



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIRURGIA

RADAMÉS BEZERRA MELO

**EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 /
ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 SOBRE A
INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXODONTIA EM RATOS**

FORTALEZA

2018

RADAMÉS BEZERRA MELO

**EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 /
ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 SOBRE A
INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXODONTIA EM RATOS**

Tese 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 Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

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

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- M1e MELO, RADAMÉS BEZERRA.
EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E
ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO
APÓS EXODONTIA EM RATOS / RADAMÉS BEZERRA MELO. – 2018.
92 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Cirurgia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.
1. Cirurgia Oral. 2. Inflamação. 3. Estresse Oxidativo. 4. Ácidos Graxos. 5. Metabolismo. I. Título.
CDD 617
-

RADAMÉS BEZERRA MELO

**EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 /
ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 SOBRE A
INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXODONTIA EM RATOS**

Tese de 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 Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Paulo Roberto Cavalcante de Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Unichristus

Prof. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo
Faculdade Paulo Picanço (FACPP)

Dedico este trabalho a minha família:

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

ULISSES, meu 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.

VALÉRIA, minha 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.

LUÍS CARLOS e IVANA, meus sogros, sou muito grato por toda a ajuda e carinho dados a mim, sendo sempre tratado como um filho por vocês, amo vocês.

VOCÊS SÃO MINHA VIDA!

VOCÊS SÃO MEU NORTE!

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, disponibilidade, atenção, e orientação precisa.

Ao Prof. Dr. 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*', o qual fez parte de minha dissertação de mestrado e que é início desse trabalho.

Ao Prof. Dr. 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 e por todo o apoio na análise desta pesquisa, que sem sua ajuda e disponibilidade esse estudo não teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva, doutor pelo Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, pelas ajudas decisivas nessa tese, sendo um braço importante nas análises dos resultados obtidos.

Ao amigo Prof. Dr. Orleânicio Gomes Ripardo de Azevedo que sempre foi muito solícito em responder quaisquer questionamentos, sendo uma peça fundamental da execução desse trabalho.

A doutoranda Cristhyane Costa de Aquino, orientanda do Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá, pela sua ajuda e companheirismo nas análises laboratoriais dessa pesquisa, que de fato não teria sido possível sem sua agilidade e vontade de ajudar desde o primeiro contato.

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 solicitude 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 Senhor 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.

Aos meus alunos da Faculdade Paulo Picanço: Lucas Emanuel Torquato Loiola, José Macário Sousa de Moraes, Agna Kariny Ferreira Sales, Eduardo Brito de Lima, Vitor Menezes Mesquita, Carlos Franco Muller, João Caetano Caloni Zanin, José Júlio Lins Cavalcante Neto que foram um braço importante desse trabalho, ajudando nos procedimentos com os animais e tornando sempre o ambiente mais agradável com a felicidade de quem tem sede por aprendizado.

À Coordenação do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

*“Não é da benevolência do açougueiro, do
cervejeiro e do padeiro que esperamos o nosso
jantar, mas da consideração que eles têm
pelos seus próprios interesses. Apelamos não
à humanidade, mas ao amor-próprio, e nunca
falamos de nossas necessidades, mas das
vantagens que eles podem obter’*

Adam Smith, 1723-1790

“Parece-me que tenho a meu favor a teoria, pois qualquer que seja o assunto em discussão, quer religioso, filosófico, político, econômico, quer se trate de prosperidade, moralidade, igualdade, direito, justiça, progresso, trabalho, cooperação, propriedade, comércio, capital, salários, impostos, população, finanças, ou governo, em qualquer parte do horizonte científico em que eu coloque o ponto de partida minhas investigações, invariavelmente chego a seguinte conclusão: a solução para os problemas sociais humanos está na liberdade.” (Frédéric Bastiat. A lei, 1848)

RESUMO

EFEITOS DO MIX DE ÓLEOS ÔMEGA 9, 6 E 3 DE BAIXA RELAÇÃO ÔMEGA-6 / ÔMEGA-3 E ELEVADA RELAÇÃO ÔMEGA-9 / ÔMEGA-6 SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXODONTIA EM RATOS.

RADAMÉS BEZERRA MELO. Tese (Doutorado) do Programa de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará). Maio, 2018. 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 desse estudo foi avaliar a ação e mecanismo antioxidante e anti-inflamatório da oferta de ácidos graxos com baixa relação ômega-6/ômega-3 e elevada relação ômega-9/ômega-6 após exodontia em ratos. Foram utilizados cento e vinte e oito ratos Wistar de 45 dias de idade aproximada com 270-310g distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: Grupo Sham, Grupo Solução Salina, Grupo Mix isolipídico e Grupo Mix Anti-inflamatório e Antioxidante. 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 Anti-inflamatório e Mix Antioxidante (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. Todos os grupos receberam por gavagem 1,2g da solução correspondente a cada grupo por kg/dia durante quatro dias antes da exodontia do primeiro molar inferior esquerdo e continuaram recebendo até o sacrifício. Foram realizados sacrifícios dos animais: três dias (fase inflamatória), sete dias (fase proliferativa), quatorze dias (final da fase proliferativa) e 21 dias (fase reparadora) pós-cirúrgicos. Foram coletados a mucosa perialveolar ao sítio da extração dental, o próprio alvéolo dental e plasma sanguíneo para análises laboratoriais: mieloperoxidase, contagem de osteoclastos, IL-1 β , NFkB, iNOS, BMP-2 e glutathiona (GSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O Mix anti-inflamatório e Antioxidante induziu uma diminuição significativa quando comparado ao grupo isolipídico e grupo salina na expressão de expressão de mieloperoxidase, concentração de GSH no plasma e tecido, concentração de TBARS no plasma e tecido, e expressão de IL-1 β na mucosa alveolar no sétimo dia pós-operatório, e induziu uma diminuição na expressão de NFkB, de iNOS, de BMP-2 no terceiro dia e sétimo dia pós-operatórios. O Mix Anti-inflamatório e Antioxidante demonstrou uma redução da resposta inflamatória e oxidante após exodontia em ratos nas fases inflamatória e proliferativa.

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 LOW RATIO OMEGA-6/OMEGA-3 AND HIGH RATIO OMEGA-9/OMEGA-6 ON INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS AFTER DENTAL EXTRACTION IN RATS.

RADAMÉS BEZERRA MELO. Thesis (Doctorate). Post-Graduation Program (*Stricto Sensu*) in Surgery, Medicine School, Federal University of Ceará). Maio, 2018. Advisor: Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Unsaturated 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 both action and mechanism of the antioxidant and anti-inflammatory oils in the mix with high nutraceutical ratio of omega-9: omega-6, antioxidant properties, and low ratio omega-6: omega-3, anti-inflammatory properties after tooth extraction in rats. One hundred twenty-eight young Wistar rats approximately 45 days of age with 270-310g were randomly divided into four groups: Group Sham, Saline Group, Isolipid Group, and Anti-inflammatory and Antioxidant Group. The animals received 0.9% NaCl, Sham Group and Saline 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 Anti-inflammatory and Antioxidant (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 Test Group. All groups received by gavage 1,2g solutions for kg/day four days before the extraction of the left mandibular first molar and continued until the day of sacrifice. The animals were sacrificed three days (inflammatory phase), seven days (proliferative phase), fourteen days (end of proliferative phase) and 21 days (repair phase) after surgery. The perialveolar mucosa, the dental alveolus, and blood plasma were collected itself for laboratory analysis: myeloperoxidase, osteoclast count, expression of IL-1 β , NF κ B, iNOS, BMP-2 and glutathione (GSH) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). The anti-inflammatory and antioxidant mix induced a significant decrease compared to the saline group and the isolipidic group in myeloperoxidase expression, osteoclast count, GSH and TBARS tissue and plasma concentrations, and IL-1 β expression on the seventh postoperative day, and induced a decrease on NF κ B expression, on iNOS expression, on BMP-2 expression on the third and seventh postoperative days. The Anti-inflammatory and Antioxidant Mix demonstrated a reduction of the inflammatory and oxidant response after exodontia in rats in the inflammatory and proliferative phase.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo dos eicosanóides durante a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos por meio do ácido araquidônico (AA) e do ácido eicopentaenoico (EPA).....	26
Figura 2 - Grupos Experimentais.....	30
Figura 3 - Composição do Mix de óleos teste e isolipídico.....	30
Figura 4 - Desenho do Estudo.....	31
Figura 5 - Identificação do 1o molar inferior (seta) e mucosa alveolar do rato após anestesia.....	32
Figura 6 - Realização da sindesmotomia, descolamento mucoperiosteal, com a utilização de um explorador clínico para descolamento da gengiva inserida.....	32
Figura 7 - Início da luxação para avulsão do 1o molar inferior esquerdo com instrumental 3s. Osso alveolar visível após o descolamento muco-periosteal(seta).....	33
Figura 8 - Alvéolo dental do 1o molar inferior pós exodontia	33
Figura 9 - Concentrações de Glutathione no plasma e concentrações de Glutathione na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo.	40
Figura 10 - TBARS no plasma e TBARS na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo	40
Figura 11 - Mieloperoxidase na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo.....	41
Figura 12 - Expressão de NFkB na mucosa alveolar no 3o e 7o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo.....	43
Figura 13 - Expressão de NFkB no osso alveolar no 3o e 7o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo	44
Figura 14 - Expressão de iNOS na mucosa alveolar no 3o e 7o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo	45
Figura 15 - Expressão de iNOS no osso alveolar no 3o e 7o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo	46
Figura 16 - Expressão de BMP-2 no osso alveolar no 3o e 7o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo	47
Figura 17 - Expressão Il-b na mucosa alveolar no 7o dia pós exodontia do 1o molar inferior em ratos.....	48
Figura 18 - Área radiolúcida no sítio de exodontia (Pixels) e Contagem de osteoclastos no 7o dia pós cirúrgico.....	49

Figura 19 - Imagem representativa da análise radiográfica e microscópica do sítio de exodontia sete dias após a extração do primeiro molar inferior esquerdo, dos animais do grupo Sham (Figura A), Salina (B), Mix Isolipídico (C) e Mix Anti-inflamatório e Antioxidante (D)..... 49

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AG – Ácidos graxos
AI – Anti-inflamatório
AO – Antioxidante
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 – Ciclooxigenase
D – Dia
DHA – Docosahexaenóico
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
EPA – Eicosapentaenóico
EROs – Espécies reativas 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
LPS – Lipopolissacarídeos
MDA – Dialdeído malônico
MPO – Mieloperoxidase
NFkB – Fator nuclear Kappa B
NPD1 – Neuroprotectina D1

PPAR – Receptor de ativação de proliferação de peroxissomas
PPAR γ – Proliferadores de peroxissomas receptor ativado gama
PBS – Solução tamponada de fosfato
PG – Prostaglandina
p – Nível de significância estatística
TBARS – Substâncias reativas ao Ácido tiobarbitúrico
TNF – Fator de necrose tumoral
rpm – Rotações por minuto
VCAM-1 – Molécula de aderência endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Exodontia	19
1.2 Inflamação	17
1.3 Ácidos Graxos: ômega-3, ômega-6 e ômega-9	22
2 OBJETIVO	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MÉTODO	29
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Animais	29
3.3 Delineamento experimental	29
3.3.1 Fluxograma experimental.....	30
3.3.2 Técnica Anestésica.....	31
3.3.3 Procedimento cirúrgico (Exodontia).....	32
3.3.4 Sacrifício dos animais.....	34
3.3.5 Análises Laboratoriais.....	34
3.3.5.1 Avaliação da peroxidação lipídica.....	34
3.3.5.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-GSH).....	35
3.3.5.3 Determinação da atividade de mieloperoxidase da mucosa alveolar.....	36
3.3.6 Análise de Western Blot (<i>NFkB</i> , <i>iNOS</i> , <i>BMP-2</i>).....	36
3.3.7 Análise de ELISA (<i>IL-1β</i>).....	37
3.3.8 Análise Radiográfica.....	38
3.3.9 Análise histológica e Histomorfométrica (contagem de osteoclastos).....	38
3.3.10 Análise estatística.....	38
4 RESULTADOS	39
4.1 TBARS e Glutathiona	39
4.2 Determinação da Mieloperoxidase na Mucosa Alveolar	41
4.3 Western Blot para <i>NFKB</i>, <i>INOS</i> e <i>BMP-2</i>	41
4.3.1 Expressão de <i>NF-kB</i> , <i>iNOS</i> em mucosa alveolar.....	41
4.3.2 Expressão de <i>NF-kB</i> , <i>iNOS</i> e <i>BMP-2</i> no osso alveolar pós-exodontia.....	42
4.4 ELISA para <i>IL-1β</i>	48
4.5 Análise Radiográfica e Histomorfométrica: contagem de Osteoclastos	48
5 DISCUSSÃO	50

6 CONCLUSÕES.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
APÊNDICE.....	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Exodontia

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).

O processo cicatricial após uma exodontia é iniciado imediatamente após o ato operatório e pode ser prejudicado 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; GUGLIELMOTTI 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).

1.2 Inflamação

A inflamação é uma reação complexa dos tecidos conjuntivos vascularizados em resposta a estímulos endógenos ou exógenos que podem causar dano celular (BRASILEIRO FILHO, 2011). Esse mecanismo de defesa do organismo tem como objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo que podem ser estímulos agressores de origem química (toxinas, substâncias cáusticas), física (radiação, trauma, queimaduras) ou biológica (bactérias, vírus) (IWALEWA et al., 2007; ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Os estímulos endógenos seriam derivados de degenerações ou necroses tissulares e de alterações na resposta imunológica, por imunocomplexos ou reações autoimunes. Já os exógenos podem ser atribuídos a agentes físicos, químicos e/ou biológicos (PEREIRA; BOGLIOLO, 2004). Essa resposta inflamatória local se instala para eliminar o agente de lesão ensejando iniciar a recuperação da integridade tecidual local (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; GALLIN; SNYDERMAN, 1999; MAJNO, 1961). Cada estímulo provoca um padrão de

resposta inflamatória, proporcional a sua intensidade, porém com variação relativamente pequena em sua natureza. Essas variações resultam na necessidade de abordagens corretivas diferentes para cada situação (GALLIN; SNYDERMAN, 1999).

A capacidade em desenvolver uma resposta inflamatória, fase inicial do processo de cicatrização, é fundamental à sobrevivência em vista dos patógenos e lesões ambientais. São classificadas em duas formas: aguda e crônica. A forma aguda é de curta duração (minutos, horas ou alguns dias) e sua principal característica é a exsudação do fluido ou proteínas para o interstício, o que provoca edema e migração leucocitária (JAMES et al., 2007). A forma crônica é de longa duração (semanas, meses ou anos), pode ser precedida pela forma aguda, entretanto, pode surgir de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes podendo ser assintomática (ROBBINS; CONTRAN, 2005; MEDZHITOV, 2008). Esta forma pode estar associada à presença de linfócitos, macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (DRAY, 1995; ROBBINS, CONTRAN, 2005; MEDZHITOV, 2008). No entanto, o estado de inflamação crônica subclínica gera lesão tecidual incipiente por meio da ativação constante do sistema imune inato (FELDMANN et al., 2004), podendo causar futura manifestação de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer, dentre outras. O mecanismo pelo qual estes mediadores pró-inflamatórios levam à manifestação dessas doenças parece envolver a atenuação da atividade insulínica, mobilização de gorduras, disfunção endotelial e estresse oxidativo (RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

A inflamação consiste em uma cascata de eventos celulares e microvasculares, organizados temporalmente, envolvendo a interação entre diferentes tipos de células inflamatórias, dentre eles incluindo: macrófagos, células polimorfonucleares (PMN) e linfócitos, as quais deixam a corrente sanguínea e atravessam a parede endotelial e são recrutadas para o local da lesão (RODRIGUEZ- VITA; LAWRENCE, 2010). Além dessas células, as células endoteliais (do endotélio) que estão no sítio da lesão, participando ativamente as quais possuem moléculas de adesão específicas para o recrutamento de leucócitos (KIM; DEUTSCHMAN, 2000; CHOI, CHA; JEON, 2012).

O processo inflamatório é caracterizado por sinais clínicos clássicos, tais como: tumor, dor, calor, rubor e, eventualmente, perda de função do órgão ou tecido lesado (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Um processo que envolve uma cascata de eventos celulares bastante organizadas e cronológicas. Primeiramente temos uma resposta aguda, que acontece em curto prazo, geralmente resulta em cura, envolve o surgimento dos quatro sinais clássicos primários da inflamação. O aumento da permeabilidade causado pela inflamação permite o

extravasamento de um líquido rico em proteínas para o interstício. (MEDZHITOV, 2008). Este acúmulo de líquido no interstício promove o edema (tumefação). Além disso, ocorre vasodilatação a qual leva ao aumento do fluxo sanguíneo caracterizando o calor e o rubor. A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular iniciada pelas células residentes (macrófagos) no tecido imediatamente após o dano. Em caso de falha da resposta inflamatória aguda na eliminação do agente patogênico, o processo permanece e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e se o recrutamento destas células é insuficiente, uma condição inflamatória crônica se segue, causando a destruição do tecido (perda de função). A fase crônica, em geral, está associada em termos histológicos, à presença de linfócitos e de macrófagos e a substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, que ocorre por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e fibrose (IWALEWA et al., 2007; DRAYTON et al., 2006). Todas as respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, são ocasionadas por mediadores químicos provenientes de proteínas do plasma sanguíneo ou secretadas de células que se encontram no local, sejam elas residentes ou não (MEDZHITOV, 2008).

Duas das mais importantes células residentes são os macrófagos e os mastócitos, que na presença de um agente agressor, são ativadas e liberam mediadores químicos que desencadeiam os eventos iniciais da resposta inflamatória. Esses mediadores liberados, derivados do AA, em destaque com as prostaglandinas, promovem cascata de eventos inflamatórios levando a hipernocicepção. Essa cascata envolve tanto os eventos vasculares quanto os celulares e, desta forma, realizam a quimiotaxia recrutando os leucócitos e outras células de defesa especializadas na fagocitose de restos celulares resultantes do processo inflamatório. (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Portanto, caso estes mediadores sejam inibidos pode haver a modulação inflamação, diminuindo suas consequências danosas inerentes aos processos inflamatórios exacerbados. Isto justifica a busca de novos fármacos que idealmente possam controlar as consequências nocivas do processo inflamatório (ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Outros mediadores (tais como a histamina e serotonina) são pré-formados e armazenados nos grânulos de mastócitos, basófilos e plaquetas. Enquanto outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma. E por fim, outros mediadores são produzidos diretamente em resposta à estimulação adequada por indutores da inflamação (OLIVEIRA, 2013).

A quimiotaxia promovida pelas células residentes para o local da lesão pode ser realizada por quimiotaxinas endógenas e exógenas. As endógenas são os componentes do sistema complemento (C3a e C5a), que são metabólitos do ácido araquidônico (eicosanóides) e as citocinas produzidas pelos macrófagos que agem nos leucócitos. As principais quimiotaxinas exógenas são os produtos bacterianos. A quimiotaxia ocorre através da ligação do estímulo quimiotático a receptores específicos dos leucócitos. Os neutrófilos são as principais células recrutadas para o sítio infeccioso, devido à liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β e TNF- α) (CUNHA et al., 2008). Eles saem do interior do leito capilar para o espaço extracelular envolvendo os seguintes passos: marginação, rolamento, adesão e diapedese (migração através do endotélio). Este processo envolve uma ação combinada de múltiplas moléculas de adesão celular, as quais são classificadas em três famílias: integrinas, imunoglobulinas e selectinas, essas moléculas que participam das interações entre leucócitos e células endoteliais (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993). Quando o neutrófilo chega ao local da lesão, ocorre a ativação leucocitária a que se dá pela produção de metabólitos do ácido araquidônico; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; modulação de moléculas de adesão e potenciação que acontece quando há um mediador que não é capaz de gerar resposta pela célula. Então, outro mediador faz com que a célula responda àquele mediador inicial. Isto ocorre por soma de efeitos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Dentre os componentes moleculares de inflamação, os principais envolvidos são as citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF- α) e as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13); quimiocinas (citocinas com capacidade quimioatrativas); proteínas de fase aguda (PFA); lipídeos bioativos, tais como eicosanóides, produzidos nas vias metabólicas do ácido araquidônico, incluindo produtos da via cicloxigenase (prostaglandinas – PGE e tromboxanos – TX) e da via lipooxigenase (leucotrienos – LT e lipoxinas) (AZEVEDO et al., 2002). A produção de quantidades adequadas de citocinas é benéfica para a resposta à infecção, mas quantidades inapropriadas ou superprodução pode ser perigosa e essas citocinas, especialmente TNF- α , estão implicadas nas causas de algumas das respostas danosas que ocorrem em condições inflamatórias (SIMOPOULOS, 2002).

Existem três mecanismos desencadeados pelo processo inflamatório que merecem destaque: O fator de transcrição NF κ b, a atividade de mieloperoxidase (MPO) e a expressão de iNOS. O NO é um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas, sendo produzido por diversos tipos de células. Desempenha um papel relevante em várias áreas, como na transmissão de estímulos nervosos, na fisiologia pulmonar, na coagulação sanguínea,

na defesa e imunidade, incluindo a modulação de respostas inflamatórias. É formado a partir do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas denominadas NO sintetases (NOS). Três isoformas distintas de NOS foram identificadas: uma isoforma neuronal (NOS_n), uma endotelial (NOS_e), e uma isoforma induzida (NOS_i), isolada inicialmente de macrófagos. A ativação da enzima iNOS resulta na liberação de maior quantidade de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos (REN *et al.*, 2007). Este mediador tem sido apontado como o mediador adicional dos efeitos das citocinas nas atividades celulares, visto que citocinas são importantes reguladores da síntese de NO em vários tipos de células (REN *et al.*, 2007). Essa liberação de NO produz outras consequências biológicas, as quais incluem vasodilatação e danos aos tecidos do hospedeiro, resultando em apoptose, lesão tecidual e dor (LIMA *et al.*, 2008). Em condições normais, o fator de transcrição NFκB encontra-se no citoplasma celular, em repouso e inativo. O mesmo está ligado a uma ou mais proteínas designadas inibidores de κB (IκBs), impedindo a translocação do NFκB para o núcleo. Para que ocorra a ativação e,consequentemente, a translocação do NFκB, as proteínas IκBs têm que ser degradadas pelo complexo proteossoma que só acontecerá depois de haver a hiperfosforilação dessas IκBs por ação de proteínas quinases específicas (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 2005). Na presença de estímulos indutores, durante o processo inflamatório, incluindo vírus, lipopolissacarídeos (LPS), o NFκB é ativado e transloca-se para o núcleo (GLEZER *et al.*, 2000). Este se liga a genes específicos inflamatórios e imunes promovendo a ativação destes, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, as metaloproteinases de matriz (MMP), a COX-2 e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (VERRI *et al.*, 2006). Este é o fator de transcrição gênica pró-inflamatório mais potente ligando-se a genes específicos, estimulando a produção e a liberação das citocinas próinflamatórias (TNF-alfa e IL-6), moléculas de adesão e imunomoduladoras (MONTERA, 2007). A mieloperoxidase (MPO) é proteína (enzima), contida nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, liberada durante a fagocitose, sendo também encontrada nos monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais exercendo papel essencial na defesa imune inata (WINTERBOURN; VISSERS; KETTLE, 2000). A MPO pode gerar vários agentes oxidantes e muitos substratos podem ser oxidados, gerando, nesta oxidação, radicais livres e/ou modificação das propriedades destes substratos (biomoléculas). Por isso, a superexpressão da MPO está relacionada a danos macromoleculares e degradação tecidual. (HANSSON; OLSSON; NAUSEEF, 2006; SALAVEJ; SPALTEHOLZ; ARNHOLD, 2006).

1.3 Ácidos Graxos: ômega-3, ômega-6 e ômega-9

Os nutrientes têm sido tradicionalmente vistos como fontes de calorias 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 de cicatrização por modular a resposta imune e metabólica (ALEXANDER, 1988; STABLES; GILROY, 2011; LI *et al.*, 2012, MELO *et al.*, 2017)

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, MELO *et al.*, 2017).

Os ácidos graxos são utilizados de maneira seletiva na síntese de fosfolípidios 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, 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 transformar o ácido oléico (ômega-9) em ácido linoléico (ômega-6) ou em ácido α -linolênico (ômega-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. (MELO *et al.*, 2017)

Os ácidos graxos da família ω -6 são derivados do ácido graxo essencial linoléico (AL, 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 AGPI da mesma família (INNIS, 2009). O ALA dá origem a outros dois AGPI 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; MELO *et al.*, 2017) 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 eicosanoides, 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 (FIO₂) 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 FIO₂ ventilatória, durante a reperusão 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 nucleicos, causando a morte celular e danos subsequentes aos órgãos (HEYLAND *et al.*, 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).

Dentro da literatura do ômega-3 ainda não há um consenso sobre a dose necessária em humanos para produzir um efeito anti-inflamatório. Muitos dos estudos existentes de suplementação até o momento têm investigando o efeito epigenético do ômega-3 usando doses baixas sendo deste modo observado apenas pequenas alterações. Em uma revisão de Calder (CALDER, 2015) sugeriu que uma dose entre 1,35 e 2,7 g / dia de EPA é necessário para os efeitos anti-inflamatórios. É provável que exista uma interação dose-resposta entre a suplementação de ômega-3 e mecanismos epigenéticos, do mesmo jeito que é observado com a produção de citocinas (MELO *et al.*, 2017). É válido ressaltar que também não há consenso no período de tempo necessário para as mudanças epigenéticas ocorrerem. A maior incorporação de ômega-3 nas membranas dos eritrócitos está dentro das primeiras 4 semanas de suplementação e não se sabe se as mudanças epigenéticas ocorrerem dentro do mesmo período de tempo (HUSSEY; LINDLEY ; MASTANA , 2017).

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). Populações com dieta rica em ômega-3 (n-3) polinsaturada ácidos graxos (PUFA) têm menor incidência de doenças não transmissíveis (SIMOPOULOS, 1999).

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 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. (CALDER, 2013)

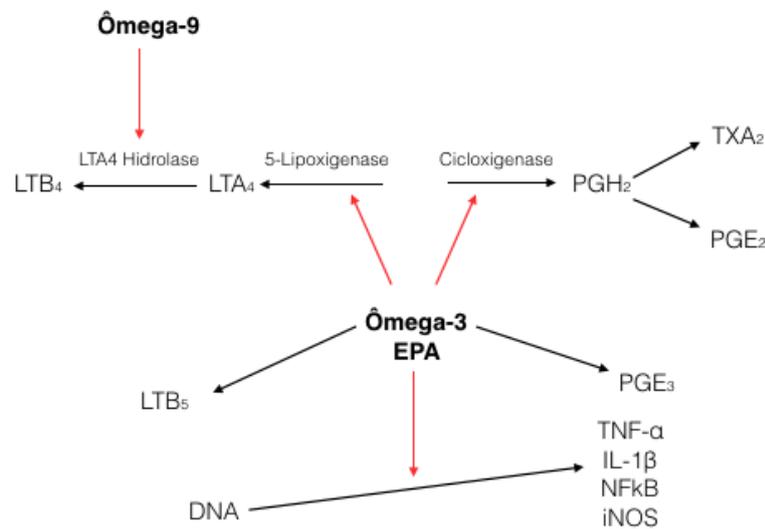
O ácido araquidônico (ω -6) e o EPA (ω -3) são ambos substratos da cicloxigenase e da lipoxigenase. Um aumento na disponibilidade do EPA age basicamente como inibidor competitivo, impedindo que o ácido araquidônico entre na cascata e gere produtos finais pró-inflamatórios. O alto consumo de ácido linoléico favorece o aumento do conteúdo de ácido araquidônico (ω -6) nos fosfolípidios 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 fosfolípidios 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 (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; KELLEY, 2001). 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 sangüíneo 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). Melo *et al.*, 2017 com o modelo de exodontia em ratos verificou a inibição da expressão do TNF- α no 3º dia pós exodontia, provavelmente explicada pela substituição LTB₄ por LTB₅. 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). Abaixo está uma figura representativa do metabolismo envolvendo os óleos ômega-3 e ômega-9.

Figura 1 - Metabolismo dos eicosanóides durante a produção de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos por meio do ácido araquidônico (AA) e do ácido eicopentaenoico (EPA).



Setas brancas = via de síntese; setas vermelhas = via inibitória. (JAMES; GIBSON; CLELAND, 2000; KELLEY, 2001)

Existem evidências substanciais de que a suplementação com ômega-3 seja capaz de inibir parcialmente vários aspectos da inflamação, incluindo inibição da produção de células inflamatórias (SIMOPOULOS, 2002) e eicosanóides gerados a partir de ômega-6. (YAQOOB; CALDER, 1995). Já foi demonstrado a influência de EPA e DHA nas funções das células imunes é mediada por mecanismos múltiplos. (CALDER, 2008)

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)

Uma das maiores preocupações na reabilitação de pacientes por meio de próteses ou implantes ósseo-integrados é a disponibilidade e qualidade de tecido ósseo alveolar

remanescente após uma exodontia, tendo em vista que a diminuição do estresse oxidativo pode desempenhar um importante papel anti-inflamatório e antirreabsortivo após exodontias. Terapias que se mostrem capazes de atenuar o estresse oxidativo podem parecer como uma alternativa para melhorar as chances de sucesso em casos de reabilitações orais.

Em Odontologia, principalmente em Cirurgia Buco-maxilo-facial, muitos procedimentos são baseados em incisões e danos teciduais, o que torna os pacientes mais susceptíveis a experiências inflamatórias relacionadas a intervenções cirúrgicas, fazendo-se necessário uma ação anti-inflamatória efetiva, mas quando utilizados fármacos anti-inflamatórios, além da ação, teremos em conjunto os efeitos adversos que podem ser graves como: gastropatias e nefropatias, além de apresentarem ação imunossupressora e, portanto, a sua utilização por tempo prolongado e/ou em doses elevadas, pode provocar diminuição das respostas imunológicas, deste modo terapias com nutraceuticos antioxidantes e anti-inflamatórios podem ser de grande valia ao controle da resposta inflamatória exuberante, se fazendo necessário ainda de mais respaldo científico para sua implementação na prática clínico-cirúrgica (MESQUITA *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2017).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

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 as fases inflamatória, proliferativa e reparadora do processo de cicatrização da ferida operatória pós exodontia em ratos.

2.2 Objetivos específicos

1 - Estudar o mix de óleos à luz das concentrações de glutathiona e de produtos reativos de ácido tiobarbitúricos no plasma e na mucosa alveolar do sítio da extração dental após exodontia em ratos nas fases proliferativa e de remodelação.

2 - Avaliar o mix de óleos na inflamação por meio da expressão de IL-1 β , NF κ B, MPO na mucosa e osso alveolares após exodontia em ratos.

3 – Analisar o mix de óleos no estresse por meio da expressão de iNOS na mucosa alveolar e no osso alveolar na fase inflamatória e proliferativa após exodontia em ratos.

4 - Demonstrar o efeito do mix de óleos na remodelação óssea inicial por meio de radiografias pós-operatórias, da contagem de osteoclastos alveolares, da expressão de BMP-2 no osso alveolar.

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 cegos, realizado de acordo com as Normas Internacionais para a Pesquisa Biomédica em Animais (1990) e de acordo com a Lei Federal no. 11.794, de 08 de outubro de 2008. Foi realizado em animais de laboratório, do Biotério do Departamento de Cirurgia, Secção 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 anexo).

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

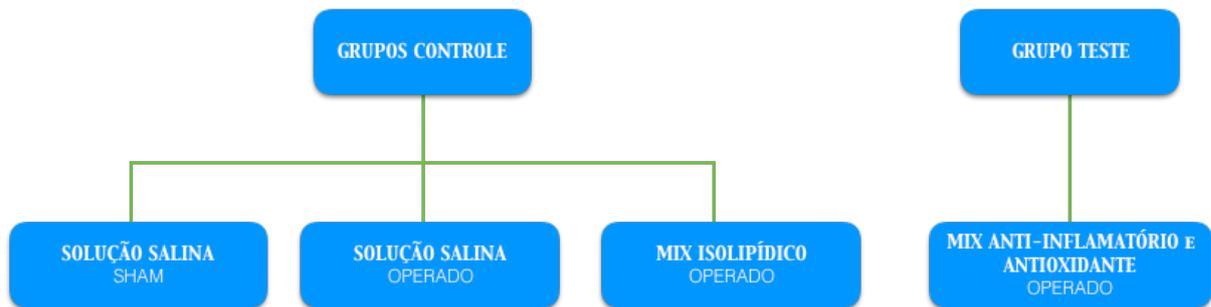
Foram utilizados 128 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*) procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no laboratório de Cirurgia Experimental – LABCEX.

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 128 animais distribuídos em 4 grupos (Grupo Sham, Grupo Salina, Grupo Mix Isolipídico e Grupo Mix Anti-inflamatório e Antioxidante), cada grupo possuía 32 animais (Figura 2). Verificar composição na Figura 3.

Figura 2 - Grupos Experimentais**Figura 3** - 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 Anti-inflamatório e Antioxidante	ω -9 + ω -6 + ω -3	ALA (35%)	
		EPA (39%)	ω -6: ω -3= 1,4: 1
	Óleo de oliva (61%) Óleo de canola (24%) Óleo de peixe (15%)	DHA (26%)	ω -9: ω -6= 3,7: 1

3.3.1 Fluxograma experimental

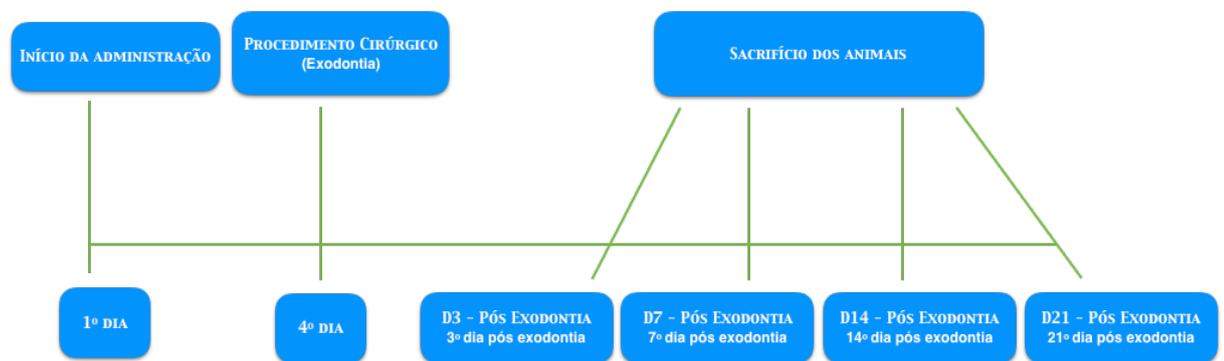
Inicialmente os animais foram pesados e separados aleatoriamente em cada um dos 4 grupos, subsequentemente administrado por 4 dias consecutivos, sempre no mesmo horário no período da manhã, por via orogástrica, gavagem, 1,2g por kg/dia da solução correspondente a cada grupo, tendo em vista que essa é a dosagem nutracêutica já estabelecida na literatura em pesquisas prévias (MELO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2017).

No quarto dia todos os animais foram anestesiados e foi realizado o procedimento cirúrgico de exodontia do 1º molar inferior esquerdo de todos os grupos exceto o grupo Sham que era somente anestesiado e posto em posição cirúrgica com os afastadores por 2 min que era o tempo médio da exodontia realizada nos demais grupos.

No terceiro dia (D3 pós exodontia), no sétimo dia (D7 pós exodontia), no décimo quarto dia (D14 pós exodontia) e no vigésimo primeiro dia (D21 após exodontia) 12 horas

após a administração da última dose (ou solução salina ou mix isolipídico ou mix anti-inflamatório e antioxidante), oito animais de cada grupo foram anestesiados, em seguida, os animais foram colocados em decúbito dorsal, onde foram submetidos a uma laparotomia, com identificação da artéria aorta, em sua bifurcação nas artérias ilíacas e colhido sangue, em seguida, foram realizadas as coletas da mucosa alveolar e hemimandíbula do lado operado para análises laboratoriais. Após as coletas foram realizados os sacrifícios dos animais por superdosagem de xilasina e cetamina. Não houve mortes dos animais antes do sacrifício, deste modo todos os animais foram utilizados para as análises desse estudo. (Figura 4)

Figura 4 - 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 ocorreu perda dos reflexos córneo-palpebrais, e não 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 serem devidamente anestesiados iniciou-se o procedimento cirúrgico. Realização do descolamento gengival da gengiva inserida, sindesmotomia, do 1º molar inferior esquerdo com instrumental 3S, seguido da luxação e avulsão dental.

Figura 5 - Identificação do 1º molar inferior (seta) e mucosa alveolar do rato após anestesia.



Figura 6 - Realização da sindesmotomia, descolamento mucoperiosteal, com a utilização de um explorador clínico para descolamento da gengiva inserida.

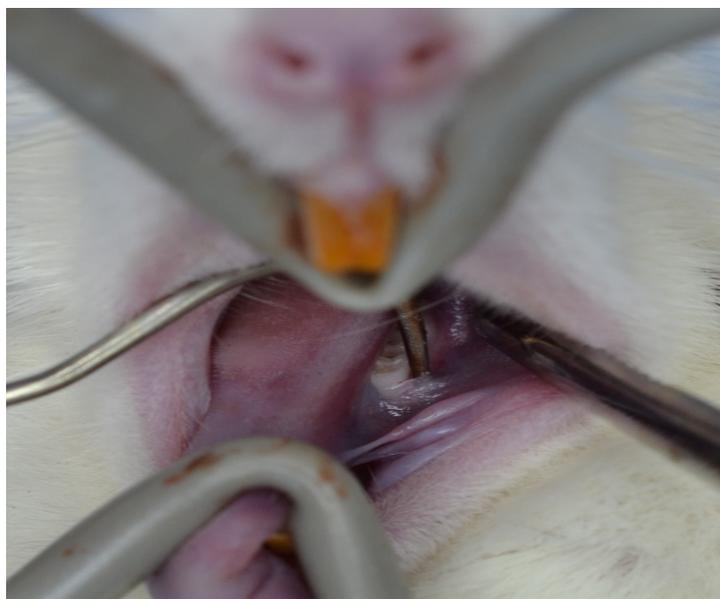


Figura 7 - Início da luxação para avulsão do 1º molar inferior esquerdo com instrumental odontológico 3s. Osso alveolar (seta) visível após o descolamento muco-periosteal.



Figura 8 - Alvéolo dental do 1o molar inferior pós exodontia, sendo possível já verificar a presença do coágulo no interior do alvéolo dental.



3.3.4 Sacrifício dos animais

Todos os animais foram sacrificados por superdosagem de xilasina e cetamina, seguindo a lógica de 8 animais por grupo nos tempos: 3º dia após exodontia, 7º dia após exodontia, 14º dia após exodontia e 21º dia após exodontia, 12 horas após a realização da última gavagem.

3.3.5 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 (-190°C). 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.

3.3.5.1 Avaliação da peroxidação lipídica

A técnica teve por objetivo quantificar o dialdeído malônico (MDA), formado na peroxidação lipídica. Procedeu-se com 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 analisado, 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.

3.3.5.2 Determinação de grupos sulfidrílicos não protéicos (Glutathiona-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

Glutathiona (GSH, 1mg/ml).

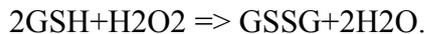
Preparação dos reagentes:

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 absorvâncias no espectrofotômetro a 412nm, 5 minutos após a adição do DTNB. A concentração final de GSH foi obtida comparando-se o valor da absorvância com uma tabela padrão de GSH, previamente preparada.

3.3.5.3 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 -70oC, durante 5 minutos cada um. Em seguida, colocou-se no freezer -70oC 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.

3.3.6 Análise de Western Blot (*NFkB*, *iNOS*, *BMP-2*)

Os animais tinham uma amostra de sua mucosa do rebordo alveolar e o osso alveolar removidos no dia do sacrifício para determinar a quantidade de NFkB, iNOS, BMP-2. 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 separada 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- de NFkB (1:400), anti-IL-1 β (1:400), anti-iNOS (1:400), anti-BMP2 (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 banda 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 NFkB, iNOS, BMP2 / GAPDH (média \pm sE) (LIMA Jr. *et al.*, 2012).

3.3.7 Análise de ELISA (IL-1 β)

A parte do tecido da mucosa alveolar coletada foi homogeneizado em tampão para citocinas como descrito por Safieh-Garabedian et al. (1995). A detecção das citocinas IL-1 β foi realizada por ELISA, usando o Kit (BD Biosciences – BD OptEIA). Resumidamente, placas para ELISA de 96 poços foram incubadas por 18h a 4 oC com 100 μ L por poço de anticorpo de captura para IL-1 β . Posteriormente, as placas foram lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e bloqueadas com 100 μ L por poço BSA 1%.

Após bloqueio das placas com BSA 1% por 1 hora, 100 μ L das amostras e da curva padrão foram adicionadas em duplicata a cada poço em várias diluições e incubadas por 2 horas à 4°C. As placas foram então lavadas três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e depois incubadas com anticorpo de detecção para IL-1 β .

Após o período de incubação a 4°C por 2 horas, as placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos com 100 μ L de estreptavidina diluída 1:200. As placas foram lavadas novamente por três vezes com 300 μ L de tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato para revelação foram adicionados. As placas foram incubadas durante 20 minutos, no escuro a temperatura ambiente. A reação enzimática foi parada com a solução de parada (H₂SO₄) e a absorbância medida a 450 nm. O resultado foi expresso em pg/mL.

3.3.8 Análise Radiográfica

As mandíbulas dos animais sacrificados 7 dias após a exodontia foram radiografadas em aparelho de raios X convencional (DabiAtlante®; 63 Kvp, 8 mA) acoplado a um sistema digital de captação de imagens Digora® (técnica radiográfica de paralelismo). As mandíbulas foram posicionadas paralelamente ao filme digital radiográfico, com distância focal de 10 cm. O tempo de exposição estabelecido pelo fabricante para o dente anterior superior (0,18 s) foi usado para todas as amostras. As radiografias foram analisadas quantitativamente usando ImageJ®. Após a randomização, um operador cegamente, mediu manualmente a área radiolúcida do alvéolo dental pós exodontia, em triplicata. Através do comando de medida foi obtida a área demarcada radiotransparente total. As medições de cada grupo foram calculadas em média e designadas como a unidade de amostra.

3.3.9 Análise histológica e Histomorfométrica (contagem de osteoclastos)

Após o sacrifício dos animais, as hemimandíbulas nas quais foi realizada exodontia foram excisadas cirurgicamente, fixadas em formol tamponado 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 4µm 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 dos ratos sacrificados no 7º dia pós exodontia. 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).

3.3.10 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). Quanto a normalidade os dados foram submetidos ao teste Komolgorov-Smirmov, os quais obedeceram a curva de normalidade. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni foram utilizados para determinar as diferenças entre os grupos. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$.

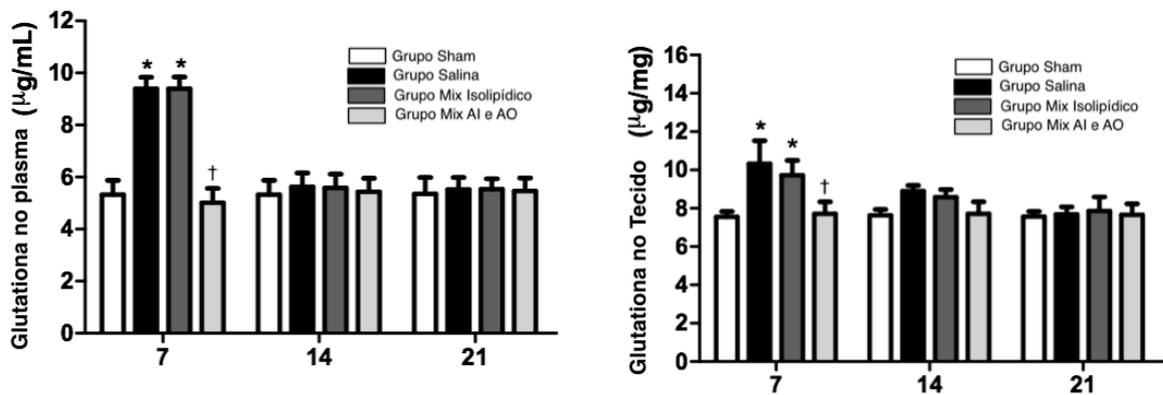
4 RESULTADOS

4.1 TBARS e Glutathione

No sétimo dia pós-operatório as concentrações de glutathione grupo salina ($9,39 \pm 0,44$) foram significativamente maiores que no grupo Sham ($5,32 \pm 0,56$) ($p < 0,001$). Apesar de não haver diferença entre o grupo salina e isolipídico ($9,40 \pm 0,44$), o grupo tratado com o mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou redução significativa dos níveis de glutathione plasmática ($5,01 \pm 0,55$) ($p < 0,001$) em relação ao grupo mix isolipídico e grupo salina. Os resultados em tecido foram similares, sete dias após a exodontia houve aumento significativo dos níveis de glutathione tecidual ($10,33 \pm 1,20$) no grupo salina em relação ao grupo Sham ($7,56 \pm 0,26$) ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos salina e isolipídico ($9,73 \pm 0,76$), já o grupo tratado com o mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou redução significativa dos níveis de glutathione reduzida ($7,67 \pm 0,63$) ($p = 0,006$) em relação ao grupo mix isolipídico e grupo salina. Nos dias 14 e 21 pós cirúrgico não houve diferença significativa entre os grupos, tanto para os níveis de glutathione plasmática como tecidual.

Os níveis de TBARS sanguíneo mostraram-se significativamente elevados no sétimo dia pós-exodontia no grupo salina ($0,23 \pm 0,04$) em relação ao grupo Sham ($0,08 \pm 0,01$) ($p = 0,001$). Não houve diferença entre os níveis de TBARS plasmático do grupo Salina e do grupo isolipídico ($0,21 \pm 0,03$), porém, o grupo anti-inflamatório apresentou níveis significativamente inferiores deste marcador ($0,10 \pm 0,02$) ($p = 0,032$) quando comparado com o grupo mix isolipídico e grupo salina. Os resultados teciduais foram similares, com o grupo salina ($0,25 \pm 0,04$) e isolipídico ($0,22 \pm 0,07$) significativamente superiores ao grupo Sham ($0,10 \pm 0,01$) ($p = 0,008$) e o grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante ($0,12 \pm 0,02$) mostrando níveis significativamente inferiores ao grupo salina e grupo isolipídico ($p = 0,033$). Nos dias 14 e 21 não houve diferença entre os níveis de TBARS plasmáticos e teciduais entre os quatro grupos de estudo.

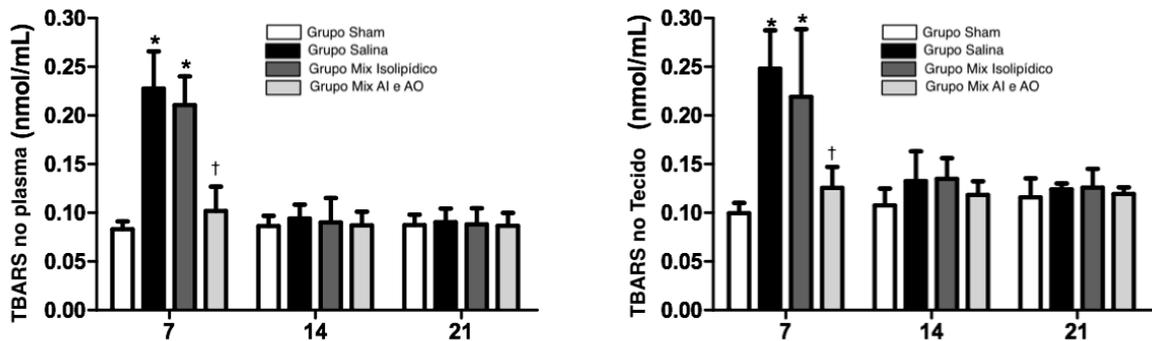
Figura 9 - Concentrações de Glutathiona no plasma e na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

Os níveis de Glutathiona no plasma e no tecido se mostraram diminuídos de modo significativo no 7º dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix isolipídico.

Figura 10 - TBARS no plasma e TBARS na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo



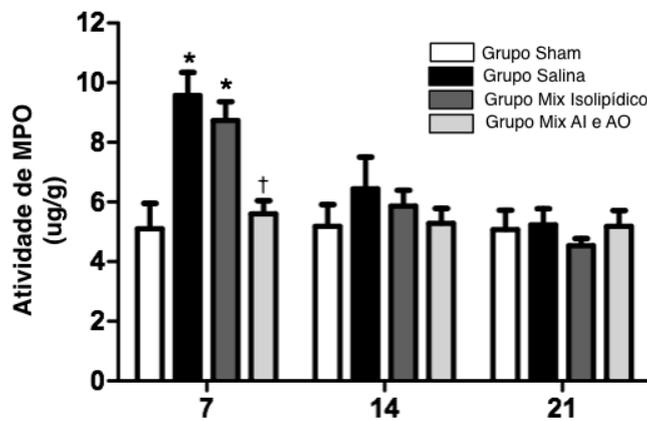
* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

Os níveis de TBARS no plasma e no tecido se mostraram diminuídos de modo significativo no 7º dia pós exodontia no grupo mix anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e mix isolipídico.

4.2 Determinação da Mieloperoxidase na Mucosa Alveolar

No sétimo dia pós-exodontia, o grupo Salina (9.57 ± 0.77) apresentou níveis significativamente elevados de MPO que o grupo Sham (5.10 ± 0.85) ($p=0.024$). Não houve diferença entre o grupo salina e o grupo Isolipídico (8.73 ± 0.64), porém o grupo com o mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou redução significativa de MPO (5.61 ± 0.43) ($p=0.014$). No 14º e no 21º dias não houve diferença significativa nos níveis de MPO entre os quatro grupos experimentais.

Figura 11 - Mieloperoxidase na mucosa alveolar 7 dias, 14 dias e 21 dias após exodontia do 1o molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

Os níveis de Mieloperoxidase no tecido, mucosa alveolar, se mostraram diminuídos de modo significativo no 7º dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos salina e mix isolipídico.

4.3 Western Blot para NFKB, INOS e BMP-2

4.3.1 Expressão de NF-kB, iNOS em mucosa alveolar

A expressão de IL-1 β após sete dias da exodontia do grupo tratado com solução salina ($67,0 \pm 1,2$) foi significativamente superior ao grupo Sham ($24,8 \pm 0,9$), sem diferença estatística com o grupo Isolipídico ($55,0 \pm 1,2$). O grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante ($33,9 \pm 1,3$) mostrou níveis de IL-1 β inferiores ao grupo salina e grupo isolipídico ($p < 0,001$).

A expressão de NFkB após três ($24,1 \pm 0,9$) e sete dias ($22,6 \pm 0,6$) do grupo Sham foram significativamente inferiores aos animais do grupo salina ($59,7 \pm 1,4$ e $53,5 \pm 1,1$,

respectivamente) e Isolipídico (53,7±1,6 e 52,3±1,3, respectivamente). O grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou diminuição significativa da expressão de NF-kB tanto no dia três (31,5±1,4) como no dia sete (27,4±1,3) ($p=0,002$) quando comparado com o grupo salina e o grupo isolipídico. Não houve diferença significativa entre a expressão de NF-kB nos quatro grupos entre os dias 3 e 7 ($p=0,239$).

A expressão de iNOS no tecido mole dos animais Sham nos dias 3 (22,9±1,2) e 7 (23,7±0,7) foram significativamente inferiores aos grupos salina (62,8±1,7 e 71,8±1,7, respectivamente) e isolipídico (55,8±1,5 e 65,1±1,9, respectivamente), os quais mostraram maior expressão de iNOS que o grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante (34,0±1,0 e 31,2±0,9, respectivamente) ($p<0,001$). Os grupos salina e isolipídico demonstraram os níveis de iNOS aumentados no dia 3 para o 7, enquanto o grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou redução nesse mesmo período ($p<0,001$).

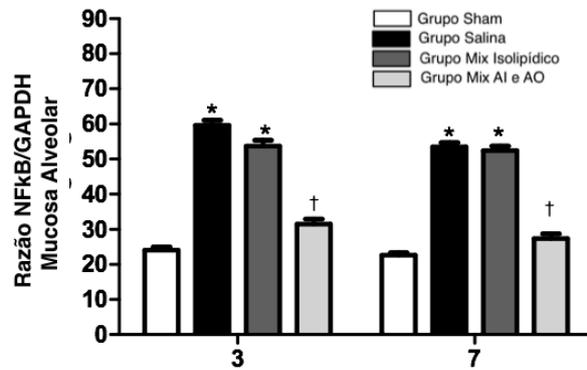
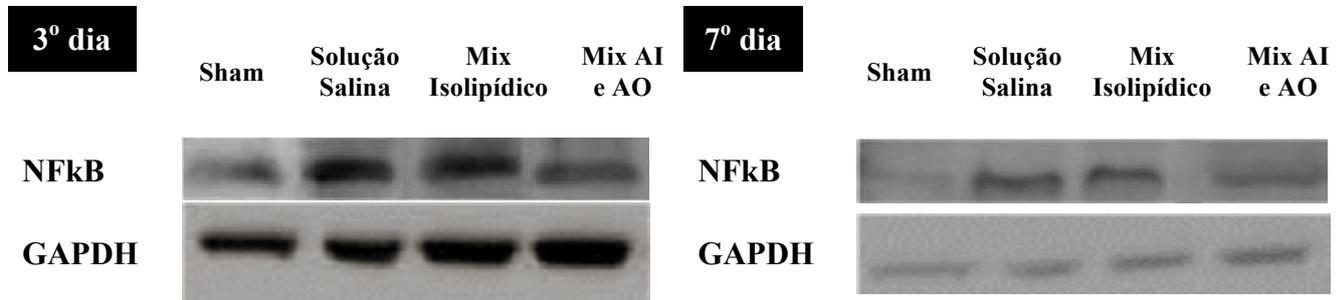
4.3.2 Expressão de NF-kB, iNOS e BMP-2 no osso alveolar pós-exodontia

Os níveis de NF-kB aumentaram significativamente no grupo salina após 3 (55,2±1,0) e 7 (57,4±0,7) em relação ao grupo Sham (20,86±0,8 e 21,3±1,0, respectivamente). O grupo salina não diferiu do grupo Isolipídico em ambos os dias (50,5±1,3 e 49,3±3,4), mas ambos mostraram valores maiores que o grupo tratado com o mix anti-inflamatório e antioxidante (33,4±1,0 e 31,9±0,7, respectivamente) ($p<0,001$) com diferença significativa. Não houve em nenhum grupo variação dos níveis de NF-kB dos dia 3 para o dia 7 ($p=0,917$).

A expressão para iNOS no grupo Sham nos dias 3 e 7 (21,9±1,1 e 25,3±1,5, respectivamente), foram significativamente menores que nos grupos salina (55,7±1,2 e 54,8±1,9, respectivamente) e Isolipídico (49,5±0,8 e 48,6±3,6, respectivamente) e estes mostraram-se significativamente elevados em relação ao mix anti-inflamatório e antioxidante (30,6±2,9 e 34,0±1,2, respectivamente). Não houve em nenhum grupo variação dos níveis de iNOS dos dia 3 para o dia 7 ($p=0,168$).

A expressão para BMP-2 foi significativamente menor no grupo Sham nos dias 3 e 7 (25,6±2,0 e 25,2±0,9) que no grupo salina (69,6±3,8 e 66,9±3,4, respectivamente) e isolipídico (65,65±2,2 e 51,7±2,7). O grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante apresentou menores níveis de BMP-2 que os grupos demais operados (32,0±2,4 e 36,1±2,8, respectivamente), com diferença significativa. A variação dos níveis deste marcador entre os dois dias não foi significativa em nenhum grupo ($p=0,694$).

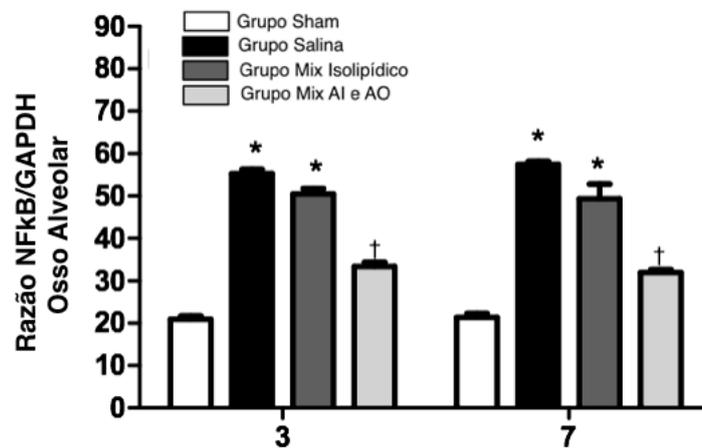
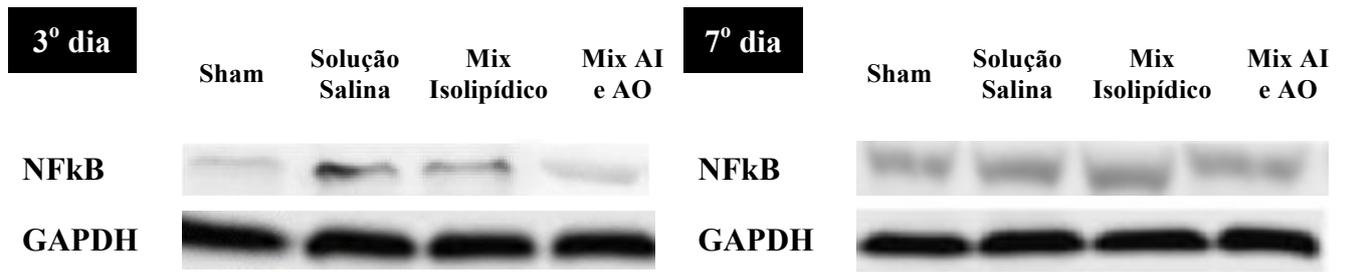
Figura 12 - Expressão de NFkB na mucosa alveolar no 3º e 7º dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

A expressão de NFkB na mucosa alveolar se se mostrou diminuído de modo significante no 3º e 7º dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

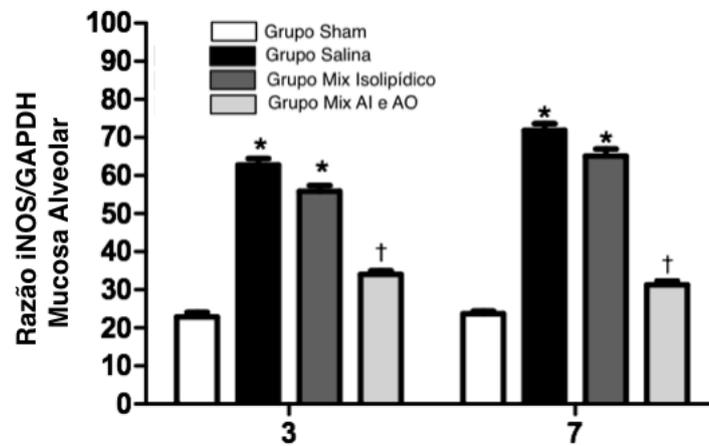
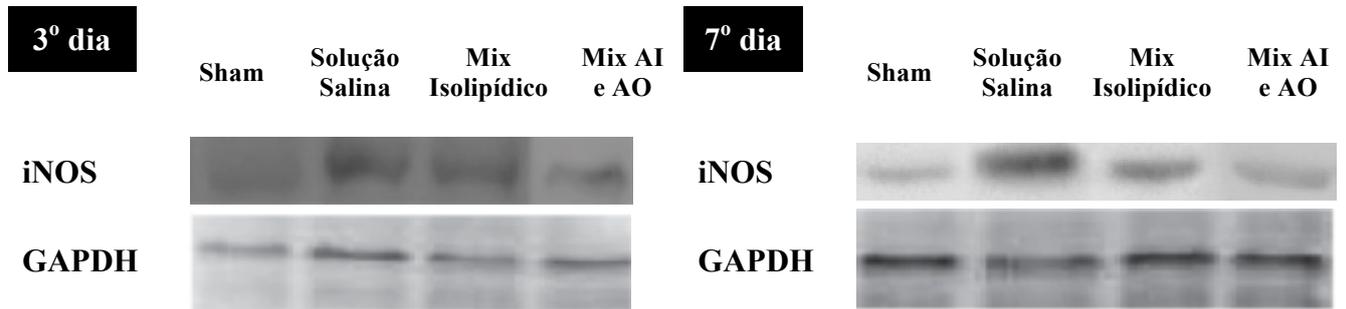
Figura 13 - Expressão de NFkB no osso alveolar no 3^o e 7^o dia após exodontia do 1o molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

A expressão de NFkB no osso alveolar se se mostrou diminuído de modo significativo no 3^o e 7^o dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

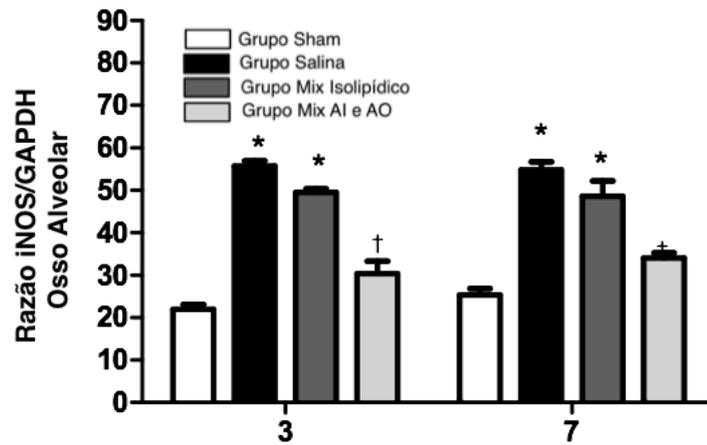
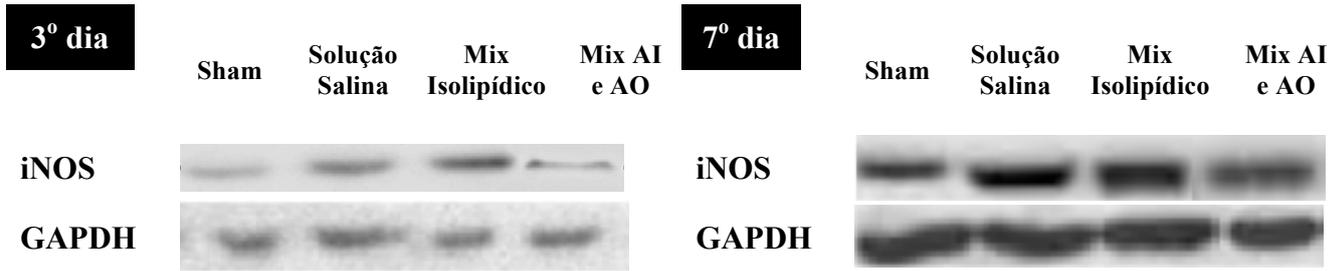
Figura 14 - Expressão de iNOS na mucosa alveolar no 3º e 7º dia após exodontia do 1º molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

A expressão de iNOS na mucosa alveolar se mostrou diminuído de modo significativo no 3º e 7º dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

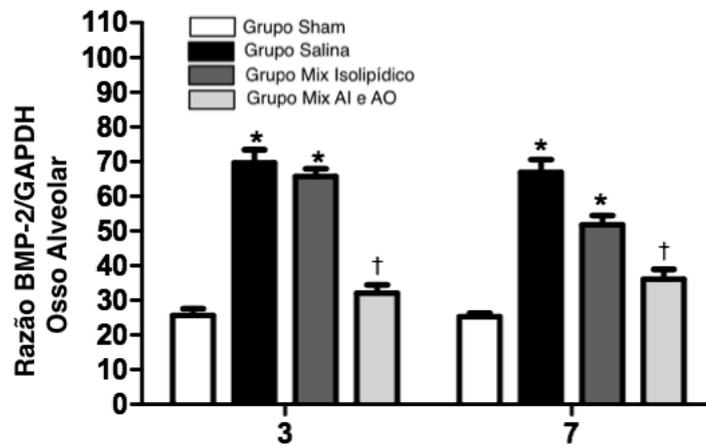
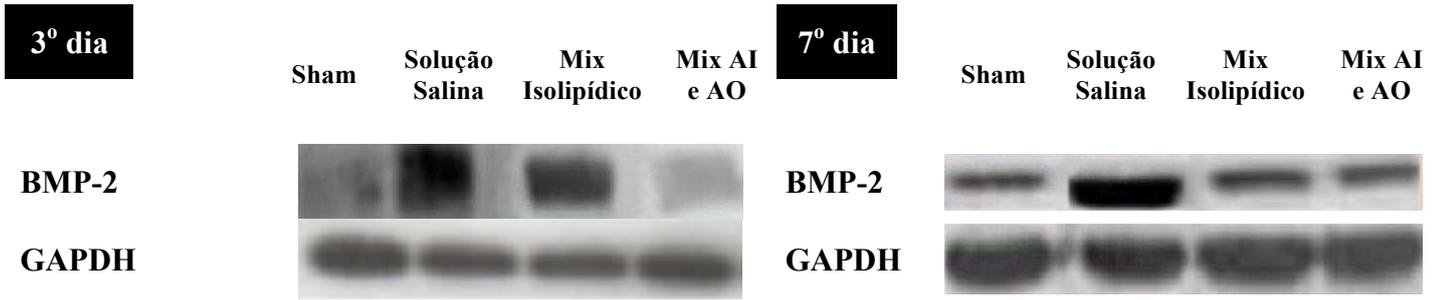
Figura 15 - Expressão de iNOS no osso alveolar no 3^o e 7^o dia após exodontia do 1^o molar inferior esquerdo



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

A expressão de iNOS no osso alveolar se se mostrou diminuído de modo significativo no 3^o e 7^o dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

Figura 16 - Expressão de BMP-2 no osso alveolar no 3º e 7º dia após exodontia do 1º molar inferior esquerdo



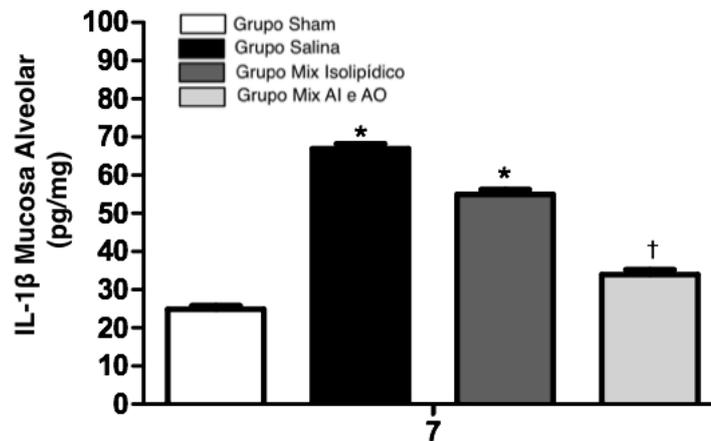
* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

A expressão de BMP-2 no osso alveolar se se mostrou diminuído de modo significante no 3º e 7º dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

4.4 ELISA para IL-1 β

A expressão de IL-1 β após sete dias da exodontia do grupo tratado com solução salina (67,0 \pm 1,2) foi significativamente superior ao grupo Sham (24,8 \pm 0,9), sem diferença estatística com o grupo Isolipídico (55,0 \pm 1,2). O grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante (33,9 \pm 1,3) mostrou níveis de IL-1 β inferiores ao grupo salina e isolipídico ($p < 0,001$).

Figura 17 - Expressão IL- β na mucosa alveolar no 7^o dia pós exodontia do 1^o molar inferior em ratos



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média \pm EPM)

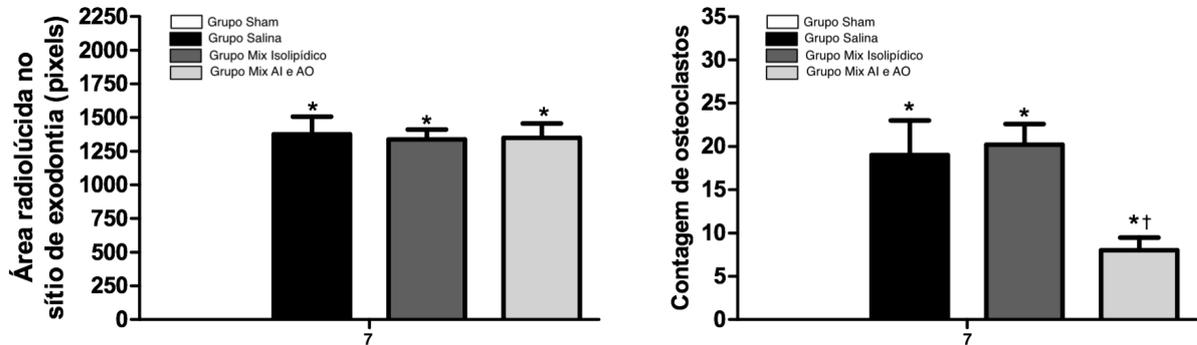
A expressão de IL-1 β na mucosa alveolar se se mostrou diminuído de modo significativo no 7^o dia pós exodontia no grupo Mix Anti-inflamatório e antioxidante quando comparado com os grupos Salina e Mix Isolipídico.

4.5 Análise Radiográfica e Histomorfométrica: contagem de Osteoclastos

A área de radiolucidez do grupo Sham (0 \pm 0) foi significativamente inferior a área de radiolucidez dos grupos tratados com salina (1375 \pm 130), mix Isolipídico (1338 \pm 72) e mix anti-inflamatório e antioxidante (1349 \pm 105) ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre os grupos operados ($p = 0,967$).

A média de osteoclastos do sham (0 \pm 0) foi significativamente menor que do grupo salina (19 \pm 4) e do grupo isolipídico (20 \pm 2), não houve diferença entre esses dois grupos, mas o grupo tratado com mix anti-inflamatório e antioxidante (8 \pm 1) mostrou número médio de osteoclastos superior ao grupo Sham, porém significativamente inferior aos demais grupos operados ($p < 0,001$).

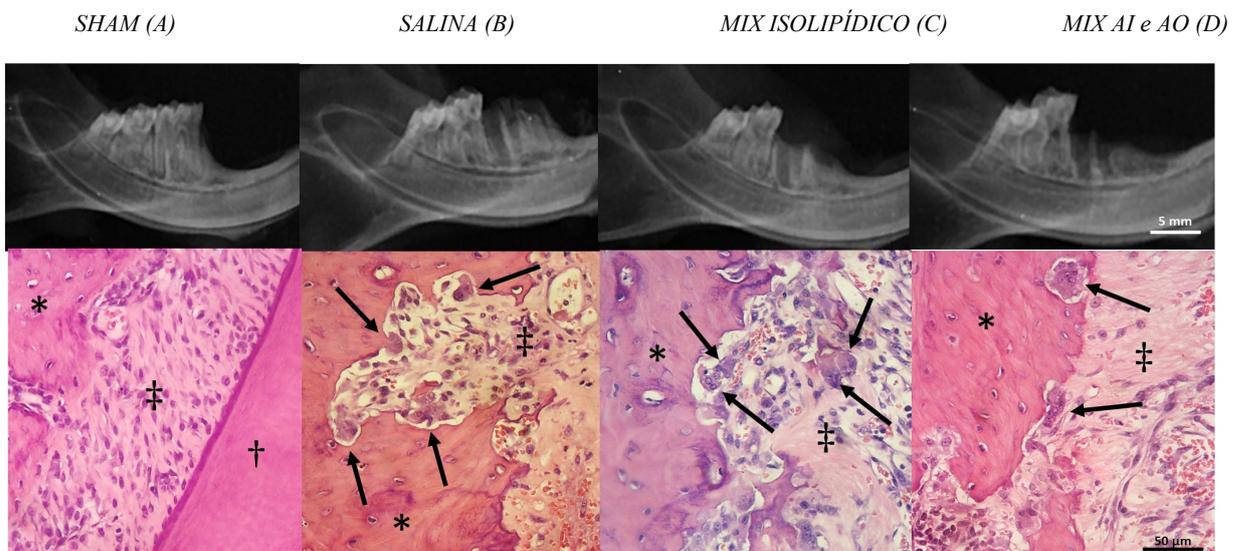
Figura 18 - Área radiolúcida no sítio de exodontia (Pixels) e Contagem de osteoclastos no 7º dia pós exodontia de 1º molar em ratos



* $p < 0,05$ versus Sham; † $p < 0,05$ versus Grupo Salina e Grupo Isolipídico; ANOVA-multifatorial/Bonferroni (média±EPM)

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 Anti-inflamatório e antioxidante percebe-se redução do número de osteoclastos aderidos à matriz óssea mineralizada através de insípidas lacunas de Howship.

Figura 19 - Imagem representativa da análise radiográfica e microscópica do sítio de exodontia sete dias após a extração do primeiro molar inferior esquerdo, dos animais do grupo Sham (Figura A), Salina (B), Mix Isolipídico (C) e Mix Anti-inflamatório e Antioxidante (D)



Setas pretas = osteoclastos; Asteriscos = tecido ósseo; Cruz = Primeiro molar inferior esquerdo; Cruz dupla = ligamento periodontal (grupo Sham) ou tecido conjuntivo (grupos submetidos a exodontia).

5 DISCUSSÃO

Pesquisas envolvendo mix, de proporções anti-inflamatórias e antioxidantes, com ação antioxidante e anti-inflamatória iniciaram em 2011 (PINHEIRO, 2011). Esse primeiro trabalho utilizando três mix de fontes variáveis de ômega-3 e com baixa relação ômega-6 / ômega-3 e elevada relação ômega-9 / ômega-6, com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, obtiveram-se mediante ao pré-condicionamento proteção neuronal frente a modelo de hipoxemia e reperfusão cerebral em ratos, sendo destacado desde esse primeiro trabalho a capacidade do mix em modular respostas de estresse, causando menos danos celulares.

Pesquisas utilizando fonte variáveis de mix frente a situações de estresse em modelos animais continuaram e encontraram resultados positivos com pré-condicionamento e tratamento em modelos experimentais de queimadura cutânea em ratos com inibição da expressão de fator nuclear NFkB, diminuição da extensão da lesão, e aumento da proliferação celular (CAMPELO, 2012). A inibição da expressão de NFkB após a suplementação com mix de proporções anti-inflamatórias e anti-oxidantes também foi encontrada nesse trabalho demonstrando a ação modeladora do mix de óleos no que tange a inflamação em situações de estresse.

O pré-condicionamento e tratamento com mix de óleos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 de propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidantes também já foi utilizado em modelo experimental de periodontite em ratos com diminuição de reabsorção óssea e com diminuição do número de osteoclastos (VASCONCELOS, 2013). A ação de diminuição do número de osteoclastos e sua consequente atividade, lacunas de howship que são visualizadas em cortes histológicos, também foi encontrada nessa pesquisa proporcionados pelo mix de óleos de proporções anti-inflamatórias e antioxidantes, utilizando modelo distinto, modelo de extração dental em ratos. (Figura 19)

Em modelo experimental em osteoartrite induzida por zimozan evidenciou-se uma proteção anti-inflamatória pelo mix de óleos de proporções anti-inflamatórias e antioxidantes, obteve-se como resultado de pré-condicionamento uma inibição da expressão de iNOS e NFkB no líquido sinovial de ratos pré-condicionados (CAVALCANTE, 2014). Tais achados corroboram com os achados dessa pesquisa, pois também existiu inibição da expressão de iNOS e NFkB na mucosa e no osso alveolar no 7º dia pós cirúrgicos em ratos tratados com o mix anti-inflamatório e antioxidante proposto nesse trabalho, demonstrando uma ação

modeladora sob a resposta inflamatória mediante a pré-condicionamento e tratamento com o mix de proporções anti-inflamatórias e antioxidantes.

Modelos experimentais 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, o primeiro trabalho que visa avaliar estresse oxidativo foi de 2014, concentrando suas investigações somente na fase inflamatória, no 3º dia pós-cirúrgico. (MELO, 2014). Na literatura não existe nenhuma pesquisa com esse modelo investigando estresse oxidativo em todas as fases de cicatrização pós exodontia em ratos, deste modo esse estudo é o primeiro trabalho utilizando modelo de exodontia em ratos que faz relação de estresse oxidativo com todas as fases de cicatrização pós exodontia em ratos.

O processo de cicatrização pós exodontia tem sido estudado em vários modelos animais. A sequência em ratos é entendida dividindo-se em 3 fases: fase inicial, inflamatória, entre 1 e 5 dias, fase proliferativa entre 6 e 14 dias, fase de formação óssea entre 15 e 21 dias, e fase de remodelação óssea de 21 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 frente ao estresse oxidativo, redução da concentração de GSH e de TBARS, nas fases inflamatória e proliferativa, 3º e 7º dia pós cirúrgico, respectivamente, mas não se observou no final da fase proliferativa, 14º dia pós cirúrgico, e também não se observou na fase de remodelação no 21º dia pós cirúrgico.(OKAMOTO, 1973) (Figura 9, 10, 11)

Evidências de ômega-3, (EPA) e (DHA), na sua capacidade de modular a inflamação vêm de trabalho *in vitro* (VERLENGIA; GORJAO; KANUNFRE, 2004; ENDRES; GHORBANI; KELLEY,1989), modelos animais (YAQOUB; CALDER, 1995; AL-KHALIFA; GIVENS; RYMER 2012; MELO *et al.*, 2017; MELO *et al.*, 2014) e estudos humanos (ITARIU *et al.*, 2012; TARTIBIAN; MALEKI; ABBASI *et al.*, 2011)

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 pelo menor número de duplas ligações presentes nos ácidos graxos ômega-9, assim conferindo menor probabilidade de ataque por espécies reativas de oxigênio. (BITTENCOURT e SENNA, 2002; MELO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2017)

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 (OH *et al.*, 2009).

A inflamação faz parte da resposta imediata do corpo perante um dano tecidual, inicia a eliminação de patógenos invasores e toxinas, a fim de reparar os tecidos danificados. Durante esta fase, as células imunológicas produzem moléculas que participam na destruição de agentes agressores (CALDER, 2013; YAQOUB; CALDER, 1995). Embora a inflamação seja uma resposta normal, pode prejudicar os tecidos do hospedeiro quando ocorre de forma exuberante.

Respostas inflamatórias inadequadas são, em parte, caracterizadas por produção anormal de mediadores inflamatórios produzidos por células mononucleares do sangue periférico (DINARELLO, 2010; NATHAN, 2010; ZHAO *et al.*, 2004).

Ácidos graxos poliinsaturados são constituintes naturais da dieta, tendo um amplo espectro fisiológico de funções (DINARELLO, 2010; SIRIWARDHANA, KALUPAHANA, MOUSTAID-MOUSSA, 2012).

Ômega-6 e ômega-3 são duas classes de ácidos graxos poliinsaturados, o ácido linoleico (ácidos graxos n-6) e o ácido alfa linolênico (ALA) ω -3 são ácidos graxos essenciais, que não podem ser sintetizados pelo corpo e devem ser fornecidos através da dieta. O principal produto final dos n-6 é o ácido araquidônico (AA), este geralmente leva à produção de eicosanóides pró-inflamatórios. ALA é o precursor do eicosapentaenóico (EPA, 20: 5 ω -3) e ácidos docosahexaenóico (DHA, 22: 6 ω -3) que por sua vez produzem eicosanóides menos inflamatórios, quando comparados com os produzidos pelo AA, deste modo credita-se a diminuição da resposta inflamatória (CALDER, 2013; TURK; CHAPKIN, 2013). Os mecanismos pelos quais ω -3 FAs agem sobre as células do sistema imunológico não são completamente compreendidos. (RODRIGUES-CRUZ; SERNA, 2017)

A atividade de MPO é um importante marcador para detecção do estresse oxidativo e um, marcador indireto, da infiltração neutrofílica local (YAP; WHITEMAN; CHEUNG, 2007; BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Logo, substâncias que inibam ou

modulem a atividade da MPO são promissores agentes terapêuticos para inflamação aguda (REYNOLDS; STEGEMAN; TERVAERT, 2002; REYNOLDS *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* revelaram que tanto o EPA quanto o DHA influenciam as respostas funcionais das células imunes, reduzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios. Estudos experimentais iniciais em modelos de autoimunidade (Leslie *et al.*, 1985 ou 2013), ensaios clínicos em pacientes com artrite reumatoide realizando suplementação com óleos de peixes (KREMER *et al.*, 1985) verificaram atividade anti-inflamatória significativa da combinação de EPA e DHA. Estudos recentes indicam que os efeitos benéficos do ω -3 seja resultado, em parte, de mudanças ocorridas na expressão gênica ocasionada pelo condicionamento de ω -3 (KABIR *et al.*, 2007).

Já existem estudos indicando que a suplementação com ω -3 pode modular a atividade do NFKB e vias de sinalização envolvidas ao estresse oxidativo. (ROBERTS, SINDHU, 2009; MELO *et al.*, 2017). Esses estudos apresentam resultados que corroboram com os achados desse trabalho, que demonstrou uma inibição de NFKB na mucosa alveolar e no osso alveolar no 3^o e 7^o dia pós exodontia nos ratos tratados com mix anti-inflamatório e antioxidante. (Figura 12, Figura 13)

No que tange a modulação do estresse oxidativo, expressão de TBARS e Glutathione, encontrados no 7^o dia pós operatório nos ratos tratados com o mix anti-inflamatório e antioxidante, mas não encontrado nas fases seguintes da sequência de cicatrização: fase proliferativa, 14^o dia pós exodontia, e fase reparadora, 21^o dia após exodontia (Figura 9, 10) esses achados complementam os que existiam na literatura (MELO *et al.*, 2014) demonstrando a diminuição da expressão de TBARS e Glutathione no 3^o dia pós exodontia, fase inflamatória, em ratos, utilizando a mesma metodologia desse estudo. Desde modo sugere-se uma proteção frente ao estresse oxidativo ocasionado pelo procedimento cirúrgico, exodontia, pelo mix anti-inflamatório e antioxidante nas fases inflamatória e em parte da fase proliferativa da cicatrização da ferida cirúrgica.

A redução nos níveis de glutathione no 7^o dia pós exodontia, fase proliferativa, no grupo que recebeu o mix anti-inflamatório e antioxidante, indica uma proteção do mix reduzindo o estresse oxidativo, induzido pelo modelo em questão, pois a sua produção se torna “menos necessária” e, desse modo, tem-se uma menor ação antioxidante natural. Geralmente, as células reagem ao estresse oxidativo com um aumento na produção de glutathione como parte de sua resposta adaptativa de defesa ao potencial agressivo dos radicais livres. (MELO *et al.*, 2010). Os achados dessa pesquisa são complementares aos de Melo *et*

al., 2014 que encontrou tal proteção na fase inflamatória, 3^o dia pós cirúrgico, utilizando o mesmo modelo e o mesmo mix anti-inflamatório e antioxidante. (Figura 9).

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 NF κ B 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 NF κ B limita a quantidade de NF κ B livre que é translocada ao núcleo para iniciar a cascata inflamatória. Observamos nesse estudo uma diminuição da expressão de NF κ B no 3^o e 7^o dias pós cirúrgicos em ratos tratados com o mix anti-inflamatório e antioxidante. A inibição da expressão de NF κ B no 3^o dia faz correlação direta com o resultado de inibição de TNF na pesquisa de Melo *et al.*, 2017 utilizando o mesmo modelo desse estudo e o mesmo mix antioxidante e anti-inflamatório. Outros sistemas comumente associados a estados inflamatórios, após a ativação de NF κ B, 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). Nesse estudo observou-se inibição de NF κ B e iNOS no 3^o dia pós exodontia na mucosa alveolar e no osso alveolar e no 7^o dia pós exodontia na mucosa alveolar e no osso alveolar pelo mix de óleos ômega 9, 6 e 3 de baixa relação ômega-6 / ômega-3 e elevada relação ômega-9 / ômega-6, demonstrando esse mecanismo inibitório desse mix anti-inflamatório e antioxidante.

Um estudo em células epiteliais bovinas estimuladas por LPS demonstrou que DHA diminuiu acentuadamente os níveis de mRNA de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Portanto, o efeito do DHA na em células epiteliais bovinas estimulada por LPS pode ser atribuído à inibição de citocinas inflamatórias (XUEXIU *et al.*, 2017) Outro achado importante recente é que efeito anti-inflamatório do DHA através da inibição da ativação do NF κ B e diminuição dos níveis de mRNA do TNF- α , IL-6 e IL-1 β que pode ser inibido pelo GW9662, antagonista específico do PPAR γ . Portanto, esses resultados sugerem que o DHA modula a resposta inflamatória, atenuando-a, possivelmente dependente da via do PPAR γ . (XUEXIU *et al.*, 2017)

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 (XUEXIU *et al.*, 2017) e (3) os ácidos graxos ômega-3 estabilizam o complexo NFκB/IκB, suprimindo a ativação de genes envolvidos no processo inflamatório (WAITZBERG, 2008). O terceiro mecanismo pôde ser visto nesse trabalho com a inibição da expressão de NFκB no 3º e 7º dia pós cirúrgico pelo mix de óleos ômega 9, 6 e 3 de baixa relação ômega-6 / ômega-3 e elevada relação ômega-9 / ômega-6. (Figura 12, Figura 13)

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 α -linolênico ou de EPA e ou de DHA, favorece a síntese de eicosanóides como a PGE3, TXA3 e LTB5, que possuem características menos inflamatórias. Esse equilíbrio proporciona menor formação de mediadores pró-inflamatórios, reduzindo alguns dos efeitos imunossupressores (Figura 12, Figura 13, Figura 14, Figura 15) (MELO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2017; ROBERT, 2005; NAKAMURA, 2005).

O aumento na ingestão de EPA e DHA resulta em uma incorporação aumentada de ω -3 na membrana fosfolipídica de células imunes (CALDER, 2013). Os ω -3 podem então modular a expressão de vários genes inflamatórios interagindo com vários receptores nucleares e fatores de transcrição (CALDER, 2008). O NFκB é um fator chave de transcrição envolvido na regulação do gene da ciclooxygenase (COX2), moléculas de adesão e citocinas inflamatórias (KUMAR *et al.*, 2004; SIGAL, 2006). Estudos anteriores relataram que o óleo de peixe diminui a ativação de NFκB em monócitos humanos (LO *et al.*, 1999; ZHAO *et al.*, 2004), já foi sugerido em estudos que EPA e DHA podem inibir a atividade da NFκB em vários níveis ao longo da via de atividade do NFκB (ZHAO *et al.*, 2004).

O resultado final do metabolismo excessivo de ácidos graxos ω -6 é a produção de mediadores pró-inflamatórios, vasodilatação, edema aumentado, aumento de 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; SIJBEN; CALDER, 2007; MELO *et al.*, 2014; MELO *et al.*, 2017).

A redução da relação ω -6: ω -3 induziu evidentes efeitos anti-inflamatórios no presente estudo com diminuição da atividade da MPO na mucosa alveolar no 7º dia pós exodontia, fase proliferativa do reparo, no sítio da extração dental. Melo *et al.*, 2017 utilizando o mesmo método desse estudo encontrou diminuição da atividade de MPO na mucosa alveolar no 3º dia, fase inflamatória do reparo, pós exodontia no sítio da extração dental. 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, existe redução da concentração de TNF- α (MELO *et al.*, 2017), 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 no 7º dia pós exodontia nos ratos suplementados com mix anti-inflamatório e antioxidante.

Um ponto chave na expressão das citocinas pró-inflamatórias é a ativação, nas células, do fator de transcrição nuclear kappa B (NF κ B), que controla a transcrição de genes da maioria dos fatores inflamatórios, incluindo o TNF-Alfa, a interleucina -6 (IL-6), a interleucina 1 beta (IL-1 β), a interleucina 8 (IL-8), a ciclooxigenase-2 (COX-2), quimiocinas, como a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), óxido nítrico sintase (iNOS) e moléculas de adesão (BARNES; KARIN, 1997).

A família de proteínas NF κ B/Rel, originalmente descrita por Sem e Baltimore, 1986, é constituída por fatores de transcrição que medeiam a resposta celular frente a uma diversidade de estímulos ligados à inflamação, infecção e apoptose, tais como TNF-Alfa, IL-1 β , espécies reativas do oxigênio (ROS), agentes anti-neoplásicos e radiação gama (FRASER, 2006; SCHWARTZ; HERNANDEZ; MARK EVERS, 1999). O estímulo promovido pelo TNF-Alfa e IL-1 β induz, não apenas estimulação do fator de transcrição, como ainda *up regulation* da

própria expressão dessas citocinas, pelo mesmo mecanismo (SCHWARTZ; HERNANDEZ; MARK EVERS,1999).

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 (MELO *et al.*, 2017), 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). Nesse trabalho existiu uma diminuição na expressão do IL-1 β no 7º dia pós operatório, início da fase proliferativa, em mucosa alveolar, acho esse diferente do resultado de Melo *et al.*, 2017 que não existiu diminuição da expressão de IL-1 β no 3º dia pós exodontia, fase inflamatória. A justificativa para não se ter diminuição da expressão de IL-1- β na fase inflamatória (MELO *et al.*, 2017) e se ter nesse trabalho na fase proliferativa está vinculado a necessidade de maior tempo de suplementação do mix de óleos de propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (RAMIREZ-RAMIREZ *et al.*, 2013).(Figura 17)

A família de proteínas da via do κ B é composta de cinco tipos: NF κ B/Rel: p65/RelA, p50/p105 (NF κ B1), p52/p100 (NF κ B2), C-Rel e RelB. RelB, C-Rel e p65 são sintetizadas já na forma ativa, enquanto p105 e p100 devem ser modificadas às formas ativas p50 e p52, respectivamente. A forma funcional da molécula de NF- κ B é constituída por dímeros homo ou heterodímeros (LAURENCIKIENE *et al.*, 2001), sendo os mais estudados compostos por p65/RelA (NF κ B1) e p50, e p52 (NF κ B2) com RelB (FRASER, 2006). Na ausência de estímulo, o NF κ B apresenta-se sequestrado no citoplasma pelas proteínas inibitórias kappaB (I κ B): I κ B-Alfa mantém o complexo p50/RelA no citoplasma na forma inativa, mascarando o sinal de localização nuclear presente no dímero e impedindo sua translocação para o compartimento nuclear (FRASER, 2006; SCHWARTZ; HERNANDEZ; MARK EVERS,1999). A forma de ativação do NF κ B mais bem estudada é aquela promovida pelo TNF-Alfa.

Diversos estudos relacionam o envolvimento do NF κ B com o desenvolvimento de aterosclerose (ZHOU *et al.*, 2009; VOGEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014). Os estudos que avaliam os níveis de expressão do NF κ B demonstraram que o alto nível, principalmente do gene NFKB1, está relacionado a doenças inflamatórias, como doença arterial coronariana. (NERI SERNERI *et al.*, 2013; NAIR *et al.*, 2014).

A redução da síntese de TNF- α na fase inflamatória modulados pelo mix anti-inflamatório e antioxidante foi resultado do estudo de Melo *et al.*, 2017, a explicação dessa

diminuição é explicada pela modulação de NFkB, resultado desse trabalho, pois tivemos uma diminuição da expressão de NFkB no 3º dia pós operatório. A redução da expressão de NFkB e TNF- α se faz importante não apenas para diminuição do edema após uma exodontia, mas também pelo controle da dor pós operatória, uma vez que uma maior expressão de TNF- α acarretará em mais dor e mais edema pós operatório. O trismo é um dos principais componentes indicativos de estado inflamatório em estudos clínicos pós operatórios, sendo o TNF- α 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 inibidores como talidomida conseguem reduzir a nocicepção em modelos de dor aguda em patas de roedores (RIBEIRO *et al.*, 2000), assim como a suplementação com mix de óleos anti-inflamatórios e antioxidantes também já se mostrou uma terapia satisfatória para esse fim em ratos. (MELO *et al.*, 2017)

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 presente aumentam a intensidade de imunomarcção local e duração da superexpressão de TNF- α em sítios de exodontia com consequente 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). Nesse estudo encontramos no 7º dia pós-operatório uma diminuição do número de osteoclastos em atividade no alvéolo dental de ratos tratados com o mix de proporções antioxidantes e anti-inflamatórios, tal resultado é semelhante ao de Melo et al 2017 utilizando o mesmo modelo e mix, mas avaliando o 3º dia pós-operatório no 7º dia pós exodontia, nesse estudo, não foi encontrado radiograficamente atraso na mineralização. (Figura 18, Figura 19)

Os mecanismos através dos quais o ômega-3 promove um ambiente anti-inflamatório dentro do o corpo é múltiplo e complexo (CALDER, 2015). Evidências iniciais sugerem que

os ômega-3 exercem efeitos alterando a expressão gênica (RUDKOWSKA *et al.*, 2013), mas que também pode surgir alterações nos marcadores epigenéticos, como a metilação do DNA.

Modulação da expressão gênica inflamatória ocorre através de fatores de transcrição, como proliferadores de peroxissomas receptor ativado gama (PPAR γ). Interações entre o PPAR γ e os ácidos graxos resultam em uma diminuição expressão de citocinas (JAUDSZUS *et al.*, 2013).

As doenças inflamatórias são frequentemente caracterizadas pela ativação crônica do fator de transcrição NF κ B e pela liberação de citocinas inflamatórias (EPSTEIN; BARNES; KARIN, 1997) e, portanto, um importante alvo para mudanças na metilação do DNA por ômega-3.

Como mencionado anteriormente, em condições inflamatórias, o NF κ B desempenha papéis na regulação positiva em genes e fatores de transcrição de citocinas pró-inflamatórias (GHOSH; MAY; KOPP,1998). Os resultados desse estudo sugerem uma inibição da expressão de NF κ B pelo mix de óleos ômega-3, ômega-6 e ômega-9 em proporções antioxidantes e anti-inflamatória.

Os ω -3 podem modular a expressão de genes relacionados a inflamação (MELO *et al.*, 2017). Na verdade, parecem modular a expressão de genes que promovem inflamação (citocinas, via NF κ B) e regulam positivamente a expressão de Glutathione S-transferase 1 microsomal (MGST1), que são envolvidos na prevenção de inflamação por desintoxicação de ROS. (ALLAM-NDO *et al.*, 2016)

Como mostrado na literatura, a incorporação de EPA e DHA em células inflamatórias ocorre com a despesa de AA (CALDER, 2013). Isso pode explicar a diminuição de níveis de expressão gênica de PTGS2 e ALOX5. Esse trabalho estudou também o efeito de ω -3 no estresse oxidativo. Espécies que reagem ao oxigênio (ROS) são produzidos pelo corpo e são importantes para funcionamento celular normal. O potencial papel do estresse oxidativo como um evento precoce doenças inflamatórias têm sido amplamente notada (ROBERTS; SINDHU,2009). Para prevenir o estresse oxidativo anormal existem vários fatores fisiológicos, esses sistemas anti-oxidantes atuam como mecanismos de proteção. Glutathione S-transferase 1 microsomal (MGST1) e heme oxigenase (HO-1) são enzimas de desintoxicação. Óxido Nítrico Sintase (NOS) catalisa a produção de óxido nítrico (NO), um radical livre, como um mecanismo de defesa.

Mesmo quando a inflamação não é induzida existe ação do ômega-3 sobre o estresse oxidativo, reduzindo a expressão de um gene pró-oxidativo que codifica iNOS e assim potencializando a expressão de MGST1, um gene antioxidante. (ALLAM-NDO *et al.*, 2016)

A inibição de NOS2(iNOS) nesse trabalho, verificada após um estímulo inflamatório cirúrgico, exodontia, ocorreu na fase inflamatória e no início da fase proliferativa de reparo pós exodontia, respectivamente, terceiro e sétimos dias pós-cirúrgicos, demonstrando a eficácia do mix de óleos de proporções anti-inflamatórias e antioxidantes na modulação da expressão de iNOS. (Figura 14, Figura 15)

O ômega-3 tem efeito benéfico na inflamação (CALDER, 2008). Faz-se importante estudar os efeitos de cada um dos ω -3 na inflamação, e verificar se são semelhantes em diferentes modelos

É verificado em pesquisas que o DHA tem efeito inibidor mais potente na expressão gênica comparativamente ao EPA (Komatsu *et al.* 2003; KISHIDA; TAJIRI; MASUZAWA, 2006; MULLEN; LOSCHER, CE; ROCHE, 2010; OLIVER *et al.*, 2012). É válido relatar que nesses estudos a inflamação foi induzida, e existe estudo com resultado contrário, sem inflamação induzida, mais especificamente em macrófagos (ALLAM-NDO *et al.*, 2016). O maior efeito do DHA parece vir de sua formação de mais mediadores lipídicos anti-inflamatórios (Resolvin D, maresinas, protectinas) do que EPA (Resolvin E) (CALDER, 2013; Serhan; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Poderia, deste modo, explicar que em estudos onde a inflamação é induzida, os efeitos do DHA na inibição inflamatória serem maiores que os efeitos do EPA, pois a indução da inflamação desencadeia a síntese de resolvinas e outros mediadores lipídicos derivados de ω -3 que não são vistos nas células quando a inflamação não é induzida.

Um ponto chave na indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias é a via clássica de sinalização do NF κ B. Nesse trabalho mostrou-se resultados inibitórios de NF κ B pelo mix de óleos ômega 3, 6, 9 com proporções anti-inflamatórias e antioxidantes.

As BMPs são ácidos polipeptídeos hidrofóbicos capazes de induzir a proliferação e diferenciação das células ósseas e células cartilaginosas.(ALDEN *et al.*, 2002) A capacidade dos BMPs de induzir osteogênese já é bastante elucidado na literatura (REN; CHUNG, 2007). Dentre os vinte subtipos existentes de BMP, o BMP-2 é o que teve maior capacidade de induzir ossificação (REDDI, 1998). BMP-2 e OPG podem agir coletivamente levando a uma notável remodelação óssea (YAO *et al.*, 2012). Estudos demonstraram que BMP-2 melhorou acentuadamente a diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL. (FULLER *et al.*, 2000). O receptor de BMP tipo IA pode inibir a formação de osteoclastos induzido por RANKL e BMP-2, tal fato sofre que os sinais mediados por BMP-2 se comunicam com sinais mediados por RANKL, e deste modo induzem a diferenciação de osteoclastos (ITOH *et al.*, 2001). Nesse estudo a ação anti-inflamatória e antioxidante no mix de baixa relação ômega-

6/ômega-3 e elevada relação ômega-9/ômega-6 apresentou níveis mais baixos de BMP-2 no osso alveolar no 7º dia pós-operatório com diferença significativa para os grupos controle operados, que provavelmente pode ser explicado por algum feedback negativo vinculado pela diminuição da inflamação, tendo em vista que existe um estímulo de BMP-2 via NFkB (IBARRA URIZAR et al., 2016). (Figura 16) As perguntas a serem respondidas em próximos estudos da relação mix de óleos de proporções anti-inflatmatórias e antioxidantes no processo cicatricial da ferida pós exodontia são vinculadas a sua ação nas fases tardias do reparo, no que tange a disponibilidade óssea, qualidade óssea e tempo final do processo de reparo ósseo pós exodontia.

Sabendo-se que a inflamação e consequentemente a dor são sintomas clássicos vinculados ao pós-operatório de exodontias quando não bem controlados por ação fármacos, dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), especialmente EPA e DHA, podem prevenir o desenvolvimento desses sintomas atenuando a resposta inflamatória (MELO et al., 2017). As novas possibilidades advindas de pesquisas recentes com nutracêuticos modulando resposta inflamatória merecem mais estudos relacionados com atos operatórios de exodontia, tendo em vista que podem vir a ser uma possibilidade de modulação inflamatória pós-operatória com a vantagem da ausência de efeitos adversos como: gastropatias e nefropatias.

6 CONCLUSÕES

1 - O mix de óleos de baixa relação ω -6/ ω -3 e alta relação ω -9/ ω -6 é eficaz na redução do estresse oxidativo à luz das concentrações de glutathione e de produtos reativos de ácidos tiobarbitúricos no plasma e na mucosa alveolar do sítio da extração dental.

2 - O mix de óleos de baixa relação ω -6/ ω -3 e alta relação ω -9/ ω -6 promove redução da inflamação por meio da diminuição da expressão de IL-1, NF κ B, MPO na mucosa e osso alveolares.

3 - A mix de óleos de baixa relação ω -6/ ω -3 e alta relação ω -9/ ω -6 induz inibição do estresse por meio da redução da expressão de iNOS na mucosa alveolar e no osso alveolar.

4 - O mix de óleos de baixa relação ω -6/ ω -3 e alta relação ω -9/ ω -6 promove redução do estresse inflamatório e remodelação óssea inicial por meio da redução número de osteoclastos alveolares, e diminuição da expressão de BMP-2 no osso alveolar.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 5. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.
- ALDEN, TD. et al. Bone morphogenetic protein gene therapy. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 27, p. 87-93, 2002.
- ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: the role of w-3 fatty acids. **Nutrition**, v.14, p. 627-633, 1998.
- AL-KHALIFA, H; GIVENS, DI; RYMER, C. Effect of n-3 fatty acids on immune function in broiler chickens. **Poult Sci.**,v. 91, p. 74-88, 2012.
- ALLAM-NDOUL, B. et al. Effect of n-3 fatty acids on the expression of inflammatory genes in THP-1 macrophages. **Lipids Health Dis.**, v 15, 2016.
- 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 odontol cienc.**, v. 18, n. 40, p. 138-142, 2003.
- AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P; LEMOS, A.P.C; LACAVA, Z. G.M. Controle da Resposta Inflamatória por Ácidos Graxos. In: CURI, Rui et al. (Orgs.). **Entend a gord. Os ác grax.**, p. 379-392. São Paulo: Manole, 2002.
- BARNES, PJ, KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.
- 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. et al. 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, impaction types and operative time on inflammatory tissue reactions following lower third molar surgery. **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. São Paulo: Manole, 2002, p.381-392.
- BOCCARDI, V. et al. -94 ins/del ATTG NFKB1 gene variant is associated with lower susceptibility to myocardial infarction. **Nutr Metab Cardiovasc Dis.**, v. 21, n. 9, p. 679-684, 2011.

BONJOUR, JP. Dietary protein: an essential nutrient for bone health. **J Am Coll Nutr.**, v. 24, p. 526-536, 2005.

BODNER, L., KAFFE, I., LITTNER, M.M., COHEN, J. Extraction 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.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo patologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

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, n. 4, p. 433, 2003.

CALDER, PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochem Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 469-484, 2015.

CALDER, PC. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **Proc Nutr Soc.**, v. 72, p. 36-326, 2013.

CALDER, PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammatory processes and inflammatory bowel diseases. **Mol Nutr Food Res.**, v. 52, p. 885-897, 2008.

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.

CAMPELO, Ana Paula Bomfim Soares. **Óleos ômega 9, 6 e 3 em pele de ratos submetidos a queimadura térmica**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2012.

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.

CAVALCANTE, Beatriz Torres de Melo. **Pré-condicionamento nutracêutico com misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 na artrite aguda induzida por zymosan em ratos**. 2014. 110 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2014.

CHOI, J. H.; CHA, D. S.; JEON, H. Anti-inflammatory and anti-nociceptive properties of *Prunus padus*. **J Ethnopharmacol.**, v. 2, n. 144, p. 379-386, nov. 2012.

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

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical

inflammatory hypernociception. **J. Leukoc. Biol.**, v. 4, n. 83, p. 824-832, abr. 2008.

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

CRONSTEIN, B. N.; WEISSMANN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthrit Rheum.**, v. 2, n. 36, p. 147-157, fev. 1993.

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

DINARELLO, CA. Anti-inflammatory Agents: present and Future. **Cell**. v.140, p. 935-950, 2010.

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.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.**, v.75, p.125-131, 1995.

DRAYTON, D. L.; LIAO, S.; MOUNZER, R. H.; RUDDLE, N. H. Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis. **Nat Immunol.**, v. 7, p. 344-353, 2006.

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

ENDRES, S; GHORBANI, R; KELLEY, VE. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **N Engl J Med.**, v. 320, p. 265-271, 1989.

EPSTEIN, FH; BARNES, PJ; KARIN, M. Nuclear factor- κ B – a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.**, v. 336, p. 1066-1071, 1997.

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

FAROOQUI, A.A. et al. 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.

FELDMANN, M. et al. The transfer of a laboratory based hypothesis to a clinically useful therapy: the development of anti-TNF therapy of rheumatoid arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.**, v. 18, n. 1, p. 59-80, 2004.

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. 93-118, 2014.

FRASER, CC. Exploring the positive and negative consequences of NF-kappaB inhibition for the treatment of human disease. **Cell Cycle.**, v. 5, n. 11, p. 1160-1163, 2006.

FULLER, K. et al. A role for TGFbeta(1) in osteoclast differentiation and survival. **J Cell Sci.**, v. 113, p. 2445- 2453, 2000.

GALLIN J.I ; SNYDERMAN, R. Overview, in Inflammation - Basic Principles and Clinical Correlates (Gallin JI and Snyderman R eds), **Lipp Willi & Wilk.**, 1999

GHOSH, S; MAY, MJ; KOPP, EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. **Annu Rev Immunol.**, v. 16, p. 225-260, 1998.

GLEZER, I. et al. O fator de transcrição NF-kapaB nos mecanismos moleculares de ação de psicofármacos. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 26-30, jan/mar. 2000.

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.

HANSSON, M; OLSSON, I; NAUSEEF, WM. Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. **Archs of Biochem Biophys**, v. 445, p. 214-224, 2006.

HAYDEN, M. S.; GHOSH, S. Shared Principles in NF-B Signaling. **Cell**, v.132, n. 3, p. 344-362, 2008.

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

- HEYLAND, D.K. et al. 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.
- HUSSEY, Bethan; LINDLEY, Martin R.; MASTANA, Sarabjit S. Omega 3 fatty acids, inflammation and DNA methylation: an overview. **Clinical Lipidology**, v. 12, n.1, p. 24-32, 2017.
- IBARRA URIZAR, A. et al. Inflammatory Cytokines Stimulate Bone Morphogenetic Protein-2 Expression and Release from Pancreatic Beta Cells. **J Interferon Cytokine Res.** v. 36, n.1, p. 20-29, 2016.
- 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.
- INNIS, SM. Essential fatty acids in growth and development. **Prog lipid res.**, v.30, p.39-103, 1991.
- ITARIU, BK. et al. Long-chain n-3 PUFAs reduce adipose tissue and systemic inflammation in severely obese nondiabetic patients: a randomized controlled trial. **Am J Clin Nutr.**, v. 96, p. 1137-1149, 2012.
- ITOH, K. *et al.* Bone morphogenetic protein 2 stimulates osteoclast differentiation and survival supported by receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. **Endocrinology**, v. 142, p. 3656-3662, 2001.
- IWALEWA, E. O. et al. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phyto medicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African J. Biotech.**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007
- 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.
- JAMES, T.; WU, A; WU, L.L. Acute and Chronic inflammation: effect of the risk factor (s) in the progression of the early inflammatory response to the oxidative and nitrosative stress. **J Biomed Lab Sci.**, v.19, n.32, 2007.
- JAUDSZUS, A. et al. Evaluation of suppressive and pro-resolving effects of EPA and DHA in human primary monocytes and T-helper cells. **J. Lipid. Res.**, v. 54, p. 923-935, 2013.
- KABIR, M. et al. Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity

and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study. **Am J Clin Nutr.**, v. 86, p. 1670-1679, 2007.

KARBAN, A. S. et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Hum Mol Genet.**, v. 13, n. 1, p. 35-45, 2004.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 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.

KIM, P. K.; DEUTSCHMAN, C. S. Inflammatory responses and mediators. **Surg Clin North Am.**, v. 3, n. 80, p. 885-894, jun. 2000.

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.

KISHIDA, E; TAJIRI, M; MASUZAWA, Y. Docosahexaenoic acid enrichment can reduce L929 cell necrosis induced by tumor necrosis factor. **Biochim Biophys Acta.**, v.176, p. 454-462, 2006.

KOMATSU, W. et al. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. **Free Radic Biol Med.**, v. 34, p.1006-1016, 2003.

KREMER, JM. et al. Effects of manipulation of dietary fatty acids on clinical manifestations of rheumatoid arthritis. **Lancet.**, v. 1, p. 184-187, 1985.

KUMAR, A. et al. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. **J. Mol. Med.**, v. 82, p. 434-448, 2004.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia:** bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAURENCIKIENE, J. et al. Possible new role for NF-kappaB in the resolution of inflammation. **Nat Med.**, v. 7, n. 12, p. 1291-1297, 2001.

LESLIE, CA. et al. Dietary fish oil modulates macrophage fatty acids and decreases arthritis susceptibility in mice. **J. Exp. Med.**, v. 162, p. 1336-1349, 1985.

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.

LIMA, V. et al. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite : Papel de moduladores farmacológicos. **Rev. Period.**, v. 18, n. 3, p. 7-19, 2008.

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.

LI, Y. Y. et al. CD14 gene-159C/T polymorphism and coronary artery disease: a meta-analysis involving 4467 subjects. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, n. 8, p. 12149-12160, 2015.

LO, CJ. et al. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. **J. Surg. Res.**, v. 82, p.216-221, 1999.

LÓPEZ-MEJÍAS, R. et al. NFKB1-94ATTG ins/del polymorphism (rs28362491) is associated with cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 426-429, 2012.

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.

MACHADO-CRUZ, S. S. et al.TLR4 and CD14 receptors expressed in rat pineal gland trigger NFKB pathway. **J. Pineal Res.**, v. 49, p. 183-192, 2010.

MAJNO, G. Studies on inflammation II. The site of action of histamine and serotonin. **J. Biophys. Biochem. Cytol.**, v.11, p.571, 1961.

MARTINDALE, R.; ZHOU, M. Terapia nutricional imunomoduladora. In: WAITZBERG, Dan Linetzky. **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. 297-230, 1999.

MEDZHITOV, R. Originand physiological roles of inflammation. **Natur.**, v. 454, p. 428-435, 2008.

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, june, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s0102-86502014000600004>>.

MELO, Radamés Bezerra et al. Anti-inflammatory effect of a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction. **Archives of Oral Biology**, v. 74, p. 63-68, feb. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003996916303326?via%3Dihub>>.

MESQUITA, T. R. M. et al. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. **Revista Dor**, v. 12, n. 4, p. 337-341, 2011.

MONTERA, V. S.P. Benefícios dos nutrientes antioxidantes e seus cofatores no controle do estresse oxidativo e inflamação na insuficiência cardíaca. **Rev.Soc. rj.**, v. 20, n. 1, p. 20-27, jan/fev. 2007.

MULLEN, A; LOSCHER, CE; ROCHE, HM. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. **J. Nutr. Biochem.**, v. 21, p. 444-450, 2010.

NAIR, J. et al. Network analysis of inflammatory genes and their transcriptional regulators in coronary artery disease. **PLOS ONE**, v. 9, n.4, 2014.

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.

NATHAN, C; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell.**,v.140, p. 82-871, 2010.

NERI SERNERI, G. et al. Exaggerated myocardial oxLDL amount and LOX-1 receptor over-expression associated with coronary microvessel inflammation in unstable angina. **Atherosclerosis**, v. 226, n. 2, p. 476-482, 2013.

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.

OKAMOTO T, RUSSO MC. Wound healing following tooth extraction. Histochemical study in rats. **Rev. Fac. Odontol .Araçatuba.**, v. 2, p. 153-164, 1973

OLIVER, E. et al. Docosahexaenoic acid attenuates macrophage-induced inflammation and improves insulin sensitivity in adipocytes-specific differential effects between LC n-3 PUFA. **J. Nutr. Biochem.**,v. 23, p. 1192-200, 2012.

OLIVEIRA, F.F.B. **Efeito antinocicpetivo e anti-inflamatório do óleo da polpa de pequi Caryocarcoriaceumwitm na artrite induxida por zymosan em ratos.** 2013. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

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.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. **Bogliolo Patologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

- PINHEIRO, Petrucia Maria Antero. **Pré-condicionamento nutricional com misturas de óleos ômega-3, 6 e 9 na isquemia e reperfusão cerebral em ratos**. 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2011.
- 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. et al. Nutrition and bone growth and development. **Proc Nutr Soc.**, v. 65, p. 348–360, 2006.
- RAMIREZ-RAMIREZ, V. et al. Efficacy of fish oil on serum of tnf α , il-1 β , and il-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. **Oxidative medicine and cellular longevity**. **Doi**, v. 10, 2013.
- REDDI, AH. Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. **Clin. Orthop. Relat. Res.**, v. 355, p. 72-76, 1998.
- REID, IR; CORNISH, J; BALDOCK, PA. Nutrition-related peptides and bone homeostasis. **J. Bone. Miner. Res.**, v. 21, p. 495-500, 2006.
- REN, J.; CHUNG, S.H. Anti-inflammatory effect of alpha-linolenic acid and its mode of action through the inhibition of nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression via NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, n.13, p. 5073-5080, jun. 2007.
- REN, XY et al. Tetramethylpyrazine inhibits angiotensin II- induced nuclear factor- kappaB activation and bone morphogenetic protein- 2 downregulation in rat vascular smooth muscle cells. **Acta physiol.Sin.**, v. 59, p. 339-344, 2007.
- REYNOLDS, W. F.; STEGEMAN, C. A.; TERVAERT, J. W. -463 G/A myeloperoxidase promoter polymorphism is associated with clinical manifestations and the course of disease in MPO-ANCA-associated vasculitis. **Clin. Immunol.**, v. 103, p. 154-160, 2002.
- REYNOLDS, W. F. et al. Myeloperoxidase promoter polymorphism -463G is associated with more severe clinical expression of cystic fibrosis pulmonary disease. **Mediat. Inflamm.**, v. 2, p. 1-8, 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.
- ROBERTS, CK; SINDHU, KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci.**, v. 84, p. 705-712, 2009.
- ROBBINS, S. S.; COTRAN, R. S. **Pathologic basis of diseases**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2005.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytok Growth Fact Rev.**, v. 21, p. 61-65, 2010.

RUDKOWSKA, I. et al. Transcriptomic and metabolomic signatures of an n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in a normolipidemic/ normocholesterolemic Caucasian population. **J. Nutr. Biochem.**, v. 24, p. 54-61, 2013.

SALAVEJ, P.; SPALTEHOLZ, H.; ARNHOLD, J. Modification of amino acid residues in human serum albumin by myeloperoxidase. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 40, p. 516-525, 2006.

SALIM, P. H.; XAVIER, R. M. Influência dos polimorfismos genéticos (IL10/CXCL8/CXCR2/NFκB) na susceptibilidade das doenças reumatológicas autoimunes. **Ver. Bras. Reumatol.**, v. 54, n. 4, p. 301-310, 2014.

SANCHEZ NETO, R. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2 por cento. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.8, n.1, p.18-23, 1993.

SANTOS, D. G. B. et al. Nuclear Factor (NF) κB polymorphism is associated with heart function in patients with heart failure. **BMC Medical Genetics**, v. 11, n. 89, 2010.

SCHWARTZ, SA; HERNANDEZ, A; MARK EVERS, B. The role of NF-kappaB/IkappaB proteins in cancer: implications for novel treatment strategies. **Surg. Oncol.**, v. 8, n. 3, p. 143-153, nov. 1999.

SHAFER WG, MUHLER JC. Effect of gonadectomy and sex hormones on the structure of the rat salivary glands. **J. Dent. Res.**, v. 32, n. 2, p. 262-268, 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.

SERHAN, CN; CHIANG, N; VAN DYKE, TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 349-61, 2008.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006.

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.

SIGAL, LH. Basic science for the clinician 39: NF-kappaB-function, activation, control, and consequences. **J. Clin. Rheumatol.**, v. 12, p. 207-211, 2006.

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.

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.

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.

SIMOPOULOS, AP. Essential fatty acids in health and chronic disease. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 70, p. 560-569, 1999.

SIMOPOULOS, AP. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 21, p. 495-505, 2002.

SIRIWARDHANA, N; KALUPAHANA, NS; MOUSTAID-MOUSSA, N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 65, p. 22-211, 2012.

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.

LI et. al

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. et al. 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.

TARTIBIAN, B; MALEKI, BH; ABBASI, A. Omega-3 fatty acids supplementation attenuates inflammatory markers after eccentric exercise in untrained men. **Clin. J. Sport Med.**, v. 21, p. 131-137, 2011.

TURK, HF; CHAPKIN, RS. Membrane lipid raft organization is uniquely modified by n-3 polyunsaturated fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 88, p. 43-47, 2013.

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.

VASCONCELOS, Camila. Pinho. Pessoa de. **Pré-condicionamento e tratamento com misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9 sobre a inflamação e a reabsorção óssea na doença periodontal experimental**. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em cirurgia), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

VERLENGIA, R; GORJAO, R; KANUNFRE, C. Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene

expression in Jurkat cells. **J. Nutr. Biochem.**, v. 15, p. 657- 665, 2004.

VERRI, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacol. Ther.**, v. 1, n. 112, p. 116-138, out. 2006.

VOGEL, U. et al. The NFKB1 ATTG ins/del polymorphism and risk of coronary heart disease in three independent populations. **Atherosclerosis**, v. 219, p. 200-204, 2011.

XUEXIU, He. et al. Docosahexaenoic acid attenuates LPS-stimulated inflammatory response by regulating the PPAR γ /NF- κ B pathways in primary bovine mammary epithelial cells. **Research in Veterinary Science**, v. 112, p. 7-12, 2017.

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

WINTERBOURN, C. C.; VISSERS, M. C. M.; KETTLE, A. J. Myeloperoxidase. **Cur. Opin. Hematol.**, v. 7, p. 53-58, 2000.

YANG, Y. N. et al. -94 ATTG insertion/deletion polymorphism of the NFKB1 gene is associated with coronary artery disease in Han and Uygur women in China. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 8, n. 6, p. 430-438, 2014.

Yao, Y. et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 and osteoprotegerin in trans-sutural distraction osteogenesis. **West Chin J Stomatol.**, v. 30, p. 425-429, 2012.

YAP, W. Y.; WHITEMAN, M.; CHEUNG, N. S. Chlorinative stress: An under appreciated mediator of neurodegeneration? **Cell Signal.**, v. 19, p. 219-228, 2007.

YAQOOB, P; CALDER, P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cell Immunol.**, v. 163, p. 120-128, 1995.

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.

ZHAO, Y. et al. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 23, p. 71-78, 2004.

ZHOU, B. et. Al. Functional polymorphism of the NFKB1 gene promoter is related to the risk of dilated cardiomyopathy. **BMC Medical Genetics**, v.10, n. 47, 2009.

APÊNDICE

Dados Brutos

TBARS no plasma (nmol/ml) – 7 dias				Glutaciona no plasma (µg/ml) – 7 dias			
Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO	Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,096	0,412	0,222	0,034	6,403	10,283	8,52	6,043
0,099	0,213	0,176	0,091	5,047	10,27	10,437	6,13
0,095	0,298	0,112	0,075	4,05	10,377	7,293	3,303
0,106	0,331	0,159	0,092	7,863	9,403	10,047	3,047
0,06	0,141	0,296	0,235	7,047	10,3	7,937	6,747
0,089	0,167	0,119	0,18	3,68	6,747	10,407	4,037
0,081	0,094	0,342	0,081	4,04	9,047	10,313	6,777
0,039	0,164	0,258	0,026	4,44	8,717	10,19	4,037

TBARS no tecido (nmol/mg) – 7 dias				Glutaciona no tecido (µg/mg) – 7 dias			
Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO	Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,105	0,226	0,1	0,105	6,337	15,997	13,855	8,623
0,051	0,447	0,102	0,243	7,303	6,76	14,209	6,611
0,08	0,209	0,37	0,167	7,705	16,756	10,734	8,63
0,133	0,249	0,102	0,07	9,372	15,825	13,708	6,611
0,121	0,209	0,329	0,107	7,632	15,187	11,507	7,819
0,093	0,052	0,073	0,153	7,714	10,167	9,74	8,649
0,078	0,31	0,607	0,112	7,371	14,258	13,75	9,661
0,136	0,283	0,07	0,047	7,344	14,184	16,075	6,643

MPO (µg/g) – 7 dias			
Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
4,863	8,199	7,674	4,715
7,715	10,715	8,480	4,738
6,720	10,540	8,508	5,605
8,347	10,494	11,420	7,821
5,264	8,070	9,430	6,439
2,987	10,582	9,043	4,494
1,540	12,467	10,029	6,563
3,397	5,536	5,273	4,503

TBARS no plasma (nmol/ml) – 14 dias				Glutaciona no plasma (µg/ml) – 14 dias			
Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO	Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,095	0,121	0,056	0,041	6,403	7,423	5,94	6,043
0,079	0,098	0,036	0,084	5,047	6,61	7,097	6,13
0,096	0,077	0,071	0,085	4,05	4,707	5,477	6,637
0,083	0,075	0,103	0,084	7,863	6,273	4,993	3,047
0,073	0,027	0,206	0,107	7,047	5,737	6,937	6,747
0,141	0,167	0,038	0,172	3,68	7,013	7,137	4,037
0,089	0,083	0,188	0,058	4,04	3,963	4,013	6,777
0,035	0,104	0,023	0,065	4,44	3,307	3,07	4,037

TBARS no tecido (nmol/mg) – 14 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,14	0,076	0,211	0,088
0,135	0,247	0,183	0,165
0,034	0,056	0,067	0,087
0,128	0,049	0,103	0,128
0,114	0,189	0,141	0,105
0,052	0,08	0,146	0,153
0,179	0,26	0,186	0,162
0,079	0,103	0,042	0,058

Glutaciona no tecido (µg/mg) – 14 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
6,027	7,314	8,794	8,7
7,623	8,823	9,31	6,081
8,374	9,364	7,077	7,737
8,073	9,733	6,8	8,708
7,751	9,187	8,402	7,819
8,192	8,671	8,752	9,414
7,428	6,852	9,774	9,086
6,027	9,184	9,752	4,189

MPO (µg/g) – 14 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
5,277	4,830	4,669	4,471
7,204	7,614	5,826	3,969
7,291	9,305	4,983	4,568
7,632	9,439	8,923	7,646
4,531	5,153	7,190	6,277
3,969	9,144	5,356	4,323
1,715	0,946	5,605	6,835
3,826	5,158	4,388	4,204

TBARS no plasma (nmol/ml) – 21 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,089	0,112	0,057	0,044
0,064	0,078	0,05	0,102
0,102	0,07	0,08	0,098
0,107	0,079	0,103	0,022
0,077	0,027	0,095	0,128
0,077	0,167	0,09	0,116
0,142	0,088	0,189	0,108
0,04	0,101	0,04	0,076

Glutaciona no plasma (µg/ml) – 21 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
5,833	5,407	4,86	5,997
6,063	4,773	6,42	6,4
3,71	6,25	5,5	3,21
8,173	6,07	6,6	6,57
7,397	6,437	4,25	6,627
3,363	4,373	6,46	6,397
3,973	7,503	6,6	3,43
4,323	3,397	3,6	5,063

TBARS no tecido (nmol/mg) – 21 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0,148	0,13	0,202	0,104
0,071	0,127	0,183	0,102
0,023	0,157	0,069	0,108
0,151	0,127	0,133	0,13
0,084	0,098	0,119	0,12
0,104	0,12	0,101	0,15
0,147	0,125	0,158	0,1
0,198	0,108	0,041	0,141

Glutaciona no tecido (µg/mg) – 21 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
5,99	9,428	12,193	8,368
7,7	6,819	7,221	6,407
8,606	7,031	6,859	7,854
7,737	7,362	7,223	8,056
7,47	8,084	9,077	7,489
7,976	6,7	7,751	9,024
7,646	9,183	7,45	9,596
7,398	6,862	5,092	4,526

MPO (µg/g) – 21 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
5,310	6,019	3,927	3,936
6,724	7,070	5,181	3,973
7,024	7,204	4,222	7,522
7,130	4,434	5,153	5,582
4,715	4,485	4,826	6,835
4,038	5,135	3,761	3,794
1,849	2,623	5,383	5,941
3,784	4,941	3,821	3,936

Razão NFκB/GAPDH Osso Alveolar – 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
21,35	54,39	47,58	32,49
22,65	52,82	49,52	35,38
20,48	57,38	51,29	31,28
18,98	56,31	53,49	34,31

Razão NFκB/GAPDH Osso Alveolar – 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
26,78	57,88	51,32	32,71
23,92	64,61	48	29,76
21,28	57,43	54,86	25,56
25,87	62,88	59,81	31,08
22,01	55,55	54,69	33,98
24,51	59,09	53,52	35,67

Razão iNOS/GAPDH Osso Alveolar – 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
21,28	55,39	50,28	22,38
19,28	52,49	51,29	31,29
22,36	56,42	48,48	36,49
24,76	58,39	47,83	31,29

Razão iNOS/GAPDH Gengiva– 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
21,71	63,78	56,84	30,54
19,98	62,09	50,72	34,23
23,72	59,57	59,34	33,65
23,47	65,93	52,67	37,31
27,94	57,07	60,21	35,81
20,54	68,32	55,36	32,48

Razão BMP-2/GAPDH Osso Alveolar – 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
23,65	69,09	61,28	36,51
22,9	75,93	57,28	27,49
32,69	67,29	69,39	22,39
21,82	60,31	71,27	32,58
26,93	84,32	66,39	36,13
26,83	60,66	68,32	37,04

Razão BMP-2/GAPDH Gengiva– 3 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
24,74	62,83	58,48	34,8
22,83	63,96	58,09	28,69
21,58	59,72	62,79	29,51
20,65	60,31	63,89	32,58
19,03	59,39	64,65	33,31
24,57	57,88	62,34	36,48

Razão NFκB/GAPDH Osso Alveolar – 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
20,21	58,45	40,42	32,38
23,47	55,41	47,59	31,29
22,31	57,39	55,49	33,48
19,22	58,31	53,89	30,45

Razão NFκB/GAPDH Gengiva– 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
20,08	52,76	54,98	24,98
23,81	51,88	49,65	31,89
24,61	58,43	54,91	29,45
21,98	50,32	55,49	22,98
22,97	54,78	48,34	28,01
22,38	52,66	50,73	26,88

Razão iNOS/GAPDH Osso Alveolar – 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
28,28	58,29	45,29	31,29
21,29	57,39	52,38	33,21
26,36	53,4	56,38	37,18
25,38	49,99	40,28	34,26

Razão iNOS/GAPDH Gengiva– 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
23,74	68,09	59,65	29,59
21,58	67,31	59,01	32,08
24,51	73,59	67,32	31,67
26,38	74,89	68,73	34,87
23,68	77,84	66,32	28,09
22,45	69,56	69,54	31,67

Razão BMP-2/GAPDH Osso Alveolar – 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
27,98	55,32	45,82	29,56
25,43	57,36	49,01	27,35
22,85	69,48	53,63	36,85
27,13	74,86	43,66	37,43
22,77	77,35	58,62	38,58
25,32	67,09	59,54	46,68

Razão IL-1 β (pg/mg)– 7 dias

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
26,42	67,43	55,32	30,31
23,47	68,98	51,28	37,37
24,78	66,41	58,3	31,29
22,46	68,38	51,29	37,19
28,56	69,32	56,38	35,97
23,42	61,29	57,39	31,38

Análise radiográfica em pixels

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0	981	1363	1311
0	1483	1520	1044
0	1673	1325	1319
0	1165	1370	1345
0	1577	1445	1254
0			

Contagem de Osteoclastos –histomorfométrico

Sham	Salina	Mix Isolpídico	Mix AI e AO
0	15	25	3
0	12	24	4
0	15	16	5
0	27	13	7
0	22	23	8
0			
0			

ANEXOS

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.

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).

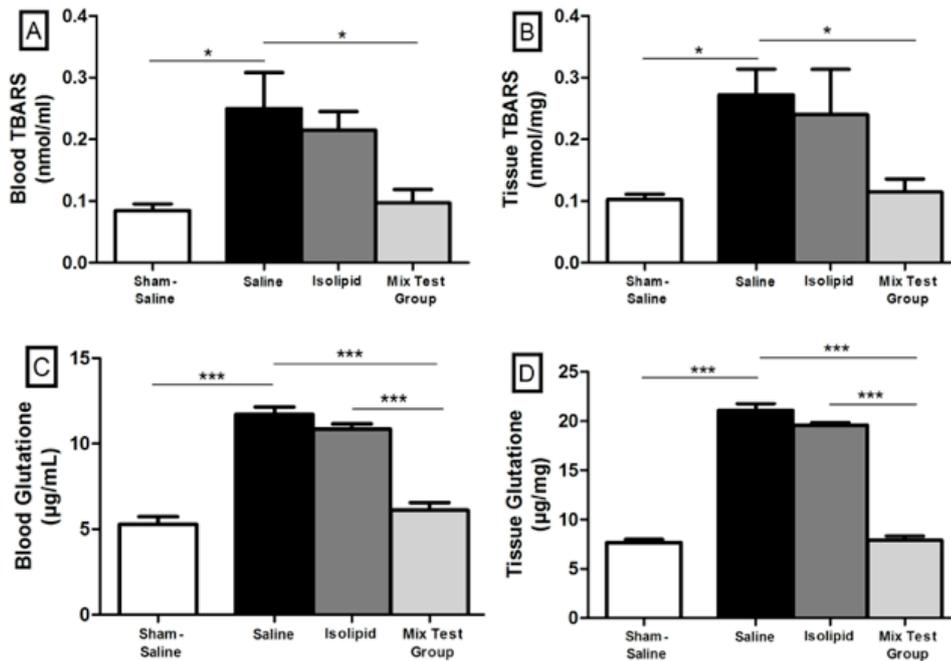


FIGURE 1 - Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels in blood (A) and local tissue (B); Glutathione (GSH) levels in blood (C) and local tissue (D) three days post dental extraction. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; Test ANOVA/Tukey.

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 isolipidic 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aob

Anti-inflammatory effect of a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction



Radamés Bezerra Melo^a, Paulo Goberlânio de Barros Silva^{b,*}, Reinaldo Barreto Oriá^c, José Ulisses de Souza Melo^d, Conceição da Silva Martins^c, Aline Matos Cunha^a, Paulo Roberto Leitão Vasconcelos^a

^a Department of Surgery, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

^b Faculty of Dentistry, University Center Christus, Fortaleza, Ceara, Brazil

^c Department of Morphology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

^d Faculty of Medicine, State University of Ceara, Fortaleza, Ceara, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2016

Received in revised form 30 October 2016

Accepted 11 November 2016

Keywords:

Surgery

Oral

Wound healing

Antioxidants

Anti-inflammatory agents

ABSTRACT

Objective: To evaluate the anti-inflammatory effect of pretreatment for three days with a fatty acid mixture with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio on rats submitted to dental extraction.

Material and methods: Thirty-two male Wistar rats (270–310 g) were randomly distributed in four groups (n = 8/group): the sham control group and the negative control group received saline; the high omega-6/low omega-9 group received isolipid fatty acid with high ω -6: ω -3 ratio and low ω -9: ω -6 ratio; the high omega-3/low omega-6 group received fatty acid with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio. Saline and oils were administered by gavage for 4 days before exodontia and 3 days after surgery, followed by euthanasia. Masseter edema was evaluated clinically and tissue samples were submitted to osteoclast count (H&E), myeloperoxidase assay, and western blotting (tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β).

Results: In the high omega-3/low omega-6 group, a significant decrease was observed in masseter edema ($p < 0.0001$), myeloperoxidase ($p < 0.0001$), osteoclasts ($p = 0.0001$) and TNF- α expression ($p < 0.0001$), but not in IL-1 β expression.

Conclusion: The ingestion of fatty acid with high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio significantly reduced inflammatory response in rats submitted to dental extraction.

© 2016 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

Historically, nutrients have been observed as a source of calories for cell homeostasis, and amino acids have been observed as a source for protein synthesis. However, current evidence supports the notion that a targeted supply of nutrients can improve

health outcomes by modulating immune and metabolic responses (Alexander, 1998; Li et al., 2012; Stables & Gilroy, 2011).

Nutraceuticals, which are nutrients at pharmaceutical doses, can modify biological responses in humans alone or in conjunction with other supplements. The most widely studied nutraceuticals are the ω -3 fatty acids EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid), glutamine, arginine and nucleotides (Stableforth, Thomas, & Lewis, 2009).

Marine fish oils, especially EPA and DHA, are particularly rich in ω -3 fatty acids (Alexander, 1998). Some authors have shown that oils with a high ω -6: ω -3 ratio can promote diseases by stimulating the production of inflammatory mediators (Allayee, Roth, & Hodis, 2009). The opposite effect may be achieved by ingesting large amounts of oil with a low ω -6: ω -3 ratio.

Changes in metabolic responses and dietary lipid levels have been shown to impact oxidative stress (Melo et al., 2014) and inflammatory responses in accordance with the ratio between the ingested polyunsaturated fatty acids (Calder, 2003). In addition,

Abbreviations: EPA, eicosapentaenoic acid; DHA, docosahexaenoic acid; ω -3, omega-3; ω -6, omega-6; G1, sham control group; G2, negative control group; G3, positive control group; G4, treatment group; POD3, third postoperative day; MPO, myeloperoxidase; CTAB, cetrimonium bromide; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; IL-1 β , interleukin 1 beta; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; ECL, electrogenerated chemiluminescence; COX, cyclooxygenase; LOX, lipoxigenase; AA, arachidonic acid; PG, prostaglandin; LT, leucotrien; TXA, thromboxan.

* Corresponding author at: Faculty of Dentistry, University Center Christus, Campus Parque Ecológico, Rua João Adolfo Gurgel, 133, Papicu, CEP: 60192–345, Fortaleza, Ceará, Brazil.

E-mail addresses: paulo_goberlanio@yahoo.com.br, paulo.goberlanio@gmail.com (P.G. de Barros Silva).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.11.009>
0003-9969/© 2016 Published by Elsevier Ltd.

fatty acids affect eicosanoid synthesis and act as growth factor mediators, thereby contributing to cell growth and epithelial cell differentiation (Capone, Bagga, & Glaspy, 1997).

The ω -3 and ω -6 fatty acid family members are metabolized by the same enzyme system and, therefore, compete for enzymes (Dyeberg, 1986). This competition impacts the production of eicosanoids, including prostaglandins, thromboxanes and leukotrienes (Fischer, 1989). Eicosanoids metabolized from polyunsaturated ω -6 fatty acids act as pro-inflammatory mediators, while those metabolized from ω -3 fatty acids have anti-inflammatory properties.

One of the greatest concerns in the postoperative care of oral surgery patients is inflammation, which causes discomfort and increases the risk of lockjaw, especially in the first three days. To determine if fatty acid supplementation could reduce inflammation and lock-jaw after a tooth extraction, we evaluated the effects of a fatty acid mixture with a high ω -9: ω -6 ratio or a low ω -6: ω -3 ratio on the inflammatory response in rats following dental extraction.

2. Materials and methods

2.1. Study design

This controlled experimental study included 32 male Wistar rats (weighing 270–310 g) supplied by the experimental animal facility of the Federal University of Ceará. The animals were acclimated for one week under controlled laboratory conditions (24 °C, relative humidity 40–60%, 12-h circadian cycle, food and water *ad libitum*) and then randomly assigned to four experimental groups (n=8/group). The sham group received saline without exodontia (0.9% NaCl). The negative control group received saline and exodontia (0.9% NaCl). The high omega-6/low omega-9 group received exodontia and an isolipid fatty acid (α -linolenic acid) with a high ω -6: ω -3 ratio (8:1) and a low ω -9: ω -6 ratio (0.4:1). The high omega-3/low omega-6 group received exodontia and a mixture of fatty acids (docosahexaenoic acid, α -linolenic acid and eicosapentaenoic acid) with a low ω -6: ω -3 ratio (1.4:1) and a high ω -9: ω -6 ratio (3.4:1).

Both saline and oil (1.2 g/kg/day) were administered by gavage 4 days before and 3 days after the extraction of the first lower left molar. The composition of the fatty acids administered in the high omega-6/low omega-9 group and the high omega-3/low omega-6 groups are shown in Table 1. The test oil mix consisted of the following edible nutritional oils: sunflower high oleic (48%), canola (25%), fish (15%) and olive (12%). The oil proportions were designed to provide a combination of antioxidant (ω -9: ω -6=3.7:1) and anti-inflammatory properties (ω -6: ω -3=1.4:1). The isolipid oil mix consisted of the following edible nutritional oils: soybean (97%) and corn (3%). The oil proportions were designed to exclude antioxidant (ω -9: ω -6=0.4:1) and anti-inflammatory properties (ω -6: ω -3=8:1).

After 4 days of gavage, the animals were anesthetized with an intramuscular injection of a freshly prepared mixture of ketamine

Table 1

Composition of fatty acid mixes used in Group 3 (isolipid) and Group 4 (inflammatory and antioxidant).

	Composition	Source of ω -3	Ratio
High omega-6 low omega-9	ω -6 + ω -3 Corn oil Soybean oil	ALA	ω -6: ω -3 = 8:1 ω -9: ω -6 = 0.3:1
High omega-3 low omega-6	ω -9 + ω -6 + ω -3 Olive oil Canola oil Fish oil	ALA (35%) EPA (39%) DHA (26%)	ω -6: ω -3 = 1.4:1 ω -9: ω -6 = 3.7:1

(90 mg kg⁻¹) and xylazine (10 mg kg⁻¹) and submitted to a tooth extraction or sham surgery (Silva et al., 2015). Three days after surgery, the animals were euthanized by cervical dislocation, and alveolar mucosa and alveolar bone samples were collected.

2.2. Determination of myeloperoxidase in alveolar mucosa

Myeloperoxidase (MPO), an enzyme expressed mainly in azurophilic neutrophil granulocytes, is a widely used quantitative marker of neutrophil infiltration in inflamed tissues. MPO activity can be determined by colorimetry and ELISA (Bradley, Christensen, & Rothstein, 1982).

Following euthanasia, a specimen of the alveolar mucosa was collected, weighed and freeze-stored at -80 °C until required for the assay. The tissue samples were homogenized in a 0.5% CTAB (cetrimonium bromide) solution (50 mg tissue/1 mL CTAB), frozen, thawed and homogenized again. Subsequently, the samples (1500 g) were centrifuged for 12 min at 4 °C. The supernatant was transferred to an Eppendorf tube and centrifuged for 10 min to remove contaminants. Ninety-six-well plates were filled with supernatant (7 μ L) and test solution (200 μ L) prepared with 5 mg o-dianisidine, 15 μ L 1% H₂O₂, 3 mL phosphate buffer and 27 mL H₂O. The absorbance was read in a spectrophotometer at 450 nm (t₀=0 min; t₁=1 min). Tissue MPO levels were determined using H₂O₂ as a substrate. A unit of MPO was defined as the amount required to convert 1 μ mol H₂O₂ into water in 1 min at 22 °C (Barreto et al., 2008). When H₂O₂ is degraded, a superoxide radical is released, which produces o-dianisidine as a function of the reaction time. Absorbance was plotted on standard neutrophil curves and expressed as MPO/mg tissue (MPO activity).

2.3. Determination of masseter edema

The masseter muscle extends from the zygomatic arch to the ramus of the mandible. Prior to surgery, after anesthetizing the animal (t₀), a caliper was introduced into the mouth and the middle portion of the masseter was measured (mm). Three days after surgery, prior to euthanasia, the masseter was measured again. Measurements were made in duplicate by a blinded investigator.

2.4. Histological processing and histomorphometric analysis (osteoclast count)

Following euthanasia, the hemi-mandibles, from which the molars were extracted, were excised, fixed in 10% formaldehyde for 24 h, decalcified in a 7% formic acid solution for 24 h and processed for histology (hematoxylin and eosin).

After the hemi-mandibles were embedded in paraffin blocks, 4 μ m-thick sections were cut using a semi-automatic microtome. The sections were stained with hematoxylin and eosin for examination under a conventional light microscope (magnification: 400x). Five micro-fields were selected for micrographs using a Leica DFC295 microscope coupled to a Leica DM 2000 microscope with LAS software (Leica Heerbrugg, Switzerland). The images were exported and analyzed with ImageJ software. The cell counter command was used to count the osteoclasts. To minimize observation bias, the slides were randomized, and the investigator was blinded to the group assignments. The sum of five micrographs was considered a sample unit for the statistical analysis (Kim et al., 2012).

2.5. Western blot for TNF- α and IL-1 β

To evaluate the protein expression of TNF- α and IL-1 β , alveolar ridge segments were homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM

Tris-HCl [pH 8.5], 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1% Tween 20, 1 mM dithiothreitol) and protease inhibitor (1 μ L inhibitor: 100 μ L RIPA). For the protein extraction, the alveolar ridge samples were centrifuged (17 min, 4°C, 13,000 rpm), and the supernatant was collected. Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid assay according to the manufacturer's protocol. Then, equal amounts of protein (50 μ g) were separated by electrophoresis in a 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, UK). The membranes were blocked with 5% non-fat dry milk for one hour and then incubated for 1 h at room temperature with anti- β -actin (1:1000), anti-TNF- α (1:400) and anti-IL-1 β (1:400) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Subsequently, the membranes were washed and incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (monkey anti-rabbit immunoglobulin G; 1:1000; Amersham Pharmacia BioTech, UK). After washing, the membranes were incubated with a chemiluminescence reagent (ECL; Amersham Pharmacia Biotech) and exposed to HyperWlm ECL (Amersham Pharmacia Biotech) to develop the western blot. The densitometry analysis was performed with ImageJ software version 1.4 (National Institutes of Health, USA). The results were expressed as the relative density of the TNF- α or IL-1 β / β -actin bands (Lima et al., 2012).

2.6. Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to assess the normality of the data distribution. All data were presented as the mean \pm SEM. GraphPad Prism software version 5.0 (GraphPad Software, Inc., California Corporation, San Diego, California) was used for the statistical analysis. A one-way ANOVA was used to compare the groups. The level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$).

2.7. Ethical considerations

Approval for the experimental use of laboratory animals was obtained by the local ethics committee on animal use (CEUA, formerly CEPA) and filed under protocol #73/2011 (29 February 2012) in compliance with Federal Law #11.794 (8 October 2008) and Decree #6.689 (15 July 2009) regulating Law #11794 (<http://www.planalto.gov.br/ccivil03/Ato2007-20102008/Lei/L11794.htm>).

3. Results

3.1. MPO activity in alveolar mucosa

The exodontia procedure raised MPO levels in the negative control group (vs. sham: 5.11 ± 1.08) and significantly decreased MPO levels in the alveolar mucosa of animals in the high omega-3/

low omega-6 group (6.38 ± 0.48) compared to negative controls (10.68 ± 0.81) ($p < 0.001$). No differences were observed between the high omega-6/low omega-9 group (9.83 ± 0.52) and the negative control group or the high omega-3/low omega-6 group (Fig. 1A).

3.2. Masseter edema

The exodontia procedure increased masseter edema in the negative control group (vs. sham: 0.12 ± 0.11). The increase in the masseter muscle thickness was significantly smaller in the high omega-3/low omega-6 group (0.49 ± 0.04) than in the negative control group (2.15 ± 0.06) or the high omega-6/low omega-9 group (1.86 ± 0.07) (Fig. 1B).

3.3. Histopathological and histomorphometric findings (osteoclast count)

On the third postoperative day, visible, although negligible, microscopic changes were observed in the sham group (Fig. 2A). In contrast, the tissue from the negative control group and the high omega-6/low omega-9 group exhibited extraction sites filled with granulation tissue and numerous, mostly binucleated, osteoclasts in the proximity of the bone tissue with evident Howship's lacunae (a microscopic sign of osteoclast activity) (Fig. 2B and C). In the high omega-3/low omega-6 group, a small number of bi- or multinucleated osteoclasts were observed adhering to the mineralized bone matrix through Howship's lacunae (Fig. 2D). No signs of local infection were observed.

Osteoclasts were significantly more numerous in the negative control group (65.7 ± 13.3) than in the sham group (0.8 ± 0.6), but no significant difference was observed between the negative control group and the high omega-6/low omega-9 group (50.6 ± 6.5). The number of osteoclasts was significantly reduced in the high omega-3/low omega-6 group (31.1 ± 2.6) ($p = 0.0001$, ANOVA/Tukey) (Figs. 1C and 2).

3.4. Western blot for TNF- α and IL-1 β

The TNF- α / β -actin ratio was significantly higher in the negative control group (35.5 ± 8.8) than in the sham group (2.1 ± 0.5), but no significant difference was observed between the negative control group and the high omega-6/low omega-9 group (44.9 ± 5.8). The TNF- α / β -actin ratio was significantly lower in the high omega-3/low omega-6 group (8.8 ± 3.3) than in the negative control group or the high omega-6/low omega-9 group ($p < 0.0001$; ANOVA/Tukey) (Fig. 3A).

The IL-1 β / β -actin ratio was significantly higher in the negative control group (44.9 ± 5.2) than in the sham group (17.5 ± 4.1) ($p = 0.0113$, ANOVA/Tukey), but no significant difference was

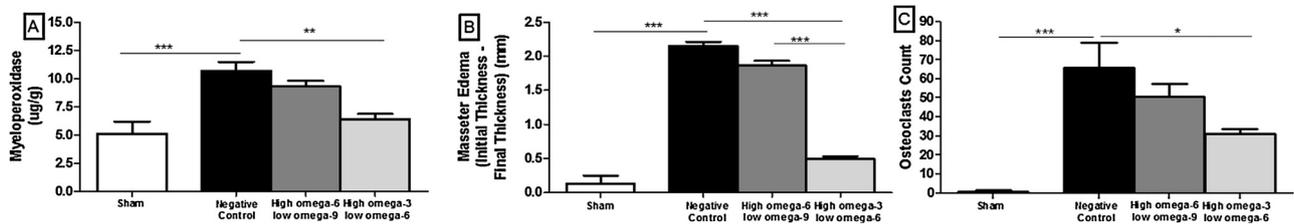


Fig. 1. Dosage of myeloperoxidase (MPO) (A), masseter edema (B) and osteoclast count (C) in tissue from the site of dental extraction in four groups of rats: Sham (n = 8), negative control (saline, n = 8), high omega-6/low omega-9 (isolidip fatty acid mix with high ω -6: ω -3 ratio and low ω -9: ω -6 ratio) and high omega-3/low omega-6 (anti-inflammatory and antioxidant fatty acid mix with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio). Results expressed as mean values \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA/Tukey).

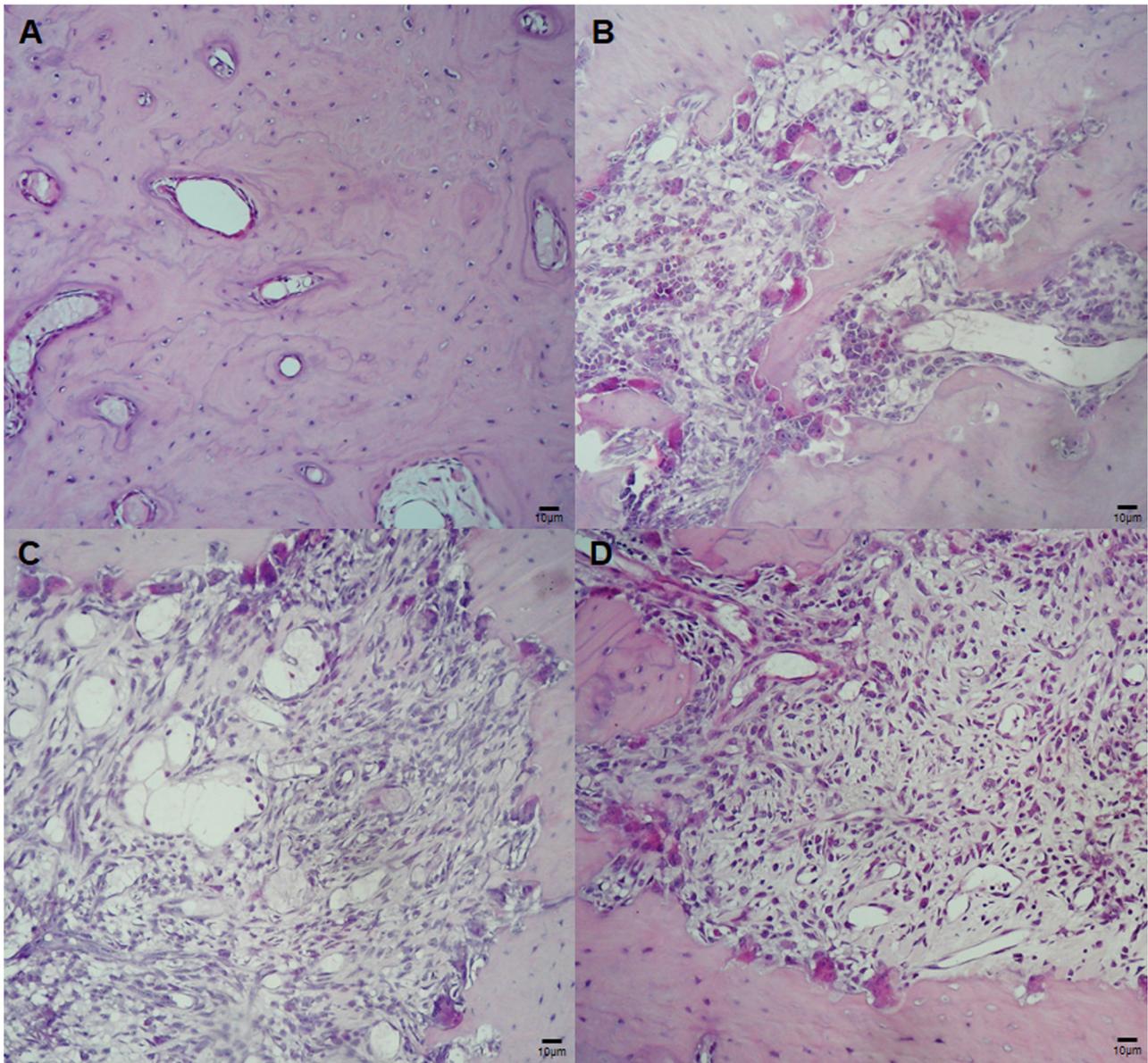


Fig. 2. Microscopic view of tissue from the site of dental extraction three days after the extraction of the first lower left molar in four groups of rats: sham (n = 8) (2A), negative control (saline, n = 8) (2B), high omega-6/low omega-9 (isolipid fatty acid mix with high ω -6: ω -3 ratio and low ω -9: ω -6 ratio) (2C), and high omega-3/low omega-6 (anti-inflammatory and antioxidant fatty acid mix with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio) (2D). The animals in the negative control group and the high omega-6/low omega-9 group had extraction sites filled with granulation tissue and numerous osteoclasts, with evident Howship's lacunae (a microscopic sign of osteoclastic activity). In the high omega-3/low omega-6 group, a small number of osteoclasts were seen adhering to the mineralized bone matrix through Howship's lacunae.

observed between the negative control group and the high omega-6/low omega-9 group (38.5 ± 7.3) or the high omega-3/low omega-6 group (38.6 ± 4.1) (Fig. 3B).

4. Discussion

Arachidonic acid (ω -6) and EPA (ω -3) are both substrates of cyclooxygenase (COX) and lipoxygenase (LOX). When increased, EPA acts as a competitive inhibitor, preventing arachidonic acid (AA) from entering the cascade and generating pro-inflammatory end products. High consumption of linoleic acid favors the increase of AA in cell membrane phospholipids, thereby increasing the production of prostaglandin (PG) E_2 and leukotriene (LT) B_4 via the COX and 5-LOX pathways, respectively. The ingestion of fish oil introduces EPA into membrane phospholipids, inhibiting AA

metabolism due to competition for the same enzyme pathways (COX and 5-LOX) and thereby promoting the formation of PGE_3 (instead of PGE_2) and LTB_5 (instead of LTB_4), which are weaker inflammatory mediators (James, Gibson, & Cleland, 2000). In general, linoleic acid is a precursor for the synthesis of pro-inflammatory eicosanoids, such as thromboxane A₂ (TXA_2), PGI_2 , PGE_2 and LTB_4 (James et al., 2000; Kelley, 2001).

Among the mediators, PGE_2 and LTB_4 have the greatest pro-inflammatory potential. PGE_2 induces fever, promotes vasodilation, increases vascular permeability and enhances pain and edema caused by other agents, such as bradykinin and histamine. However, PGE_2 acts as an anti-inflammatory mediator when it suppresses $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$ production and as an immunosuppressant when it inhibits lymphocyte proliferation, natural killer cell activity and $IL-2$ and interferon production. LTB_4 increases

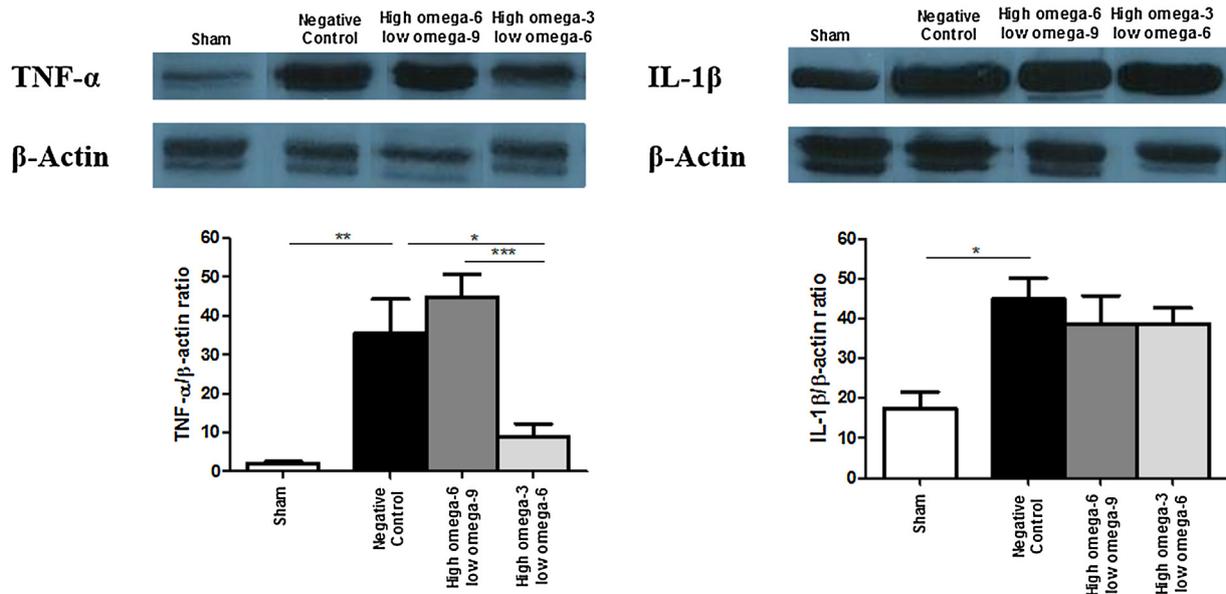


Fig. 3. TNF- α (A) and IL-1 β (B) expression in alveolar mucosa from the site of dental extraction in four groups of rats: sham (n = 8), negative control (saline, n = 8), high omega-6/low omega-9 (isolipid fatty acid mix with high ω -6: ω -3 ratio and low ω -9: ω -6 ratio) and high omega-3/low omega-6 (anti-inflammatory and antioxidant fatty acid mix with low ω -6: ω -3 ratio and high ω -9: ω -6 ratio). Results expressed as mean values \pm standard error of the mean. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (ANOVA/Tukey).

vascular permeability, blood flow and leukocyte chemotaxis, which triggers the release of lysosomal enzymes and increases the production of reactive oxygen species, TNF α , IL-1 and IL-6. In all of these scenarios, LTB₄ acts as a pro-inflammatory mediator (Grimble, 2002). In the present study, TNF- α production was likely suppressed due to the substitution of LTB₅ for LTB₄. As previously mentioned, thromboxanes are also a product of eicosanoid metabolism. TXA₂ (the main byproduct of AA) promotes platelet aggregation, leukocyte adhesion and smooth muscle contraction (Calder, 2003).

Alternatively, the increased availability of ω -3 fatty acids (such as linolenic acid, EPA and DHA) favors the synthesis of anti-inflammatory eicosanoids, such as PGE₃, TXA₃ and LTB₅. Such a balance is less favorable for the generation of pro-inflammatory mediators, and some immunosuppressive effects may be lost (Robert, 2005).

Excessive ω -6 fatty acid metabolism results in the production of pro-inflammatory mediators, vasoconstriction, increased edema, increased chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes, increased pro-inflammatory cytokine signal transduction and local tissue toxicity, potentially leading to inflammatory conditions, such as systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure syndrome. Lowering the ω -6: ω -3 ratio in the diet makes it possible to provide the pro-inflammatory products required for immune responses and attenuation of excessive inflammatory and oxidative conditions, as demonstrated in experimental animal studies and clinical trials (Bas et al., 2007; Melo et al., 2014; Sijben & Calder, 2007).

In our study, the ingestion of oils with a reduced ω -6: ω -3 ratio was associated with anti-inflammatory effects, reduced masseter edema and lower MPO levels in alveolar bone tissue. As the first cells to migrate from the blood vessels to the site of injury, neutrophils play a protective role through phagocytosis. In the first days following injury, neutrophils account for approximately 50% of all cells at the wound site. Eventually, the local stimulus for recruitment (pro-inflammatory cytokine synthesis) wanes and infiltration clears in a few days as the lysed neutrophils are phagocytosed by macrophages (Alves, Godoy, Figueiredo, & Menezes et al., 2007). The reduction in TNF- α expression observed

in our study may be explained by a reduction in the synthesis of pro-inflammatory mediators (such as LTB₄) induced by antioxidant and anti-inflammatory agents. The decrease in MPO levels and masseter edema due to reduced leukocyte chemotaxis, vascular permeability and blood flow may also be attributed to antioxidant and anti-inflammatory mediators (Grimble, 2002).

Treatment with antioxidants efficiently reduces the serum levels of nitric oxide and several pro-inflammatory mediators, including TNF- α , IL-1 β and IL-6. However, the reduction of TNF- α synthesis through the inhibition of oxidative stress is more efficient in the short term than the reduction of IL-1 β synthesis. Like IL-6 and nitric oxide, IL-1 β seems to require longer exposure before inhibition occurs (Ramirez-Ramirez et al., 2013). This would explain why the treatment promptly inhibited TNF- α synthesis, while reducing IL-1 β levels only slightly.

The reduction of TNF- α synthesis not only helps minimize edema after dental extraction but also reduces pain. Trismus is a major indicator of inflammation in clinical trials and TNF- α acts swiftly by sensitizing nociceptors and limiting mouth opening (Bello, Adeyemo, Bamgbose, Obi, & Adeyinka, 2011; Ribeiro, Vale, Ferreira, & Cunha et al., 2000). Inhibition by specific agents, such as thalidomide, was shown to reduce nociception in a murine model of acute paw pain (Ribeiro et al., 2000).

In addition, TNF- α is intimately involved in osteoclastogenesis. During the first 3–7 days after dental extraction, TNF- α synthesis is usually upregulated and hyperinflammatory conditions (such as periodontal disease) enhance local immunostaining and prolong TNF- α superexpression at the site of extraction, resulting in greater alveolar bone loss associated with hyperactivation of osteoclasts (Kim et al., 2012).

The increased number of osteoclasts *in situ* is directly proportional to the increase in tartrate-resistant acid phosphatase expression (Zenger, Ek-Rylander, & Andersson, 2010) and oxidative stress, which accelerates the process of bone resorption (Halleen et al., 1999). Thus, drugs capable of reducing TNF- α levels and other markers in the same family (such as receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) effectively inhibit bone resorption (Kimachi, Kajiya, Nakayama, Ikebe, & Okabe, 2011) by reducing metabolic activity and osteoclasts at the extraction site (Zenger

et al., 2010) and by reducing local oxidative stress (Lima et al., 2012), as observed in the present study.

In conclusion, the fatty acid mixture tested in this study (high ω -9: ω -6 ratio and low ω -6: ω -3 ratio) effectively reduced TNF- α and MPO levels (but not IL-1 β levels), masseter edema and osteoclast numbers at the site of dental extraction in rats. In addition to having a protective effect against atherosclerosis and plaque rupture, the anti-inflammatory properties of marine n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) (Calder, 2012) and the present antioxidant therapy offer a promising alternative for the prevention of bone loss after a tooth extraction. Thus, antioxidant therapy is a potentially important addition to dental rehabilitation after implant-supported mucous prostheses and dental implants. However, more research is needed to confirm the findings that reduction of inflammation in the early healing stage after tooth extraction results in greater bone availability.

Conflict of interests

The authors report no conflicts of interest related to this study and agree with the decisions about it, approved the final manuscript and referred to it as original manuscript, with text, figures and photographs that have not appeared in any other publication, this material has been submitted only to Archives of Oral Biology.

References

- Alexander, J. W. (1998). Immunonutrition: The role of ω -3 fatty acids. *Nutrition*, *22*, 627–633.
- Allayee, H., Roth, N., & Hodis, H. N. (2009). Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: Implications for nutrigenetics. *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics*, *2*, 140–148.
- Alves, R. D., Godoy, G. P., Figueiredo, C. R. L. V., & Menezes, R. (2007). Pathogenic aspects of the periodontal disease associated to diabetes mellitus. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, *51*, 1050–1057.
- Barreto, A. R., Cavalcante, I. C., Castro, M. V., Junqueira, A. F., Vale, M. R., Ribeiro, R. A., et al. (2008). Fucoidin prevents clostridium difficile toxin-a-induced ileal enteritis in mice. *Digestive Diseases and Sciences*, *53*, 990–996.
- Bas, O., Songur, A., Sahin, O., Mollaoglu, H., Ozen, O. A., Yaman, M., et al. (2007). The protective effect of fish n-3 fatty acids on cerebral ischemia in rat hippocampus. *Neurochemistry International*, *50*, 548–554.
- Bello, S. A., Adeyemo, W. L., Bamgbose, B. O., Obi, E. V., & Adeyinka, A. A. (2011). Effect of age, impaction types and operative time on inflammatory tissue reactions following lower third molar surgery. *Head Face Medicine*, *7*. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-160x-7-8>.
- Bradley, P. P., Christensen, R. D., & Rothstein, G. (1982). Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood*, *60*, 618–622.
- Calder, P. C. (2003). Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: Potential application in surgical and trauma patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *36*, 433–436.
- Calder, P. C. (2012). The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes: Atherosclerosis and plaque stability. *Molecular Nutrition Food Research*, *56*, 1073–1080.
- Capone, S. L., Bagga, D., & Glaspy, J. P. (1997). Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acid ratios and breast cancer. *Nutrition*, *13*, 822–824.
- Dyeberg, J. (1986). Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. *Nutrition Reviews*, *44*, 125–134.
- Fischer, S. (1989). Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. *Advances in Lipid Research*, *23*, 169–198.
- Grimble, R. (2002). Use of n-3 fatty acid-containing lipid emulsions in the intensive care unit environment: The scientist's view. *Clinical Nutrition*, *21*, 15–20.
- Halleen, J. M., Räisänen, S., Salo, J. J., Reddy, S. V., Roodman, G. D., Hentunen, T. A., et al. (1999). Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*, 22907–22910.
- James, M. J., Gibson, R. A., & Cleland, L. G. (2000). Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. *American Journal of Clinical Nutrition*, *71*, 343s–348s.
- Kelley, D. S. (2001). Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, *17*, 669–673.
- Kim, D. J., Cha, J. K., Yang, C., Cho, A., Lee, J. S., Jung, U. W., et al. (2012). Changes in periodontium after extraction of a periodontally-involved tooth in rats. *Journal of Periodontal and Implant Science*, *42*, 158–165.
- Kimachi, K., Kajiya, H., Nakayama, S., Ikebe, T., & Okabe, K. (2011). Zoledronic acid inhibits rank expression and migration of osteoclast precursors during osteoclastogenesis. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *383*, 297–308.
- Li, H. L., Chen, L. P., Hu, Y. H., Qin, Y., Liang, G., Xiong, Y. X., et al. (2012). Crocodile oil enhances cutaneous burn wound healing and reduces scar formation in rats. *Academic Emergency Medicine*, *19*, 265–273.
- Lima, R. C. P. Jr., Figueiredo, A. A., Freitas, H. C., Melo, M. L., Wong, D. V., Leite, C. A., et al. (2012). Involvement of nitric oxide on the pathogenesis of irinotecan-induced intestinal mucositis: Role of cytokines on inducible nitric oxide synthase activation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *69*, 931–942.
- Melo, R. B., Guimarães, S. B., Silva, P. G. B., Oriá, R. B., Melo, J. U., & Vasconcelos, P. R. (2014). 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 Cirurgica Brasileira*, *29*, 371–375.
- Ramirez-Ramirez, V., Macias-Islas, M. A., Ortiz, G. G., Pacheco-Moises, F., Torres-Sanchez, E. D., Sorto-Gomez, T. E., et al. (2013). Efficacy of fish oil on serum of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 oxidative stress markers in multiple sclerosis treated with interferon beta-1b. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 709493. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/709493>.
- Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2000). Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. *European Journal of Pharmacology*, *391*, 97–103.
- Robert, O. (2005). Practical applications of fish oil (ω -3 fatty acids) in primary care. *The Journal of the American Board of Family Practice*, *18*, 28–36.
- Sijben, J. W., & Calder, P. C. (2007). Differential immunomodulation with long-chain n-3 pufa in health and chronic disease. *The Proceedings of the Nutrition Society*, *66*, 237–259.
- Silva, P. G., Ferreira Junior, A. E., Teófilo, C. R., Barbosa, M. C., Lima Júnior, R. C., Sousa, F. B., et al. (2015). Effect of different doses of zoledronic acid in establishing of bisphosphonate-related osteonecrosis. *Archives of Oral Biology*, *60*, 1237–1245.
- Stableforth, W. D., Thomas, S., & Lewis, S. J. (2009). A systematic review of the role of immunonutrition in patients undergoing surgery for head and neck cancer. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *38*, 103–110.
- Stables, M. J., & Gilroy, D. W. (2011). Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Progress in Lipid Research*, *50*, 35–51.
- Zenger, S., Ek-Rylander, B., & Andersson, G. (2010). Long bone osteoclasts display an augmented osteoclast phenotype compared to calvarial osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *394*, 743–749.

Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa Animal



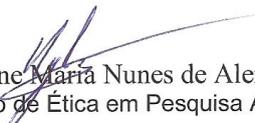
Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

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  Nunes de Alencar
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA