-inflamatórios.

Trabalhos clínicos mostram que a redução dos níveis de radicais livres de oxigênio são uma importante ferramenta terapêutica adjuvante no tratamento preventivo de distúrbios metabólicos como o diabetes mellitus, no qual o aumento do estresse oxidativo leva a desregulação metabólica e resistência periférica à ação da insulina (SHAPIRO; LUTATY ; ARIEL, 2011; FLACHS; ROSSMEISL; KOPECKY, 2014). Distúrbios sistêmicos como o diabetes mellitus levam a aumento da expressão de mediadores químicos pró-inflamatórios (SHAPIRO; LUTATY; ARIEL, 2011), os quais após procedimentos cirúrgicos orais podem levar a apoptose de fibroblastos e aumento do estresse oxidativo local (YU *et al.*, 2011) o qual é responsável por significativa perda óssea mediada por osteoclastos (HALLEEN *et al.*, 1999).

A nutrição é um importante fator no desenvolvimento e manutenção para um tecido ósseo sadio. Componentes da dieta, tais como proteínas, vitaminas, e oligoelementos são

necessários para o metabolismo ósseo normal. (BONJOUR, 2005; PRENTICE *et al.*, 2006; REID; CORNISH; BALDOCK, 2006)

O processo de reparo do osso alveolar é iniciado imediatamente após a extração dentária e pode ser prejudicada por vários fatores endógenos, como por exemplo, fatores hormonais e por vários fatores exógenos, como por exemplo, nutrição. (DEVLIN; SLOAN, 2002).

O processo de reparo alveolar após exodontia em ratos é assunto amplamente estudado, possuindo uma sequência de eventos conhecida. (HSIEH;DEVLIN; ROBERTS, 1994; DEVLIN;GARLAND; SLOAN, 1996; DE CARVALHO; MARIANO; OKAMOTO, 1997; DEVLIN, 2000). Inicia-se com a formação de um coágulo que preenche o alvéolo, passando por processo de maturação e sendo aos poucos substituído por tecido de granulação (SMITH, 1974). O ligamento periodontal residual está presente até o segundo dia pós-extração, os fibroblastos provenientes deste multiplicam-se e apresentam pronunciada atividade de síntese de fibras colágenas do tipo I e III, (LIN; MCCULLOCH;CHO, 1994; DEVLIN, 2000; DEVLIN e SLOAN, 2002) tais fibras serão molde para formação do futuro osso trabecular (LIN;MCCULLOCH; CHO, 1994; DEVLIN, 2000). Três dias após a exodontia, as células epiteliais mostram intensa atividade mitótica com a finalidade de recobrir a ferida. Ao longo deste período inicial, ocorre a angiogênese (DEVLIN; GARLAND; SLOAN,1996; DE CARVALHO;MARIANO;OKAMOTO, 1997; MCMILLAN, 1999). Após 4 a 5 dias, inicia-se a substituição do tecido conjuntivo denso por tecido ósseo neoformado, com deposição de osteóide pelos osteoblastos (IIZUKA; MILLER; MARKS, 1992; DEVLIN, 2000). Osteoclastos iniciam a reabsorção das cristas e septos alveolares por volta deste mesmo período após a exodontia. (SMITH, 1974; DEVLIN, 2000). Fibras de colágeno tipo I, principal componente da matriz óssea orgânica (DOMON *et al.*, 1999), tornam-se bem evidentes após 6 dias da exodontia. Fibras de colágeno do tipo I e III estão distribuídas pelo alvéolo, da maneira similar às trabéculas ósseas neoformadas, ou seja, das paredes alveolares para o centro (DEVLIN, 2000). Uma semana após a exodontia, o epitélio recobre quase a totalidade do alvéolo e aumenta a deposição de tecido ósseo intra-alveolar (GUGLIELMOTTI e CABRINI, 1985; DEVLIN;GARLAND; SLOAN, 1996). Feixes de colágeno tipo I circundam as áreas de neoformação óssea, enquanto que as de colágeno tipo III estão presentes nos sítios de neoformação óssea no interior do alvéolo (DEVLIN, 2000). Cerca de 10 dias após a exodontia, o alvéolo está completamente recoberto por epitélio. Osso jovem está presente em todo o alvéolo, imaturo e fibrilar na região central e mais organizado nas proximidades das paredes ósseas (HSIEH; DEVLIN; ROBERTS, 1994;

DEVLIN;GARLAND; SLOAN, 1996). Entre 2 e 3 semanas, ocorre união e espessamento das trabéculas ósseas neoformadas, juntamente com diminuição dos espaços medulares e vasculares (DE CARVALHO; MARIANO; OKAMOTO, 1983; GUGLIEL, MOTTI e CABRINI, 1985; DEVLIN; GARLAND; SLOAN, 1996; DE CARVALHO;MARIANO; OKAMOTO, 1997). Após 21 dias, predominam os processos de remodelação óssea, que se estendem por meses após a exodontia, até praticamente não haver diferença estrutural entre osso neoformado e osso alveolar adjacente (GUGLIELMOTTI e CABRINI, 1985; KINGSMILL, 1999).

Dentre as preocupações nas reabilitações orais de pacientes por meio de próteses ou implantes osteointegrados, destaca-se a disponibilidade e qualidade de tecido ósseo alveolar remanescente após uma exodontia. Nesse sentido, a diminuição do estresse oxidativo pode desempenhar um importante papel anti-inflamatório e antirreabsortivo pós-exodontias e, como consequência, procedimento e ou terapias que se mostrem capazes de atenuar o estresse oxidativo ganham importância como mais uma via para incrementar as chances de sucesso em casos de reabilitações orais.

Em Odontologia, principalmente em Cirurgia Bucomaxilofacial, muitos são os procedimentos com danos teciduais de grande monta, o que acaba por representar um universo de pacientes cirúrgicos complexos e mais susceptíveis a quadros inflamatórios, obrigando a administração de uma terapêutica anti-inflamatória agressiva e, por conseguinte, com assumidos riscos gástricos, nefrológicos e imunológicos entre outros e, desse modo, nutracêuticos antioxidantes podem se revelar de grande valia para uma ação anti-inflamatória, se essa ação possuir o necessário respaldo científico experimental.(MESQUITA *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2014).

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo é avaliar a influência da oferta de ácidos graxos com baixa relação ômega-6/ômega-3 e elevada relação ômega-9/ômega-6 na inflamação e estresse oxidativo durante a fase inflamatória da cicatrização da ferida operatória pós exodontia em ratos.

3 MÉTODO

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi de caráter experimental, com o uso de animais vivos e controle intra-indivíduo com avaliadores e operadores de forma cegada, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal no. 6.638, de 08 de Maio de 1979. Foi realizado em animais de laboratório, do Biotério do Departamento de Cirurgia, Seccção de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pertencente à Universidade Federal do Ceará.

As condições deste alojamento até o bem estar geral dos animais, foram controladas pela direção do biotério e os procedimentos foram baseados nos princípios dos 3Rs (*Replacement, Reduction, Refinement*).

O modelo de estudo, assim como a revisão científica, foi avaliado pelo comitê de ética em investigação animal competente, da Universidade Federal do Ceará, tendo sido aprovado pelo protocolo número 73/2011 em 07 de dezembro de 2011 (em apêndice).

Os animais foram manipulados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os esforços foram realizados no sentido de reduzir o número de animais utilizados.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 32 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX da UFC.

Os animais possuíam 270-310g.

Todos receberam ração padrão e água *ad libitum*, e foram mantidos nas mesmas condições ambientais, em gaiolas individuais, com ciclos de dia (12 horas) e noite (12 horas).

3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados 32 animais distribuídos em 4 grupos (Sham, Salina, Mix isolipídico e Mix test), cada grupo com 8 animais (Figura 1). Verificar composição na Figura 2.

Figura 1 – Grupos Experimentais

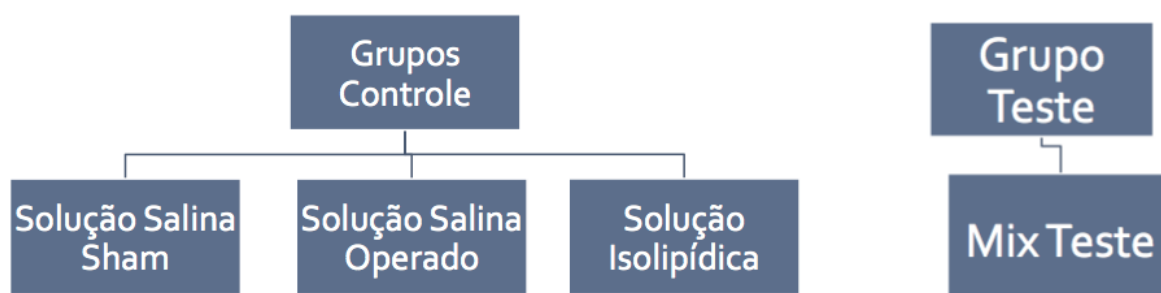


Figura 2- Composição do Mix de óleos teste e isolipídico.

	Composição	Fonte ω -3	Relação
Mix Isolipídico	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de milho Óleo de soja	ALA	ω -6: ω -3= 8: 1 ω -9: ω -6= 0,3: 1
Mix Teste	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de oliva Óleo de canola Óleo de peixe	ALA (35%) EPA (39%) DHA (26%)	ω -6: ω -3= 1,4: 1 ω -9: ω -6= 3,7: 1

3.3.1 Fluxograma experimental

Inicialmente os animais foram pesados e separados aleatoriamente em cada um dos 4 grupos e, a seguir, administrados por 4 dias consecutivos, uma única vez por dia, sempre no mesmo horário no período da manhã, por via orogástrica, gavagem, 1,2g por kg/dia da solução correspondente a cada grupo.

No quarto dia (D4), cada animal foi anestesiado, mensurado a espessura pré-operatória do masseter do lado esquerdo e realizado o procedimento cirúrgico.

No sétimo dia (D7), 12 horas após a administração da última dose (ou solução salina ou mix isolipídico ou mix teste), os animais foram anestesiados, mensuradas as espessuras pós-operatórias da região central do músculo masseter do lado esquerdo e, em seguida, o animal foi colocado em decúbito dorsal, onde foi submetido a uma laparotomia, com

identificação da artéria aorta, em sua bifurcação nas artérias ilíacas e colhido sangue. Em seguida, foi realizada a coleta da mucosa alveolar e hemimandíbula do lado operado para análises laboratoriais. Após as coletas, o animal foi sacrificado por deslocamento cervical. Não houve mortes dos animais antes do sacrifício (Figura 3).

Figura 3 – Desenho do Estudo



3.3.2 Técnica Anestésica

Todos os animais foram anestesiados, até o grupo Sham que foi somente anestesiado, por associação de cloridrato de cetamina a 5% na dose de 90mg/kg, e cloridrato de xilasina a 2%, na dose de 10mg/kg, administrados simultaneamente, por via intramuscular, na parte posterior do membro pélvico direito. Os animais foram considerados anestesiados quando ocorria perda dos reflexos córneo-palpebrais e retirada da pata ao estímulo doloroso por preensão.

Foi realizado controle rigoroso dos tempos e da temperatura dos animais (por meio de termômetro retal) dos animais, mantendo-os entre 36° e 37° C utilizando meios físicos (uso de lâmpada incandescente para aquecer, quando necessário) durante todo o procedimento cirúrgico. Também foi verificado se os animais apresentavam cianose de extremidade ou de mucosas durante todo experimento.

3.3.3 Procedimento cirúrgico (Exodontia)

Após os animais devidamente anestesiados iniciou-se o procedimento cirúrgico. Realização do descolamento da gengiva inserida, sindesmotomia, do 1º molar inferior esquerdo com instrumental 3S, seguido da luxação e avulsão dental.

Figura 4 – Identificação do 1º molar inferior do rato após anestesia.



Figura 5 – Realização da sindesmotomia com a utilização de um explorador clínico para descolamento da gengiva inserida.

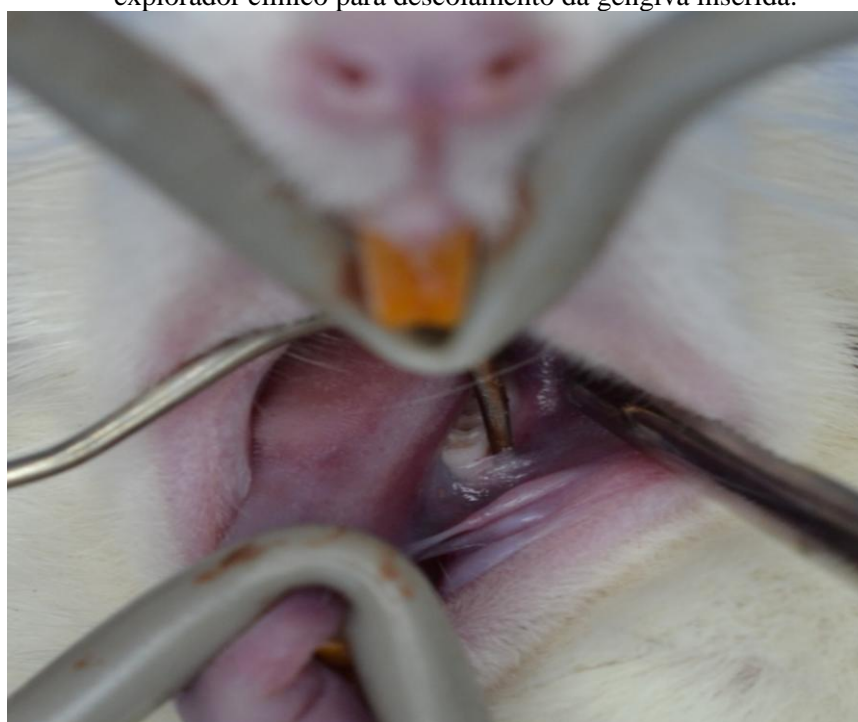
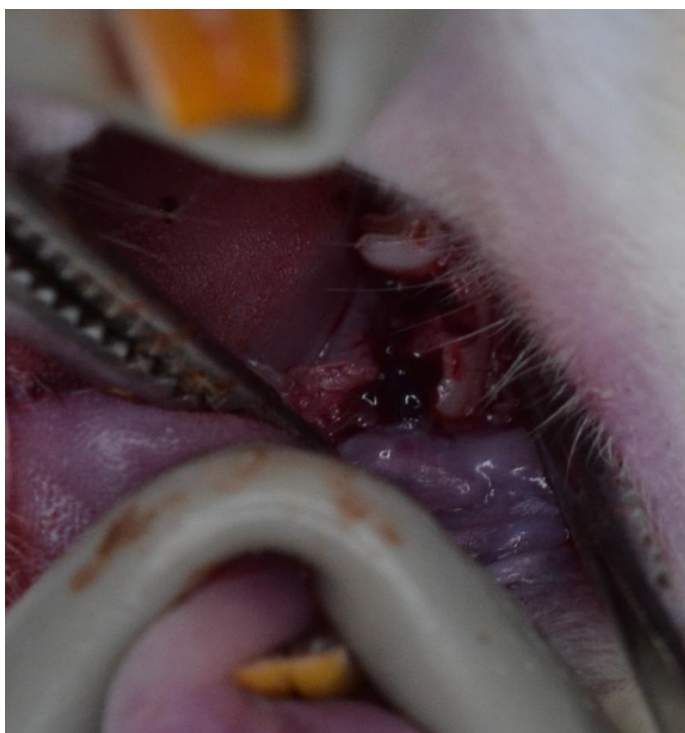


Figura 6 – Início da luxação para avulsão do 1º molar inferior esquerdo com instrumental 3s.



Figura7 – Alvéolo dental do 1º molar inferior pós exodontia.



3.3.4 Sacrifício dos animais

Todos os animais foram mortos por deslocamento cervical no 3º dia após exodontia, 12 horas após a realização do último condicionamento.

3.3.5 Análise do edema de boca de rato

Inicialmente, após anestésiar o animal para o procedimento cirúrgico, foi mensurada (em mm) a espessura do músculo masseter na porção média. Esse músculo se estende do arco zigomático à face lateral do ramo da mandíbula e a medida é realizada introduzindo-se um especímetro na boca do rato antes do procedimento cirúrgico (tempo zero). Prévio ao sacrifício dos animais, no 3º dia pós cirúrgico, foi mensurado novamente a espessura do masseter seguindo o mesmo padrão utilizado para aferição pré-cirúrgica. Os resultados foram expressos pela média da diferença (antes do procedimento cirúrgico – 3º dia pós cirúrgico) da espessura (mm) \pm erro padrão da média (SEM) em cada grupo de animais.

Figura 8 – Mensuração da região do músculo masseter com a utilização de um especímetro.



3.3.6 Análises Laboratoriais

Os tubos de ensaio, contendo sangue arterial heparinizado (4,0ml) foram colocados em centrífuga refrigerada Jouan modelo MR23i (França) e, centrifugados a 4.000 r.p.m. durante 10 minutos, mantendo-se a temperatura interna em 10°C. O plasma, assim, obtido foi dividido em alíquotas e imediatamente armazenado a -70°C.

O fragmento de mucosa alveolar do sítio da extração foi removido e imediatamente mergulhado em nitrogênio líquido, com cento e noventa graus centígrados negativos. Após o congelamento, procedeu-se à fragmentação do material, utilizando-se grau e pistilo de porcelana. Os fragmentos, em número variável, foram colocados em tubos de ensaio e armazenados a -70°C até sua utilização.

3.3.6.1 Avaliação da peroxidação lipídica

A técnica teve por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA), formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se, a seguir, a extração desse composto, usando um solvente orgânico (N-butanol), determinando-se a concentração de MDA que foi expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Utilizou-se no presente estudo, para a quantificação do teor de TBARS no tecido (mucosa alveolar), o teste de Uchiyama e Mihara (1978), semelhante ao acima descrito, onde a concentração de TBARS foi expressa em nmol/mg de tecido.

Determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico na mucosa alveolar.

O MDA é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico, originando um composto de cor rosa.

Reagentes:

Cloreto de potássio: 1,15%

Ácido tiobarbitúrico: 0,6%

Ácido fosfórico: 1%

N-butanol

Procedimento:

O teor de TBARS (nmol/g de tecido) foi quantificado pelo método de Uchiyama e Mihara (1978), frequentemente utilizado para estimar a peroxidação lipídica. A amostra do tecido, a ser analisada, foi congelada em nitrogênio líquido e estocada a -70°C, imediatamente

após a coleta. Após pesagem, a amostra de tecido foi homogeneizada em KCl gelado, 1,15%, resultando em uma solução ácida com concentração a 10%. Retirou-se uma alíquota de 0,5ml de cada amostra e acrescentou-se 1,0ml de solução aquosa de TBA 0,6% e 3,0ml da solução de ácido fosfórico (H_3PO_4 , 1%). A mistura foi colocada em banho fervente por 45 minutos, resfriada em banho de gelo, seguido de adição de 4,0ml de N- butanol. Após 2,0 minutos de agitação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 3.000 r.p.m. A absorbância da camada orgânica sobrenadante (fase butanólica) foi medida em espectrofotômetro Beckman DU-640 (Fullerton – Califórnia) a 520nm e 535nm.

A diferença entre os valores obtidos nas duas leituras foi utilizada para calcular a concentração de TBARS, usando a regressão linear a partir de uma curva padrão.

3.3.6.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathione-GSH)

A determinação dos grupos SH foi realizada pelo método de Sedlak e Lindsay (1968), baseado na reação do 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB – reagente de Ellman) com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5- tiobenzóico. A medida do produto de reação formado foi feita por leitura da absorbância a 412nm em espectrofotômetro (Beckman DU-640, Fullerton, Califórnia).

Drogas e reagentes:

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)

Ácido tricloroacético (ATC 50%)

Tampão TRIS 0,4M ph 8,9

5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB) 0,5M)

Metanol

Glutathione (GSH, 1mg/ml).

Preparação dos reagentes:

Ácido tricloroacético 50% - diluído em água destilada

EDTA Na₂0,2M PM 372,2(%, 211g + H₂O qsp 70,0ml)

EDTA Na₂0,02M (30ml de EDTA Na₂0,2M + H₂O qsp 300ml)

Reação



Procedimento:

A amostra de mucosa alveolar foi pesada e homogeneizada em 5ml de EDTA 0,02M gelado, com bastão de vidro e filtrado em lã de vidro. Foram retirados 4,0ml do homogenato e misturou-se com 3,2ml de água destilada e 0,8ml de ácido tricloroacético a 50%. O tubo foi agitado e centrifugado a 3000 RPM por 15 minutos. Foram retirados 2,0ml do sobrenadante e acrescentou-se 4,0ml de TRIS 0,4M (pH 8,9) e 1,0ml de DTNB 0,01M; agitou-se a mistura para homogeneização. Em seguida foram lidas as absorbâncias no espectrofotômetro a 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorbância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

3.3.6.3 Determinação da atividade de mieloperoxidase da mucosa alveolar

Separou-se 0,5mg do HTAB/100ml de tampão fosfato 50mM (pH 6,0). Em seguida, 50mg da mucosa alveolar foi macerado com nitrogênio líquido e, colocou-se no tampão com HTAB (pH 6,0). Após esse procedimento, obteve-se o homogenato que passou por três ciclos de congelamento e descongelamento a -70°C , durante 5 minutos cada um. Em seguida, colocou-se no freezer -70°C e, após 5 minutos, retirou-se a amostra e levou-se ao sonicador até descongelar, em 3 ciclos. Depois desse procedimento, centrifugou-se a amostra a 3000 r.p.m., durante 15 minutos. Acrescentou-se O-dionisidine ao tampão fosfato e por último o peróxido de hidrogênio. Finalmente, fez-se a leitura no tempo zero e com cinco minutos (Δ atividade).

3.3.7 Análise histológica e Histomorfométrica (contagem de osteoclastos)

Após a sacrifício dos animais, as hemimandíbulas nas quais foi realizada exodontia foram excisadas cirurgicamente, fixadas em formol 10% durante 48h, descalcificadas com solução de ácido fórmico 7% durante 72h e seguiram para processamento histológico.

Após inclusão em parafina fundida e confecção de blocos, foram realizados cortes de $4\mu\text{m}$ em micrótomo semiautomático e coloração por hematoxilina-eosina para análise por microscopia de luz convencional. Foram selecionados cinco microcampos: um de terço cervical, dois de terço médio e dois terço apical alveolar em um aumento de 400x para contagem do número de osteoclastos no sítio de exodontias. O procedimento de contagem foi realizado cegamente e as lâminas foram aleatorizadas para evitar vieses de observação.

Considerou-se a soma dos cinco microcampos como unidade amostral para análise estatística (Média±EPM).

3.3.8 Análise Western Blot (*TNF- α* e *IL-1 β*)

Os animais tinham uma amostra de sua mucosa do rebordo alveolar removido no dia do sacrifício para determinar a quantidade de *TNF- α* e *IL-1 β* . As amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -70°C até serem necessárias para o ensaio. Resumidamente, os tecidos foram homogeneizados em 0,5 ml de tampão de lise (50 mM Tris-HCl [pH 8,5]; NaCl 50 mM; EDTA 0,1 mM, 1% de Tween 20, 1 mM de [cada] ditiotretitol, leupeptina, aprotinina, e fluoreto de fenilmetilsulfonilo). A proteína total (50g proteína) foi resolvida em electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio a 10% e transferida para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino Unido). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado / solução salina tamponada com Tris 0,1% com Tween 20 durante 14 h a 4°C , seguido por um período de incubação de 2 h à temperatura ambiente com os anticorpos primários (anticorpo policlonal de coelho anti-actina (β 1:1000), anti-*TNF- α* (1:400) e anti-*IL-1 β* (1:400) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). As transferências foram lavadas com e incubadas com peroxidase de rábano silvestre conjugado anticorpo secundário (macaco de imunoglobulina G anti-coelho, 1:1000; Amersham Pharmacia BioTech UK). durante 1 hora à temperatura ambiente, as membranas foram lavadas, incubadas com quimioluminescência eletrogerada (ECL; Amersham Pharmacia Biotech), e exposto a HyperWlm ECL (Amersham Pharmacia Biotech), para desenvolver a mancha de Western. análises foram realizadas por densitometria 1,4 software ImageJ (National Institute of Health, USA). os dados foram expressos como a densidade relativa do *TNF- α* ou *IL-1 β* / bandas β -Actina (média \pm sE) (LIMA Jr. *et al.*, 2012).

3.3.9 Análise estatística

Os dados desse estudo foram digitados no Excel (Windows), versão 2007 da Microsoft, e analisados pelo SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Analisados quanto a normalidade pelo teste Kolmogorov-Smirnov, os quais obedeceram a curva de normalidade. One-way ANOVA foi o teste utilizado para determinar as diferenças entre os grupos. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DETERMINAÇÃO DA MIELOPEROXIDASE NA MUCOSA ALVEOLAR

Houve redução significativa da atividade de MPO (Mieloperoxidase) apenas do grupo tratado com Mix Teste (6.38 ± 0.48) em relação ao grupo salina (10.68 ± 0.81). Dados expressos em forma de Média \pm EPM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ANOVA/Tukey) (Figura 9A).

4.2 DETERMINAÇÃO DO EDEMA EM MUSCULO MASSETER

O aumento da espessura do masseter do grupo tratado com o Mix Teste (0.49 ± 0.04) foi significativamente inferior ao aumento do masseter do grupo tratado com Salina (2.15 ± 0.06) e do grupo tratado com o Mix Isolipídico (1.86 ± 0.07). Dados expressos em forma de Média \pm EPM (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ANOVA/Tukey) (Figura 9B).

4.3 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA: CONTAGEM DE OSTEOCLASTOS

Enquanto não se observou alterações microscópicas evidentes no grupo Sham (Figura 10A), três dias após a exodontia, o grupo tratado com solução salina e com o mix isolipídico apresentavam o sítio de extração preenchido por tecido de granulação e numerosos osteoclastos, no geral, binucleados, nas proximidades do tecido ósseo, com presença de evidentes lacunas de Howship (sinal microscópico de atividade osteoclástica) (Figura 10B e 10C). No grupo tratado com o Mix Teste número reduzido de osteoclastos bi ou multinucleados podiam ser observados aderidos à matriz óssea mineralizada através de insípidas lacunas de Howship (Figura 10D).

O número de osteoclastos no grupo tratado com salina (65.7 ± 13.3) mostrou-se significativamente superior ao número de osteoclastos no grupo Sham (0.8 ± 0.6). Não houve diferença significativa entre o grupo Salina e Tratado com Mix Isolipídico (50.6 ± 6.5), porém houve redução da contagem no grupo tratado com o Mix Teste (31.1 ± 2.6) ($p = 0.0001$, ANOVA/Tukey) (Figura 9C)

Figura 9: Dosagem de MPO (A), Edema de Masseter (B) e Contagem de osteoclastos (C) em sítio de exodontia de ratos tratados sem tratamento (Sham), e tratados com solução salina, mix isolipídico ou mix teste. Dados expressos em forma de Média±EPM (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; ANOVA/Tukey).

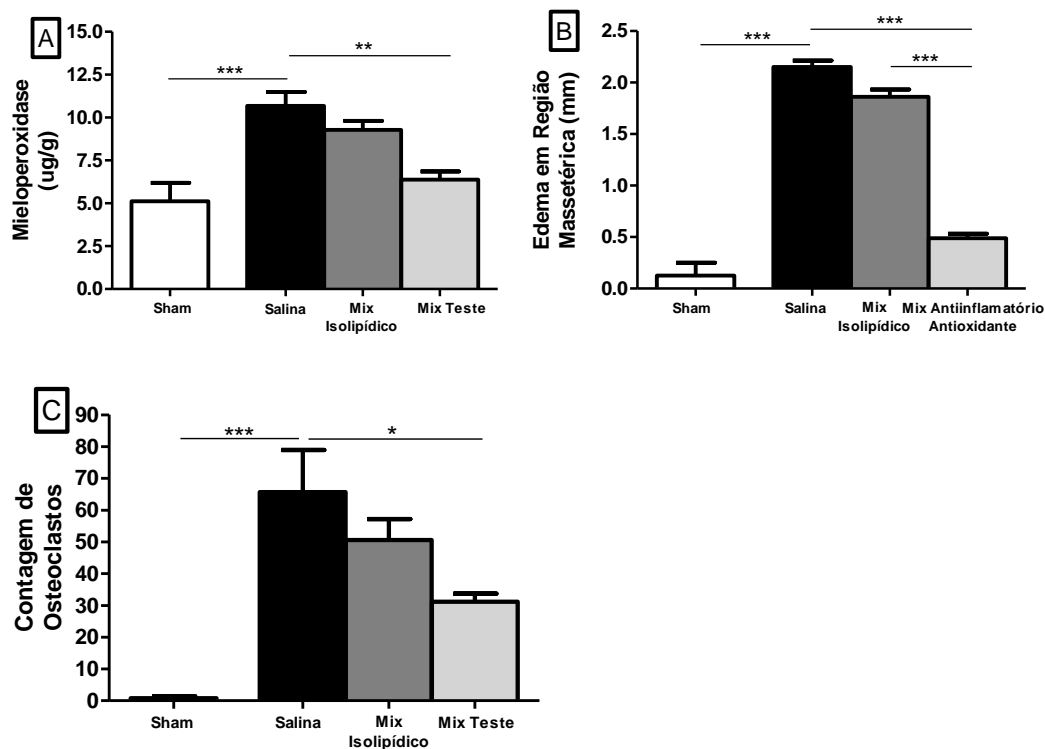
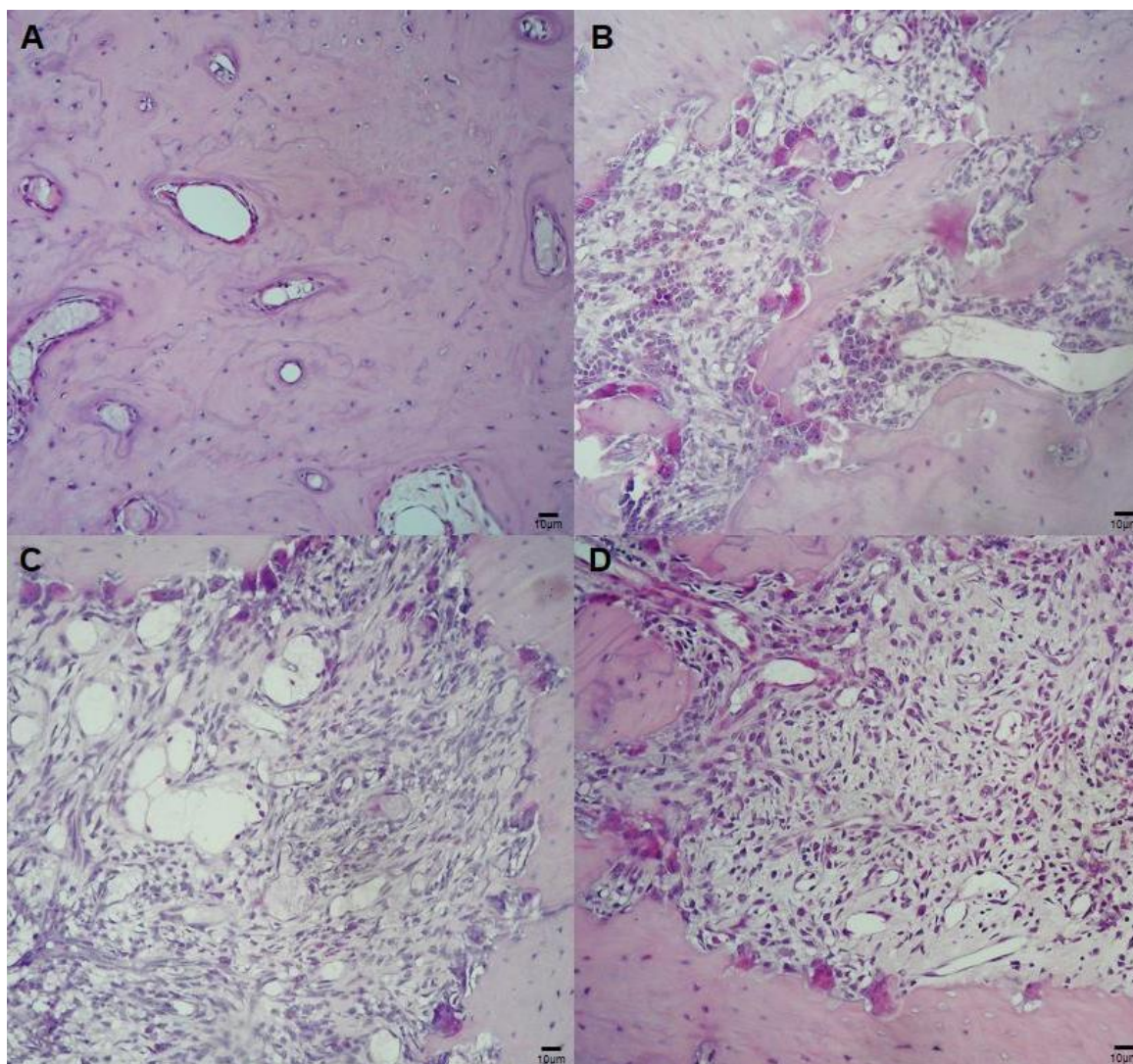


Figura 10: Imagem representativa da análise microscópica do sítio de exodontia, três dias após a extração do primeiro molar inferior esquerdo, dos animais do grupo Sham (Figura A), Salina (B), Mix Isolipídico (C) e Mix Teste Group (D).



O grupo tratado com solução salina operado e com o mix isolipídico apresentavam o sítio de extração preenchido por tecido de granulação e numerosos osteoclastos com presença de evidentes lacunas de Howship (sinal microscópico de atividade osteoclástica). No grupo tratado com o Mix Teste percebe-se redução do número de osteoclastos aderidos à matriz óssea mineralizada através de insípidas lacunas de Howship (Figura 10).

4.4 WESTERN BLOT PARA TNF- α E IL-1 β

A relação TNF- α / β -actina mostrou-se significativamente aumentada no grupo Salina (35.5 \pm 8.8) em relação ao grupo Sham (2.1 \pm 0.5). Não houve diferença entre os grupos Salina e

Tratado com Mix Isolipídico (44.9 ± 5.8), porém, houve redução significativa da relação $\text{TNF-}\alpha/\beta\text{-actina}$ no grupo tratado com o Mix Teste (8.8 ± 3.3) em relação ao grupo salina e mix isolipídico ($p < 0.0001$, ANOVA/Tukey) (Figura 12A).

A relação $\text{IL-1}\beta/\beta\text{-actina}$ mostrou-se significativamente elevada no grupo salina (44.9 ± 5.2) em relação ao Sham (17.5 ± 4.1), porém, não houve diferença significativa entre a relação $\text{IL-1}\beta/\beta\text{-actina}$ nos grupos Salina e tratados com os Mix Isolipídico (38.5 ± 7.3) e com o Mix teste (38.6 ± 4.1) ($p = 0.0113$, ANOVA/Tukey) (Figura 12B).

Figura 11: Imagem representativa da análise da expressão de $\text{TNF-}\alpha$ (A) e $\text{IL-1}\beta$ (B) de mucosa alveolar sobre sítio de exodontia de ratos tratados sem tratamento (Sham), e tratados com solução salina, mix isolipídico ou mix teste.

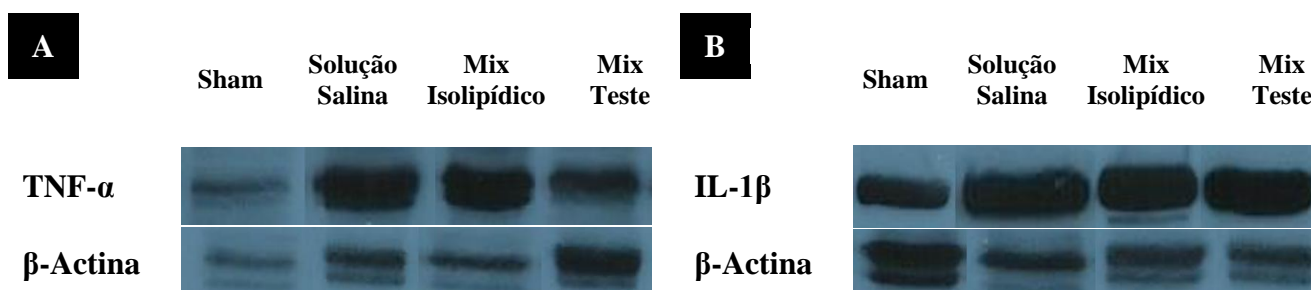
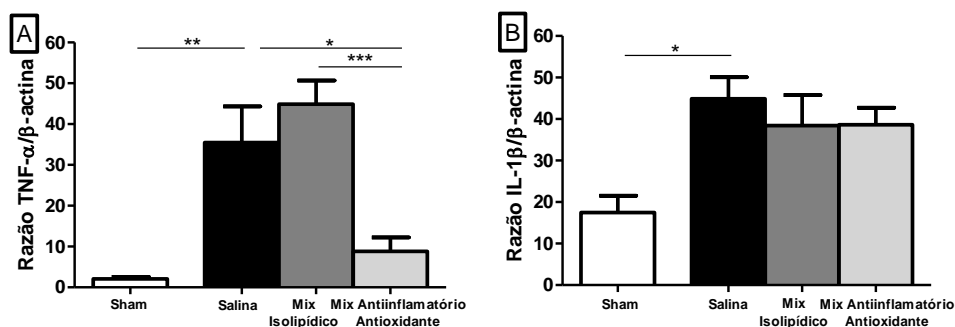


Figura 12: Expressão de $\text{TNF-}\alpha$ e (A) $\text{IL-1}\beta$ (B) de mucosa alveolar sobre sítio de exodontia de ratos tratados sem tratamento (Sham), e tratados com solução salina, mix isolipídico ou mix teste.

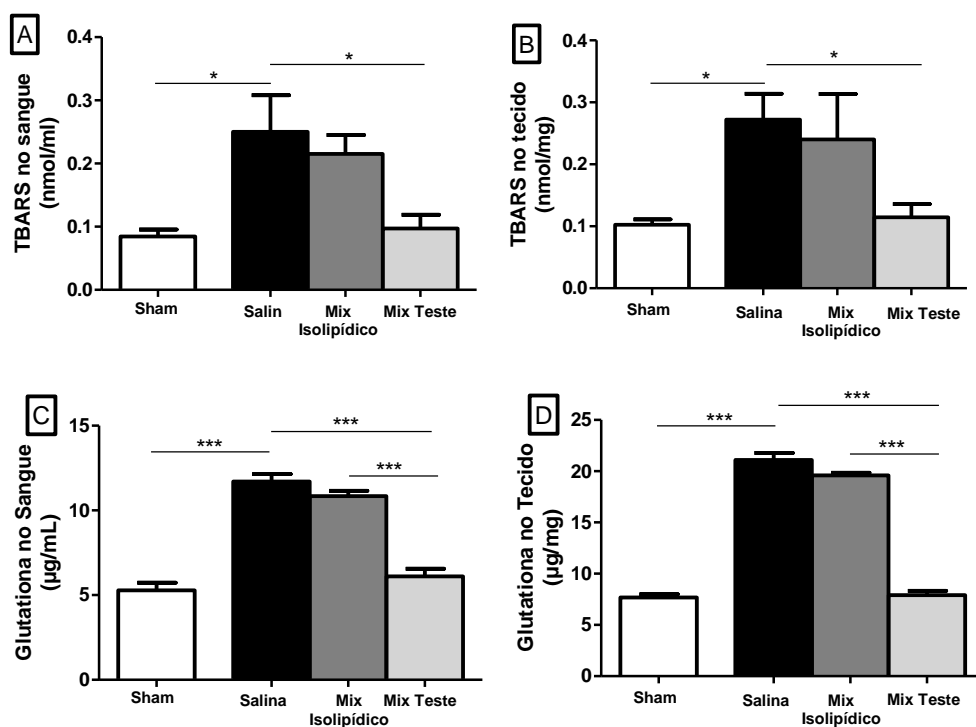


4.5 TBARS E GLUTATIONA

Houve redução significativa nas concentrações de TBARS no sangue do grupo tratado com o Mix Teste (0.10 ± 0.02) em relação ao grupo tratado com salina (0.25 ± 0.06) (Figura 13A). Houve redução significativa nas concentrações de TBARS no tecido do grupo

tratado com o Mix Teste (0.11 ± 0.02) em relação ao grupo tratado com salina (0.27 ± 0.04) (Figura13B). Houve redução significativa de concentrações de Glutathione no sangue de animais tratados com o Mix Teste (6.10 ± 0.45) em relação ao grupo tratado com o Mix Isolipídico (10.84 ± 0.32) e em relação ao grupo tratado com salina (12.46 ± 0.24) (Figura13C). Houve redução significativa das concentrações de Glutathione no tecido nos animais tratados com o Mix Teste (7.90 ± 0.42) em relação aos grupos Solução Salina (21.10 ± 0.69) e Mix Isolipídico (19.58 ± 0.27) (Figura13D). Dados expressos em forma de Média \pm EPM (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$; ANOVA/Tukey).

Figura13: TBARS no sangue (A). TBARS no Tecido (B). (C) Concentrações de Glutathione no Sangue (C). Concentrações de Glutathione no Tecido (D).



5 DISCUSSÃO

Pesquisas de extração dental em ratos se iniciaram em 1923 com Euler (EULER, 1923), de tal maneira que este processo tem sido investigado em uma série de modelos

experimentais, nas mais variadas condições locais e sistêmicas, com o intuito de observar a relação entre o reparo e os possíveis fatores que nele interferem. Apesar do longo período de estudos utilizando esse modelo de estudo, não existe trabalho que se propôs a avaliar o estresse oxidativo pós-exodontia em ratos.

O processo de cicatrização pós exodontia em tem sido estudada em vários modelos animais. A sequência em ratos é entendida dividindo-se em 3 fases: fase inicial, inflamatória, entre 1 e 5 dias, fase de formação óssea de 5 a 20 dias, e fase de remodelação óssea de 20 a 60 dias. Neste trabalho verificou-se a proteção do mix de óleos ômega 9, 6 e 3 de baixa relação ômega-6 / ômega-3 e elevada relação ômega-9 / ômega-6 no estresse oxidativo e na inflamação no 3^o dia pós cirúrgico.

Ácidos graxos frequentemente incorporados em membranas fosfolipídicas são o ômega-3: eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ômega-6: ácido araquidônico (AA), e w-9: ácido oleico (OA). EPA e DHA têm efeitos diretos sobre a fluidez estrutural e funcional da membranas celulares. Por meio de incorporação dos fosfolípidos nas membranas celulares, os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) influenciam nas respostas imunes e inflamatórias, atuando na fluidez das membranas (facilitando ou dificultando a adesão de receptores, moléculas de superfície e de produção de enzimas), a síntese de moduladores de inflamação (eicosanóide) e na transdução de sinal, com maior ou menor produção de citocinas inflamatórias.

Os ácidos graxos ômega-9 (ácido oleico) conferem proteção contra a peroxidação lipídica diferente dos ácidos graxos polinsaturados como linolênico, EPA, DHA que contêm 4, 5 e 6 duplas ligações, respectivamente, e são muito menos estáveis. O uso de formulações ricas em lipídios na forma monoinsaturada, comparado ao uso de polinsaturados culminou com menor resposta inflamatória e menor produção de radicais livres com fórmula rica em monoinsaturados (CURI *et al.*, 2002). As membranas que são ricas em ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) são menos susceptíveis a oxidação por radicais livres do que as membranas ricas em ácidos graxos poli-insaturados, possivelmente por o menor número de duplas ligações presentes nos ácidos graxos ômega-9 conferirem menor probabilidade de ataque por espécies reativas de oxigênio. (BITTENCOURT e SENNA, 2002)

O azeite de oliva é rico em ácidos graxos ω -9 e vitamina E e fitoesteróides conhecidos por suas propriedades antioxidantes. O fato de a estrutura molecular do AO ter somente uma dupla ligação, juntamente com a presença de vitamina E, confere uma maior proteção contra a peroxidação lipídica (GRIMBLE, 2002). O Azeite de Oliva reduz o acúmulo de ERO (espécies reativas de oxigênio) (OH *et al.*, 2009).

O ácido araquidônico (ω -6) e o EPA (ω -3) são ambos substratos da cicloxigenase e da lipoxigenase. Um aumento na disponibilidade do EPA age basicamente como inibidor competitivo, impedindo que o ácido araquidônico entre na cascata e gere produtos finais pró-inflamatórios. O alto consumo de ácido linoléico favorece o aumento do conteúdo de ácido araquidônico (ω -6) nos fosfolipídios das membranas celulares, aumentando, conseqüentemente, a produção de prostaglandina (PG) E2 e leucotrieno (LT) B4, por meio das vias enzimáticas da ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase (5-LOX), respectivamente. A ingestão de óleo de peixe introduz EPA nos fosfolipídios das membranas, inibindo o metabolismo do ácido araquidônico por competição pelas mesmas vias enzimáticas (COX e 5-LOX), promovendo a formação de PGE3, em vez de PGE2, e LTB5, em vez de LTB4, que são mediadores inflamatórios menos ativos (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000). Em geral, o ácido linoléico é precursor da síntese de eicosanóides com características pró-inflamatórias, como o tromboxano A2 (TXA2), as PGI2 e PGE2 e os LTB4 (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; KELLEY, 2001).

As PGE2 e os LTB4 são os mediadores que possuem o maior potencial pró-inflamatório. A PGE2 induz à febre, promove vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e potencializa a dor e o edema causados por outros agentes, como bradicinina e histamina. Por outro lado, a PGE2 inibe a produção do TNF- α e IL-1, apresentando, nesse aspecto, característica anti-inflamatória. Tem potencial imunossupressor, pois inibe a proliferação de linfócitos, a atividade das células *natural killer* (NK) e a produção de IL-2 e Interferon (IFN). O LTB4 aumenta a permeabilidade vascular, o fluxo sanguíneo e a quimiotaxia dos leucócitos, induz à liberação de enzimas lisossomais e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio e de TNF- α , IL-1 e IL-6. Em todos esses aspectos, o LTB4 é pró-inflamatório (GRIMBLE, 2002; CALDER, 2003). No presente estudo foi possível verificar a inibição da expressão do TNF- α provavelmente explicada pela substituição LTB4 por LTB5 (Gráfico 2A). Como citado, os tromboxanos (TX) também provêm do metabolismo dos eicosanóides. Entre eles, o TXA2 é o principal subproduto do AA, promovendo agregação plaquetária, adesão leucocitária e contração da musculatura lisa (CALDER, 2003).

A transdução de sinais e a expressão de genes são influenciadas pelos níveis de EPA e DHA obtidos pela dieta (CALDER; GRIMBLE, 2002; CORNELL; SHANLEY, 2005). Os ácidos graxos ω -3 estabilizam o sistema NF κ B. O NF κ B é um fator de transcrição nuclear encontrado em todos os tipos celulares, estando envolvido em repostas a estímulos, tais como: estresse, citocinas, radicais livres, radiação ultravioleta, antígenos virais ou bacterianos.

Possui um papel chave na regulação da resposta imune à infecção e sua regulação incorreta foi associada a câncer, doenças auto-imunes e inflamatórias, choque séptico e infecções virais (HELTON; ESPAT, 2001). O NFκB age como o interruptor “liga/desliga” para a célula gerar mediadores pró inflamatórios como o TNF, IL-6, e interferon-γ. Ao ser estabilizado no citoplasma com seu complexo inibidor, o NFκB limita a quantidade de NFκB livre que é translocada ao núcleo para iniciar a cascata inflamatória. Outros sistemas enzimáticos comumente associados a estados inflamatórios após a ativação de NFκB incluem o do NO, da molécula de aderência intracelular-1 (ICAM-1), da molécula de aderência endotelial vascular-1 (VCAM-1), e outros. Outro benefício do EPA e do DHA na resolução de inflamações é a produção de potentes moléculas anti-inflamatórias e neuroprotetoras, resolvinas, docosatrienos e neuroprotectinas (SERHAN, 2005).

Os ácidos graxos ômega-3 exercem efeito anti-inflamatório por pelo menos três mecanismos: (1) influenciam a composição fosfolipídica da membrana celular, resultando na síntese de mediadores lipídicos com menor potencial inflamatório do que mediadores derivados dos ácidos graxos ômega-6; (2) agem como agonistas de PPAR (receptor de ativação de proliferação de peroxissomas), cuja ativação exerce efeitos anti-inflamatórios e (3) os ácidos graxos ômega-3 estabilizam o complexo NFκB/IκB, suprimindo a ativação de genes envolvidos no processo inflamatório (WAITZBERG, 2008).

Recentemente foi descrito que o DHA é precursor de um mediador denominado neuroprotectina D1 (NPD1), a partir de sua lipoxigenação e ulterior hidrólise. A síntese de NPD1 é induzida como uma resposta de alarme ao estresse oxidativo e/ou ativação de neurotrofinas, acionando a sinalização para a manutenção da homeostase e integridade celular (NIEMOLLER; BAZAN, 2010; PALACIOS-PELAEZ; LUKIW; BAZAN, 2010).

Por outro lado o aumento da oferta de ácidos graxos da família ômega-3, como o ácido linolênico ou de EPA e de DHA, favorece a síntese de eicosanóides como a PGE₃, TXA₃ e LTB₅, que possuem características anti-inflamatórias. Esse equilíbrio proporciona menor formação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo alguns dos efeitos imunossupressores (Figura 9A, Figura 9B, Figura 9C, Figura 2A, Figura 2B) (ROBERT, 2005; NAKAMURA, 2005).

O resultado final do metabolismo excessivo de ácidos graxos ω-6 é a produção de mediadores pró-inflamatórios, vasodilatação, edema aumentado, aceleração da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares, aumento da transdução dos sinais nucleares de citocinas pró-inflamatórias e da toxicidade tecidual local. Alterando-se a proporção de lipídios ω-6 para os ω-3 na dieta pode-se aperfeiçoar a provisão desses produtos pró-inflamatórios para a resposta

imune e de consolidação necessária e atenuar-se ao mesmo tempo os estados inflamatórios e oxidantes excessivos. Tal fato foi comprovado em estudos experimentais com animais e em ensaios clínicos (BAS *et al.*, 2007; SIJZEN; CALDER, 2007; MELO *et al.*, 2014).

A redução da relação ω -6: ω -3 provocou evidentes efeitos anti-inflamatórios no presente estudo com diminuição do edema de masseter e da atividade da MPO em rebordo alveolar. Os neutrófilos são as primeiras células que migram dos vasos sanguíneos para o tecido lesionado conferindo um papel protetor através da fagocitose. Nos primeiros dias após a lesão, os neutrófilos constituem cerca de 50% de todas as células no local da ferida e a menos que os estímulos para o recrutamento de neutrófilos persistam no local da ferida (síntese de citocinas pró-inflamatórias), a infiltração de neutrófilos cessa após alguns dias e os neutrófilos lisados são fagocitados pelos macrófagos (ALVES *et al.*, 2003). Com a diminuição da síntese de moléculas pró-inflamatórias como o LTB₄ decorrente do tratamento antioxidante e anti-inflamatório instituído, houve redução da concentração de TNF- α , da permeabilidade vascular, do fluxo sanguíneo e da quimiotaxia dos leucócitos (GRIMBLE, 2002; CALDER, 2003) e deste modo houve consequente redução da atividade de MPO e edema de masseter.

O tratamento com antioxidantes é eficaz na redução da expressão sorológica de diversos mediadores pró-inflamatórios, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e dos níveis Óxido Nítrico. No entanto, a redução da síntese de TNF- α por inibição do estresse oxidante é mais eficaz em curto prazo do que a redução da síntese de IL-1 β , que, juntamente com os demais marcadores citados (IL-6 e Óxido Nítrico), parecem necessitar de mais tempo de exposição aos agentes para serem prontamente inibidos (RAMIREZ-RAMIREZ *et al.*, 2013). Isso justifica capacidade da resposta inibitória do Mix Teste em inibir prontamente a síntese de TNF- α de modo significativo, mas não haver redução significativa da expressão de IL-1 β nesse trabalho.

A redução da síntese de TNF- α é importante não apenas para diminuição do edema e após uma exodontia, mas também da dor. O trismo é um dos principais componentes indicativos de estado inflamatório em estudos clínicos e o TNF- α é um mediador que age prontamente sensibilizando nociceptores induzindo limitação de abertura bucal (BELLO *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2000). A inibição da sua síntese por meio de agentes específicos como talidomida conseguem reduzir a nocicepção em modelos de dor aguda em patas de roedores (RIBEIRO *et al.*, 2000).

Além disso, o TNF- α é uma citocina intimamente envolvida no processo de osteoclastogênese. O aumento da síntese de TNF- α ocorre normalmente em de três a sete dias após uma exodontia, e estados hiperinflamatórios como a doença periodontal aumentam a

intensidade de imunomarcação local e duração da superexpressão de TNF- α em sítios de exodontia com conseqüente aumento da perda óssea alveolar decorrente da superativação de osteoclastos (KIM *et al.*, 2012). O aumento do número de osteoclastos em sítio é diretamente proporcional ao aumento da expressão de fosfatase ácida tartarato-resistente (ZENGER; EK-RYLANDER.; ANDERSSON, 2010) e do estresse oxidativo que auxiliam no processo reabsorção óssea (HALLEN *et al.*, 1999). Assim, fármacos que auxiliem na redução da concentração de TNF- α e outros marcadores da mesma família, como o Ligante de Receptor Ativador do Fator Nuclear kappa B (RANKL), conseguem prontamente inibir a reabsorção óssea (KIMACHI *et al.*, 2011), por meio da redução da atividade metabólica e do número de osteoclastos em sítio de exodontia (ZENGER; EK-RYLANDER.; ANDERSSON, 2010), e redução do estresse oxidativo local (LIMA Jr. *et al.*, 2011) como observado nesse estudo.

Assim, terapias com nutracêuticos antioxidantes parecem constituir importantes ferramentas terapêuticas adjuvantes no controle da inflamação após exodontia, como demonstrado nesse trabalho. Além disso, sinalizam uma possível prevenção da perda óssea alveolar após exodontia, fato esse de suma importância para posteriores reabilitações orais por meio de próteses implantossuportadas, devendo ainda essa sinalização merecer embasamento por meio de pesquisas experimentais.

6 CONCLUSÕES

O tratamento com o Mix Teste mostrou-se eficaz na redução das concentrações de Glutathione no sangue e na mucosa alveolar do sítio da extração dental, redução das concentrações de TBARS no sangue e na mucosa alveolar no sítio da extração dental, redução da expressão do TNF- α , redução da atividade de MPO, redução do edema na região masseterica e redução do número de osteoclastos no sítio da exodontia de ratos, porém, não houve redução significativa da expressão de IL-1 β .

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: the role of w-3 fatty acids. **Nutrition**, v.14, p. 627-633, 1998.
- ALLAYEE, H.; ROTH, N.; HODIS, H.N. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: implications for nutrigenetics. **J nutrigenet nutrigenomics**, v. 2, p.140-148, 2009.
- ALVES, R.D. et al. Mecanismos imunológicos e auto-imunidade na doença periodontal. **Rev odonto cienc**, v. 18, n. 40, p.138-142,2003.
- BARRETO, A. R. Fucoidin prevents clostridium difficile toxin-a-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 990-996, 2008.
- BAS, O.The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. **Neurochem. Int.**, v. 50, n. 3, p. 548-554, 2007.
- BELLO, S. A. el al. Effect of age, impactiontypes and operativetime on inflammatorytissuereactionsfollowinglowerthirdmolarsurgery. **Head & face medicine**, v. 7, n. 8, 2011.
- BITTENCOURT, P. I. H.; SENNA, S. M. Ácidos graxos e aterosclerose. In: **Curi, Rui. Entendendo a Gordura: os ácidos graxos**. 1 ed. Manole, v.27, p.381-392.São Paulo, 2002.
- BONJOUR, JP. 2005. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. **J Am Coll Nutr** 24:526S–536S.
- BODNER, L., KAFFE, I., LITTNER, M.M., COHEN, J. Extrac- tion site healing in rats. A radiologic densitometric study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol**, v.75, p. 367–372.1993.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.
- CALDER, P.C. LONG-CHAIN. N-3 fatty acids and inflammation: potential application in Surgical and trauma patients. **Braz j med biol res**, v.36, p.433, 2003.
- CALDER, P.C.; DECKELBAUM, R.J. Dietary lipids: more than just a source of calories. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.2, n. 2, p.105-107, 1999.
- CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur.J. Clin. Nutr.**, v.56, p. 14-19, 2002.
- CAPONE, S.L.; BAGGA, D.; GLASPY, J.A. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acid ratios and breast cancer. **Nutrition**, v.13, n.9,1997.
- CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.56, p. 14-19, 2002.
- CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz j med biol res**, v.36, p.433, 2003.

CALDER, P.C.; DECKELBAUM, R.J. Dietary lipids: more than just a source of calories. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.2, n. 2, p.105-107, 1999.

CORNELL, T.T.; SHANLEY, T.P. Signal transduction overview. **Crit. Care Med.**, v. 33, p. 410-413, 2005

CURI, R, J. et al. Ácidos Graxos e Câncer. In: **Curi, Rui**. Entendendo a Gordura: os ácidos graxos. 1 ed. Manole, v. 37, p.523-538, São Paulo, 2002.

DAYAN, D., BODNER, L., HOROWITZ, I., Effect of salivary gland hypofunction on the healing of extraction wounds: a histomorphometric study in rats. **J. Oral Maxillofac**. v. 50, p. 354–358.1992

DE CARVALHO, PS; MARIANO, RC; OKAMOTO, T. Treatment of fibrinolytic alveolitis with rifamycin B diethylamide associated with gelfoam: a histological study. **Braz Dent J**, v.8, p. 3-8,1997.

DEVLIN, H. Early bone healing events following rat molar tooth extraction. **Cells Tissues Organs**v. 167, p. 33-37,2000.

DEVLIN, H; SLOAN, P. Early bone healing events in the human extraction socket. **Int J Oral Maxillofac Surg**,v. 31, p.641-645,2002.

DEVLIN, H., GARLAND, H., SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 54, p.1087–1091,1996.

DEVLIN, H; GARLAND, H; SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. **J Oral Maxillofac Surg**,v. 54, p. 1087-1091,1996.

DOMON, S. et al .In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root- resorbing tissue induced by tooth movement. **Arch Oral Biol**, v. 44, p. 907-915,1999.

DYEBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutr. Rev.**, v. 44, n. 4, p. 125-135, 1986.

EULER, H. Heilung von extractions wunden: line tue experimentallestudie. **Dt Mschr Zannheiek**, v. 41, p. 687-700, 1923.

FAROOQUI, A.A.; ONG, W-Y.; HORROCKS, L.A.; CHENC, P.; FAROOQUI, T. Comparison of biochemical effects of statins and fish oil in brain: the battle of the titans. **Brain Res. Rev.**, v. 56, n. 2, p. 443-471, 2007.

FISCHER, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. **Adv. Lipid. Res.**, v. 23, p. 169-196, 1989.

FLACHS,P; ROSSMEISL, M; KOPECKY, J. The effect of n-3 fatty acids on glucose homeostasis and insulin sensitivity. **Physiological research**, v. 63, suppl. 1, p. S93-s118, 2014.

GRIMBLE, R. Use of n-3 fatty acid-containing lipid emulsions in the intensive care unit environment: the scientist's view. **Clin nutr.**, v. 21, p.15-21, 2002.

GRIMBLE, R.F. Immunonutrition. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, v. 21, n. 2, p. 216-222, 2005.

GUGLIELMOTTI, MB, CABRINI, RL. Alveolar wound healing and ridge remodeling after tooth extraction in the rat: a histologic, radiographic, and histometric study. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 43, p. 359-364, 1985.

HALLEEN, J. M. et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *The journal of biological chemistry*, v. 274, n. 33, p. 22907-22910, 1999.

HELTON, W.S.; ESPART, N.J. Defining mechanism of ω -3 fatty-acid activity. *Nutrition*, v. 17, p. 674, 2001.

HEYLAND, D.K.; DHALIWAL, R.; DAY, A.G.; MUSCEDERE, J.; DROVER, J.; SUCHNER, U.; COOK, D.; Canadian Critical Care Trials Group. Reducing deaths due to oxidative stress (the REDOXS study): Rationale and study design for a randomized trial of glutamine and antioxidant supplementation in critically-ill patients. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 65, n. 3, p. 250-263, 2006.

HSIEH, YD; DEVLIN, H; ROBERTS, C. Early alveolar ridge osteogenesis following tooth extraction in the rat. *Arch Oral Biol*, v. 39, p. 425-428, 1994.

IIZUKA, T.; MILLER, S.C.; MARKS, S.C. JR. Alveolar bone remodeling after tooth extraction in normal and osteopetrotic (ia) rats. *J. Oral Pathol. Med.*, v. 21, p. 150-155, 1992.

INNIS, S.M. Omega-3 fatty acids and neural development to 2 years of age: do we know enough for dietary recommendations? *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, v. 48, p. 16-24, 2009.

JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *Am j clin nutr.*, v.71, p.343-348, 2000.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*. v. 17, p. 669-73, 2001

INNIS, SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog lipid res.*, v.30, p.39-103, 1991.2001.

KIM, D. J. et al. Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *Journal of periodontal & implant science*, v. 42, n. 5, p. 158-165, 2012.

KIMACHI, K. et al. Zoledronic acid inhibits rank expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn-schmiedeberg's archives of pharmacology*, v. 383, n. 3, p. 297-308, 2011.

KINGSMILL VJ. Post-extraction remodeling of the adult mandible. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 10, p. 384-404, 1999.

LI, H.L. et al. Crocodile oil enhances cutaneous burn wound healing and reduces scar formation in rats. *Academic emergency medicine*, v.19, p. 265-273, 2012.

LIMA JR., R. C. P. et al. Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. **Cancer and chemotherapy pharmacologic**, v. 69, n. 4, p. 931-942, 2012.

LIN, WL; MCCULLOCH, CA; CHO, MI. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. **Anat Rec**, v. 240, p. 492-506, 1994.

MAAHS, MP. et al. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. **Head Neck**. 2011 Feb;33(2):199-207. doi: 10.1002/hed.21422.

MARTINDALE, R.; ZHOU, M. Terapia nutricional imunomoduladora. In: **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 4 ed. São Paulo: atheneu, 2009. Cap 119, p. 1987-2006.

MCMILLAN, MD. Neutrophils in the molar tooth extraction wound in the rat: a transmission electron microscope (TEM) study. **J Oral Pathol Med**, v. 28, p. 297-30, 1999.

MELO, Radamés Bezerra. et al. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio omega-9:omega-6 and low ratio omega-6:omega-3 after molar extraction in rats. **Acta cir. Bras**, v. 29, n. 6, p. 371-375 . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502014000600004>>.june 2014 .

MESQUITA, T. R. M.; SOUZA, A. A.; CONSTANTINO, E.; PELÓGIA, N. C. C.; POSSO, I. P.; PIRES, O. C. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. *Revista Dor*, v. 12, n. 4, p. 337-341, 2011.

NAKAMURA, K. Influence of preoperative administration of w-3 fatty acid-enriched supplement on inflammatory and immune responses in patients undergoing major surgery for cancer. **Nutrition**, v.21, p. 639-649, 2005.

NIEMOLLER, T.D.; BAZAN, N.G. Docosahexaenoic acid neurolipidomics. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 91, n. 3-4, p. 85-89, 2010.

OH, Y.T. et al. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF- kappaB signaling pathways. **Neurosci. Lett.**, v. 464, n. 2, p. 93-97, 2009.

PALACIOS-PELAEZ, R.; LUKIW, W.J.; BAZAN, N.G. Omega-3 essential fatty acids modulate initiation and progression of neurodegenerative disease. **Mol. Neurobiol.**, v. 41, n. 2-3, p. 367-374, 2010

PIRES, VL. et al. Preconditioning with L-alanyl-L-glutamine in a Mongolian gerbil model of acute cerebral ischemia/reperfusion injury. **Acta Cir Bras.**, v. 26, n 1, p. 14-20, 2011.

PRENTICE A, SCHOENMAKERS I, LASKEY MA, DE BONO S, GINTY F, GOLDBERG GR. Nutrition and bone growth and development. **Proc Nutr Soc** 65:348-360, 2006

RAMIREZ-RAMIREZ, V. et al. Efficacy of fish oil on serum of $\text{tnf } \alpha$, $\text{il-1 } \beta$, and il-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. **Oxidative medicine and cellular longevity**. *Doi*, v. 10, 2013.

REID IR, CORNISH J, BALDOCK PA. Nutrition-related peptides and bone homeostasis. **J Bone Miner Res** 21:495–500, 2006.

RIBEIRO, R. A. et al. Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European journal of pharmacology**, v. 391, n. 1-2, p. 97-103, 2000.

ROBERT, O. Practical applications of fish oil (w-3 fatty acids) in primary care. **J am board pract.** v.18, p.28-36, 2005.

SANCHES NETO R, BARONE B, TEVES DC, SIMÕES MJ, NOVO NF, JULIANO Y. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas em ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2%. **Acta cir. Bras**; 8: 18-23, 1993.

SHAFER WG, MUHLER JC. Effect of gonadectomy and sex hormones on the structure of the rat salivary glands. **J Dent Res.** 32(2): 262-8, 1953.

SHAPIRO, H; LUTATY, A; ARIEL, A. Macrophages, meta-inflammation, and immunometabolism. **The scientific world journal**, v. 11, p. 2509-2529, 2011.

SERHAN, C.N. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatriens, and neuroprotectins. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, v. 8, n. 2, p. 115-121, 2005

SILVA, HC. Coletta RD, Jorge J, et al: The effect of cyclosporin A on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. **Arch Oral Biol**, v. 46, p. 875, 2001.

SIJBEN, J.W.; CALDER, P.C. Differential immunomodulation with long-chain n-3 pufa in health and chronic disease. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 66, n. 2, p. 237-259, 2007.

SHIMIZU, M. et al. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. **Anat. Rec.**, v. 259, p. 76–85, 2000

SMALES, R.J. Effects of systemic cortisone on healing of tooth sockets in rats. A histologic study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 45, p. 685–688, 1978.

SMITH, N. A comparative histological and radiographic study of extraction socket healing in the rat. **Aust Dent J**, v. 19, p. 250-254, 1974.

STABLES, M.J.; GILROY, D.W. Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. **Prog lipid res.** v. 50, n. 1, p. 35-51, 2011.

STABLEFORTH, W. D. ; THOMAS ,S.; LEWIS, S. J. A systematic review of the role of immunonutrition in patients undergoing surgery for head and neck cancer. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 38, p. 103–110. 2009.

SUAREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; SACCOL, A.; PARDO-CARRASCO, S. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. *Bolm Inst. Pesca*, v. 28, p. 48-52, 2002.

UBIOS, A.M; JARES FURNO, G.; GUGLIELMOTTI, M.B. Effect of calcitonin on alveolar wound healing. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 20, p. 322–324, 1991.

WAITZBERG, D.L. Ômega-3: o que existe de concreto? São Paulo: Nutralite, 2008.

YU, P. et al. Hydrogen-rich medium protects human skin fibroblasts from high glucose or mannitol induced oxidative damage. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 409, n. 2, p. 350-355, 2011.

ZENGER, S.; EK-RYLANDER, B.; ANDERSSON, G. Long bone osteoclasts display an augmented osteoclast phenotype compared to calvarial osteoclasts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 394, n. 3, p. 743-749, 2010.

APÊNDICE

Dados Brutos

TBARS no Sangue (nmol/ml)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,085	0,615	0,224	0,026
0,141	0,193	0,192	0,088
0,105	0,283	0,109	0,080
0,072	0,322	0,162	0,089
0,052	0,157	0,300	0,189
0,090	0,167	0,120	0,187
0,087	0,098	0,337	0,088
0,045	0,167	0,278	0,029

Glutaciona no sangue (µg/ml)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
6,180	10,717	9,587	6,710
5,513	13,280	11,483	6,770
4,550	12,500	9,867	7,007
6,963	13,170	11,213	3,713
6,880	11,550	9,973	7,080
3,847	9,847	11,733	4,703
4,240	11,800	10,998	7,147
4,107	10,817	11,857	5,713

TBARS no tecido (nmol/mg)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,102	0,210	0,109	0,179
0,079	0,442	0,115	0,213
0,080	0,245	0,387	0,130
0,129	0,344	0,104	0,070
0,130	0,191	0,314	0,108
0,093	0,065	0,145	0,095
0,075	0,338	0,672	0,099
0,132	0,343	0,075	0,022

Glutaciona no tecido (µg/mg)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
6,259	20,328	17,844	8,946
7,885	17,692	19,844	6,713
7,623	21,429	19,602	7,531
9,238	20,258	19,592	6,713
7,976	23,520	19,490	8,946
7,481	21,834	20,369	8,946
7,905	23,591	19,854	9,127
7,077	20,167	20,076	6,309

Razão TNF-α/b-actina

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
1,66	61,18	38,16	2,04
3,59	13,11	70,36	5,18
1,04	32,20	29,40	19,31
		41,53	

Edema de Masseter (mm)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,0	2,1	2,0	0,5
0,0	2,0	2,0	0,3
0,0	2,0	1,6	0,6
1,0	2,3	2,1	0,4
0,0	2,0	1,9	0,7
0,0	2,2	1,7	0,5
0,0	2,5	2,0	0,4
0,0	2,1	1,6	0,5

Razão IL-1B/b-actina

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
10,54	56,20	26,49	44,69
20,33	40,79	37,07	46,00
27,65	32,55	51,75	28,82
11,30	49,98		34,92

MPO (µg/g)

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
4,448	8,443	8,162	5,388
8,443	11,605	9,430	6,075
7,780	13,273	9,208	6,946
7,881	11,499	10,499	8,314
6,052	8,890	10,559	7,319
0,697	12,420	10,056	4,651
0,738	12,467	10,121	7,526
4,881	6,867	6,204	4,817

Contagem de osteoclastos

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0	110	37	23
0	41	46	43
0	59	52	30
1	37	43	28
3	103	75	28
	44		28
			38

Artigo Publicado

4 - ORIGINAL ARTICLE
EFFECTS OF DRUGS**Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats¹**

Radamés Bezerra Melo^I, Sérgio Botelho Guimarães^{II}, Paulo Goberlânio de Barros Silva^{III}, Reinaldo Barreto Oriá^{IV}, José Ulisses de Souza Melo^V, Paulo Roberto Leitão Vasconcelos^{VI}

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502014000600004>

^IFellow Master degree, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, Federal University of Ceara (UFC), Fortaleza-CE, Brazil. Conception of the study, technical procedures, acquisition of data, manuscript writing.

^{II}PhD, Associate Professor, Department of Surgery, Head, Experimental Surgery Laboratory (LABCEX), UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

^{III}Fellow Master degree, Postgraduate Program in Dentistry (Stomatology), UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Pre and post-operative animal care, statistical analysis.

^{IV}PhD, Associate Professor, Department of Morphology, Head, LABICONTE, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Conception and design of the study, critical revision.

^VPhD, Associate Professor, Department of Surgery, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Critical revision.

^{VI}PhD, Full Professor, Coordinator, Postgraduate Program in Surgery, Department of Surgery, UFC, Fortaleza-CE, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; critical analysis, final approval of the manuscript.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the antioxidant and antiperoxidative effects of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 in the third day after tooth extraction in rats.

METHODS: Thirty-two male Wistar rats (270-310g) were randomly distributed in two groups: Control (n=24) and Test (n=8). Control group was divided into three subgroups (n=8): G1: Sham-Saline; G2: Saline; G3: Isolipid. G1 and G2 animals received NaCl 0.9% while G3 rats were treated with an isolipid mixture (alpha-linolenic acid – ALA) containing -6/-3 oils (8:1 ratio) and -9/-6 (0.4:1 ratio). Test group animals (G4) received oily mixtures (alpha-linolenic acid – ALA, docosahexaenoic acid – DHA, eicosapentaenoic acid – EPA) of -6/-3 (1.4:1 ratio) and -9/-6 (3.4:1 ratio). Saline and oils were administered by gavage during four days before and three days after first mandibular molar extraction. Following, samples (arterial blood and alveolar mucosa) were collected for glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays.

RESULTS: Oil mixes induced a significant decrease in GSH and TBARS tissue and plasma concentrations in the third day post-surgery.

CONCLUSION: Gavage administration of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats induces a significant decrease in lipid peroxidation.

Key words: Fatty Acids, Omega-3. Fatty Acids, Omega-6. Lipid Peroxidation. Tooth Extraction. Rats.

Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats

Introduction

Oxidative stress can be defined as imbalance between production and collection of reactive oxygen species (ROS). The oral supplementation of antioxidants is well indicated in several situations, such as cancer, sepsis, preoperative of major surgeries and malnourished or critically ill patients¹. The omega-3 is one of the most used in research immunonutrients².

Currently, the adequacy of the balance of dietary lipids has motivated numerous investigations. In patients with changes in metabolic responses, the balance between dietary lipids aims to control oxidative stress and increased inflammatory response, through the relationship between the types of polyunsaturated fatty acids ingested³, affecting the synthesis of eicosanoids that act as intermediate messengers of growth factors controlling the growth and differentiation of epithelial cells⁴.

Protective effects of oils mixes against ischemia/reperfusion injury have been demonstrated. Pinheiro *et al.*⁵ investigated the effects of pre-conditioning with mixtures of oils containing high and low ratio ω -6/ ω -3 and ω -9/ ω -6 relationship in an experimental model and concluded that these oil combinations protects brain neurons against ischemia-reperfusion injury. The data found in the literature vary widely as to the best combination of antioxidants, the dosage, route of administration, the levels to be ideally achieved, the best time and how long they have to be administered in order to provide an effective protection against the oxidative injury. Despite the fact that there is no consensus regarding those topics, an early study has recommended that therapy should be instituted before the establishment of oxidative injury⁶.

The hypothesis of this study is that the use of combinations containing different proportions of omega 3, 6 and 9 amino acids may have a noticeable antioxidant effect during the inflammatory

phase of the wound healing after dental extraction.

Methods

Approval for experimental use of laboratory animals was obtained from the local Ethics Committee on Animal Use (CEUA, former CEPA) (protocol 73/2011, February 29, 2012)) and is in compliance with the Federal Law No. 11794 of October 8, 2008, and the Decree n° 6,689, July 15, 2009 that regulated the law in 11,794, available from <http://www.planalto.gov.br/ccivil03/ato2007-2010/2008/LeiL11794.htm>. The study was designed to minimize the number of animals required for the experiments.

Study design

Wistar rats provided by the Faculty of Medicine Small Animals Breeding Facility (UFC) In this controlled experimental study, after one week of acclimatization, 32 male Wistar rats provided by the Faculty of Medicine Small Animals Breeding Facility (UFC), weighing 270-310g, were randomly distributed in two groups: Control (n=24) and Test (n=8). Control group was divided into three subgroups (n=8) as follows: G1: Sham-Saline; G2: Saline; G3: Isolipid. G1 and G2 animals received NaCl 0,9% while G3 rats were treated with an isolipid mixture (alpha-linolenic acid – ALA) containing -6/-3 oils (8:1 ratio) and -9/-6 (0.4:1 ratio), by gavage for four days before and three days after surgical procedure. Test group animals (G4) received oily mixtures (alpha-linolenic acid – ALA, docosahexaenoic acid – DHA, eicosapentaenoic acid – EPA) of -6/-3 (1.4:1 ratio) and -9/-6 (3.4:1 ratio). Saline and oils were administered by gavage during four days before and tree days after first mandibular molar extraction⁷. Isolipid and Mix preparations are detailed on Table 1.

TABLE 1 – Composition of isolipid and oil mixes preparations.

	Composition	Source ω -3	Ratio
Isolipid	ω -6 + ω -3		ω -6: ω -3= 8: 1
	Corn oil Soybean oil	ALA	ω -9: ω -6= 0,3: 1
Test oil mixes	ω -9 + ω -6 + ω -3	ALA (35%)	
		EPA (39%)	ω -6: ω -3= 1,4: 1
	Olive oil Canola oil Fish oil	DHA (26%)	ω -9: ω -6= 3,7: 1

Melo RB *et al.*

On the third day, G1 and G2 rats, anesthetized with a fresh-prepared mixture of ketamine $90\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ + xylazine $10\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ injected intramuscularly, underwent a surgical molar extraction. G1 animals underwent sham operation. Rats were kept under controlled environmental conditions (24°C relative humidity 40%–60%, 12-hour alternate light–dark cycles, food and water *ad libitum*).

Samples (arterial blood and alveolar mucosa) were collected on the third post-operative and the animals were killed by cervical dislocation at the end of the experiment.

Laboratory parameters

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and glutathione (GSH) concentrations were assayed to evaluate the oxidative stress, using methods described in the literature. Lipid peroxidation was assayed by measuring malondialdehyde as TBA-reactive substances⁸. GSH levels were estimated by the method of Sedlak and Lindsay⁹.

Statistical analysis

Data distribution was analyzed by the Shapiro-Wilk test. All data were expressed as mean \pm SEM. SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) was used for statistical analysis. One-way ANOVA was performed to determine differences among groups. A probability value of $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

TBARS Assay

Blood TBARS concentrations decreased significantly in G4 rats treated with test mixes oil (0.25 ± 0.06 vs. 0.10 ± 0.02 , $p < 0.05$), compared with saline control group (Figure 1A). Also, there was a significant decrease in tissue TBARS levels in G4 rats compared with saline-treated group tissue of the group treated with test oil mixes (0.27 ± 0.04 vs. 0.11 ± 0.02 , $p < 0.05$) (Figure 1B).

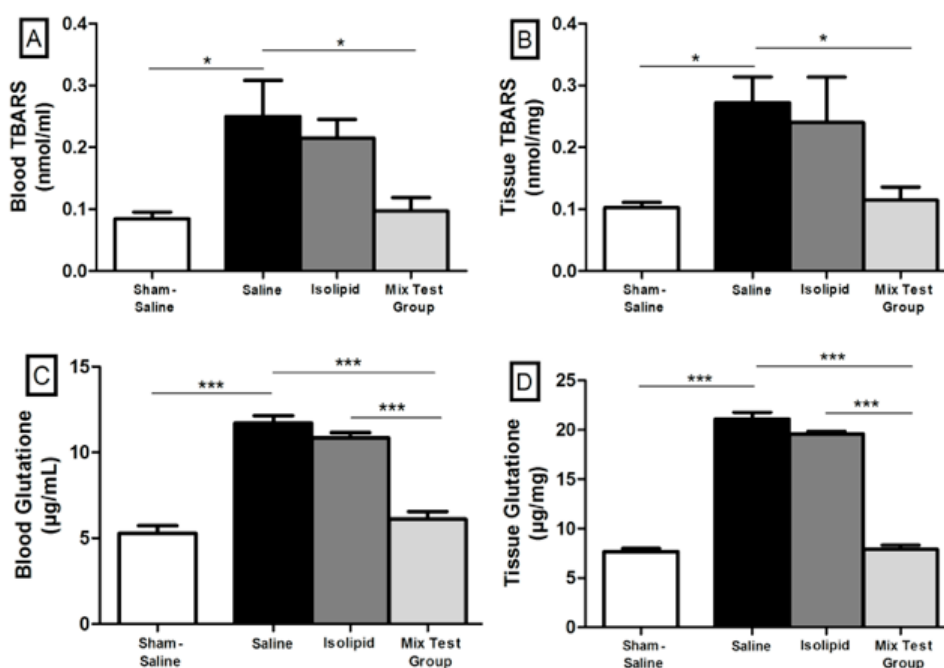


FIGURE 1 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in blood (A) and local tissue (B); Glutathione (GSH) levels in blood (C) and local tissue (D) three days post dental extraction. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Test ANOVA/Tukey.

Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio Omega-9:Omega-6 and low ratio Omega-6:Omega-3 after molar extraction in rats

GSH Assay

There was a significant reduction in GSH blood levels in G4 animals treated with oil mixes ($10.84 \pm 00:32$ vs. $6:10 \pm 0:45$, $p < 0.001$) compared with the group treated with Isolipid mix and with the group treated with saline ($12:46 \pm 00:24$ vs. $6:10 \pm 0:45$, $p < 0.001$) (Figure 1C). However, GSH blood and tissue concentrations increased significantly ($p < 0.001$) in rats treated with saline, compared with animals submitted to a simulated (sham) procedure (Figure 1C/D). There were significant reductions in tissue GSH levels in animals treated with test oil mixes compared with saline group (21.10 ± 0.69 vs. $12:42 \pm 7.90$, $p < 0.001$) and isolipid mix (21.10 ± 0.69 vs. $19:58 \pm 12:27$, $p < 0.001$) (Figure 1C/D).

Discussion

Research studies concerning the relationship between the repair and the possible factors that affect the healing process after tooth extraction in rats were initiated in early 1923¹⁰⁻¹¹. The healing process post dental extraction has been studied in several animal models, and its sequence is relatively understood and divided into three phases: (a) initial phase: inflammatory between one and five days, (b) middle phase: during bone formation five to 20 days, (c) final phase: bone remodeling phase from 20 to 60 days¹². Local and systemic factors may affect rat socket healing, including salivary gland hypofunction, osteoporosis, osteopetrosis, diabetes mellitus and treatment with calcitonin or cortisone¹²⁻¹⁷. In this work it was found that oil mixes administered by gavage before and after dental extraction may provide protection from lipid peroxidation in the third post-operative day. (Figure 1)

Fatty acids are used in a selective synthesis of phospholipids of cell membranes and their organelles. Essential fatty acids can determine structural and functional alterations of membrane phospholipids, including cells of the immune system, modifying its permeability, activity of receptors and enzymes, transport, regulatory functions and cellular metabolism¹⁸. Moreover, activate intracellular signaling routes for the formation of biologically active molecules that act as second messengers. Thus, may interfere with physiological events related to hemodynamic¹⁹, oxygenation²⁰, inflammation²¹ and organic defense²².

Omega-9 (oleic acid) confer protection against lipid peroxidation of different polyunsaturated fatty acids such as linolenic acid, EPA, DHA containing 4, 5 and 6 double bonds respectively and because that are much less stable. The use of compositions rich in monounsaturated lipids as compared to the use of polyunsaturated showed low inflammatory response and

low production of free radicals rich in monounsaturated formula. Membranes that are rich in monounsaturated fatty acids (MUFA) are less susceptible to oxidation by free radicals that membranes rich in saturated fatty acids, presumably because the greater number of unsaturations increase the likelihood of double bonds than in reactive oxygen species²³. This may explain the antiperoxidative protection of oil mixes test shown in Figure 1A and 1B.

Olive oil is rich in ω -9 fatty acids and vitamin E and is known for its antioxidant properties. The fact that the molecular structure of oleic acid have only one double bond, together with the presence of vitamin E confers greater protection against lipid peroxidation. Antioxidants decrease the accumulation of ROS²⁴, which can reduce local tissue damage and accelerate the healing process²⁵.

In this study, the use of an oil mix containing alpha-linolenic acid – ALA, docosahexaenoic acid – DHA, eicosapentaenoic acid – EPA of -6/-3 (1.4:1 ratio) and -9/-6 (3.4:1 ratio) promoted a decrease in GSH levels, an issue showing that GSH becomes “lesser necessary” and, in this way, an antioxidant action. Generally, cells react to oxidative stress with a increase in GSH pool as part of their adaptative answer to the potential oxidative lesion.²⁰ Therefore, a lower GSH level indicates a less aggressive potential oxidative stress.

Conclusion

This study shows the antiperoxidative effects of oil mixes containing alpha-linolenic acid – ALA, docosahexaenoic acid – DHA, eicosapentaenoic acid – EPA of -6/-3 (1.4:1 ratio) and -9/-6 (3.4:1 ratio) acids when administered by gavage before and after rat tooth extraction.

References

1. Grimble RF. Immunonutrition. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005 Mar;21(2):216-22 PubMed PMID: 15711216.
2. Stableforth WD, Thomas S, Lewis SJ. A systematic review of the role of immunonutrition in patients undergoing surgery for head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Feb;38(2):103-10. doi: 10.1016/j.ijom.2008.12.008.
3. Calder PC. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. *Braz J Med Biol Res* 2003 Apr;36(4):433-46 PubMed PMID: 12700820.
4. Capone SL, Bagga D, Glaspy JA. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acid ratios and breast cancer. *Nutrition*. 1997;13(9):822-4 PubMed PMID: 9290101.
5. Pinheiro PM, Campelo AP, Guimarães SB, Patrocínio RM, Valença Junior JT, Vasconcelos PR. Preconditioning with oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and a low ratio Omega-6:Omega-3 in rats subjected to brain ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras*. 2011;26 Suppl 1:32-7. PubMed PMID: 21971654.
6. Silva HC, Coletta RD, Jorge J, Bolzani G, Almeida OP, Graner E. The

Melo RB *et al.*

- effect of cyclosporin A on the activity of matrix metalloproteinases during the healing of rat molar extraction wounds. *Arch Oral Biol.* 2001 Sep;46(9):875-9. PubMed PMID: 11420061.
7. Pires VL, Souza JR, Guimarães SB, Silva Filho AR, Garcia JH, Vasconcelos PR. Preconditioning with L-alanyl-L-glutamine in a Mongolian gerbil model of acute cerebral ischemia/reperfusion injury. *Acta Cir Bras.* 2011;26 Suppl 1:14-20. PubMed PMID: 21971651.
 8. Uchiyama M, Mihara M: Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978 May;86(1):271-8. PubMed PMID: 655387.
 9. Sedlak J, Lindsay RH: Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968 Oct;24:25(1):192-205. PubMed PMID: 4973948.
 10. Maahs MP, Azambuja AA, Campos MM, Salum FG, Cherubini K. Association between bisphosphonates and jaw osteonecrosis: a study in Wistar rats. *Head Neck.* 2011 Feb;33(2):199-207. doi: 10.1002/hed.21422.
 11. Bodner L, Kaffe I, Littner MM, Cohen J. Extraction site healing in rats. A radiologic densitometric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993 Mar;75(3):367-72. PubMed PMID: 8469551.
 12. Smales RJ. Effects of systemic cortisone on healing of tooth sockets in rats. A histologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978 May;45(5):685-8. PubMed PMID: 276785.
 13. Ubios AM, Jares Furno G, Guglielmotti MB. Effect of calcitonin on alveolar wound healing. *J Oral Pathol Med.* 1991 Aug;20(7):322-4. PubMed PMID: 1895250.
 14. Dayan D, Bodner L, Horowitz I. Effect of salivary gland hypofunction on the healing of extraction wounds: a histomorphometric study in rats. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992 Apr;50(4):354-8. PubMed PMID: 1545290.
 15. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Sep;54(9):1087-91. PubMed PMID: 8811819.
 16. Shimizu M, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Bone wound healing after maxillary molar extraction in ovariectomized aged rats: quantitative backscattered electron image analysis. *Anat Rec.* 2000 May;259(1):76-85. PubMed PMID: 10760746.
 17. Calder PC, Deckelbaum RJ. Dietary lipids: more than just a source of calories. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 1999 Mar;2(2):105-7. PubMed PMID: 10453339.
 18. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug;56 Suppl 3:S14-9. PubMed PMID: 12142955.
 19. Pinheiro PM, Campelo AP, Guimarães SB, Patrocínio RM, Valença Junior JT, Vasconcelos PR. reconditioning with oil mixes of high ratio Omega-9: Omega-6 and a lowratio Omega-6:Omega-3 in rats subjected to brain ischemia/reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2011;26 Suppl 1:32-7. PubMed PMID: 21971654.
 20. Melo JUS, Santos JM, Kimura Ode S, Campos Júnior MM, Melo RB, Vasconcelos PR. Effects of fatty acids on liver regeneration in rats. *Rev Col Bras Cir.* 2010 Oct;37(5):351-7. PubMed PMID: 21181001.
 21. Grimble RF. Dietary manipulation of the inflammatory response. *Proc Nutr Soc.* 1992 Aug;51(2):285-94. PubMed PMID: 1438337.
 22. Johnston PV. Dietary fat, eicosanoids, and immunity. *Adv Lipid Res.* 1985;21:103-41. PubMed PMID: 3895844.
 23. Oh YT, Lee JY, Lee J, Kim H, Yoon KS, Choe W, Kang I. Oleic acid reduces lipopolysaccharide-induced expression of iNOS and COX-2 in BV2 murine microglial cells: possible involvement of reactive oxygen species, p38 MAPK, and IKK/NF-kappaB signaling pathways. *Neurosci Lett.* 2009 Oct 23;464(2):93-7. doi: 10.1016/j.neulet.2009.08.040.
 24. Luo JD, Wang YY, Fu WL, Wu J, Chen AF. Gene Therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. *Circulation.* 2004 Oct;110(16):2484-93. PubMed PMID: 15262829.
 25. Niemoller TD, Bazan NG. Docosahexaenoic acid neurolipidomics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2010 Apr;91(3-4):85-9. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2009.09.005.

Correspondence:

Prof. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos
 Rua Professor Costa Mendes, 1608/3º andar
 60430-140 Fortaleza – CE Brasil
 Tel.: (55 85)3366-8083
 Fax: (55 85)3366-8064
 paulo.vasconcelos@ufc.br

Received: Jan 16, 2014

Review: March 18, 2014

Accepted: April 22, 2014

Conflict of interest: none

Financial source: Coordination of Improvement for Higher Academic Staff (CAPES)

¹Research performed at Experimental Surgery Laboratory (LABCEX), Faculty of Medicine, Federal University of Ceara (UFC), Fortaleza-CE, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Surgery, UFC. Tutor: Prof. Paulo Roberto Leitao Vasconcelos.

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa Animal



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 73/2011, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS DE ÔMEGA 3,6 E 9 NO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR EM RATOS APÓS EXODONTIA”**, de responsabilidade de RADAMÉS BEZERRA MELO, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de dezembro de 2011.

Fortaleza, 29 de FEVEREIRO de 2012

Profa. Dra. Nylane  Maria Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA