



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

CAMILA PINHO PESSOA DE VASCONCELOS

**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**

FORTALEZA

2013

CAMILA PINHO PESSOA DE VASCONCELOS

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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico- Cirúrgicas.

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

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata
Ferreira de Carvalho Leitão.

FORTALEZA

2013

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)

- V45p 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 / Camila Pinho Pessoa de Vasconcelos. – 2013. 77 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médico-Cirúrgicas, Fortaleza, 2013.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.
Coorientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.
1. Periodontite. 2. Inflamação. 3. Ácidos graxos. 4. Linhaça. I. Título.

CDD 617

CAMILA PINHO PESSOA DE VASCONCELOS

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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Cirurgia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Médico- Cirúrgicas.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos (Orientador)

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Francisco das Chagas Medeiros

Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Rodrigo Dornfeld Escalante

Universidade de Fortaleza- UNIFOR

À Deus, que se mostra sempre presente na minha vida.

Aos meus pais, Suzana e Abner, pelo amor, confiança, incentivo e apoio durante toda a minha vida, sem os quais eu não teria alcançado os meus objetivos.

Aos meus irmãos, Marcelo e Mariana, pela confiança, força e amizade.

Ao meu namorado, João Victor, pelo amor, paciência e companheirismo em todos os momentos.

Aos meus familiares, em especial aos meus avós, por sempre torcerem pela minha felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, pela orientação e a quem eu agradeço a confiança depositada e tantos ensinamentos.

À Prof. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão, pela competência e por toda a dedicação, paciência e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, pelos conhecimentos transmitidos.

À Dra. Adriana Magalhães Andrade de Menezes, pela sua contribuição indispensável na realização de diversas fases desse estudo.

À Prof. Dra. Gerly Anne de Castro Brito e à Prof. Dra. Vilma de Lima, pela colaboração nas leituras histológicas.

Aos alunos da Iniciação Científica, Glaylton Silva Santos e Johnata Kael Marinho, pela dedicação e exímia ajuda, de domingo a domingo, durante toda a fase experimental.

À nutricionista Aline Matos Cunha, pelo preparo das misturas de óleos e pela presteza com quem atendeu às minhas inúmeras solicitações.

À Karoline Sabóia Aragão e à Iracema Matos de Melo, pela disposição e contribuição.

À Roberta Dalcico, pela disponibilidade e valiosa ajuda neste trabalho.

Às secretárias do programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Maria Luciene Vieira De Oliveira e Magda Gomes Fontenele, por todo o apoio, compreensão e dedicação permanente aos alunos do Programa.

Às técnicas do laboratório Maria do Socorro França Monte, Conceição da Silva Martins e Maria Silvandira França Pinheiro (Vandinha), pela disponibilidade em ajudar e pelo apoio fundamental.

Ao Sr. Bento Francisco de Oliveira, técnico do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, pela atenção e prontidão com que atendeu às solicitações.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro desse projeto.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito.”
Benjamin Disraeli

RESUMO

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. **CAMILA PINHO PESSOA DE VASCONCELOS. Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Cirurgia, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará (Grau de Mestre em Ciências Médico-Cirúrgicas). Abril, 2013. Orientador Prof. Dr. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.**

A periodontite é uma doença inflamatória crônica que resulta da extensão do processo inflamatório iniciado na gengiva para os tecidos de sustentação dos dentes. É caracterizada por sangramento gengival, formação de bolsa periodontal, destruição do tecido conjuntivo e reabsorção do osso alveolar, podendo levar à perda do dente. Os ácidos graxos ômega-3 (ω -3) e ômega-9 (ω -9) possuem ação antiinflamatória e antioxidante, enquanto os ômega-6 (ω -6) apresentam propriedades pró- inflamatórias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anti-inflamatório e antirreabsortivo do pré condicionamento com mistura de óleos (ω -3, ω -6 e ω -9), contendo alta proporção de ω -9/ ω -6 e baixa proporção de ω -6/ ω -3, na doença periodontal experimental (DPE). A DPE foi induzida, passando-se um fio de náilon 3.0 em torno do segundo molar superior esquerdo de ratos Wistar machos, com peso médio corporal de 180-200 gramas. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 2 grupos: o controle e o tratado. O grupo controle foi subdividido em 3 grupos: NORMAL, cujos animais não foram submetidos à DPE e não receberam qualquer tratamento, SALINA e Isolipídico (ISO), cujos animais receberam solução salina ou uma mistura isolipídica de ação neutra do ponto de vista inflamatório, contendo ω -6/ ω -3, numa proporção 8:1 e ω -9/ ω -6, com 0,4:1. O grupo tratado foi subdividido em 3 grupos: Mix 1, Mix 2 e Mix 3. Os animais receberam misturas de óleos com ação anti-inflamatória e antioxidante, com a proporção 1,4:1 de ω -6/ ω -3 e de 3,4:1 de ω -9/ ω -6, diferindo apenas na fonte do ω -3: Mix 1, contendo o ácido α -linolênico; Mix 2, contendo os ácidos α -linolênico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, e Mix 3, contendo os ácidos α -linolênico e docosahexaenóico. Em ambos os grupos (controle e tratado), a administração dos óleos/solução salina foi realizada diariamente, por via orogástrica (gavagem), tendo início 7 dias antes da indução da periodontite até o dia do sacrifício, no 11º dia após serem submetidos à DPE. Alguns animais foram sacrificados 6 horas após a indução da periodontite para análise de mieloperoxidase (MPO). Foram analisados os seguintes parâmetros: índice de perda óssea (IPO), mieloperoxidase (MPO), alterações

histopatológicas e imunohistoquímica para o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi). A periodontite experimental causou aumento do infiltrado inflamatório no tecido gengival, aumento significativo de IPO e alteração da disposição do colágeno do periodonto. Além disso, foi identificada a presença de restos epiteliais de Malassez (REM) na proximidade do cimento e do osso alveolar. O grupo Mix 1, cujo ω -3 é proveniente do ALA (óleo de linhaça), foi capaz de diminuir o IPO, reduzir o infiltrado inflamatório e os níveis de MPO gengival em relação ao grupo SALINA e ISO. O Mix 1 ainda diminuiu a imunomarcagem para NF- κ B e para NOSi. Conclui-se que a ingestão de óleos à base de linhaça possui efeito anti-inflamatório e osteoprotetor na doença periodontal experimental em ratos Wistar.

Palavras-chave: Periodontite. Inflamação. Ácidos graxos. Linhaça.

ABSTRACT

CAMILA PINHO PESSOA DE VASCONCELOS. *Strictu Sensu* Post-graduation in Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Federal University of Ceara (Degree of Master of Surgery). Abril, 2013. Advisor: Prof. Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos.

Periodontitis, a chronic inflammatory disease that results from extension of the inflammatory process initiated in the gingiva to the supporting tissues of the teeth, is characterized by bleeding gums, periodontal pocket formation, destruction of connective tissue and alveolar bone resorption and may lead to loss tooth. Omega-3 (ω -3) and omega-9 (ω -9) unsaturated fatty acids are anti-inflammatory and antioxidant, while omega-6 (ω -6) fatty acids have proinflammatory properties. The aim of this study was to investigate the anti-inflammatory and the bone protective effect of preconditioning with fatty acids mixes (ω -3, ω -6 and ω -9) containing high ratio of ω -9/ ω -6 and low ratio of ω -6/ ω -3 on the experimental periodontal disease (EPD). EPD was induced by passing a 3.0 nylon thread around the upper left second molar in Wistar male rats. The animals were distributed into two groups: control and treated. Control group was subdivided in 3 subgroups: NORMAL, whose animals were not submitted to DPE and received no treatment, SALINE and Isolipidic (ISO), whose animals received saline or a isolipid solution mixture containing ω -6/ ω -3 oils (8:1 ratio) and ω -9/ ω -6 (0.4:1 ratio). Treated group included 3 subgroups: Mix 1, Mix 2 and Mix 3. The animals received anti-inflammatory and antioxidant mixtures of ω -6/ ω -3 (1.4:1 ratio) and ω -9/ ω -6 (3.4:1 ratio), differing only in source of ω -3: Mix 1 containing α -linolenic acid; Mix 2, composed of α -linolenic, docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids and Mix 3 containing α -linolenic, docosahexaenoic. In both groups (control and treated) the administration of oil/saline solution was performed daily by gavage, starting 7 days before the periodontitis induction until euthanasia on 11th day after surgery. Some animals was sacrificed in the sixth hour after surgery for gingival myeloperoxidase (MPO). The parameters assessed were alveolar bone loss (ABL), histological analysis, myeloperoxidase (MPO) and immunohistochemistry for inducible nitric oxide syntase (iNOS) and nuclear factor- κ B (NF- κ B). Experimental periodontitis caused significant increases in BLI and in inflammatory cell infiltrate in the gingival tissue and periodontal collagen disarrangement. Furthermore, was identified the presence of the epithelial cell rests of Malassez (ERM) in the proximity of the cementum and alveolar bone. Mix1,

which ω -3 is derived from ALA (flaxseed oil) was able to reduce the BLI and the inflammatory infiltrate in comparison with the SALINE e ISO. Mix 1 also decreased the demarcation to iNOS and NF- κ B. These results show that flaxseed oil intake has anti-inflammatory and bone protective effect on the experimental periodontal disease in Wistar rats.

Keywords: Periodontitis. Inflammation. Fatty acids. Flaxseed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Desenho esquemático do dente e do periodonto	19
FIGURA 2	Fotomicrografia do tecido periodontal para visualização dos Restos Epiteliais de Malassez (REM)	20
FIGURA 3	Fatores que contribuem para a patogênese da doença periodontal..	24
FIGURA 4	Estrutura dos ácidos graxos ômega-6 e 3	29
FIGURA 5	Classificação dos ácidos graxos, segundo a presença de dupla ligação.....	30
FIGURA 6	Mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária	32
FIGURA 7	Mediadores bioquímicos menos potentes que a cascata do ω -6, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune	33
FIGURA 8	Cálculo da área da perda óssea	39
FIGURA 9	Efeito dos Óleos sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) na doença periodontal experimental (DPE) em ratos	44
FIGURA 10	Aspecto macroscópico das maxilas em nível vestibular coradas com azul de metileno a 10% no décimo primeiro dia pós-cirurgia	45
FIGURA 11	Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival de ratos, 6 horas (A) e 11 dias (B) após a indução da doença periodontal experimental	46
FIGURA 12	Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos à DPE, que receberam Mix 1 ou SALINA, e de animais sem doença periodontal (NORMAL)	48
FIGURA 13	Avaliação dos restos epiteliais de Malassez	49
FIGURA 14	Visualização dos restos epiteliais de Malassez na região de segundo molar superior	50
FIGURA 15	Fotomicrografias mostrando a marcação de NF-kB no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental	51
FIGURA 16	Fotomicrografias mostrando a marcação da enzima NOSi no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental	52

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Soluções e composição com respectiva fonte de ω -3	38
TABELA 2	Escores histopatológicos, considerando o infiltrado inflamatório e a integridade do cimento e osso alveolar	41
TABELA 3	Efeito das misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratos	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AG	Ácido graxo
AGS	Ácido graxo saturado
AGPI	Ácido graxo poliinsaturado
ALA	Ácido α -linolênico
ANOVA	Análise de Variância
BSA	Soro de albumina bovina
C	Carbono
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	3,3-diaminobenzidine-peróxido
DHA	Ácido docosahexaenóico
DP	Doença periodonatal
DPE	Doença periodontal experimental
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de crescimento epitelial
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EPM	Erro padrão da média
g	Gramma
GI	Gengiva inserida
GL	Gengiva marginal livre
HE	Hematoxilina-eosina
HTAB	Tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio
IL	Interleucina
i.p.	Intraperitoneal
IPO	Índice de perda óssea
ISO	Solução isolipídica
JMG	Junção mucogengival
Kg	Quilograma
LA	Ácido linoléico
LAFICA	Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer
LP	Ligamento periodontal

LT	Leucotrieno
LX	Lipoxina
mg	miligrama
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
MMP	Metaloproteinases de matriz
MPO	Mieloperoxidase
NF-κB	Fator nuclear-kappa B
NK	Natural Killers
nm	nanômetro
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS _e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS _i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS _n	Óxido nítrico sintase neuronal
OA	Osso alveolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PA	Processo alveolar
PBS	Solução salina tamponada
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PMN	Polimorfonucleares
PPAR	Receptor de ativação de proliferação de peroxissomas
REM	Restos epiteliais de Malassez
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	Fator de necrose tumoral
TX	Tromboxano
UFC	Universidade Federal do Ceará

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
γ	Gama
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
=	Igual a
κ	Kapa
+	Mais
\pm	Mais ou menos
>	Maior que
<	Menor que
μL	Microlitro
μm	Micrometro
%	Porcentagem
ω	Ômega

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Periodonto	17
1.1.1	Gengiva	17
1.1.2	Ligamento Periodontal	17
1.1.3	Cemento Radicular	18
1.1.4	Osso Alveolar	18
1.1.5	Formação do periodonto de sustentação	19
1.2	Doença Periodontal	21
1.2.1	Mediadores envolvidos na doença periodontal	24
1.2.2	Modelo Experimental	26
1.3	Ácidos Graxos Ômega-3, 6 e 9	28
2.	JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	36
2.1	Objetivo Geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
3.	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	Animais	37
3.2	Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE)	37
3.3	Grupos Experimentais	37
3.4	Variáveis Avaliadas	39
3.4.1	Análise do Índice de Perda Óssea	39
3.4.2	Ensaio da mieloperoxidase	40
3.4.3	Análise Histopatológica	40
3.4.4	Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) e para o fator nuclear- kappa B (NF-κB).....	42
3.4.5	Análise Estatística	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a perda óssea alveolar na doença periodontal experimental em ratos	44
4.1.1	Avaliação do Índice de Perda Óssea	44
4.1.2	Avaliação macroscópica da hemiarcada superior de animais sem e com doença periodontal experimental	45
4.2	Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em gengiva	

	de ratos, 6 horas e 11 dias após a indução da doença periodontal experimental (DPE).....	46
4.3	Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas	47
4.3.2	Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a presença de Restos Epiteliais de Malassez	49
4.4	Imunohistoquímica	50
4.4.1	Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a imunomarcção para o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi)	50
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
	ANEXO	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Periodonto

O periodonto (peri = em torno de, odonto = dente) é definido como o conjunto de tecidos que circundam os dentes. Subdivide-se em periodonto de inserção (ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) e periodonto de proteção (gingiva). A principal função do periodonto é inserir o dente no tecido ósseo dos maxilares e manter a integridade da superfície da mucosa mastigatória da cavidade oral (BRAGA *et al.*, 2007). O periodonto, também chamado de “aparelho de inserção” ou “tecidos de suporte dos dentes”, forma uma unidade de desenvolvimento, biológica e funcional, que sofre determinadas alterações com a idade e, além disso, está sujeita a alterações morfológicas relacionadas a modificações funcionais e no meio bucal (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

O periodonto compreende os seguintes tecidos: a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento radicular e o osso alveolar (Figura 1).

1.1.1 Gengiva

É a parte da mucosa oral que cobre o processo alveolar e circunda a porção cervical dos dentes. Assume sua forma e textura definitivas em associação com a erupção dos dentes. A gengiva sadia é rosa, firme, terminando em margens afiladas. Divide-se em gengiva marginal livre e gengiva inserida. A gengiva marginal livre tem cor rósea, superfície opaca, consistência firme e, frequentemente, é arredondada, de modo a formar uma pequena invaginação ou sulco entre o dente e a gengiva. A gengiva inserida tem textura firme e cor rósea e, com frequência, mostra uma superfície que apresenta uns pontilhados delicados, o que lhe confere o aspecto de casca de laranja. É demarcada apicalmente pela junção mucogengival, onde a gengiva funde-se com a mucosa oral (Figura 1) (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

1.1.2 Ligamento Periodontal

É o tecido conjuntivo, ricamente vascularizado e celular que circunda as raízes dos dentes e une o cemento radicular à lâmina dura ou ao osso alveolar

propriamente dito. Em direção coronária, o ligamento periodontal é contínuo com a lâmina própria da gengiva e está separado da gengiva pelos feixes de fibras colágenas que conectam a crista do osso alveolar com a raiz (as fibras da crista alveolar). Suas fibras colágenas unem o cemento ao osso alveolar, resultando em uma firme ancoragem dentária. O colágeno tipo I é predominante (80%), mas apresentam também colágeno do tipo III e fibras elásticas, que estão incorporadas nas paredes dos vasos sanguíneos (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

1.1.3 Cimento Radicular

É um tecido mineralizado, especializado que reveste as superfícies radiculares e, ocasionalmente, pequenas porções das coroas dos dentes. Possui muitas características em comum com o tecido ósseo. Todavia, o cemento não contém vasos sanguíneos e linfáticos, não tem inervação, não sofre remodelação e reabsorção fisiológicas, porém se caracteriza pela formação contínua ao longo da vida. Como outros tecidos mineralizados, contém fibras colágenas embutidas em uma matriz orgânica. Sua porção mineral, composta principalmente por hidroxiapatita, corresponde à aproximadamente 65% de seu peso; um pouco mais que no osso (60%). O cemento desempenha diferentes funções, dentre as quais destacam-se, a inserção das fibras do ligamento periodontal na raiz e a contribuição para o processo de reparo após danos à superfície radicular (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

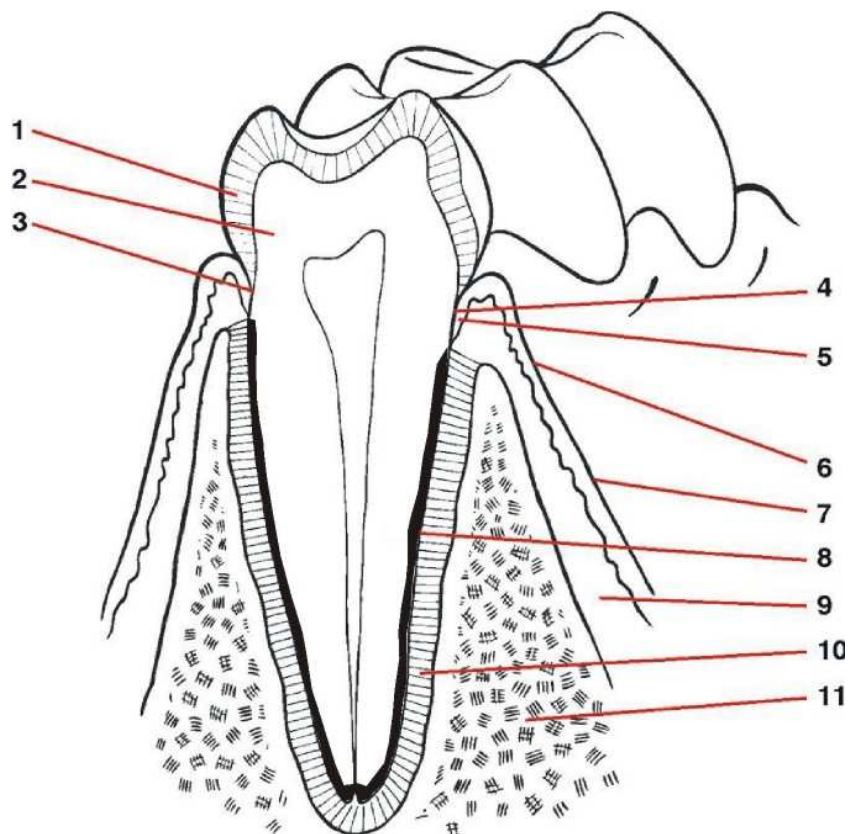
1.1.4 Osso Alveolar

O processo alveolar é definido como as partes da maxila e da mandíbula que formam os alvéolos dentários, cavidades nos ossos mandibulares e maxilares que alojam e dão suporte aos dentes. Desenvolve-se em associação com o desenvolvimento e a erupção dos dentes (LINDHE; LANG; KARRING, 2010). O osso alveolar propriamente dito é contínuo com o processo alveolar e forma a delgada lâmina óssea que reveste o alvéolo dentário. O osso alveolar está continuamente sofrendo remodelação como resultado de sua adaptação às necessidades funcionais (HOLMSTRUP, 2001).

Em conjunto com o cemento radicular e o ligamento periodontal, o osso alveolar constitui o aparelho de inserção dos dentes, cuja função principal é absorver e

distribuir as forças geradas pela mastigação e por outros contatos dentários (LINDHE; LANG; KARRING, 2010).

Figura 1. Desenho esquemático do dente e do periodonto.



1. Esmalte; 2. Dentina; 3. Junção esmalte-cemento/região cervical; 4. Epitélio juncional; 5. Epitélio sulcular oral; 6. Término da gengiva marginal livre e início da gengiva inserida; 7. Gengiva inserida; 8. Cimento; 9. Epitélio gengival oral; 10. Ligamento periodontal; 11. Osso ou processo alveolar.

Fonte: LEITÃO, 2002.

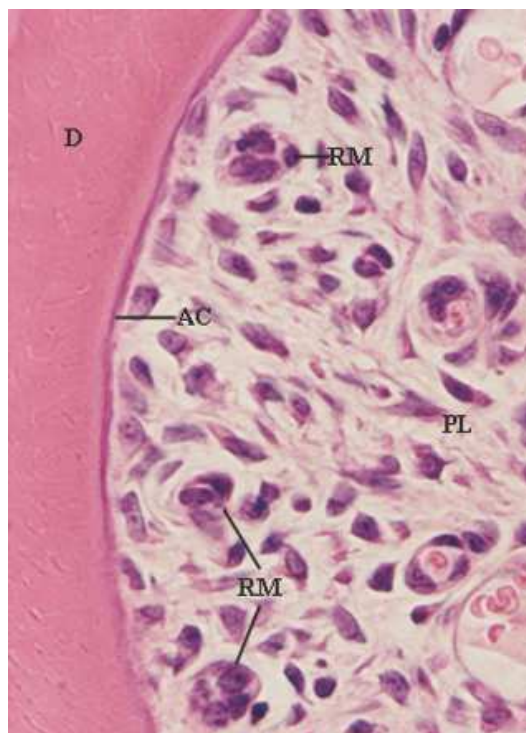
1.1.5 Formação do periodonto de sustentação

Durante o desenvolvimento do órgão dental, quando a formação do esmalte e da dentina coronária chega ao nível da união cimento-esmalte, o epitélio interno e externo do órgão do esmalte se une dando origem à bainha epitelial de Hertwig. Esta terá a função de modelar a forma da raiz, induzindo a deposição de dentina até a completa formação radicular (PROKOPOWITSCH, 2000).

As células da bainha radicular de Hertwig cessam sua proliferação, enquanto os odontoblastos recém-diferenciados formam dentina radicular, aumentando gradualmente o comprimento da raiz. Na região cervical, aparecem espaços, fenômeno

denominado fragmentação da bainha de Hertwig. O contínuo crescimento da raiz provoca aumento progressivo desses espaços, que coalescem, reduzindo a bainha a cordões celulares. Com o progresso dessa fragmentação, os cordões se rompem, constituindo grupos isolados de células, denominados restos epiteliais de Malassez (RAGO *et al.*, 2008) (Figura 2).

Figura 2. Fotomicrografia do tecido periodontal para visualização dos restos epiteliais de Malassez (REM).



Tecido periodontal corado com HE, demonstrando a ocorrência de restos epiteliais de Malassez (RM) no ligamento periodontal (PL) e nas proximidades do cemento acelular (AC) e da dentina (D). Aumento de 100x. Fonte: CERRI; GONÇALVES; SASSO- CERRI, 2009.

Durante muito tempo acreditou-se que os restos epiteliais de Malassez (REM) permaneciam na região apical do ligamento periodontal de forma latente, sem nenhuma atividade mitótica. No entanto, têm sido propostas várias funções para essas células epiteliais, variando desde a função de prevenção da reabsorção radicular, até um papel importante na manutenção da espessura do ligamento periodontal, prevenindo a anquilose. Durante o processo inflamatório periapical crônico, diversos fatores de origem bacteriana e/ou endógena, como as endotoxinas, os mediadores inflamatórios, as citocinas pró-inflamatórias e os fatores de crescimento, podem estimular a proliferação

epitelial dos REM (PEIXOTO, 2012). O seu desaparecimento poderia resultar em ossificação do ligamento, causando anquilose dento-alveolar (RAGO *et al.*, 2008).

1.2 Doença Periodontal

A Doença Periodontal (DP) é uma infecção crônica, produzida predominantemente por bactérias gram-negativas. É definida como uma doença sujeito e sito-específica, que evolui continuamente com períodos de exacerbação e de remissão, resultando de uma resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e seus produtos. A sua progressão é favorecida pelas características morfológicas dos tecidos afetados, o que a distingue de outras doenças infecciosas (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Com níveis de prevalência elevados, é considerada a segunda doença dentária mais comum na população humana de todo o mundo (ALMEIDA *et al.*, 2006). As doenças do periodonto ocorrem na infância, adolescência e juventude, mas a prevalência, a destruição tecidual e a perda dentária causadas pela doença periodontal aumentam com a idade. Muitas mudanças teciduais ocorrem com o envelhecimento, algumas das quais podem favorecer o desenvolvimento de doenças periodontais (FIGUEIREDO *et al.*, 2004) Os resultados do Projeto SB Brasil 2010 indicam que o percentual de indivíduos sem nenhum problema periodontal foi de 68% para a idade de 12 anos, 51% para a faixa de 15 a 19 anos, 17% para os adultos de 35 a 44 anos e somente 1,8% nos idosos de 65 a 74 anos (BRASIL, 2010), ou seja, 98,2% dos idosos brasileiros apresentam sinais e/ou sintomas de doença periodontal, representando um contingente de mais de 3 milhões de idosos que são desdentados em pelo menos um maxilar. Como as pessoas tendem a viver mais tempo e, para manter os dentes até idades mais avançadas, uma maior ocorrência de periodontite deve ser esperada (GALVÃO *et al.*, 2003).

As manifestações clínicas da doença são dependentes das propriedades agressoras dos microrganismos e da capacidade do hospedeiro em resistir à agressão (ALMEIDA *et al.*, 2006).

Microorganismos, normalmente, estão presentes na saliva, na língua, nas bochechas, nas superfícies dentárias e no sulco gengival. O número de bactérias na saliva pode ser medido em milhares por mililitro, mas a maior população de bactéria é

encontrada no dorso da língua. O sulco gengival sadio contém mais bactérias que as encontradas livres na saliva (ELEY; SOORY; MANSON, 2012). Uma higiene oral deficiente leva a um aumento da quantidade de microrganismos no biofilme, resultando em mudanças nos fatores ecológicos locais, o que levará a alterações nos microrganismos e permitirá o aparecimento de novas espécies (RODRIGUES; NEWMAN, 2002). Na doença periodontal, a população bacteriana do sulco se multiplica (ELEY; SOORY; MANSON, 2012).

As principais condições inflamatórias que acometem o periodonto são gengivite e periodontite (BRAGA *et al.*, 2007). A primeira é reversível, ao contrário da segunda que é irreversível (ALMEIDA *et al.*, 2006).

A gengivite é uma inflamação apenas do periodonto de proteção (gengiva) e é clinicamente caracterizada por mudanças na coloração do tecido gengival (hiperemia) e presença de sangramento a sondagem e, normalmente, associa-se a presença de placa bacteriana no sulco gengival (BRAGA *et al.*, 2007). Promove a fragilização das estruturas, o que possibilita um maior acesso dos agentes bacterianos agressores e/ou seus produtos às áreas subjacentes, podendo culminar num quadro de periodontite (ALMEIDA *et al.*, 2006). Uma vez estabelecida a gengivite, se não houver intervenção na formação continuada da placa bacteriana, pode desenvolver-se, em indivíduos suscetíveis, um quadro de periodontite (BRAGA *et al.*, 2007).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por microrganismos específicos, resultando em uma destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar, com formação de bolsa periodontal, retração gengival ou ambas (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004), podendo levar à perda do dente (BRAGA *et al.*, 2007, TOMOFUJI *et al.*, 2009). É considerada a maior causa de perda dentária em adultos (TODESCAN, 1995; ASSUMA *et al.*, 1998; IWASAKI *et al.*, 2010) e é a doença mais prevalente associada à perda óssea, incluindo a osteoporose (ASSUMA *et al.*, 1998). A perda dentária também tem sido associada com uma ingestão deficiente de determinados nutrientes e mudanças na preferência alimentar (IWASAKI *et al.*, 2011).

Para seu diagnóstico, há necessidade da realização de um exame clínico, com auxílio de uma sonda periodontal milimetrada, com o objetivo de evidenciar a presença de inflamação gengival e perda do tecido conjuntivo em volta do dente; e de um exame radiográfico para avaliação de perda óssea (LOPES; FELIPE, 2010).

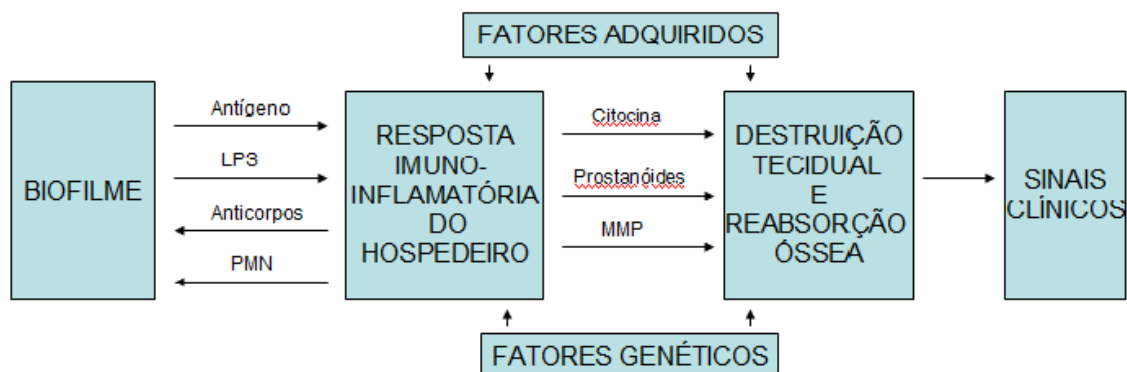
Histologicamente verifica-se o envolvimento da porção coronal da crista óssea, dano extenso às fibras do ligamento periodontal, migração apical do epitélio juncional a partir da junção cimento-esmalte, além da disseminação dos danos inflamatórios e imunológicos aos tecidos adjacentes à bolsa periodontal (AMADEI *et al.*, 2011).

A maioria dos microrganismos da placa bacteriana pode causar destruição tecidual por meio de duas formas: (1) diretamente, através da invasão do tecido pelos mesmos, os quais liberam substâncias nocivas que induzem morte celular e necrose tecidual; e, (2) indiretamente, por meio da ativação de células inflamatórias que produzem e liberam mediadores com potentes atividades pró-inflamatória e catabólica (BASCONES- MARTÍNEZ *et al.*, 2009).

A influência de fatores sistêmicos do hospedeiro na doença periodontal há muito tempo foi reconhecida. Dados mais recentes indicam que as doenças periodontais podem ter um impacto significativo em condições sistêmicas, tais como a ocorrência de doenças cardíacas, infarto ou nascimento pré-termo de bebês com baixo peso. Então, os fatores do hospedeiro podem agir localmente, reduzindo a resistência para a destruição dos tecidos periodontais, como um resultado do desafio bacteriano, e o desafio bacteriano pode produzir respostas locais ou sistêmicas que contribuem para a doença sistêmica (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004).

Os mecanismos imunoinflamatórios do hospedeiro são ativados por produtos bacterianos. Tal ativação induz a expressão de anticorpos, bem como a ativação de polimorfonucleares, numa tentativa de controlar o desafio bacteriano no sulco gengival. Além disso, citocinas e prostanóides, assim como as metaloproteinases de matriz (MMP) são ativadas por meio da resposta do hospedeiro, podem estimular os danos ao tecido conjuntivo e ao osso e moldar a apresentação clínica da doença (Figura 3) (KORNMAN, 2008). Acrescenta-se o fato de que MMP, como as collagenases, apesar de estarem envolvidas com a renovação tecidual, quando produzidas em grande quantidade desempenham papel crucial na degradação do tecido conjuntivo e reabsorção óssea (SILVEIRA; ALVES, 2009), enquanto que as prostaglandinas E₂ agem juntamente com as citocinas sobre os fibroblastos e osteoclastos, que também são levados a produzir MMP, o que estimula ainda mais a perda óssea e de inserção (OFFENBACHER; HEASMAN; COLLINS, 1993).

Figura 3. Fatores que contribuem para a patogênese da doença periodontal.



Fonte: adaptado de KORNMAN, 2008.

A inflamação é a característica patológica central, e a placa é o fator etiológico responsável pela indução do processo inflamatório do hospedeiro. O acúmulo de placa resulta de higiene bucal ineficaz e é complicado pela presença de fatores locais, tais como cálculo, restaurações desbordantes ou dentes apinhados e mal alinhados (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004). A inflamação local altera a microbiota normal, sendo que a presença de exsudato e de sangue favorece o crescimento de bactérias gram-negativas, com maior potencial patogênico (ROXO JUNIOR; GABRIELLI, 2004).

1.2.1 Mediadores envolvidos na doença periodontal

Muitas alterações teciduais associadas com a doença periodontal parecem ser respostas bem orquestradas, sugerindo a influência de uma regulação do hospedeiro. Entre as respostas orquestradas estão as atividades antimicrobianas por células inflamatórias agudas (neutrófilos) e atividades adaptativas trazidas por meio dos monócitos/ macrófagos e linfócitos (CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004).

Os neutrófilos estabelecem a primeira linha de defesa contra bactérias periodontopatogênicas (ÖVER *et al.*, 1993; BASCONES- MARTINEZ *et al.*, 2009) e são considerados os principais tipos celulares presentes na bolsa periodontal (BASCONES- MARTINEZ *et al.*, 2009). A diminuição do número de neutrófilos e/ou diminuição da sua função é prejudicial para a manutenção da saúde periodontal. Os neutrófilos contêm o material necessário para a fagocitose e morte de microrganismos

patogênicos, incluindo a lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, proteínas catiônicas e a mieloperoxidase (MPO) (ÖVER *et al.*, 1993, OZMERIC, 2004; CARRANZA; NEWMAN; TAKEI, 2004). A MPO, que está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, é uma enzima que desempenha uma função antimicrobiana devido às espécies reativas geradas a partir do sistema MPO- H₂O₂-haletos. Sugere-se que seja eficaz para erradicar a *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus* e um microrganismo periodontopático, a *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ÖVER *et al.*, 1993).

Devido à sua importância durante os processos inflamatórios, e por ser um indicador da presença de polimorfonucleares (PMN) nos tecidos, a MPO tem sido amplamente utilizada como um marcador inflamatório de condições agudas e crônicas. Além disso, mudanças de MPO também têm sido associadas com a gravidade de muitas doenças (QUEIROZ- JUNIOR *et al.*, 2009).

O controle clínico do processo inflamatório periodontal somente será possível com a caracterização de toda a microbiota presente nessa entidade. Caso a alteração na microbiota não seja contida de forma eficaz, a persistência de bactérias, como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, induzirá o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, tais como interleucina- 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a prostaglandina E₂ (PGE₂), resultando na seqüência de eventos que provocará destruição do tecido conjuntivo e do osso alveolar, com conseqüente aumento da gravidade da doença (ROXO JUNIOR; GABRIELLI, 2004).

Muitos mediadores inflamatórios, tais como IL-1 e TNF- α , têm sido encontrados em níveis elevados na presença da doença periodontal, o que os torna importantes nos testes de diagnósticos e de suscetibilidade (BRUNETTI, 2004). Vários estudos mostram que o TNF- α exerce um papel significativo na perda óssea, que é característica da doença periodontal (GRAVES, 2008).

Evidências crescentes sugerem que a ativação de enzimas proteolíticas, incluindo uma família de enzimas metal-dependentes chamadas metaloproteinases de matriz (MMP), é responsável pela destruição do colágeno durante doenças inflamatórias. As MMP são produzidas por macrófagos, fibroblastos residentes, queratinócitos, e a enzima pré-formada está presente nos polimorfonucleares (PMNs). A produção e liberação das MMP são reguladas por citocinas tais como TNF- α e IL-1 β . Estas citocinas liberam MMP por um mecanismo dependente de PGE₂ (LIMA *et al.*, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas 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 NOS_i, resulta na liberação de maior quantidade de NO (concentrações nanomolares) por períodos mais longos. Essa liberação de NO produz outras conseqüências biológicas, as quais incluem vasodilatação e danos aos tecidos do hospedeiro, resultando em apoptose, lesão tecidual e dor. No metabolismo ósseo, a produção constitutiva de pequenas quantidades de NO por osteoblastos desempenha um importante papel na regulação do crescimento dessas células, enquanto altas concentrações de NO, produzidas pela NOS_i, via ativação de citocinas, estão associadas à redução da formação óssea, observada em algumas condições clínicas, como na osteopenia inflamatória (LIMA *et al.*, 2008).

1.2.2 Modelo Experimental

A dificuldade de estudar a doença periodontal em humanos fez com que os pesquisadores utilizassem modelos experimentais para compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de etiopatogenia da doença e para avaliar modalidades de tratamento (ALMEIDA *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011; SOUZA; ROCHA, 2011).

A literatura científica utiliza como modelo de estudo experimental para a indução da doença periodontal os roedores, mais precisamente os ratos. Esses animais são frequentemente utilizados por oferecem algumas vantagens como: fácil manejo, avaliação microbiológica e exame histológico possíveis de serem realizados e preço acessível. Além disso, os aspectos clínicos, radiográficos e histológicos das doenças periodontais em ratos são parecidos com aqueles observados em humanos (SILVA; LOPES; STORRER, 2008). A estrutura do tecido periodontal na região de molar é similar à dos seres humanos (FERNANDES *et al.*, 2007). Histologicamente, algumas mudanças patológicas como ulcerações, migrações epiteliais e processos inflamatórios apicais podem ser reconhecidos em pesquisas com ratos (GALVÃO *et al.*, 2003; SILVA; LOPES; STORRER, 2008).

A indução da doença periodontal em ratos tem sido realizada fundamentalmente por três formas: (i) a inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos, que tem sido extensivamente estudada, com as características de uma infecção, um pouco diferente do que ocorre em humanos; (ii) a indução de uma ligadura ao redor da cervical do dente, o que permite o acúmulo de microrganismos subgingivais e (iii) a alimentação dos animais com uma dieta de promoção de placa supragengival, a fim de acumular naturalmente a placa supragengival sobre a área dentogengival, como, por exemplo, dieta rica em sacarose (GALVÃO *et al.*, 2003).

A ligadura para induzir periodontite em ratos foi descrita primeiramente em 1966 e é atualmente considerado como um dos modelos animais mais utilizados em pesquisas periodontais (DUARTE *et al.*, 2010). Segundo Galvão *et al.* (2003), o uso de ligaduras, na região subgingival dos molares é capaz de promover o processo inflamatório crônico nos ratos, independente do tipo da dieta. Uma ligadura de algodão, de seda ou de náilon é colocada na região cervical de molares maxilar ou mandibular de ratos para permitir o acúmulo de placa, induzindo alterações nos tecidos periodontais semelhantes às observadas na periodontite humana, incluindo a ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias e fibras do ligamento periodontal e perda óssea (DUARTE *et al.*, 2010).

Alguns autores observaram o deslocamento da margem gengival, acúmulo de placa bacteriana, aumento de infiltrado inflamatório no tecido subjacente, migração do epitélio juncional e reabsorção da crista óssea alveolar na região mesial dos dentes de ratos com periodontite induzida por meio de ligadura (GALVÃO *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2007).

Com o transcorrer do tempo, a prevalência da gengivite parece decrescer, enquanto aumenta reciprocamente a de periodontite. As regiões mais afetadas são os segmentos em torno dos dentes maxilares, onde a gengivite é mais severa que nos dentes mandibulares (LASCALA; MOUSSALLI, 1994).

Estudos com o uso de substâncias farmacológicas com propriedades antiinflamatórias, neutralizando alguns mediadores dos macrófagos ativados, demonstraram resultados significativos na contenção dos processos destrutivos da periodontite crônica. Além dos anti-inflamatórios não esteroidais, produtos naturais vêm sendo estudados no intuito de avaliar suas propriedades anti-inflamatórias e a sua ação no processo destrutivo do periodonto (RÊGO *et al.*, 2010).

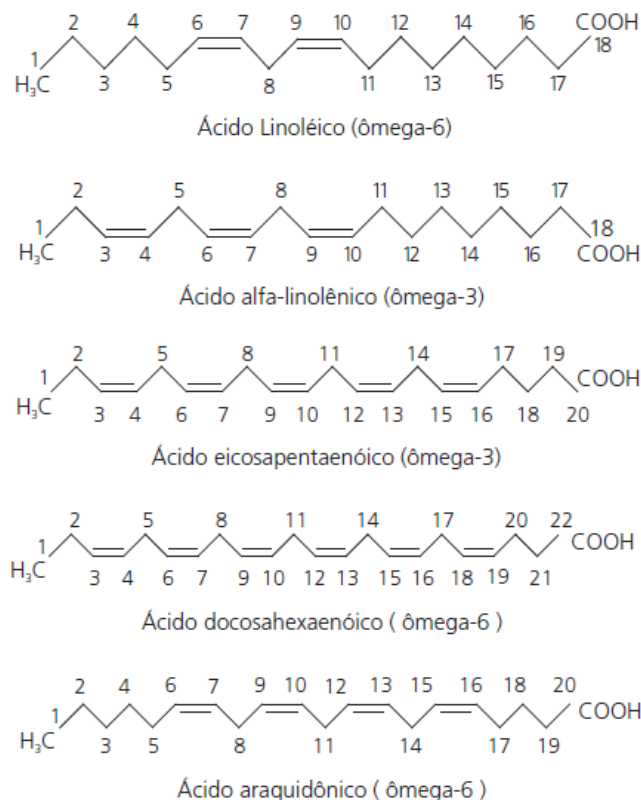
1.3 Ácidos Graxos Ômega-3, 6 e 9

Os lipídios desempenham uma variedade de funções celulares e são a principal forma de armazenamento de energia na maioria dos organismos. Atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis, como precursores de hormônios e determinados grupos são considerados funcionais (PERINI *et al.*, 2010).

Componentes lipídicos, principalmente os Ácidos Graxos (AG), se encontram distribuídos em todos os tecidos, principalmente nas membranas celulares e células de gordura (PERINI *et al.*, 2010). Ácidos graxos são ácidos orgânicos de moléculas lineares que podem ter de 4 a 22 carbonos em sua estrutura. Eles são classificados em saturados (sem dupla ligação), monoinsaturados (com uma dupla ligação) e poliinsaturados (com duas ou mais duplas ligações) (HIRAYAMA *et al.* 2006). Os ácidos graxos insaturados, por possuírem duplas ligações, são considerados quimicamente mais instáveis (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002).

Os ácidos graxos têm nomes sistemáticos, mas a maioria também tem nomes comuns e são descritos por uma nomenclatura abreviada, por exemplo, 18:2 n-6. Esta nomenclatura indica o número de átomos de carbono na cadeia, o número de ligações duplas na cadeia e a posição da primeira ligação dupla a partir do terminal da cadeia de metila (CALDER; GRIMBLE, 2002). Os átomos de carbono de número 2 e 3, adjacentes ao grupo carboxila, são denominados de carbonos α e β , respectivamente, enquanto que o último carbono é o ω - ou n-carbono (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002). Dependendo da posição da primeira ligação dupla, a partir da extremidade metila, os ácidos graxos insaturados são divididos em três famílias: ω -9, ω -6 e ω -3, quando a primeira ligação dupla é localizada entre o C9 e C10, C6 e C7, e C3 e C4, respectivamente (ALEXANDER, 1998; KELLEY, 2001).

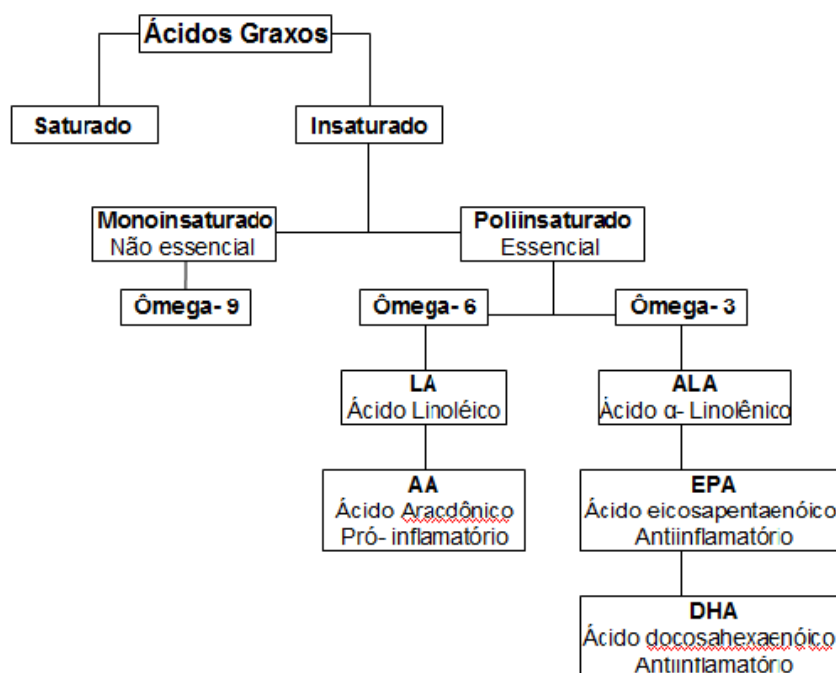
A série de ω -9 é representada pelo ácido oléico (18:1 ω -9), a de ω -6 é derivada do ácido linoléico (LA; 18:2 ω -6) e ácido araquidônico (AA; 20:4 ω -6). Outros ácidos graxos ω -6 importantes, porém menos abundantes na dieta que o LA, é o conjugado LA com γ -LA (18:3 ω -6). Dieta com ácidos graxos da família ω -3 inclui o ácido α -linolênico (ALA; 18:3 ω -3), eicosapentaenóico (EPA; 20:5 ω -3) e docosahexaenóico (DHA; 22:6 ω -3) (Figura 4) (KELLEY, 2001). O ω -3 e o ω -6 são ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), enquanto a maioria dos ω -9 são monoinsaturados (Figura 4) (ALEXANDER, 1998).

Figura 4. Estrutura dos ácidos graxos ômega-6 e 3.

Fonte: PERINI *et al.*, 2010.

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, porque as duplas ligações, situadas no terceiro e sexto átomos de carbono, não podem ser produzidas pelo organismo humano, de forma que os ácidos graxos essenciais devem ser obtidos a partir da dieta (Figura 5) (MESQUITA *et al.*, 2011; SUAREZ-MAHECHA *et al.*, 2002). 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). As enzimas necessárias para essa finalidade são as delta-9 e delta-15 dessaturases. Essas enzimas transformam o ácido oléico (18:1 ômega-9) em ácido linoléico (18:2 ômega-6) e ácido α -linolênico (18:3 ômega-3), ambos considerados ácidos graxos essenciais (AGE) (WAITZBERG, 2008).

Figura 5. Classificação dos ácidos graxos, segundo a presença de dupla ligação.



Fonte: adaptado de SANTUCCI, 2012.

O ácido linoléico e o ácido α -linolênico, porém, podem ser alongados e dessaturados pelo sistema enzimático (alongase e dessaturase) para produzir DHA e EPA, a partir de óleos vegetais provenientes da alimentação, porém isso ocorre em baixa percentagem. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (SUAREZ-MAHECHA *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2006).

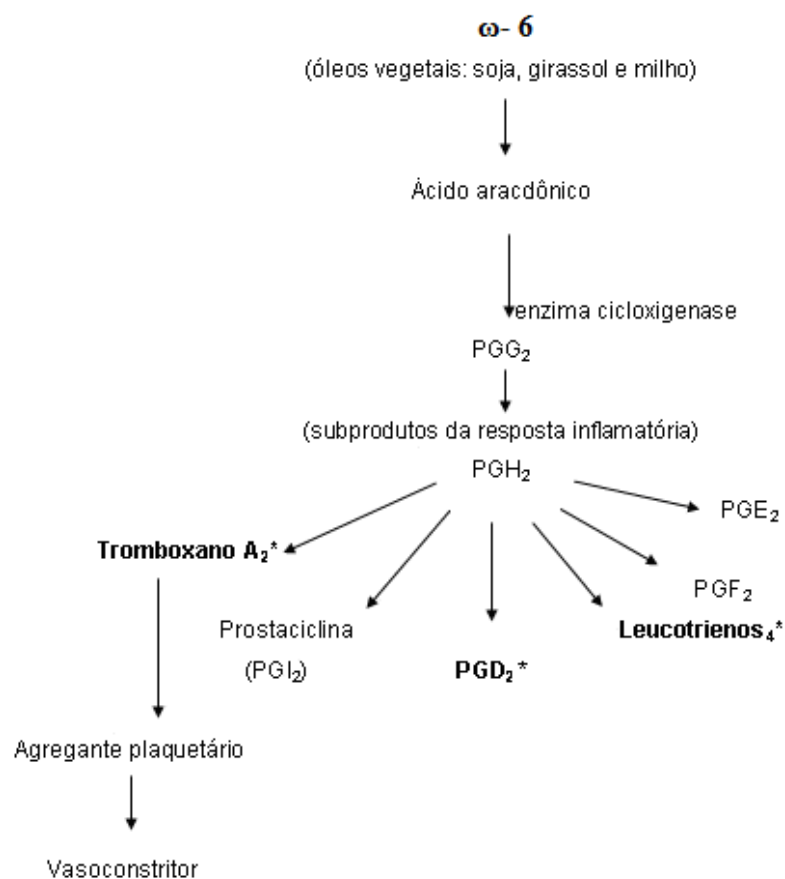
O AA e o EPA presentes nas membranas celulares podem ser metabolizados via lipoxigenases e ciclooxigenases para formar os eicosanóides (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002). Denominam-se eicosanóides um grupo de substâncias sinalizadoras que influenciam, como mediadores biologicamente ativos, um grande número de processos fisiológicos. Como substâncias de vida curta, essas agem apenas nas proximidades do seu local de produção (MARTINS; GRUEZO, 2009). O ácido linoléico (18:2 ω -6) forma o γ -linolênico (18:3 ω -6), que é convertido em ácido araquidônico, sendo este o precursor da síntese de eicosanóides. Os eicosanóides são produzidos nos tecidos, sendo responsáveis pela formação especificamente das prostaglandinas da série 2, tromboxano A (TXA) e leucotrienos da série 4, potentes

mediadores bioquímicos envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária (Figura 6) (HIRAYAMA *et al.*, 2006).

Em outra via, o α -linolênico (18:3 ω 3) é convertido, de forma lenta em ácido eicosapentanóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), precursores de mediadores químicos menos potentes, as prostaglandinas da série 3, tromboxano A e leucotrienos da série 5, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune (Figura 7). Os ácidos graxos ômega-3 favorecem a produção de prostaciclina, que tem os efeitos opostos ao ômega-6, isto é prevenir a formação de coágulos e causar vasodilatação (HIRAYAMA *et al.*, 2006). Existe uma competição entre os ácidos graxos essenciais ômega-3 (ácido α -linolênico) e ômega-6 (ácido linoléico) pela enzima de dessaturação Δ 6-dessaturase (BARBOSA *et al.*, 2007), que é uma chave metabólica clássica e comum para ambas as vias metabólicas (HIRAYAMA *et al.*, 2006), sendo que estas têm maior afinidade pelo ácido α -linolênico em detrimento do linoléico. Assim, os ácidos graxos EPA e DHA, produtos da conversão do ácido graxo α -linolênico (ômega-3), bloqueiam a ação da Δ 6 dessaturase, inibindo a conversão do ácido linoléico (ômega-6) a ácido araquidônico e, conseqüentemente, a produção de eicosanóides da série par, como prostaglandinas 2 e leucotrienos 4. Dessa forma, os ácidos graxos ômega-3 exercem um efeito protetor, impedindo os eicosanóides da série par de exercerem seus efeitos nocivos (BARBOSA *et al.*, 2007).

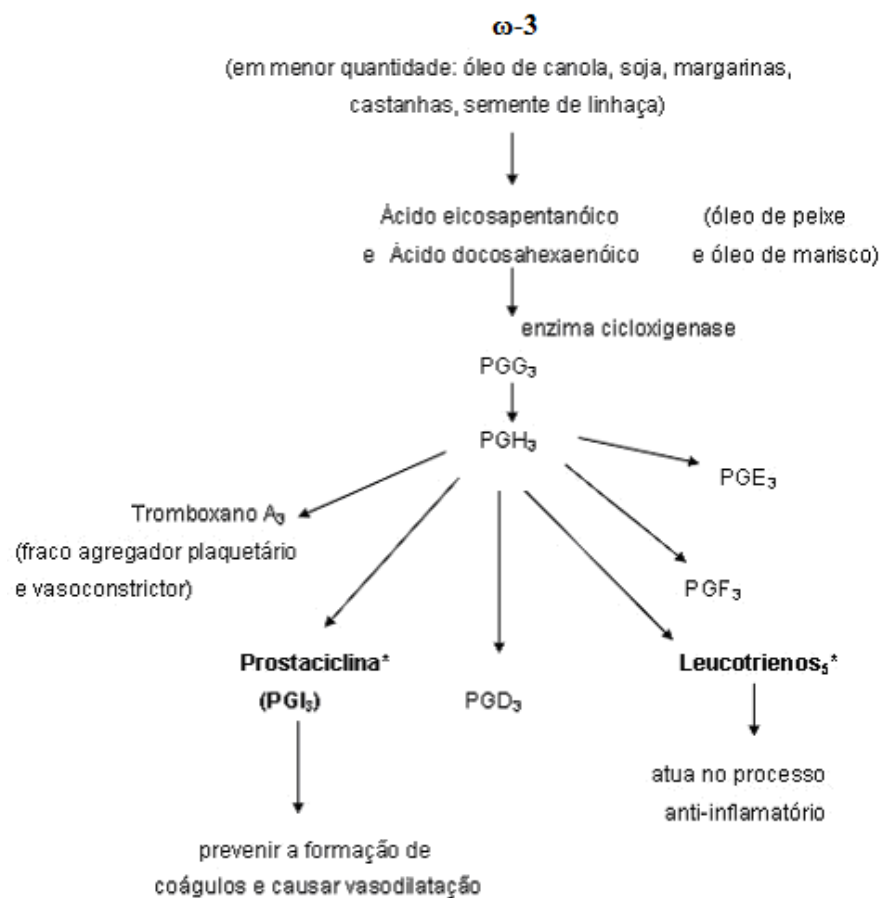
Por esse motivo, considera-se que o ω -3 tem papel maior no mecanismo de defesa do sistema imune, enquanto que o ω -6 participa de forma mais efetiva do processo inflamatório (HIRAYAMA *et al.*, 2006). O tipo e a quantidade de eicosanóides produzidos dependem do tipo de lipídio ingerido na dieta e da presença ou ausência de injúria ou inflamação (MOREIRA; CURI; MANCINI FILHO, 2002).

Figura 6. Mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária



Fonte: HIRAYAMA *et al.*, 2006.

Figura 7. Mediadores bioquímicos menos potentes que a cascata do ω -6, que atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune



Fonte: HIRAYAMA *et al.*, 2006.

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

Estudos prévios têm mostrado que dietas ricas em ômega-6 podem aumentar o risco de doenças crônicas associadas a um estado inflamatório. Por outro lado, um consumo elevado de ômega-3 parece reduzir o aparecimento de várias doenças, incluindo doenças coronarianas, diabetes tipo 2, artrites reumatóides, asma, depressão e

câncer. Tem-se sugerido que a proporção balanceada desses dois tipos de ácidos graxos pode ser necessária para prevenção e tratamento de doenças crônicas (IWASAKI *et al.*, 2011).

As quantidades de ácidos graxos e as proporções entre os ácidos graxos das famílias ω -6 e ω -3, ingeridas atualmente pelo homem, são difíceis de serem analisadas, pois dependem da fisiologia, disponibilidade de alimento e dieta de cada indivíduo. Ainda não foram precisamente estabelecidas as taxas mínimas do consumo de ácidos graxos das séries ω -3 e ω -6 para atender às exigências humanas destes nutrientes, porém, há necessidade de um equilíbrio entre as disponibilidades destes ácidos graxos na alimentação. De acordo com o *Institute of Medicine*, a relação satisfatória entre ω -6/ ω -3 é de 10:1 a 5:1 e de acordo com base em experimentação animal esta proporção seria de 1:150 enquanto hoje, em dietas ocidentais, a relação atinge 10 a 25:1, causando um desbalanceamento dos ácidos graxos no organismo humano (PERINI *et al.*, 2010). Recomenda-se também que a ingestão de ácido linoléico (ω -6) não deve exceder 10% do total de calorias (MARTINS; GRUEZO, 2009).

As principais fontes alimentares do ácido linoléico (ω -6) são: os óleos de soja, girassol e milho, e do ácido α -linolênico (ω -3) são: os óleos de linhaça, canola e peixes (MESQUITA *et al.*, 2011, PERINI *et al.*, 2010). O ácido α -linolênico ou ALA (ω -3) é encontrado em plantas, animais e espécies marinhas e em concentrações elevadas na semente de linhaça (*Linum usitatissimum*), onde a quantidade de ALA varia de 44,6 a 51,5 do total de ácidos graxos (PERINI *et al.*, 2010). DHA e EPA são ácidos graxos ω -3 encontrados em peixes oleosos e em óleos de peixe (IWASAKI *et al.*, 2010). Ácidos graxos ômega-9 são encontrados em castanhas de caju, azeitonas, abacate e óleo de canola. Em quantidades menores, eles também são encontrados em nozes, sementes de gergelim e girassol, amendoim, óleo de milho, trigo e aveia (SANTUCCI, 2012).

Estudos adicionais indicaram que os ácidos graxos ω -3 são essenciais durante todo o ciclo de vida. Muitos grupos científicos têm recomendado a provisão de uma dieta, de modo que os ácidos graxos ω -3 serão incluídos em fórmulas infantis e em soluções entéricas e parentéricas (SIMOPOULOS, 1991).

Investigar a relação entre a proporção de ω -6 e ω -3 na dieta e a doença periodontal é importante para indicar um valor para essa proporção e compreender o papel da modificação da dieta na prevenção e no tratamento da doença periodontal.

Além da prevenção fundamental da perda dentária, possível consequência da doença periodontal (IWASAKI et al., 2011).

Quando a relação entre ω -9 e ω -6 é maior que 1 (ω -9: ω -6 > 1), tem função anti-oxidante. Quando a relação entre ω -6 e ω -3 é menor que 4, tem função anti-inflamatória.

No presente estudo, serão avaliados óleos com elevadas proporções de ω -9: ω -6 e baixa proporção ω -6: ω -3, ou seja, com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, respectivamente, na prevenção da doença periodontal experimental em ratos. Esse estudo busca compreender, portanto, o impacto da dieta na prevenção de inflamação.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A utilização de anti-inflamatórios de maneira indiscriminada pela população é uma realidade, principalmente em países em desenvolvimento, onde a população não tem acesso facilitado aos serviços de saúde. Muitos destes fármacos apresentam efeitos adversos 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 e suas consequências à saúde (Mesquita *et al.*, 2011).

A osteoporose tem sido sugerida como um fator etiológico para doença periodontal por promover a diminuição óssea generalizada (SHEN *et al.*, 2004). GRIEL *et al.* (2007) relataram que a dieta com ácidos graxos pode beneficiar a integridade óssea. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no mundo, 13% a 18% das mulheres e 3% a 6% dos homens, acima de 50 anos, sofrem com a osteoporose. No Brasil, o número de pessoas que possuem a doença chega a 10 milhões e os gastos com o tratamento e a assistência no Sistema Único de Saúde (SUS), são altos. Só em 2010, o Sistema Único de Saúde (SUS) gastou aproximadamente R\$ 81 milhões para a atenção ao paciente portador de osteoporose e vítima de quedas e fraturas. Com o aumento da expectativa de vida, o número de casos deve aumentar consideravelmente. Portanto, faz-se necessário conhecer novas fontes de tratamento.

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o papel da dieta na prevenção da inflamação, por meio da administração diária das misturas de óleos de ômega-3, 6 e 9, com elevada proporção de ω -9: ω -6 e com baixa proporção de ω -6: ω -3, em animais submetidos à doença periodontal experimental (DPE), doença inflamatória crônica.

2.2 Objetivos Específicos:

- Estudar os efeitos das misturas de óleos (ω -3, ω -6 e ω -9), com elevada proporção de ω -9: ω -6 e com baixa proporção de ω -6: ω -3, na reabsorção óssea, no influxo de neutrófilos, nos restos epiteliais de Malassez e na expressão de NOSi e de NF- κ B;

Avaliar se a fonte de ω -3 interfere nos efeitos das misturas de óleo;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, com peso médio corporal de 180-200 gramas, procedentes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas, em número de 6 animais por gaiola, em ambiente com temperatura de 24°C em ciclo dia/noite de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

Todos os protocolos experimentais estão de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) contemplados no protocolo 62/2010 do Conselho de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (ANEXO).

3.2 Indução da Doença Periodontal Experimental (DPE)

Os animais foram anestesiados com tribromo 1% (1ml/100g) por via intraperitoneal (i.p). A DPE foi induzida pela inserção de fio de sutura de náilon (3.0) ao redor do segundo molar superior esquerdo. Previamente à passagem do fio, utilizou-se um guia nos espaços interproximais mesial e distal supracitado, a fim de facilitar a passagem do fio. Este foi adaptado de modo que o nó cirúrgico ficasse voltado para a face vestibular da boca do animal. O fio de sutura propicia acúmulo de placa bacteriana, promovendo subsequente inflamação e reabsorção óssea alveolar (LIMA *et al.*, 2000). Os animais foram sacrificados 6h ou 11 dias após a indução da doença periodontal por deslocamento cervical.

3.3 Grupos Experimentais

Os grupos tratados foram constituídos por animais submetidos à DPE, que receberam, por gavagem, doses diárias de 1,2 g mistura/kg/dia de óleo com a proporção 1,4:1 de ω -6/ ω -3 (efeito anti-inflamatório) e de 3,4:1 de ω -9/ ω -6 (efeito anti-oxidante). O que diferencia os grupos tratados são as diferentes fontes de ω -3: ALA, EPA e DHA, provenientes de linhaça, óleo de peixe e algas, resultando nos grupos denominados **Mix 1**, **Mix 2** e **Mix 3** (Tabela 1). As soluções foram administradas de 24/24 horas, sempre

no mesmo horário (período da manhã) e foram iniciadas 7 dias antes da indução da DPE até o dia do sacrifício.

Os grupos controle consistiram de:

1. Animais não submetidos à DPE e que não receberam qualquer tratamento (**NORMAL**);
2. Animais submetidos à DPE que receberam, por gavagem, 1,2 g mistura/kg/dia de solução isolipídica, contendo ω -6/ ω -3, numa proporção 8:1 (ação neutra do ponto de vista inflamatório) e ω -9/ ω -6, com 0,4:1 (**ISO**). A solução foi administrada diariamente (24/24h), 7 dias antes da indução da doença até o dia do sacrifício (Tabela1);
3. Animais submetidos à DPE que receberam diariamente 0,5 mL de salina por gavagem, 7 dias antes da indução da DPE até o dia do sacrifício (**SALINA**).

Tabela 1. Soluções e composição com respectiva fonte de ω -3.

Solução	Composição	Fonte de ω -3	Proporções
ISO	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 1	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico Óleo de linhaça	ALA	ω -6: ω -3= 1,4: 1 ω -9: ω -6= 3,8: 1
Mix 2	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico Óleo de peixe	ALA (35%) EPA (39%) DHA (26%)	ω -6: ω -3= 1,4: 1 ω -9: ω -6= 3,7: 1
Mix 3	ω -9 + ω -6 + ω -3 Óleo de canola Óleo de girassol rico em oléico DHA puro de algas	ALA (84%) DHA (16%)	ω -6: ω -3= 1,4: 1 ω -9: ω -6= 3,7: 1

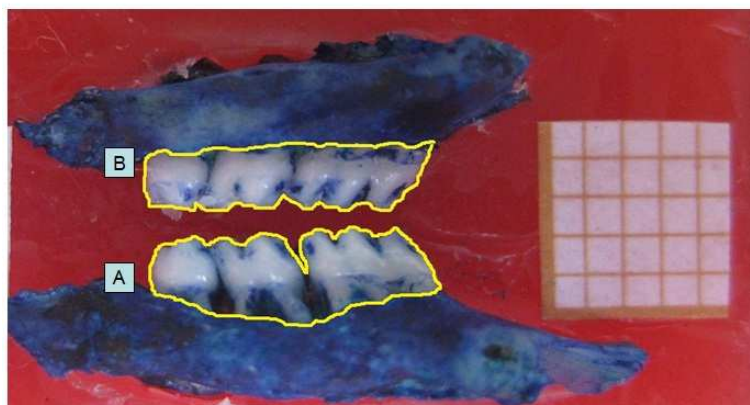
ALA= ácido α -linolênico; EPA= ácido eicosapentaenóico; DHA= ácido docosahexaenóico.

3.4 Variáveis Avaliadas

3.4.1 Análise do Índice de Perda Óssea.

Após 11 dias da indução da doença periodontal, os animais foram sacrificados e tiveram a maxila removida e fixada em formaldeído 10% por 24 horas. Após este período, as maxilas foram separadas em duas hemiarcadas (direita e esquerda), dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de se obter um contraste do osso com os dentes, os quais se coram com menos intensidade. As hemiarcadas foram montadas em cera utilidade para serem fotografadas e analisadas em software Image J (Media Cybernetics, CA, USA). O software calculou a área correspondente aos dentes e à perda óssea alveolar das hemiarcadas com DPE, da qual foi subtraída da área correspondente aos dentes na hemiarcada contralateral do mesmo animal, para a obtenção da área real da perda óssea alveolar de cada animal, denominada índice de perda óssea (IPO). Essa área foi calculada inicialmente em pixels, que foram posteriormente convertidos para mm² por meio do uso de um padrão de milímetros fixado ao lado de cada maxila durante as tomadas fotográficas (MENEZES et al., 2005) (Figura 8). Por fim, os dados obtidos foram inseridos em um programa para análise bioestatística (GraphPad Prism 5.0, San Diego, CA, USA).

Figura 8. Cálculo da área da perda óssea.



A: área correspondente aos dentes e à perda óssea alveolar das hemiarcadas com DPE. **B:** área correspondente aos dentes na hemiarcada contralateral do mesmo animal. Índice de perda óssea (IPO) = A-B. A área foi convertida de pixels para mm² por meio do padrão milimetrado fixado ao lado das arcadas. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.2 Ensaio da mieloperoxidase

A atividade de MPO, uma enzima encontrada principalmente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, tem sido utilizada como marcador quantitativo da infiltração neutrofílica no tecido inflamado, determinada por método colorimétrico e leitura final realizada em leitor de ELISA (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982).

Após o sacrifício, na sexta hora ou no décimo primeiro dia após a indução da DPE, uma porção da gengiva vestibular do 2º molar superior esquerdo foi coletada, pesada e congelada em freezer -80°C até a realização do ensaio. As amostras foram homogeneizadas em solução de HTAB 0,5% (Brometo de hexadeciltrimetilamônio), na proporção de 50mg de tecido por ml de HTAB. As amostras foram congeladas, descongeladas e trituradas mais uma vez, mantendo a mesma proporção tecido/HTAB, ou seja. Posteriormente as amostras foram centrifugadas (1500 g/12 min/4 °C), sob condições adequadas de refrigeração. O sobrenadante foi transferido para um Eppendorf® e novamente centrifugado (10 min) para melhor remoção de contaminantes. Após plaqueamento (placas de 96 wells) de 7 µL do sobrenadante, 200 µL da solução de leitura (5 mg O-dianisidine; 15 µL H₂O₂ 1%; 3 mL tampão fosfato; 27 mL H₂O), a absorbância das amostras foi medida a 450nm (t₀=0 min e t₁=1 min) em espectrofotômetro. Os níveis teciduais de atividade de MPO foram determinados utilizando-se o peróxido de hidrogênio como substrato. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de converter 1 µmol de peróxido de hidrogênio a água em 1 minuto a 22 °C (BARRETO *et al.*, 2008). No ensaio, à medida que o peróxido era degradado ocorria a produção de ânion superóxido, responsável pela produção de o-dianisidina em função do tempo de reação. A mudança na absorbância foi obtida, plotada em curva padrão de neutrófilos e os valores obtidos foram expressos como MPO/mg de tecido (atividade de MPO).

3.4.3 Análise Histopatológica

As análises histopatológicas foram realizadas em cortes seriados da hemiarcada. Decorridos 11 dias após a indução da DPE pela passagem do fio de náilon, os animais foram sacrificados e suas hemiarcadas, removidas. Estas foram fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a tratamento com

EDTA a 10% por aproximadamente 30 dias, para a desmineralização. A seguir, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 5 µm em micrótomo apropriado e as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE).

Para a análise microscópica das hemiarcadas coradas com HE, foi considerada a região entre os 1º e 2º molares, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar e cimento. Tais achados foram classificados de acordo com os escores padronizados no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer-LAFICA por LEITÃO *et al.* (2005) (Tabela 2). Ainda nas lâminas histológicas coradas em HE, analisou-se a presença e quantidade dos restos epiteliais de Malassez. Foram avaliados 5 campos por lâmina, no aumento de 100x. Os restos epiteliais de Malassez foram contados na região entre os 1º e 2º molares para avaliação estatística entre os grupos.

Tabela 2. Escores histopatológicos, considerando o influxo de células inflamatórias e a integridade do cimento e do osso alveolar.

Escore 0	Ausência ou apenas discreta infiltração celular (células do infiltrado inflamatórias são escassas e restritas à região da margem gengival) Processo alveolar e cimento preservados
Escore 1	Infiltrado celular moderado (infiltrado inflamatório presente por toda a gengiva inserida) Pequena reabsorção do processo alveolar Cimento preservado
Escore 2	Infiltrado celular acentuado (infiltrado inflamatório na gengiva e no ligamento periodontal) Degradação acentuada do processo alveolar Destuição parcial do cimento
Escore 3	Infiltrado inflamatório acentuado Reabsorção completa do processo alveolar Destuição severa do cimento

Fonte: LEITÃO *et al.*, 2005.

3.4.4 Imunohistoquímica para detecção da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) e para o fator nuclear kappa- B (NF-κB).

A imunohistoquímica para NOSi e NF-κB foi realizada utilizando o método de estreptavidina-biotina-peroxidase (HSU; RAINE, 1981). No 11º dia, os animais foram sacrificados e tiveram suas maxilas removidas, fixadas em formol a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas a tratamento com EDTA 10% para desmineralização. A seguir, as hemiarcadas foram suspensas em sulfato de sódio a 5%, sendo, então, incluídas em parafina. Após este procedimento, foram feitos cortes seriados de 4 µm em micrótomo apropriado e colocados em lâminas de L- polilissina, apropriadas para a realização de imunohistoquímica. Os cortes foram desparafinizados, hidratados em xilol e álcool e imersos em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0), sob aquecimento em forno de microondas, por 15 minutos para a recuperação antigênica. Após o resfriamento, obtido em temperatura ambiente por 20 minutos, foram feitas lavagens com solução tamponada de fosfato (PBS), intercaladas com o bloqueio da peroxidase endógena com solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos). Os cortes foram incubados *overnight* (4°C) com o anticorpo policlonal primário de coelho anti- NOSi (1:200) ou com anticorpo policlonal primário de coelho anti-fração p50 NLS de NF-κB (1:200). Todos os anticorpos foram diluídos em albumina sérica bovina (BSA) 5%. Após a lavagem, no dia seguinte, foi feita a incubação com o anticorpo secundário (de detecção) biotilado anti- IG de coelho, diluído 1:200 em BSA 5%, por 30 minutos. Depois de lavado, os cortes foram incubados com o complexo estrepto- avidina peroxidase conjugada (complexo ABC Vectastain®) por 30 minutos. Após nova lavagem com PBS, seguiu-se coloração com o cromógeno 3,3' diaminobenzidine- peróxido (DAB), seguida por contra- coloração com hematoxilina de Mayer. Por fim, realizou-se a desidratação das amostras e montagem das lâminas. Controles negativos foram processados simultaneamente como descrito acima, no entanto o anticorpo primário foi substituído por BSA 5%. A avaliação qualitativa foi realizada com base na comparação entre os grupos.

3.4.5 Análise Estatística

Para análise estatística foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 5.00 para Windows (San Diego, Califórnia, USA). Os resultados foram expressos como

média \pm erro padrão da média (EPM) ou mediana, acompanhada de valores extremos, de acordo com o parâmetro avaliado.

Para comparações entre os grupos foram utilizados: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni para comparar médias, e teste de Kruskal-Wallis e Dunn's para as medianas. Em todas as situações foi adotado o nível de significância $p < 0,05$.

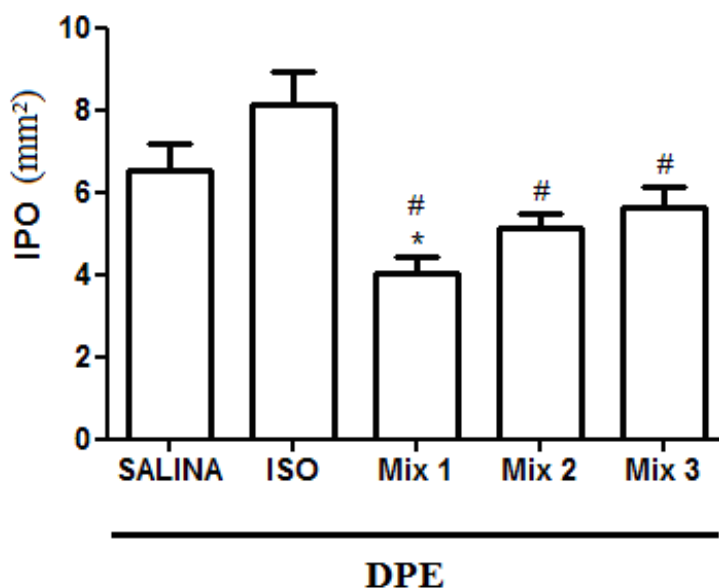
4. RESULTADOS

4.1 Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a perda óssea alveolar na doença periodontal experimental em ratos.

4.1.1 Avaliação do Índice de Perda Óssea

A indução da DPE nos animais que receberam solução salina (SALINA) ou solução isolipídica (ISO) resultou em perda óssea alveolar significativa em relação aos animais sem DPE, cujo IPO foi próximo de zero (dado não mostrado). Não se observou diferença estatística entre os grupos SALINA e ISO. O tratamento com Mix 1 foi capaz de prevenir, de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o IPO, representado pela redução na reabsorção óssea na face vestibular das maxilas em 39%, em relação ao grupo de animais com DPE que receberam salina e em 50% em relação aos animais que receberam a solução isolipídica. (Figura 9). Os animais tratados com Mix 2 e Mix 3 apresentaram redução na perda óssea alveolar em 37,5% e 31,3% respectivamente, em relação ao grupo ISO.

Figura 9. Efeito das misturas de óleos sobre o Índice de Perda Óssea (IPO) na doença periodontal experimental (DPE) em ratos.

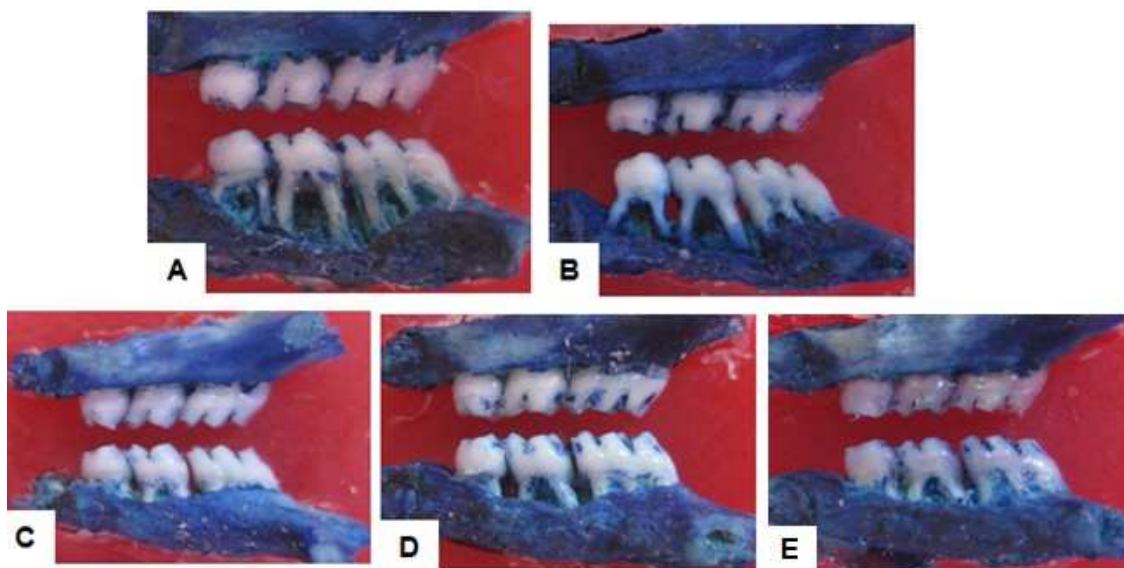


As barras representam média \pm EPM de no mínimo 5 animais com DPE por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SALINA; # $p < 0,05$ em relação ao grupo ISO (ANOVA, Bonferroni).

4.1.2 Avaliação macroscópica da hemiarcada superior esquerda de animais sem e com doença periodontal experimental

Observou-se, a partir da avaliação macroscópica das hemiarcadas de ratos submetidos à DPE que receberam salina (Figura 10-A) ou solução isolipídica (ISO) (Figura 10-B), que a presença da ligadura com fio de náilon foi capaz de induzir a doença periodontal e os principais sinais clínicos que a caracterizam, tais como: reabsorção óssea alveolar, com exposição de raízes, quando comparado à hemiarcada correspondente que não recebeu a ligadura (Figuras 10-A, 10-B, 10-C, 10-D e 10-E). Observou-se redução da perda óssea nos grupos de animais submetidos à DPE e tratados com Mix 1 (Figura 10-C), Mix 2 (Figura 10-D) e Mix 3 (Figura 10-E), em relação aos grupos SALINA (Figura 10-A) e ISO (Figura 10-B).

Figura 10. Aspecto macroscópico das maxilas em nível vestibular coradas com azul de metileno a 10% no décimo primeiro dia pós-cirurgia.



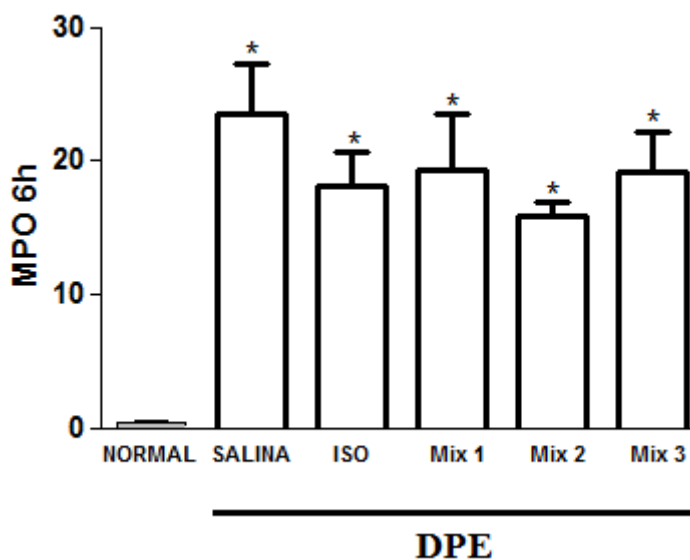
A: Maxila de animal com DPE, no qual foi administrada salina, mostrando intensa destruição óssea alveolar e exposição das raízes. **B:** Maxila de animal submetido à DPE e que recebeu solução isolipídica, revelando resultado semelhante ao anterior. **C:** Maxila de animal com DPE que recebeu Mix 1, mostrando uma redução da perda óssea alveolar. **D:** Maxila de animal com DPE, que recebeu Mix 2, mostrando uma considerável diminuição da reabsorção óssea alveolar. **E:** Maxila de animal submetido à DPE, no qual foi administrado Mix 3, mostrando reabsorção óssea alveolar, porém, nitidamente menor que as observadas nos grupos salina e ISO.

4.2 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em gengiva de ratos, 6 horas e 11 dias após a indução da doença periodontal experimental (DPE).

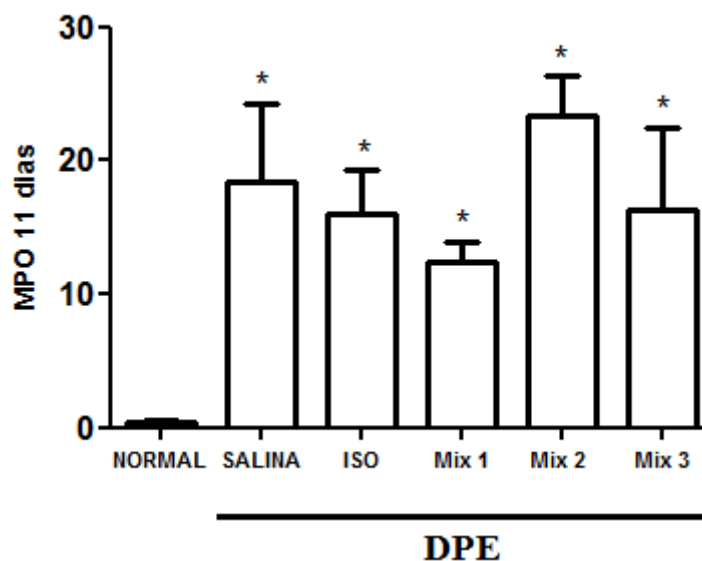
A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e pode ser considerada um indicador do acúmulo de neutrófilos no tecido (BRADLEY; CHRISTENSEN; ROTHSTEIN, 1982). Observou-se aumento significativo ($p < 0,05$) da atividade da MPO na 6ª hora (Figura 11-A) e 11 dias (Figura 11-B) após a indução da DPE, nos grupos SALINA e ISO em relação aos animais que não foram submetidos à DPE (NORMAL). A administração dos Mix 1, Mix 2 ou Mix 3 não foi capaz de prevenir o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase induzido pela DPE, nem na 6ª hora (Figura 11-A) e tampouco no 11º dia (Figura 11-B).

Figura 11. Atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival de ratos, 6 horas (A) e 11 dias (B) após a indução da doença periodontal experimental (DPE).

A



As barras representam média \pm EPM de no mínimo 5 animais com DPE por grupo. *representa diferenças estatísticas em relação ao grupo NORMAL, $p < 0,05$ (ANOVA, Bonferroni).

B

As barras representam média \pm EPM de no mínimo 5 animais com DPE por grupo. *representa diferenças estatísticas em relação ao grupo NORMAL, $p < 0.05$ (ANOVA, Bonferroni).

4.3 Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas

A tabela 3 representa os escores atribuídos às análises histopatológicas das maxilas. A partir dos cortes seriados das hemiarcadas, observou-se que a administração do Mix 1 reduziu de forma estatisticamente significativa as alterações histopatológicas observadas na DPE em relação aos grupos SALINA e ISO.

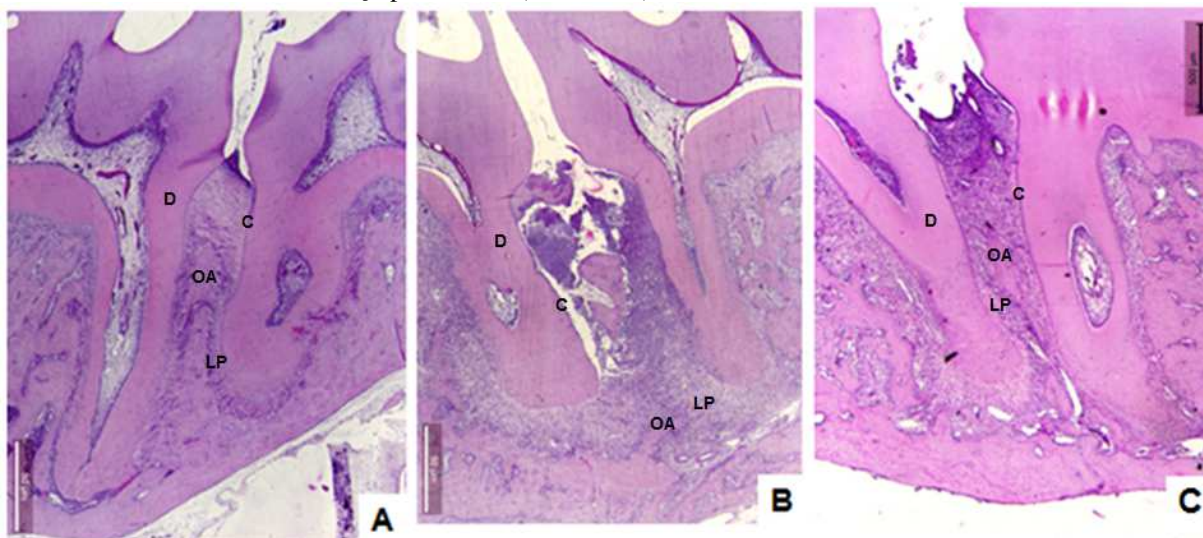
A análise das maxilas dos animais submetidos à DPE que receberam SALINA (Figura 12-B) mostrou a presença de infiltrado celular, reabsorção do osso alveolar e destruição do cimento em relação ao grupo NORMAL, sem a doença (Figura 12-A). Nos animais que receberam Mix 1 (Figura 12-C) observou-se discreto infiltrado celular e preservação do processo alveolar e cimento em relação ao grupo SALINA (Figura 12-B) e ISO (dado não mostrado).

Tabela 3. Efeito das misturas de óleos ômega 3, 6 e 9 sobre as alterações histopatológicas observadas na DPE em ratos.

	Tratamentos					
	NORMAL	SALINA	ISO	Mix 1	Mix 2	Mix 3
Escores	0 (0-0)	3 (3-3)	3 (3-3)	1 (1-1)*	1,5 (1-2)	2,5 (2-3)

Os dados representam Mediana e variação de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1° e 2° molares foram consideradas para análise dos seguintes parâmetros: presença de infiltrado celular e grau de preservação do processo alveolar e cemento. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas entre os animais com DPE que receberam Mix 1 e os grupos SALINA e ISO (Kruskal-Wallis e Dunn's).

Figura 12. Fotomicrografias de periodontos de animais submetidos à DPE, que receberam Mix 1 ou SALINA, e de animais sem doença periodontal (NORMAL):



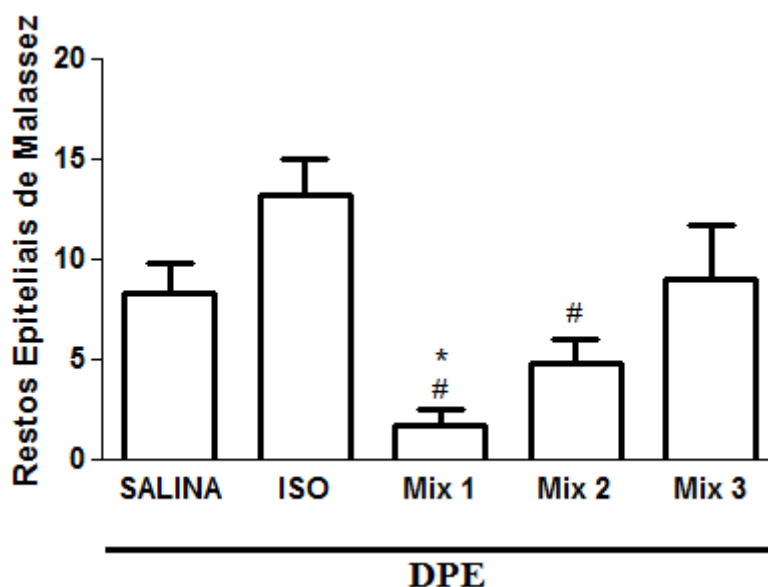
As regiões entre os 1° e 2° molares foram analisadas. **A:** Periodonto de animais normais que não foram submetidos à DPE (NORMAL). **B:** Periodonto de animais submetidos a DPE e que receberam salina (SALINA). **C:** Periodonto de animais com DPE e que receberam Mix 1, mostrando presença de discreto infiltrado celular e preservação do processo alveolar e do cemento, em comparação ao periodonto de animais com DPE que receberam salina (B). Aumento de 40x. D = dentina; OA = Osso alveolar; C = cemento e LP = ligamento periodontal.

4.3.2 Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a presença de Restos Epiteliais de Malassez

A figura 13 mostra a diferença entre os grupos do número de restos epiteliais de Malassez, por área, entre os grupos analisados.

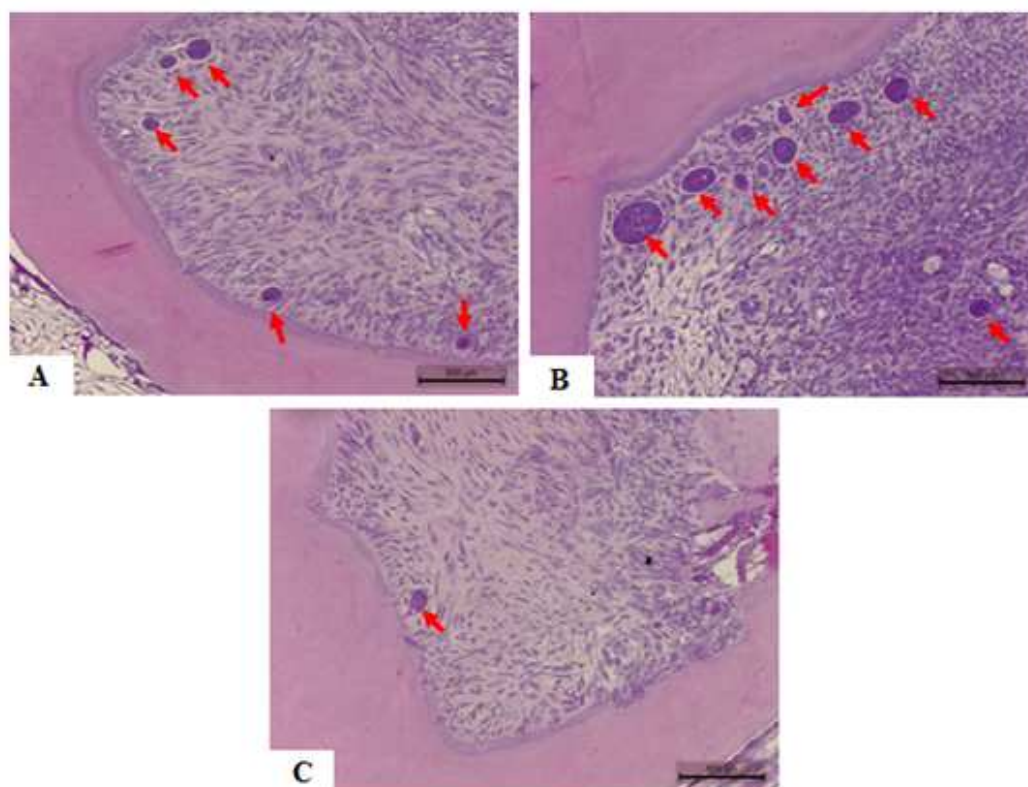
A partir da análise histológica das hemiarçadas coradas em HE, observou-se que a indução da doença periodontal resultou no aumento de restos epiteliais de Malassez, observados entre o 1º e 2º molar (Figura 14-B) em relação ao grupo NORMAL (Figura 14-A). O grupo que recebeu administrações do Mix 1 (figura 14-D) apresentou menor quantidade dessas células em relação aos grupos SALINA e ISO (Figura 14-B e 14-C respectivamente).

Figura 13. Quantificação da presença dos restos epiteliais de Malassez na doença periodontal experimental



Os dados representam o número de restos epiteliais de Malassez por área, de pelo menos 5 animais, onde as regiões entre os 1º e 2º molares foram consideradas. Foram analisadas 4 áreas. Aumento de 100x. * $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas em relação ao grupo SALINA; # $p < 0,05$ representa diferenças estatísticas em relação ao grupo ISO (ANOVA/Bonferroni).

Figura 14. Visualização dos restos epiteliais de Malassez na região de segundo molar superior.



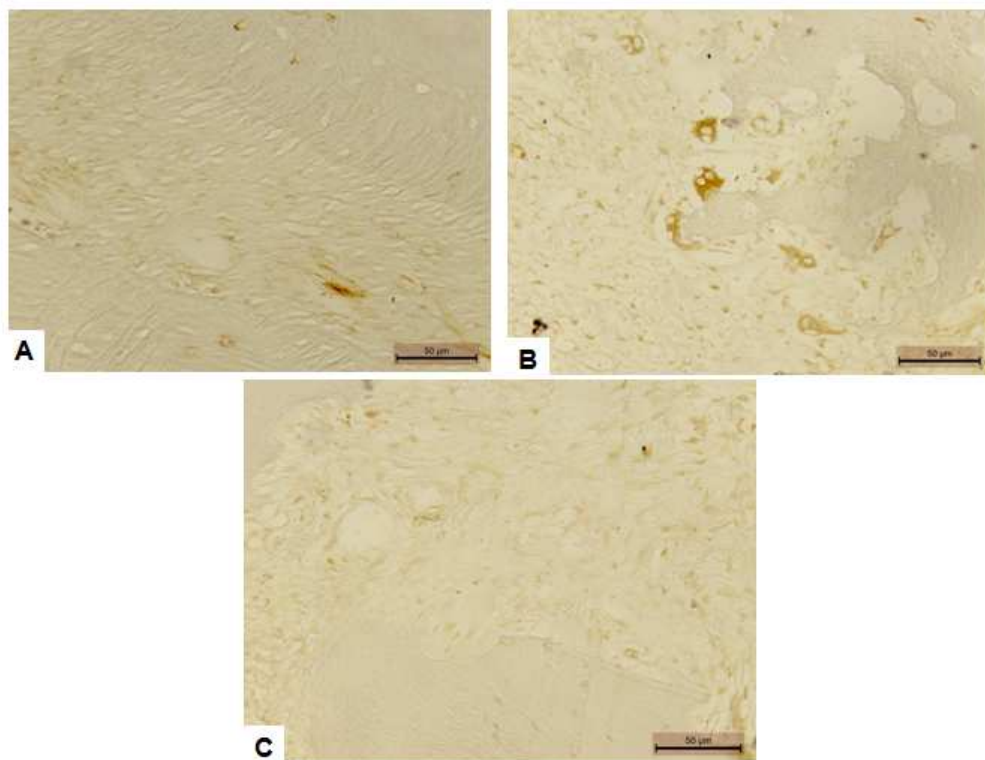
A: SALINA; **B:** ISO; **C:** Mix 1, mostrando diferentes quantidades de restos epiteliais de Malassez (setas) entre os grupos. Aumento de 100x.

4.4 Imunohistoquímica

4.4.1 Efeito das misturas de ômega-3, 6 e 9 sobre a imunomarcção para o fator nuclear- κ B (NF- κ B) e óxido nítrico sintase induzida (NOSi).

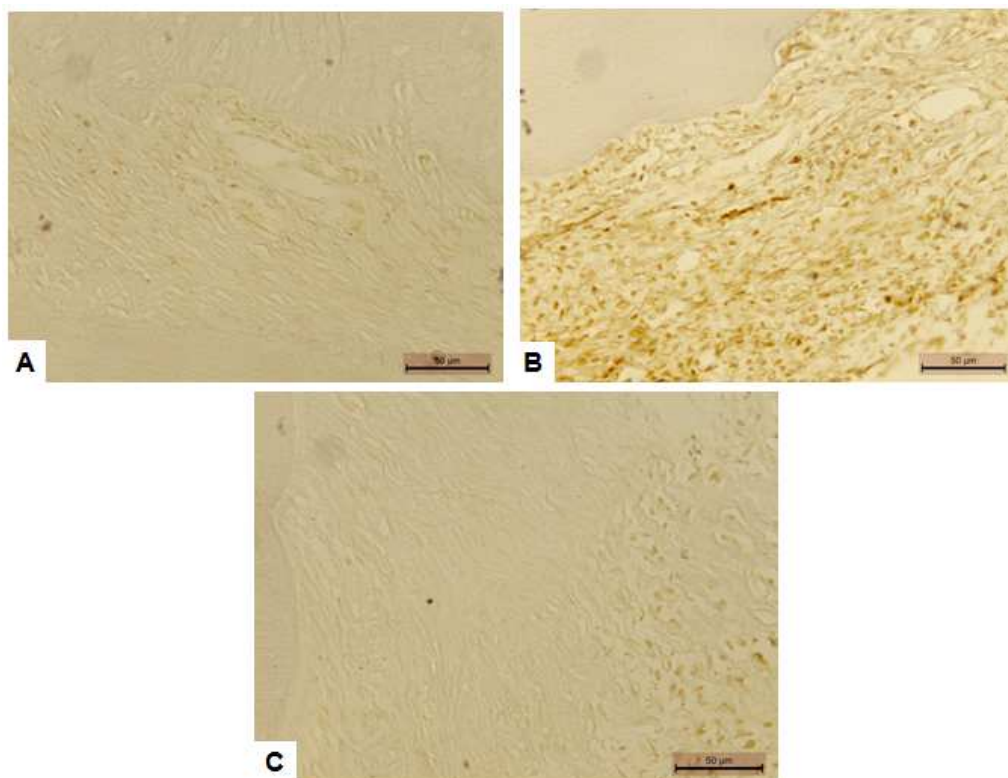
As figuras que se seguem mostram a expressão de NF- κ B (Figura 15) e da enzima NOSi (Figura 16) nos tecidos periodontais de ratos submetidos à doença periodontal experimental por 11 dias.

Figura 15. Fotomicrografias mostrando a marcação de NF-kB no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental.



A marcação foi realizada nas hemi-maxilas obtidas dos grupos NORMAL (A), SALINA (B) e Mix 1 (C). Células marcadas positivamente são claramente observadas nos tecidos gengivais retirados do grupo salina, enquanto que poucas células marcadas foram observadas nos espécimes provenientes dos ratos sem DPE (NORMAL) ou que receberam Mix 1. Aumento de 400x

Figura 16. Fotomicrografias mostrando a marcação da enzima NOSi no periodonto de ratos submetidos à doença periodontal experimental.



A marcação foi realizada nas hemi-maxilas obtidas dos grupos NORMAL (A), SALINA(B) e Mix 1 (C). Células marcadas positivamente são claramente observadas nos tecidos gengivais retirados do grupo salina, enquanto que poucas células marcadas foram observadas nos espécimes provenientes dos ratos sem DPE (NORMAL) ou que receberam Mix 1. Aumento de 400x.

As figuras acima mostram claramente que o Mix 1 foi capaz de reduzir a expressão de NF-kB e da enzima iNOS na gengiva dos ratos submetidos à DPE. Esse mesmo grupo apresentou ainda menos osteoclastos e mais osteoblastos.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo, de acordo com trabalhos citados na literatura, demonstrou que o uso de ligadura como meio de indução de periodontite é um método eficiente, capaz de causar alterações teciduais significativas (ALMEIDA *et al.*, 2007; SILVA; LOPES; STORRER, 2008; TOMOFUJI *et al.*, 2009). A colocação do fio de náilon entre os 1º e 2º molares de ratos induziu intensa reabsorção óssea alveolar, observada pelas análises macro e microscópicas, no 11º dia pós cirúrgico, semelhante ao que acontece na doença periodontal em humanos. Esses dados estão de acordo com estudos prévios realizados no Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do Câncer - LAFICA - que demonstraram perda óssea alveolar a partir do 3º dia após a cirurgia, atingindo valores máximos de destruição periodontal no período compreendido entre os 7º e 11º dias pós-cirúrgicos. No 11º dia foi constatado intenso infiltrado celular, além da destruição total do processo alveolar e do cemento (LIMA *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005). No presente estudo, corroborando com os resultados da morfometria e também reforçando estudos anteriores, a análise histopatológica, realizada no 11º dia pós-cirúrgico, das hemiarcadas dos animais submetidos à cirurgia e que receberam apenas salina (SALINA) ou solução isolipídica (ISO), apresentou características clássicas da doença periodontal induzida, evidenciadas também por LIMA *et al.*, 2000; LEITÃO *et al.*, 2004: destruição do osso alveolar e do cemento, bem como desorganização das fibras colágenas do periodonto e infiltrado de células polimorfonucleares no tecido conjuntivo. Esse achado está de acordo com trabalhos que evidenciam destruição severa de fibras colágenas durante a progressão da doença periodontal em ratos (MENEZES *et al.*, 2012), deixando espaços que vão sendo ocupados progressivamente por células inflamatórias e tecido conjuntivo frouxo periodontal. Por esse motivo, o 11º dia foi o selecionado para o sacrifício no presente estudo.

A administração do Mix 1, produzido a partir da linhaça, uma rica fonte de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente de ALA, preveniu, de forma significativa, a perda óssea alveolar, observada a partir da análise do índice de perda óssea (IPO) da hemiarcada dos animais com periodontite induzida, após 11 dias de tratamento, em 39% e 50% em relação aos grupos controles SALINA e ISO, respectivamente. Os grupos que receberam os Mix 2 ou Mix 3, cujas fontes de ômega-3 (ω -3) são provenientes do óleo de peixe ou alga, respectivamente, não apresentaram diferença estatística no IPO em

relação ao grupo SALINA, mas apenas em relação ao grupo isolipídico (ISO). Vale ressaltar que não se observou significância estatística entre os grupos SALINA e ISO na análise macroscópica (IPO). Provavelmente, esse achado deva-se à limitação do modelo experimental utilizado, que apresenta, no 11º dia de experimento, destruição total do processo alveolar e do cimento (LIMA *et al.*, 2000; MENEZES *et al.*, 2005). Nesse caso, se a perda óssea fosse avaliada previamente, como por exemplo no 7º dia de experimento, possivelmente seria observado diferença estatística entre os grupos ISO e SALINA. A análise histopatológica reforça os achados macroscópicos, uma vez que não se observou diferenças significantes entre os escores histológicos atribuídos aos grupos ISO e SALINA. Novos experimentos, no entanto, antecipando o dia do sacrifício, são necessários para determinar se a administração da solução isolipídica (ISO) é capaz de exacerbar o processo inflamatório induzido pelo posicionamento do fio de náilon.

A análise histológica ratifica os dados coletados na avaliação do IPO, demonstrando que a administração do Mix 1 foi capaz de prevenir o dano aos tecidos periodontais. Observou-se, nas hemiarçadas dos animais desse grupo, maior preservação do osso alveolar e cimento, além de maior integridade das fibras do ligamento periodontal e discreto infiltrado inflamatório quando comparado com as hemiarçadas dos animais dos grupos SALINA e ISO. O estudo histológico não evidenciou diferenças significantes entre os grupos Mix 2 ou Mix 3 em relação aos controles SALINA e ISO, grupos que apresentaram severa destruição dos tecidos periodontais. A análise histopatológica foi imprescindível para definir se a administração dos Mix 2 ou Mix 3 apresentaram efeitos positivos na prevenção da perda óssea induzida pela doença periodontal no presente trabalho. Os dados coletados a partir do índice de perda óssea, isoladamente, não esclarecem se essas duas misturas apresentam efeitos benéficos na preservação do tecido ósseo, visto que os grupos Mix 2 e Mix 3 apresentaram menor índice de perda óssea (estatisticamente significante) quando comparados ao grupo ISO, mas não ao grupo SALINA.

Os resultados encontrados estão de acordo com estudos prévios, que concluíram que o suplemento com linhaça ou com óleo de linhaça, em adultos, parece ser benéfico ao osso, possivelmente pela inibição da reabsorção óssea (KIM; ILICH, 2011), via redução da atividade de osteoclastos, relatada como uma das consequências da suplementação da dieta com ácidos graxos ω -3 (SUN *et al.*, 2003). De fato, a avaliação histopatológica realizada no presente estudo detectou uma menor quantidade

de osteoclastos no grupo que recebeu Mix 1 quando comparado ao grupo SALINA e ISO (dados não mostrados).

Um estudo avaliando o efeito da incorporação de nozes e linhaça, como fontes de ALA, na dieta de homens de meia idade com osteoporose, demonstrou efeitos benéficos de ALA na saúde óssea, uma vez que se detectou redução significativa dos níveis séricos de N-telopeptídeos, um marcador da reabsorção óssea, e níveis séricos estáveis de fosfatase alcalina óssea, proteína secretada pelos osteoblastos e utilizada como indicador da formação do tecido ósseo. N-telopeptídeos estão relacionados à reabsorção óssea, uma vez que são originados a partir da quebra proteolítica do colágeno presente no osso pela ação de osteoclastos (GRIEL *et al.*, 2007). Estudos sugerem que o óleo de linhaça contribui para a diminuição da reabsorção óssea, via inibição da biossíntese de citocinas, mediadores fortemente associados à fisiopatologia da doença periodontal (GRIEL *et al.*, 2007; ABDELKARE *et al.*, 2011).

As principais citocinas envolvidas na periodontite são a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as quais são encontradas em concentrações elevadas tanto no periodonto de animais submetidos à periodontite experimental (LIMA *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2004), assim como no tecido gengival de pacientes acometidos pela doença periodontal (MENEZES *et al.*, 2012). Os níveis destas citocinas no sulco gengival relacionam-se diretamente à severidade da doença periodontal e são reduzidos após o tratamento (GORSKA *et al.*, 2003). Está bem estabelecido na literatura que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, estimula a produção de mediadores catabólicos do tecido conjuntivo e do osso, como a própria IL-1, IL-6, TNF- α e metaloproteinases de matriz (MMP), amplificando a resposta inflamatória e recrutando e ativando osteoclastos, culminando com a reabsorção óssea (PAQUETTE; WILLIAMS, 2000).

O efeito protetor do Mix 1, observado no presente estudo, pode estar, em parte, associado à diminuição na liberação de TNF- α , como consequência da suplementação diária com ALA, efeito descrito na literatura (ZHAO *et al.*, 2007). Reforçando essa hipótese, tem sido demonstrado que uma dieta rica em semente de linhaça, fonte de ALA, reduz os efeitos sistêmicos do TNF- α tanto em humanos (CAUGHEY *et al.*, 1996), como em camundongos, resultando no aumento do conteúdo mineral ósseo desses animais (COHEN; MOORE; WARD, 2005). De fato, trabalhos demonstram a participação de TNF- α na reabsorção óssea e também na inibição da síntese de colágeno *in vitro* (BERTOLINI *et al.*, 1986) devido aos seus efeitos

autócrinos (ZOU *et al.*, 2001) e sistêmicos (KONIG; MUHLBAUER; FLEISCH, 1988; LI *et al.*, 2004).

A redução do TNF- α pode estar relacionada com a inibição do fator nuclear κ B (NF- κ B), um fator de transcrição que regula a expressão de múltiplos genes imunes e inflamatórios. De fato, estudos relatam que os ácidos graxos EPA e DHA reduzem a expressão de TNF- α pelo bloqueio do NF- κ B (ZHAO *et al.*, 2004). Vale lembrar que parte do ALA ingerido na dieta pode ser alongado e dessaturado pelo sistema enzimático (alongase e dessaturase) para produzir DHA e EPA (SUAREZ-MAHECHA *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2006). A ativação do NF- κ B resulta na liberação de múltiplos mediadores inflamatórios, incluindo IL-1 β , IL-6 e TNF- α (HALL *et al.*, 1995; SONIS; FEY, 2000). O presente trabalho demonstrou, por meio de marcação imunohistoquímica, maior expressão de NF- κ B no periodonto dos animais do grupo SALINA, sugerindo a participação desse fator de transcrição na doença periodontal experimental. Esse dado está de acordo com um estudo recente que utilizou o mesmo modelo e metodologia aplicados no presente trabalho, demonstrando que a doença periodontal experimental está associada ao aumento significativo na expressão de NF- κ B nos tecidos periodontais (MENEZES *et al.*, 2012). Observou-se, ainda, através da imunohistoquímica, diminuição de NF- κ B, no grupo Mix 1 em relação ao grupo SALINA, o que sugere que seu efeito benéfico pode estar relacionado à inibição de NF- κ B e, conseqüentemente, de citocinas pró-inflamatórias relacionadas à fisiopatologia da doença periodontal experimental.

O NF- κ B encontra-se no citoplasma na sua forma inativa, associado à uma proteína inibitória, I κ B. Vários estímulos extracelulares, incluindo vírus, citocinas inflamatórias, lipopolissacarídeos (LPS) e agentes oxidantes, são capazes de ativá-lo, dissociando-o da I κ B, através da fosforilação dessa proteína por kinases específicas. A dissociação da I κ B resulta na translocação do NF- κ B para o núcleo, aonde liga-se a sítios específicos de genes inflamatórios e imunes, regulando a expressão de múltiplas proteínas inflamatórias, como citocinas, enzimas e moléculas de adesão (BARNES, 1997). No presente trabalho, vale ressaltar, utilizou-se anticorpo específico que se liga à porção dissociada do NF- κ B, ou seja, que não está ligada à proteína inibitória, estando o NF- κ B apto para exercer sua ação de transcrição no núcleo celular.

Os mecanismos associados aos efeitos estimulatórios de IL-1 e TNF na reabsorção óssea ainda não estão completamente esclarecidos, no entanto, vários

trabalhos sugerem que são mediados, em parte, por prostaglandinas E₂ (TASHJIAN *et al.*, 1987; GOLDRING *et al.*, 1990; TATAKIS, 1993; RALSTON; GRABOWSKI., 1996), cuja liberação é reduzida pela dieta rica em ω -3 (CALDER; GRIMBLE, 2002; IWASAKI *et al.*, 2011; WEISS; BARRETT-CONNOR; VON MÜHLEN, 2005).

Além das prostaglandinas, o óxido nítrico (NO) tem sido apontado como mediador adicional dos efeitos das citocinas na atividade da célula óssea, visto que citocinas são importantes reguladores da síntese de NO em vários tipos de células (MacINTYRE *et al.*, 1991; LOWIK *et al.*, 1994; RALSTON *et al.*, 1995; EVANS; RALSTON, 1996) e vários estudos demonstram o envolvimento de NO como mediador da reabsorção óssea em condições associadas a ativação de citocinas, como na periodontite (LAPPIN *et al.*, 2000; KATO; MIKAMI; SAITO, 2001; LOHINAI *et al.*, 2001). Corroborando com esses estudos, o presente trabalho demonstrou, por meio de marcação imunohistoquímica, o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi) no periodonto de animais do grupo SALINA, quando comparados ao grupo de animais sem a doença periodontal (NORMAL). A NOSi é responsável pela produção de NO, a partir da L-arginina e oxigênio molecular, em processos inflamatórios, visto que sua expressão é induzida por citocinas pró-inflamatórias (MONCADA *et al.*, 1991; BOGDAN *et al.*, 1994). Os resultados do presente estudo corroboram com dados prévios do LAFICA que demonstraram que o bloqueio farmacológico da NOSi resulta em proteção dos tecidos periodontais em animais submetidos à doença periodontal experimental (LEITÃO *et al.*, 2004) reforçando a participação do NO na fisiopatologia dessa doença. No presente trabalho observou-se que a administração do Mix 1 preveniu o aumento da expressão de NOSi no periodonto dos animais submetidos à periodontite pela passagem do fio de náilon.

A inibição na liberação de NO, via NOSi, está relacionado à proteção óssea, uma vez que NO apresenta efeitos profundos no recrutamento e ativação de osteoclastos (CHOLE *et al.*, 1998; KASTEN *et al.*, 1994; MACINTYRE *et al.*, 1991), além de reagir com derivados do oxigênio, como o superóxido para formar uma cascata de espécies altamente reativas, incluindo peroxinitrito, resultando na nitrosilação de resíduos de tirosina em proteínas (SZABO, 1996; BECKMAN; KOPPENOL, 1996). A produção de radicais tóxicos pode contribuir para o dano tecidual, que é característica da resposta inflamatória (EVANS; RALSTON, 1996). Dessa forma, o efeito protetor conferido pelo Mix 1 pode ser atribuído, em parte, à diminuição na expressão da enzima NOSi e, conseqüentemente, na menor liberação de NO e na formação de peroxinitrito e também

ao efeito antioxidante relatado do ALA (HUDTHAGOSOL *et al.*, 2012), prevenindo o estresse oxidativo, por controlar a formação de radicais livres como espécies reativas de oxigênio, peroxinitrito e superóxido. A menor expressão de NOSi observada no periodonto dos animais que receberam Mix 1 pode estar relacionada à menor ativação de NF- κ B, dado também coletado no presente estudo, que por sua vez tem sido apontado como o fator transcricional mais relevante na regulação da expressão de NOSi em determinadas situações (TAYLOR *et al.*, 1998; FOUAD *et al.*, 2004).

Estudos da Universidade de Toronto relataram que o aumento da ingestão de linhaça permitiu uma maior habilidade de defesa do organismo contra bactérias e vírus, demonstrando os efeitos benéficos da linhaça relacionados ao sistema imune. (MOGHADDASI, 2011). Além disso, CALDER (1998) concluiu que dietas contendo grandes quantidades de óleo de linhaça diminuem a proliferação de linfócitos em comparação com as dietas com ácido graxo saturado ou ricas em ω -6. Vale ressaltar que, embora a doença periodontal resulte, primariamente, de uma resposta inflamatória à presença de bactéria na placa dentobacteriana, a suscetibilidade inata do paciente determina a evolução da doença, ou seja, o mecanismo de destruição tecidual na doença periodontal se dá por meio efeitos da resposta imune (SILVEIRA; ALVES, 2009). Sob esse aspecto, espera-se que os efeitos positivos da linhaça no sistema imune, somados aos seus efeitos anti-inflamatórios, influenciem positivamente no controle da progressão da doença periodontal.

Os efeitos das diversas fontes de ω -3 também são investigadas e discutidas em pesquisas relacionadas ao desenvolvimento ósseo, além de suas ações sobre o reparo ósseo. Um estudo recente demonstrou que filhotes de ratas alimentadas com óleo de linhaça, rico em ALA, durante o período perinatal, apresentaram melhora no conteúdo mineral e densidade óssea, ao atingir a idade adulta. Em um outro estudo do mesmo autor, no entanto, foi observado maior densidade mineral e resistência óssea nos filhotes de ratas alimentadas com óleo de peixe, rico em EPA e DHA em comparação com ratos alimentados com óleo de soja, ricos em ALA (LUKAS *et al.*, 2011).

O presente estudo não investigou se os resultados encontrados devem-se a efeitos específicos do ALA ou de EPA e DHA, produzidos a partir de processos de alongação e dessaturação (SUAREZ-MAHECHA *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos que investigam os efeitos de ω -3 na saúde óssea utilizam peixes como fonte (e não vegetais), que são ricos em EPA e DHA e não contêm ALA. Esses trabalhos relatam efeitos benéficos de uma dieta suplementada com

esses ácidos graxos na regulação do metabolismo ósseo sugerindo que a ingestão de ω -3, a partir de óleo de peixe, tem sido inversamente associada à ocorrência da periodontite (IWASAKI *et al.*, 2010; LUKAS *et al.*, 2011). Demonstrou-se, ainda, que uma dieta rica em óleo de peixe modula a reabsorção óssea causada pela inoculação de *Porphyromonas gingivalis* em ratos e reduz os níveis de prostaglandinas E2, leucotrieno B4 e fator ativador de plaquetas, o que demonstra ser uma terapia auxiliar no tratamento da doença periodontal (BENDYK *et al.*, 2009).

No presente estudo, ao contrário dos trabalhos mencionados, não se observou proteção periodontal nos grupos que receberam os Mix 2 ou Mix 3, ricos em EPA e DHA provenientes de peixes e algas, respectivamente. Esses achados são contraditórios, haja vista que diversos efeitos benéficos desses ácidos graxos têm sido relatados em vários sistemas como no controle da pressão arterial e dos níveis de triglicerídeos no sangue (BARBOSA *et al.*, 2007), no combate à osteoporose (GRIEL *et al.*, 2007), no melhoramento das atividades cerebrais (PERINI *et al.*, 2010), na prevenção de doenças autoimunes, dentre outros efeitos. Esperava-se, portanto, encontrar menos inflamação e reabsorção óssea nos grupos Mix 2 e Mix 3 em relação aos SALINA e ISO, uma vez que EPA e DHA são mais rapidamente incorporados às células, o que favorece efeitos mais rápidos do que os do ALA. Tem sido relatado na literatura, no entanto, que ALA apresenta efeitos próprios inerentes, além daqueles atribuídos à sua conversão em EPA e DHA, especialmente no controle de doenças crônicas (SIMOPOULOS, 1999), como é o caso da doença periodontal. Tem-se discutido que o papel de ALA na nutrição humana torna-se mais relevante a longo prazo, se ingerido diariamente. O alto teor em vitamina E e suas ações anti-oxidantes têm sido apontados como uma vantagem do ALA em relação aos ácidos graxos oriundos de peixe (SIMOPOULOS, 1999), o que pode ter contribuído para melhores resultados observados no grupo que recebeu ALA (Mix 1) em relação aos grupos que receberam DHA e EPA (Mix 2 e Mix 3) avaliados no presente estudo. Corroborando com essa hipótese, um estudo recente comparando o efeito antioxidante de uma dieta rica em nozes (rica fonte de ALA) com uma dieta à base de peixes (fonte de DHA e EPA), aponta clara vantagem para as nozes, sugerindo que a inclusão desse alimento na dieta diária é benéfica para manter o *status* antioxidante no corpo (HUDTHAGOSOL *et al.*, 2012).

O presente trabalho demonstrou ainda, por meio da avaliação da atividade da mieloperoxidase, enzima presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos, que a indução

da doença periodontal experimental resultou no aumento considerável do influxo de neutrófilos para a região gengival dos animais submetidos à periodontite experimental, observado na 6^o hora e 11^o dias após o posicionamento do fio de náilon. Esse achado é compatível com estudos em humanos que mostram atividade aumentada de mieloperoxidase no fluido crevicular de pacientes com doença periodontal infecciosa, correlacionando a concentração desta enzima nos tecidos periodontais com a evolução da doença, o que sugere que este parâmetro pode ser um bom complemento para diagnóstico (QUEIROZ- JUNIOR *et al.*, 2009). ÖVER *et al.*, 1993 afirmou que a atividade desta enzima diminuiu significativamente após terapia periodontal. Outros estudos, em animais, confirmam esses achados. QUEIROZ- JUNIOR *et al.*, 2009 mostraram maior atividade dessa enzima em gengiva de ratos submetidos à periodontite experimental em relação aos animais sem a doença.

Os resultados apresentados na presente pesquisa confirmam trabalhos descritos na literatura mostrando que a doença periodontal experimental leva à um aumento significativo da atividade da MPO, observado tanto na 6 hora (MENEZES *et al.*, 2005) como no 11^o dia (MELO, 2012) após o procedimento cirúrgico. De fato, os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) constituem a primeira linha de defesa contra as bactérias periodontopatogênicas. No sulco gengival, os neutrófilos tentam eliminar as bactérias por meio de fagocitose e/ou liberam substâncias inflamatórias, tais como lisozima, lactoferrina, fosfatase alcalina, hidrolases ácidas, mieloperoxidase bem como espécies reativas de oxigênio (MIYASAKI; NEMIROVSKIY, 1997; BASCONES-MARTÍNEZ *et al.*, 2009). O aumento de neutrófilos no tecido gengival observado no presente modelo experimental, portanto, deve-se à reação inflamatória local, com a possível contribuição do crescimento bacteriano, induzidos pelo posicionamento do fio de náilon.

Apesar dos efeitos benéficos da administração de Mix 1 na evolução da doença periodontal experimental, não se observou redução no influxo de neutrófilos no tecido gengival dos animais desse grupo, em nenhum dos tempos avaliados quando comparado aos grupos SALINA ou ISO. Esse achado sugere que o efeito positivo do Mix 1 observado no presente estudo não está relacionado à inibição do influxo de neutrófilos para o tecido gengival. Especula-se que as propriedades antioxidantes da linhaça previnam a formação de espécies reativas de oxigênio, formadas a partir da ativação de neutrófilos, contribuindo para a proteção periodontal observada nesse grupo frente à doença periodontal experimental.

Por fim, avaliou-se, a participação dos restos epiteliais de Malassez na doença periodontal experimental e as possíveis ações de ALA, EPA e DHA no aumento e/ou diminuição dessas estruturas. Os restos epiteliais de Malassez são remanescentes da bainha epitelial de Hertwig, estrutura envolvida no desenvolvimento da dentina radicular, cemento e osso alveolar no período da formação dos dentes (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). São reconhecidos microscopicamente como agrupamentos ou ilhotas com 4 a 20 células arredondadas a ovais ou como cordão de células entrelaçadas, junto à superfície de cemento, ao longo do comprimento da raiz dentária, cuja função encontra-se desconhecida (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Por muito tempo, acreditou-se que os restos epiteliais de Malassez eram células latentes ou quiescentes, uma estrutura sem função e frequentemente associada à gênese de cistos e tumores (TEN CATE, 1972; RINCON; YOUNG; BARTOLD, 2006) e com a resposta inflamatória à infecção bacteriana (LIU *et al.*, 2001). Trabalhos demonstram, no entanto, que esse componente periodontal epitelial é ativo, produz mediadores e tem importantes funções na manutenção da normalidade periodontal, evitando a anquilose dentária associada ao movimento ortodôntico (KAT *et al.*, 2003), uma vez que participam da manutenção do espaço periodontal (CERRI; GONÇALVES; SASSO-CERRI, 2009; CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M., 2010).

Devido ao impasse em torno do papel dessas células no que diz respeito à manutenção da normalidade do periodonto e/ou no desenvolvimento de processos patológicos, decidiu-se avaliar primeiramente se a indução da doença periodontal experimental resulta no aumento do número dessas células na região de interesse, ou seja, entre os primeiros e segundos molares superiores direitos dos animais acometidos. De fato, observou-se um aumento significativo dos restos epiteliais de Malassez no periodonto do grupo SALINA e ISO em relação aos animais sem a doença periodontal (NORMAL), o que sugere a participação dessas células na fisiopatologia da periodontite experimental. Este achado está de acordo com CERRI; GONÇALVES; SASSO-CERRI (2009), relatando que, sob condições patológicas, os restos epiteliais de Malassez podem proliferar, resultando no aumento do número e do tamanho destas estruturas. Um estudo recente encontrou relação direta entre o desenvolvimento da doença periodontal e o aparecimento dos restos epiteliais de Malassez (RODINI, 2005). A administração de Mix 1, mas não dos Mix 2 e 3, foi capaz de prevenir o aumento dessas células de forma estatisticamente significativa em relação aos grupos SALINA e ISO. Provavelmente, esse resultado não esteja associado a nenhum efeito específico da

linhaça, mas seja uma consequência da diminuição do processo inflamatório, uma vez que não se encontra na literatura estudos relacionando ω -3 e restos epiteliais de *Malassez*. No entanto, novas pesquisas são necessárias para esclarecer essa hipótese.

Em resumo, a administração de Mix 1 nesse trabalho foi capaz de preservar o periodonto de animais submetidos à periodontite, o que sugere um papel benéfico da linhaça na regulação do processo inflamatório e na remodelação óssea. Os resultados apresentados são consistentes com dados descritos na literatura que sugerem fortemente que uma dieta rica em ALA reduz a reabsorção óssea, provavelmente devido à redução na liberação de TNF e prostaglandinas, menor ativação de NF-kB e à menor expressão de NOSi, reduzindo, conseqüentemente, a liberação de NO por células presentes nos tecidos inflamados. Está bem estabelecido o papel desses mediadores na doença periodontal experimental e em humanos, o que reforça essa possível explicação. Ademais, soma-se a esses efeitos, o papel antioxidante da linhaça que contribui para a diminuição do estresse oxidativo.

Poucos estudos descritos na literatura envolvendo ômega-3 na prevenção e tratamento de doenças buscam investigar a influência da fonte desse ácido graxo nos seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento e reparo do tecido ósseo. O presente estudo sugere, no entanto, que esses efeitos podem mudar consideravelmente de acordo com a fonte avaliada, sugerindo que o mesmo pode ocorrer em outros sistemas do organismo. Esse dado é relevante, tendo em vista o aumento considerável do consumo de ω -3 no mundo, advindo principalmente do óleo de peixe. Não se pode deixar de levar em consideração, no entanto, que o custo do óleo de peixe vem aumentando cada vez mais com a restrição crescente da pesca. Ademais, a aquicultura, ou seja, a produção de peixes e outros animais aquáticos, sob condições controladas, não será capaz de suprir adequadamente a demanda (NAYLOR *et al.*, 2000), o que reforça a importância de pesquisas avaliando os óleos vegetais como fontes mais sustentáveis e economicamente viáveis de ω -3. Essa, certamente, é a maior contribuição do presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

- 1 O pré-condicionamento com os óleos de ômega-3, 6 e 9 é capaz de reduzir as características da inflamação na periodontite experimental.
- 2 Os óleos de ômega-3, 6 e 9, por diminuir o índice de reabsorção óssea, promovem osteoproteção na doença periodontal induzida. A fonte de ômega-3 mais eficaz é o ALA (Mix 1).
- 3 O pré-condicionamento com ALA (Mix 1) tem efeito osteoprotetor e anti-inflamatório no modelo da periodontite experimental em ratos Wistar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELKAREM, H. M.; EL-KADER, M. M. A.; KASEM, S. A. Manipulation of flaxseed inhibits tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 production in ovarian-induced osteoporosis. **Saudi Med J.**, v. 32, n. 4, p. 369-375, 2011.

ALEXANDER, J. W. Immunonutrition: The Role of ω - 3 Fatty Acids. **Nutrition**, v. 14, p. 627-633, 1998.

ALMEIDA, J. M.; FERNANDES, L. A.; BONFANTE, S.; MARTINS, T. M.; LUIZE, D. S.; MACARINI, V. C.; BOSCO, A. F.; GARCIA, V. G. Avaliação radiográfica do comportamento do tecido ósseo alveolar após procedimento de indução de doença periodontal em ratos. **Revista Periodontia**, v. 14, n. 4, p. 85-91, 2007.

ALMEIDA, R. F.; PINHO, M. M.; LIMA, C.; FARIA, I.; SANTOS, P.; BORDALO, C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, v. 22, p. 379-390, 2006.

AMADEI, S. U.; SOUZA, D. M.; PRADO, R. F.; SCHERMA, A. P.; ROCHA, R. F. Efeito da deficiência estrogênica no suporte ósseo periodontal em periodontite experimental em ratas. **Braz J Periodontol.**, v. 21, n. 4, p. 100-105, 2011.

ASSUMA, R.; OATES, T.; COCHRAN, D.; AMAR, S.; GRAVES, D. T. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. **Journal Immunology**, v. 160, p. 403-409, 1998.

BARBOSA, K. B.; VOLP, A. C.; RENHE, I. R.; STRINGHETA, P. C. Omega-3 and 6 fatty acids and implications on human health. **Rev Soc Bras Alim Nutr.**, n. 32, p. 129-145, 2007.

BARRETO, A. R.; CAVALCANTE, I. C.; CASTRO, M. V.; JUNQUEIRA, A. F.; VALE, M. R.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H.; BRITO, G. A. Fucoidin prevents *Clostridium difficile* toxin-A-induced ileal enteritis in mice. **Dig. Dis. Sci.**, v. 53, p. 990-996, 2008.

BASCONES-MARTÍNEZ, A.; MUÑOZ-CORCUERA, M.; NORONHA, S.; MOTA, P.; BASCONES-ILUNDAIN, C.; CAMPO-TRAPERO, J. Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 14, n. 12, p. 680-685, 2009.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: The good, the bad, and ugly. **Am J Physiol**, v.271, p. C1424-C1437, 1996.

BENDYK, A.; MARINO, V.; ZILM, P. S *et al.* Effect of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids on experimental periodontitis in the mouse. **J Periodontal Res.**, v. 44, p. 211-216, 2009.

BERTOLINI, D. R.; NEDWIN, G. E.; BRINGMAN, T. S.; SMITH, D. D.; MUNDY, G. R. Stim- ulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. **Nature**, v. 319 p. 516-518, 1986.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; PAIK, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. **J Leukocyte Biol.**, v. 55, p. 227-233, 1994.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, p. 618-622, 1982.

BRAGA, F. S. F. F.; MIRANDA, L. A.; MICELI, V. C.; ÁREAS, A.; FIGUEREDO, C. M. S.; FISCHER, R. G.; MARQUES, A. F. G. S.; CAMPOS, L. L.; SZTAJNBOK, F. R. Artrite Crônica e Periodontite. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 47, n. 4, p. 276-280, 2007.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Projeto SB2010: pesquisa nacional de saúde bucal 2010/ Nota para imprensa. Primeiros resultados. Texto disponibilizado em 28 dez. 2010. In: <http://www.sbbrasil2010.org/>. Disponível em: < http://www.mrchip.com.br/mrchip/angelo/SBBrasil2010_Nota_Imprensa.pdf>. Acesso em: 19 maio 2012.

BRASIL. **Portal da Saúde**. Campanha Nacional: Prevenção à osteoporose deve começar na infância. Texto disponibilizado em 20 out. 2011. In: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/2743/162/prevencao-a-osteoporose-deve-comecar-na-infancia.html>. Acesso em: 14 janeiro 2013.

BRUNETTI, M. C. **Periodontia Médica. Uma abordagem integrada**. São Paulo: SENAC Editora, cap. 1, p. 21- 40, 2004.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 57, p. 487-502, 1998.

CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 14-19, 2002.

CARRANZA, FA; NEWMAN, MG; TAKEI, HH. **Periodontia Clínica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

CAUGHEY, G. E.; MANTZIORIS, E.; GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G.; JAMES M. J. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. **Am J Clin Nutr.**, v. 63, p. 116-122, 1996.

CERRI, P. S.; GONÇALVES, J. S.; SASSO-CERRI, E. Area of Rests of Malassez in Young and Adult Rat Molars: Evidences in the Formation of Large Rests. **The Anatomical Record**, v. 292, p. 285-291, 2009.

CHOLE, R. A. TINLING, S. P.; LEVERENTZ, E.; MCGINN, M. D. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Blocks Osteoclastic Bone Resorption in Adaptive Bone Modeling. **Acta Otolaryngol.**, v. 118, n. 5, p. 705-711, 1998.

- COHEN, S. L.; MOORE, A. M.; WARD, W. E. Flaxseed oil and inflammation-associated bone abnormalities in interleukin-10 knockout mice. **J Nutr Biochem.**, v. 16, p. 368-374, 2005.
- CONSOLARO, A.; CONSOLARO, M. F. M. O. As funções dos Restos Epiteliais de Malassez, o EGF e o movimento ortodôntico ou Por que o movimento ortodôntico não promove a anquilose alveolodentária? **Dental Press Journal of Orthodontics**, v. 15, n. 2, p. 24-32, 2010.
- DUARTE, P. M.; TEZOLIN, K. R.; FIGUEIREDO, L. C.; FERES, M.; BASTOS, M. F. Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**, v. 55, p. 142-147, 2010.
- ELEY, B. M.; SOORY, M.; MANSON, J. D. **Periodontia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 474 p.
- EVANS, D. E.; RALSTON, S. H. Nitric oxide and bone. **J Bone Miner Res.**, v. 11, p. 300-305, 1996.
- FOUAD, D.; SIENDONES, E.; COSTÁN, G.; MUNTANÉ, J. Role of NF-kappaB activation and nitric oxide expression during PGE protection against d-galactosamine-induced cell death in cultured rat hepatocytes. **Liver Int.**, v. 24, n. 3, p. 227-236, 2004.
- GALVÃO, M. P. A.; CHAPER, A.; RÖSING, C. K.; FERREIRA, M. B. C.; SOUZA, M. A. L. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003.
- GORSKA, R.; GREGOREK, H.; KOWALSKI, J.; LASKUS-PERENDYK, A.; SYCZEWSKA, M.; MADALINSKI, K. Relationship between clinical parameters and cytokine profiles in inflamed gingival tissue and serum samples from patients with chronic periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, v. 30, p. 1046-1052, 2003.
- FERNANDES, M. I.; GAIO, E. J.; OPPERMAN, R. V.; RADOS, P. V.; ROSING, C. K. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. **Brazilian Oral Research**, v. 21, n. 3, p. 216-221, 2007.
- FIGUEIREDO, A. B. G.; AZOUBEL, I. M.; CAVALCANTE, N. L.; GUSMÃO, E. S.; JOVINO-SILVEIRA, R. C. Avaliação da provável perda dental por doença periodontal. **International Journal of Dentistry**, v. 3, n. 1, p. 297-302, 2004.
- GALVÃO, M. P. A.; CHAPPER, A.; RÖSING, C. K.; FERREIRA, M. B. C.; SOUZA, M. A. L. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 56-62, 2003.
- GOLDRING, M. B.; GOLDRING, S. R. Skeletal tissue response to cytokines. **Clinical Orthopaedics**, v. 258, p. 245-278, 1990.
- GRAVES, D. Cytokines That Promote Periodontal Tissue Destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1585-1591, 2008.

GRIEL, A. E.; KRIS-ETHERTON, P. M.; HILPERT, K. F.; ZHAO, G.; WEST, S. G.; CORWIN, R. L. An increase in dietary n-3 fatty acids decreases a marker of bone resorption in humans. **Nutrition Journal**, v. 6, n. 2, p. 1-8, 2007.

HALL, P. D., BENKO, H., HOGAN, K. R., STUART, R. K. The influence of serum tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 concentrations on nonhematologic toxicity and hematologic recovery in patients with acute myelogenous leukemia. **Exp Hematol.**, v.23, n.12, p.1256-1260, 1995.

HIRAYAMA, K. B.; SPERIDIÃO, P. G. L.; NETO, U. F. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Live**, v.10, n. 3, p. 1-10, 2006.

HOLMSTRUP, P. Anatomia macroscópica do periodonto. In: EILSON, T. G.; KORNMAN, K. S. Fundamentos de periodontia. São Paulo: Quintessence editora, cap. 3, p. 17-26, 2001.

HSU, S. M.; RAINE, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 1349-1353, 1981.

HUDTHAGOSOL, C.; HADDAD, E.; JONGSUWAT, R. Antioxidant activity comparison of walnuts and fatty fish. **J Med Assoc Thai.**, v. 95, n. 6, p. S179-88, 2012.

IWASAKI, M.; MANZ, M. C.; MOYNIHAN, P.; YOSHIHARA, A.; MURAMATSU, K.; WATANBE, R.; MIYAZAKI, H. Relationship between Saturated Fatty Acids and Periodontal Disease. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 7, p. 861-867, 2011.

IWASAKI, M.; TAYLOR, G. W.; MOYNIHAN, P.; YOSHIHARA, A.; MURAMATSU, K.; WATANABE, R.; MIYAZAKI, H. Dietary ratio of n-6 to n-3 polyunsaturated fatty acids and periodontal disease in community-based older Japanese: A 3-year follow-up study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, p. 107-112, 2011.

IWASAKI, M.; YOSHIHARA, A.; MOYNIHAN, P.; WATANABE, R.; TAYLOR, G. W.; MIYAZAKI, H. Longitudinal relationship between dietary u-3 fatty acids and periodontal disease. **Nutrition**, v. 26, p. 1105-1109, 2010.

KASTEN, T. P.; COLLIN-OSDOBY, P.; PATEL, N.; OSDOBY, P.; KRUKOWSKI, M.; MISKO, T.; SETTLE, S.; CURRIE, M.; NICKOLS, G. Potenciation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v. 91, p. 3569-3573, 1994.

KAT, P. S.; SAMPSON, W. J.; WILSON, D. F.; WIEBKIN, O. W. Distribution of the epithelial rests of Malassez and their relationship to blood vessels of the periodontal ligament during rat tooth development. **Australian orthodontic journal**, v.19, n. 2, p. 77, 2003.

KATCHBURIAN, E. & ARANA, V. **Histologia e Embriologia Oral**. Texto, Atlas, Correlações Clínicas. Editora Panamericana. SP. 2ª edição. 2004

KATO, C.; MIKAMI, M.; SAITO, K. Nitric oxide production and iNOS mRNA expression in mice induced by repeated stimulation with live *Fusobacterium nucleatum*. **Microbiol Immunol.**, v. 45, n. 1, p. 69-78, 2001.

KELLEY, D. S. Modulation of Human Immune and Inflammatory Responses by Dietary Fatty Acids. **Nutrition**, v. 17, p. 669-673, 2001.

KIM, Y.; ILICH, J. Z. Implications of dietary alpha-linolenic acid in bone health. **Nutrition**, v. 27, p. 1101-1107, 2011.

KONIG, A.; MUHLBAUER, R. C.; FLEISCH, H. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary tetracycline excretion from prelabeled mice. **J Bone Miner Res.**, v. 3, p. 621-627, 1988.

KORNMAN, K. S. Mapping the Pathogenesis of Periodontitis: A New Look. **Journal of Periodontology**, v. 79, n. 8, p. 1560-1568, 2008.

LAPPIN, D. F.; KJELDSEN, M.; SANDER, L.; KINANE, DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. **J Periodontal Res.**, v. 25, p. 369-373, 2000.

LASCALA, NT; MOUSSALLI, NH. **Compêndido terapêutico periodontal**. São Paulo: Artes Médicas, cap. 6, 1994. 516p.

LEITÃO, Renata Ferreira de Carvalho. **Estudo do papel do óxido nítrico na doença periodontal experimental**. 2002. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2002.

LEITÃO, R. F.; ROCHA, F. A.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; e BRITO, G. A. C. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 75, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R. F. C.; CHAVES, H. V.; ROCHA, F. A. C.; LIMA, V.; RIBEIRO, R. A.; BRITO, G. A. C. Nitric Oxide Synthase Inhibition Prevents Alveolar Bone Resorption in Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 76, n. 6, p. 947-954, 2005.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; ALENCAR, V. B. M.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European Journal of Oral Sciences**, v. 108, p. 123-129, 2000.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – Papel de moduladores farmacológicos. **Revista Periodontia**, v. 18, n. 3, p. 7-19, 2008.

LIMA, V.; VIDAL, F. D. P.; ROCHA, F. A. C.; BRITO, G. A. C.; RIBEIRO, R. A. Effects of TNF- α inhibitors pentoxifylline and thalidomide on alveolar bone loss in

short- term experimental periodontal disease in rats. **Journal of Periodontology**, v. 75, n.1, p. 156-162, 2004.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.1, p. 3-47, 2010.

LI, P.; SCHWARZ, E. M.; O'KEEFE, R. J.; MA, L.; LOONEY, R. J.; RITCHLIN, C. T.; BOYCE, B. F.; XING, L. Systemic tumor necrosis factor alpha mediates an increase in peripheral CD11bhigh osteoclast precursors in tumor necrosis factor alpha-transgenic mice. **Arthritis Rheum.**, v. 50, p. 265-276, 2004.

LIU, F.; ABIKO, Y.; NISHIMURA, M.; KUSANO, K.; SHI, S.; KAKU, T. Expression of inflammatory cytokines and beta-defensin 1 mRNAs in porcine epithelial rests of Malassez in vitro. **Med Electron Microsc.**, n. 34, p. 174-178, 2001.

LOHINAI, Z. Evidence for reactive nitrogen species formation in the gingivomucosal tissue. **J Dent Res**, v. 80, n. 2, p. 470-475, 2001.

LOPES, D. R.; FELIPE, M. E. M. C. Aterosclerose e periodontite – revisão de literatura. **Revista Periodontia**, v. 20, n. 4, p. 14-19, 2010.

LÖWIK, C. W. G. M. *et al.* Inducible production of nitric oxide in osteoblast- like cells and in fetal mouse bone explants is associated with suppression of osteoclastic bone resorption. **J Clin Invest**, v. 93, n. 4, p. 1465-1472, 1994.

LUKAS, R.; GIGLIOTTI, J. C.; SMITH, B. J.; ALTMAN, S.; TOU, J. C. Consumption of different sources of omega-3 polyunsaturated fatty acids by growing female rats affects long bone mass and microarchitecture. **Bone**, v. 49, n. 3, 455-462, 2011.

MACINTYRE, I.; ZAIDI, M.; TOWHIDUL ALAM, A. S. M.; DATTA, H. K.; MOONGA, B. S.; LIDBURY, P. S.; HECKER, M.; VANE, J. R. Osteoclast inhibition: An action of nitric oxide not mediated by cyclic GMP. **Proc Natl Acad Sci (USA)**, v. 88, p. 2936-2940, 1991.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MARTINS, J. M.; GRUEZO, N. D. Ácido Graxo w-6 na Etiologia do Câncer de Cólon e Reto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 1, p. 69-74, 2009.

MELO, Iracema Matos de. **Efeitos do anastrozol na periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas**. 2012. 110 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Fortaleza, 2012.

MENEZES, A. M.; ROCHA, F.A.; CHAVES, H.V.; CARVALHO, C.B.; RIBEIRO, R.A.; BRITO, G. A. C. Effect of sodium alendronate on alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 1901-1909, 2005.

MENEZES, A. M.; SOUZA, G. F. P.; GOMES, A.S.; LEITÃO, R. F. C.; RIBEIRO, R. A.; OLIVEIRA, M. G.; BRITO, G. A. C. S- nitrosoglutathione decreases inflammation and bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of Periodontology**, v. 83, n. 4, p. 514-521, 2012.

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

MIYASAKI, K. T.; NEMIROVSKLY, E. Myeloperoxidase isoform activities released by human neutrophils in response to dental and periodontal bacteria. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 5, n. 1, p. 27-32, 1997.

MOGHADDASI, M. S. Linseed and usages in humanlife. **Advances in Environmental Biology**, v. 5, n. 6, p. 1380-1392, 2011.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIBBS, J. R.; HIGGS, A. E. Nitric oxide: Physiology pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire**, v. 24, p. 105-123, 2002.

NAYLOR, R. L.; GOLDBURG, R. J.; PRIMAVERA, J. H.; KAUTSKY, N.; BEVERIDGE, M. C.; CLAY, J.; FOLKE, C.; LUBCHENCO, J.; MOONEY, H.; TROELL, M. Effect of aqua- culture on world fish supplies. **Nature**, v. 405, p. 1017-1024, 2000.

OFFENBACHER, S.; HEASMAN, P. A.; COLLINS, J. G. Modulation of host PGE₂ secretion as a determinant of periodontal disease expression. **Journal of Periodontology**, v. 64, p. 432-444, 1993.

ÖVER, C.; YAMALIK, N.; YAVUZYLMMAZ, E.; ERSOY, F.; ERATALAY, K. Myeloperoxidase activity in peripheral blood, neutrophilcrevicular fluid and whole saliva of patients with periodontal disease. **J Nihon Univ. Sch. Dent.**, V. 35, P. 235-240, 1993.

OZMERIC, N. Advances in periodontal disease markers **Clinica Chimica Acta**, v. 343, p. 1-16, 2004.

PAQUETTE, D. W.; WILLIAMS, R. C. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. **Periodontol**, v. 24, n. 1, p. 239-253, 2000.

PEIXOTO, R. F.; PEIXOTO, D. F. Aspectos imunológicos e etiopatogênicos das lesões periapicais inflamatórias crônicas; Etiopathogenic and immunologic aspects of chronic inflammatory periapical lesions. **UNOPAR Cient., Ciênc. biol. saúde**, v. 14, n. 3, 2012.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER; J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V.

Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PROKOPOWITSCH, I. Influência do uso de hidróxido de cálcio como medicação intracanal na permeabilidade e limpeza dentinária radicular em dentes portadores de rizogênese incompleta. **ECLER Endodontics**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2000.

QUEIROZ- JUNIOR, C. S.; PACHECO, A. M. F.; FONSECA, A. H.; KLEIN, A.; CALIARI, M. V.; FRANCISCHI, J. N. Myeloperoxidase Content is a marker of systemic inflammation in a chronic condition: The example given by the periodontal disease in rats. **Mediators of Inflammation**, Article ID 760837, v. 2009, p. 1-7, 2009.

RAGO, A. B.; KIERTSMAN, F.; RAGGIO, D. P.; LONG, S. M.; CHELOTTI, A.; BARBOSA, J.; CAMARGO, L. B. Restos epiteliais de Malassez no ligamento periodontal e sua possível relação com anquilose dento-alveolar. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 26, n. 1, p. 115-119, 2008.

RALSTON, S. H.; HO, L. P.; HELFRICH, M.; GRABOWSKI, P. S.; JOHNSTON, P. W.; BENJAMIN, N. Nitric oxide: A cytokine induced regulator of bone resorption. **J Bone Miner Res**, v. 10, p. 1040-1049, 1995.

RALSTON, S. H.; GRABOWSKI, P. S. Mechanisms of cytokine induced bone resorption: Role of nitric oxide, cyclic guanosine monophosphate, and prostaglandins. **Bone**, v. 19, p. 29-33, 1996.

RÊGO, R. D.; POMPEU, M. M. L.; MOREIRA, M. M. S. M.; NAIDU, T. G.; PEREIRA, S. L. S. Avaliação morfológica do efeito do óleo essencial do croton zehntneri (oecz) sobre a perda óssea alveolar em ratos com periodontite induzida. **Revista Periodontia**, v. 20, n. 2, p. 69-75, 2010.

RINCON, J. C.; YOUNG, W. G.; BARTOLD, P. M. The epithelial cell rests of Malassez—a role in periodontal regeneration? **J Periodontal Res.**, v. 41, p. 245-252, 2006.

RODINI, C. O. **Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9.** Dissertação (Mestrado em Odontologia) Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, USP; 2005.

RODRIGUES, A. M.; NEWMAN, M. G. Microbiologia e imunologia periodontal. In: CARDOSO, R. J. A.; GONÇALVES, E. A.N. **Periodontia/ cirurgia/ cirurgia para implantes.** São Paulo: Artes Médicas, cap. 2, p. 21-50, 2002.

ROXO JUNIOR, P.; GABRIELLI, M. F. R. Alterações imunológicas na doença periodontal: Revisão de literatura. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v. 27, n. 5, p. 195-198, 2004.

SANTUCCI, M. N. Power of omega-3s. **Dimensions of Dental Hygiene**, v. 10, n. 11, p. 60-63, 2012.

- SHEN, E. C.; GAU, C. H.; HSIEH, Y. D.; CHANG, C. Y.; FU, E. Periodontal status in post-menopausal osteoporosis: a preliminary clinical study in Taiwanese women. **Journal-Chinese Medical Association**, v. 67, n. 8, p. 389-393, 2004.
- SILVA, A. E. B.; LOPES, J. R.; STORRER, C. M. Estudo histológico de indução da periodontite com ligaduras em um modelo animal – projeto-piloto. **Revista UnicenP de Biologia e Saúde**, v. 1, n. 8, p. 70-75, 2008.
- SILVEIRA, V. R.; ALVES, A. P. N. Perfil celular e mediadores químicos na doença periodontal associada ao biofilme dental - Revisão de literatura. **Revista Periodontia**, v. 19, n. 9, p. 73-79, 2009.
- SIMOPOULOS, A. P. ω -3 Fatty acids in health and disease and in growth and development. **Am J Clin Nutr.**, v. 54, p. 438-463, 1991.
- SIMOPOULOS, A. P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **Am J Clin Nutr.**, v. 70, p. 560S-569S, 1999.
- SONIS, S. T., FEY, E. G. Oral complications of cancer therapy. **Oncology.**, v. 16, p. 680-686, 2000.
- SOUZA, D.M.; PRADO, F. A.; PRADO, M. A.; ROCHA, R. F.; CARVALHO, Y. R. Avaliação da perda óssea periodontal em ratos por meio dos métodos radiográficos e morfométrico. **Brazilian Journal Periodontology**, v. 21, n. 3, p. 67-73, 2011.
- SOUZA, D. M.; ROCHA, R. F. Associação entre ingestão de álcool e periodontite experimental em ratas fêmeas. **Revista da AMRIGS**, v. 55, n. 4, p. 315-319, 2011.
- SUAREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; SACCOL, A.; PARDO-CARRASCO, S. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Bolm Inst. Pesca**, v. 28, p. 48-52, 2002.
- SUN, D.; KRISHNAN, A.; ZAMAN, K.; LAWRENCE, R.; BHATTACHARYA, A.; FERNANDES, G. Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. **J Bone Miner Res.**, v. 18, p. 1206-1216, 2003.
- SZABO, C. The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. **Shock**, v. 6, p. 79-88, 1996.
- TASHJIAN, A. H. JR.; VOELKEL, E. F.; LAZZARO, M.; GOAD, D.; BOSMA, T.; LEVINE, L. Tumor necrosis factor-alpha (cachectin) stimulates bone resorption in mouse calvaria via a prostaglandin-mediated mechanism. **Endocrinology**, v. 120, p. 2029-2036, 1987.
- TATAKIS, D. N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **Journal of Periodontology**, v. 64, p. 416-431, 1993.
- TAYLOR, B. S.; DE VERA, M. E.; GANSTER, R. W *et al.* Multiple NF-kappa B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. **J Biol Chem.**, v. 273, p. 15148–15156, 1998.

TEN CATE, A. R. The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.**, v. 34, p. 956-964, 1972.

TOMOFUJI, T.; EKUNI, D.; SANBE, T.; IRIE, K.; AZUMA, T.; MARUYAMA, T.; TAMAKI, N.; MURAKAMI, J.; KOKEGUCHI, S.; YAMAMOTO, T. Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 46, p. 163-168, 2009.

TODESCAN, JH. **Doença Periodontal**. FOU SP, 1995.

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

WEISS, L. A.; BARRET-CONNOR, E.; VON MUHLEN, D. Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. **Am J Clin Nutr.**, v. 81, p. 934-938, 2005.

ZHAO, Y.; JOSHI-BARVE, S.; BARVE, S.; CHEN, L. H. Eicosapentaenoic *acid* prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. **J Am Coll Nutr.**, v. 23, p. 71-78, 2004.

ZHAO, G.; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; GILLIES, P.J.; WEST, S. G.; KRIS-ETHER-TON, P. M. Dietary alpha-linolenic acid inhibits proinflammatory cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in hypercholesterolemic subjects. **Am J Clin Nutr.**, v. 85, n. 2, p. 385-391, 2007.

ZOU, W.; HAKIM, I.; TSCHOEP, K.; ENDRES, S.; BAR-SHAVIT, Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. **J Cell Biochem.**, v. 83, p. 70-83, 2001.

ANEXO

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 nº62/10, sobre o projeto intitulado: **“EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO ENTERAL COM MIX DE ÓLEOS DE ÔMEGA 3,6 E 9 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM RATOS SUBMETIDOS A PERIODONTITE.”**, de responsabilidade de Camila Pinho Pessoa de Vasconcelos, 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 24 de março de 2011.

Fortaleza, 25 de março de 2011


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