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

JOSÉ GUILHERME PEREIRA GONÇALVES

Avaliação da influência da suplementação sistêmica com luteína na progressão da periodontite experimental

Araçatuba
2024

José Guilherme Pereira Gonçalves

Avaliação da influência da suplementação sistêmica com luteína na progressão da periodontite experimental

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

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

Araçatuba
2024

Aos meus pais; Renivaldo dos Reis Brito Gonçalves e Fádua Regina Sales Pereira. Toda gratidão do mundo a vocês por sempre cuidar de mim, me aconselhar e principalmente me amar. Amo vocês na mesma intensidade ou mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por estar comigo durante todo esse trajeto, por toda força que me deu, saúde, coragem, oportunidade e todo o resto. Se escrevo esses agradecimentos hoje, é por causa Dele.

Aos meus pais, **Renivaldo dos Reis Brito Gonçalves** e **Fádua Regina Sales Pereira** que fizeram desse sonho realidade. Obrigado pai, por todo esforço feito debaixo do sol, chuva e frio, para me manter no melhor conforto apenas estudando. Prometo que meu “pé pesado” não era tão pesado assim nos retornos de carro sozinho para Araçatuba, apenas aquele radar de Pongaí que sempre atrapalhava meu percurso. Cada conselho que o senhor me deu, eu ouvi e segui, mesmo as vezes virando o olho e falando “ta bom, pai”. Sem palavras para o homem que o senhor sempre foi e continua sendo para mim, te amo demais. Obrigado mãe, por sempre me apoiar, me ouvir, me prestigiar, por sempre estar comigo. Lembro do dia que passei, da sua preocupação em como e onde eu moraria fora de casa, que bom que deu tudo certo. Estarei sempre aqui para te ajudar reconectar o controle da televisão ou explicar que para entrar no streaming é só clicar no botão que tá escrito o nome do próprio streaming. Não me imagino sem você! Te amo pra sempre, do tamanho do universo. Conseguimos.

A minha irmã **Poliana Cristina Pereira Gonçalves de Godoy**, que praticamente se forma em Odontologia comigo, pelo tanto que me pergunta sobre cada procedimento existente. Irmã, te amo demais, obrigado por todo apoio (moral e financeiro, até mesmo por cada R$ 20,00 para me afundar em fastfoods) sinto o calor do nosso abraço, daquele nosso primeiro abraço depois que fui embora, no meu retorno na páscoa em 2019, choramos muito, choramos até hoje. Você foi essencial, serei sempre seu irmãozinho. Tenho muito orgulho de você! Ao meu cunhado (ou irmão, já que está na minha vida desde meus 4 anos) **Diogo de Godoy**, te amo, mesmo você sendo ariano nato e só lembrando de mim quando seu dente dói (ou nas horas que eu te pedia um pix).
Ao meu querido irmão **Luís Fernando Pereira Gonçalves**, que não entende como eu preciso morar fora por 6 anos pra me tornar Dentista, mas que sempre torce por mim e (esporadicamente) lembra da minha existência e me manda uma mensagem

me chamando de “feio” ou que está me aguardando pra nossa próxima ida ao cinema. Te amo, todos nos acham parecidos por aqui.

Aos meus tios **Laércio Sales Pereira** e **Sueli Jose dos Santos Pereira**, e minha prima **Isabela dos Santos Pereira**, que me receberam de braços abertos debaixo do teto de vocês durante toda a graduação, não faço ideia do que seria de mim se não tivesse minha tia cuidando do seu “filho mais velho”. Obrigado tia, por todo esforço feito para me receber aqui, me doar um quarto, roupa lavada e MUITO bem passada, comida (sempre lembrando dos meus pratos preferidos) das coquinhas na janta (costume que instaurei nessa família) e principalmente pela paciência. Sei que sou complicado e por isso serei eternamente grato a vocês. O boleto com o valor dos 37 copos e 21 pratos quebrados será depositado assim que eu receber meu primeiro salário.
Obrigado Isa, receber um irmão mais velho aos 13 anos não deve ter sido fácil, ainda mais sabendo que teria que dividir o banheiro com ele... Não queria ser você. Agradeço muito por cada momento que tivemos, por cada risada, rolê, café no Safira e jantinha no Méqui! Sorrimos juntos, choramos juntos, treinamos juntos, fofocamos juntos e por mim isso nunca vai deixar de acontecer. Sou pra sempre seu irmão mais velho! Me faltam palavras para expressar tamanha gratidão por vocês três, amo vocês.

Aos meus avós, **Valmir Brito Gonçalves** e **Edith da Invenção Gonçalves**, um grande orgulho que tenho é ser o primeiro neto a se formar numa faculdade publica, ser dentista foi fruto de todo apoio e confiança que veio de vocês. Só Deus e eu sabemos a dor que foi naquele dia na rodoviária, o ônibus partindo e eu vendo vocês ficando e acenando pra mim com os olhos cheios de lagrimas... Dizem que mudar dói, entendo isso desde aquele dia. Amo vocês, obrigado por terem contribuído tanto com a minha formação, tanto profissionalmente quanto homem. Tenho os melhores avós do mundo.

Ao meu sobrinho **Lukaian Gonçalves de Godoy**; lembro que você já quis ser “tio” quando crescesse, depois mudou para dentista e atualmente quer ser famoso no tiktok, mas independentemente do que você escolha ser ou fazer, te amarei pra sempre. Sempre o Nenezinho do Tio Gui.

A minha família de Araçatuba que se fez sempre presente; **Flávia Guimarães Bandeira**, **Amanda Guimarães Bandeira**, **Rinaldo Bandeira** e **Luzinete Pereira Guimarães**. Com vocês aqui eu sentia muito menos a falta de casa.

Aos meus padrinhos **Reginaldo Brito Gonçalves** e **Railda Brito Gonçalves**, sinto o orgulho que vocês têm por mim daqui, é reciproco. Amo vocês.

A minha prima **Vitória Gomes Gonçalves**, que sempre foi minha confidente, te amo demais Gominhas, você foi essencial nesse caminho, pra sempre nós. Aos demais primos também, vocês foram essenciais demais nessa caminhada!

Aos meus amigos de longa data, **Larissa Cristina Torre**, **Hiandra Almeida**, **Marcelo Tomazini Junior** (Junior), **Flávia Beatriz Sgobbi** e **Kennedy Rodrigues**, que me recebiam com muita alegria e felicidade nas férias e feriados em São Carlos, vocês recarregam minhas energias.
Às minhas amigas tão especiais, **Shayane Santos** e **Gabriela Boniholi**, sou muito grato por ter vocês, por nossas conversas no grupo, por cada noite mexicana, fim de semana na chácara, lanches e viagens, fizeram e fazem até hoje minha vida mais leve. Obrigado por cada conselho e risadas, guardo tudo com muito carinho.

À minha tia **Carmem Gomes Gonçalves**, **Ana Lúcia Guimarães** (Dindona) e **Gleidson Guimarães** (Dindão), que me acompanham desde minha infância até os dias de hoje. Cada retorno para São Carlos sabendo que eu encontraria vocês, me lembrava que tudo continuava igual, mesmo comigo longe. Amo vocês.

Aos grandes amigos conquistados nesses anos de graduação, **Sofia Eduarda Novaes de Oliveira**, **Laura Gabriela Macedo**, **Odir Nunes de Oliveira Filho**, **Daniel Silva Leão** e **Ana Júlia Neves Fernandes**, ter vocês aqui me fizeram ter forças pra continuar. Guardo cada momento com muito carinho.
Também à **Julia Maria Batista da Silva**, **José Roberto Virginiano Matos**, **Anna Julha Souza de Jesus**, **Taynara Leandro Pereira** e **Tielly Nogueira Fetti**, que mesmo surtando durante o EAD permaneceram presentes e fiéis durante todo o resto do (longo) percurso. Amigos como vocês é tudo o que eu precisava. Amo muito todos vocês.

À **Isabela Maria Passarela Gomes** e **Ana Paula Ribeiro Miranda**, que junto a Laura, formamos o grupo da carona. São extremamente especiais pra mim, cada risada, cada conversa no caminho da faculdade ou desabafo no retorno foram de uma necessidade imensa. Amo vocês.

Ao meu orientador Professor Dr. **Juliano Milanezi de Almeida,** que lá em 2020 me aceitou como seu orientado de Iniciação Científica, logo depois de ter operado minha recessão nos incisivos inferiores. No dia daquela cirurgia nasceu minha paixão pela Periodontia. Obrigado Professor, por toda oportunidade que o senhor me deu, por ter me orientado por todo esse tempo na clínica, na liga e na graduação como um todo, sempre me transmitindo muita sabedoria e elegância! Tenho o senhor como uma grande referência.

Ao meu Doutorando preferido, **Otávio Augusto Pacheco Vitória**, que trilhou esse caminho junto comigo, me ensinando e cobrando muito. Chefinho, você foi extremamente essencial pra isso tudo, obrigado pelos conselhos, puxões de orelha, reuniões e açaís surpresas. Tenho muita sorte de ter você no meu caminho e muito orgulho de ver você conquistando tudo o que tem conquistado.

A minha querida Prof.ª Dra. **Daniela Micheline dos Santos**, ilustre professora que passou na minha vida no ano das próteses, aceitou o desafio de me fazer aprender sobre os retentores intracanais e me fez me apaixonar pela Prótese Fixa. Sempre digo da extrema sorte que é cair na sua ala, ter sua orientação. Tenho a senhora. como uma grande referência, sua confiança em mim em cada clínica, me deixando aplicar os conhecimentos obtidos na Liga de Periodontia com o Professor. Juliano. Aprendi tanto com a senhora, desde a olhar o paciente como um todo até a me desprender das demais preocupações e estar onde meus pés estão! Imensa gratidão por tudo, professora.

Agradecimento a Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” pela concessão da bolsa de pesquisa da reitoria do **Programa Institucional de Iniciação Científica** (PIBIC) através do edital 04/2022.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa regular de Mestrado ao discente Otávio Augusto Pacheco Vitória (Processo n° 2021/0925-9).

"*Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo*."

Walter S. Landor

RESUMO

GONÇALVES, J. G. P. **Avaliação da influência da suplementação sistêmica com luteína na progressão da periodontite experimental**. 2024. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

O propósito deste estudo foi de avaliar os efeitos da suplementação sistêmica com luteína (LT) na progressão da periodontite experimental (PE). 60 ratos machos (*Wistar*) foram divididos em dois grupos, sendo: Grupos: ST/SS (n=30): Indução da PE e 0,7 ml/kg de SS via gavagem gástrica (GG) diaria por todo período experimental. ST/LT (n=30): indução da PE e GG com 250mg/kg de LT diaria por período experimental. A indução da PE foi realizada por meio da instalação de uma ligadura de algodão no primeiro molar inferior esquerdo em todos os animais. A eutanásia foi realizada por meio superdosagem com Thiopental (150 mg/kg) aos 7, 15 e 30 dias após a indução de PE (ST/SS e ST/LT). As hemimandíbulas foram removidas e submetidas ao processamento por desmineralização para análise histométrica para porcentagem de osso na furca (POF) e análise histopatológica da região de furca. Os dados foram submetidos à análise de variância *two-way* (ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). De acordo com os resultados histométricos, o grupo ST/VE aos 7 dias apresentou menor POF quando comparado com o período de 15 e 30 dias ($p \leq 0,05$), o mesmo é observado quando comparado com o período de 7, 15 e 30 dias no grupo ST/LT ($p \leq 0,05$). No grupo ST/VE aos 30 dias foi observado menor POF quando comparado com ST/LT aos 7 e 30 dias ($p \leq 0,05$). Em relação aos resultados histopatológicos, foi possível observar em todos os períodos experimentais que os espécimes do grupo ST/LT apresentaram maior estruturação do tecido ósseo e conjuntivo na região de furca com trabéculas ósseas de contorno irregular, presença de osteoclastos ativos com pequenas quantidades de fibroblastos quanto de fibras colágenas em comparação com o grupo ST/VE que apresentou tecido ósseo e

conjuntivo com áreas necróticas, e com osteoclastos ativos/inativos. O grupo ST/LT demonstrou diminuição progressiva na intensidade da resposta inflamatória de acordo com os períodos experimentais, estendendo-se por todo tecido conjuntivo da região de furca. Enquanto o grupo ST/VE, apresentou intenso infiltrado inflamatório a qual se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca. Conclui-se que que a suplementação sistêmica com luteína foi capaz de aumentar a porcentagem de osso e reduzir a inflamação na região de furca em ratos com periodontite experimental.

Palavras-chave: Periodontite. Luteína. Doença periodontal.

ABSTRACT

GONÇALVES, J. G. P. **Evaluation of the influence of systemic supplementation with lutein on the progression of experimental periodontitis.** 2024. 40f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2024.

The purpose of this study was to evaluate the effects of systemic supplementation with lutein (LT) on the progression of experimental periodontitis (EP). 60 male rats (Wistar) were divided into two groups: Groups: ST/SS (n=30): PE induction and 0.7 ml/kg of SS via gastric gavage (GG) daily for the entire experimental period. ST/LT (n=30): PE induction and GG with 250mg/kg of LT daily for the entire experimental period. PE was induced by installing a cotton bandage on the first lower left molar in all the animals. Euthanasia was carried out by overdosing with Thiopental (150 mg/kg) at 7, 15 and 30 days after PE induction (ST/SS and ST/LT). The hemimandibles were removed and processed by demineralization for histometric analysis of the percentage of bone in the furcation (POF) and histopathological analysis of the furcation region. The data was submitted to two-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test ($p \leq 0.05$). According to the histometric results, the ST/VE group at 7 days showed lower POF when compared to the 15 and 30 day periods ($p \leq 0.05$), and the same was observed when compared to the 7, 15 and 30 day periods in the ST/LT group ($p \leq 0.05$). A lower POF was observed in the ST/VE group at 30 days when compared to ST/LT at 7 and 30 days ($p \leq 0.05$). Regarding the histopathological results, it was possible to observe in all experimental periods that the specimens from the ST/LT group showed greater structuring of the bone and connective tissue in the furcation region with irregularly contoured bone trabeculae, the presence of active osteoclasts with small amounts of fibroblasts and collagen fibers compared to the ST/VE group which showed bone and connective tissue with necrotic areas and active/inactive osteoclasts. The ST/LT group showed a progressive decrease in the intensity of the inflammatory response over the

experimental periods, extending to all the connective tissue in the furcation region. The ST/VE group showed an intense inflammatory infiltrate which extended throughout the connective tissue and bone tissue of the furcation region. It is concluded that systemic supplementation with lutein was able to increase the percentage of bone and reduce inflammation in the furcation region in rats with experimental periodontitis.

Keywords: Periodontitis. Lutein. Periodontal disease.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	34
Anexo B	Certificado de análise da luteína	35
Anexo C	Certificado de análise veículo	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem representativa do desenho experimental e da região de interesse.	17-20
Figura 2	Gráfico mostrando as médias ± desvios padrão da porcentagem de osso na furca para cada grupo e período.	22
Figura 3	Fotomicrografias das características histopatológicas	23
Figura 4	Parâmetros, escores e distribuição dos espécie de acordo com a análise histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior nos diferentes grupos.	24

LISTA DE SIGLAS

AF	Área total de furca
AO	Área ocupada por osso
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
CAT	Carotenóide
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
HE	Hematoxilina e eosina
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
kg	Quilo
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Luteína
mg	Miligrama
ml	Mililitros
MMP-1	Metaloproteinase da matriz 1
mRNA	RNA mensageiro
NC3Rs	NC3Rs Reporting Guidelines Working Group
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NOSI	Óxido nítrico sintase induzível
PE	Periodontite experimental
PE2	Prostaglandina E2
POF	Porcentagem de osso na furca
RANKL	Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B
SS	Solução salina
ST	Sem tratamento
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VE	Veículo
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. MATERIAL E MÉTODOS 21
2.1 Animais 21
2.2 Cálculo amostral 21
2.3 Randomização e grupos experimentais 22
2.4 Protocolo anestésico 22
2.5 Indução da PE 23
2.6 Protocolo de suplementação com LT ou VE 23
2.7 Eutanásia e processamento histológico 23
2.8 Análise histométrica de POF 24
2.9 Análise histopatológica 24
2.10 Desfecho primário e secundário 25
2.11 Análise estatística 25
3 RESULTADOS 26
3.1 Análise histométrica da porcentagem de osso na furca 26
3.2 Análise histopatológica da região de furca 27
4. DISCUSSÃO 28
5. CONCLUSÃO 30
Referências bibliográficas 31
Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal 38
Anexo B – Certificado de análise da luteína 39
Anexo C – Certificado de análise do veículo 40

1. INTRODUÇÃO

Segundo à Organização Mundial de Saúde, a Doença Periodontal, que compreende gengivite e a periodontite é uma infecção recorrente que acomete os tecidos de sustentação do dente (World Health Organization, 2018). Essa condição tem seu estágio inicial caracterizado por sangramento, inchaço gengival e dor, conhecido como gengivite, e sem intervenção correta podendo evoluir para periodontite, havendo a perda de inserção periodontal e do osso de suporte (NEWMAN *et al.,* 2011).

Sendo uma das principais causas de perda dentária no mundo (TONETTI *et al.*, 2017), apresenta uma recorrência que oscila entre 20 a 50% (SANZ, 2010), porém é esperado que sua prevalência aumente nos próximos anos devido ao crescimento da população idosa e ao aumento da retenção de dentes naturais na população mais velha (TONETTI; BOTTENBERG; CONRADS, 2017). Em aspectos de normalidade, biofilmes subgengivais na saúde apresentam bactérias gram-positivos e algumas espécies gram-negativas (MOORE; MOORE, 1994), porém com a precarização da higiene bucal tal microbiota é modificada apresentando um aumento abundante de morfotipos gram-negativos, sendo diretamente correlacionados com o a inflamação da gengiva (THEILADE *et al.,* 1966). O desenvolvimento da periodontite é observado junto a mudanças profundas na composição das comunidades subgengivais, com o surgimento de espécies gram-negativas diferentes das observadas anteriormente, bactérias essas que compõem a tríade do complexo vermelho; *T. denticola*, *P. gingivalis* e *Tanneralla forsythia* (DIAZ; HOARE; HONG, 2016). Nesse mesmo ambiente, diversos outros tipos de microrganismos se apresentam, com uma abundância considerável, como P. intermedia, *Filifactor alocis* pode ser um indicativo associado a gravidade de destruição periodontal (ARMITAGE *et al.,* 1982).

A interação entre a microbiota oral, a resposta do hospedeiro e o desenvolvimento da periodontite, é complexa. A complexidade apresenta-se, de certo modo, pela ampla taxa bacteriana residente no microbioma subgengival e pelas suas respectivas variações, assim como pela natureza das respostas imunes e

inflamatórias do hospedeiro (CURTIS; DIAZ; VAN DYKE, 2020), onde observa-se um aumento dramático das citocinas, quimiocinas e metaloproteinases nos tecidos periodontais e no fluido crevicular na periodontite (ROMANELLI et al., 1999). Um aumento considerável também é observado nos mediadores lipídicos da resposta precoce, como leucotrieno B4 e prostaglandina E2 (OFFENBACHER; ODLE; VAN DYKE, 1986; SOLOMO; JUHLIN; KIRSCHENBAUM, 1968) (KLEIN; RAISZ, 1970). A existência de patógenos na bolsa gengival causa a secreção dessas quimocinas pelas células epiteliais que recrutam neutrófilos da circulação sistêmica para o epitélio juncional (BOSSHARDT; LANG, 2005; FUJITA *et al.,* 2018). As respostas proteolíticas protetoras dos neutrófilos perturbam consequentemente o epitélio, promovendo assim a invasão do patógeno mais profundamente nos tecidos epiteliais e na lâmina própria, aumentando a degradação do tecido e a reabsorção óssea (BOSSHARDT; LANG, 2005).

Quando se associa o controle da inflamação do hospedeiro e a microbiota da periodontite, nota-se que o controle preveniu a periodontite em modelos animais, demonstrando assim que a eliminação da infecção pode ser obtida (HASTURK *et al*., 2006; VAN DYKE; SERHAN, 2003), podendo assim reverter as alterações do biofilme com a resolução da disbiose microbiana (HASTURK *et al*., 2007). A terapia de modulação do hospedeiro utiliza de terapias medicamentosas servindo como complemento ao tratamento periodontal (PRESHAW, 2018). A terapia antimicrobiana sistêmica fornece maior disponibilidade de medicamentos nas bolsas periodontais profundas e áreas de furca, afetando os microrganismos que residem no epitélio gengival e no tecido conjuntivo (PATIL; MALI; MALI, 2013).

Entretanto, é imperativo que os profissionais da odontologia levem em consideração a crescente probabilidade de complicações associadas à utilização indiscriminada de antibióticos, sobretudo aquelas relacionadas à resistência antimicrobiana. A adoção de compostos antioxidantes de origem natural no tratamento desta enfermidade de elevada prevalência, em detrimento dos antibióticos, pode se mostrar uma abordagem eficaz (NARUISHI, 2020). Nesse sentido, os carotenoides (CAT), que constituem uma classe de fitoquímicos responsáveis pela diversidade cromática observada em alimentos, é amplamente reconhecido por exercer uma ampla gama de benefícios fisiológicos que contribuem positivamente para a saúde humana. Esses elementos naturais são obtidos através da dieta,

estando presentes em diversas frutas e vegetais (RAO; RAO, 2007) possuem propriedades antioxidantes que atuam diretamente na redução da inflamação (BJØRKLUND; CHIRUMBOLO, 2017).

Dentre os diversos grupos de carotenos, destaca-se a luteína, pertencente ao grupo das xantofilas (EROGLU; HARRISON, 2013). Apresentando-se como um pó lipofílico cristalino vermelho laranja, a luteína é um oxicarotenoide natural sensível ao calor, a qual coexiste com sua forma isomérica, zeaxantina. Possui dois grupos terminais cíclicos (anéis beta e alfa-ionona) e uma estrutura isoprenóide C40 (SHEGOKAR; MITRI, 2012). É insolúvel em água, mas solúvel em gorduras e solventes lipofílicos (KHACHIK; CHANG, 2009). Dentre suas principais características, destacam-se seus efeitos antioxidante (FIEDOR; BURDA, 2014) e anti-inflamatório (YOUNG; LOWE, 2001), apresenta também efeitos benéficos em distúrbios oculares (LIMA; ROSEN; FARAH, 2016) e doenças sistêmicas (TAPIERO; TOWNSEND; TEW, 2004).

Além da sua ação antioxidante extremamente potente, extinguindo o oxigênio singleto e eliminando os radicais livres (KIM *et al.,* 2006; KIJLSTRA *et al.,* 2012), outro efeito protetor da LT está na capacidade de filtrar a luz azul, reduzindo assim os danos fototóxicos às células receptoras de luz (JUNGHANS; SIES; STAHL, 2001). Vários estudos observaram que a LT inibe tanto a cascata de citocinas pró-inflamatórias (Chung, 2017) quanto o fator de transcrição fator nuclear-kappa β (NF-kβ) (LIU *et al.,* 2017). Há também evidências na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (LIU *et al.,* 2017; LI *et al.,* 2015), a expressão do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (RAFI; SHAFAIE, 2007) e a ativação do sistema complemento (TIAN *et al*., 2015). Através de todos esses mecanismos, presume-se que a LT seja capaz de exercer um papel fundamental regulador nas vias imunológicas, na modulação das respostas inflamatórias e na redução do dano oxidativo.

A saúde óssea é de grande importância pois a diminuição da densidade mineral óssea pode levar à osteoporose e fraturas (BLIUC *et al*., 2015). Sabe-se que a inflamação periodontal induzida pela infecção bacteriana exacerba a reabsorção óssea alveolar, o desequilíbrio funcional entre osteoblastos e osteoclastos leva à progressão da periodontite (DARVEAU; TANNER; PAGE, 2004), desse modo, estudos em camundongos mostraram que a LT estimulou significativamente a

formação óssea e inibiu a reabsorção óssea através de sua atividade reguladora no NF-kβ (TAKEDA *et al.,* 2017). Resultados semelhantes foram obtidos in vitro, onde a luteína foi eficiente aumentando a formação óssea, prevenindo a perda e diminuindo a diferenciação de osteoclastos dependente de interleucina-1 (TOMINARI *et al.,* 2017). Estudos observacionais confirmaram os possíveis efeitos benéficos da ingestão de luteína na densidade total óssea de quadril em homens (REGU *et al.,* 2011), demonstrando mais uma vez seu papel positivo na saúde óssea (HAYHOE *et al.,* 2017). Estudos indicam também que quando a luteína é adicionada em culturas de osteoblastos, seus efeitos são positivos, resultando em um aumento da formação de nódulos ósseos mineralizados, além de atuar em osteoblastos maduros estimulando o processo de mineralização, sua atuação na reabsorção óssea também foi positiva, suprimindo a formação de osteoclastos induzida por 1α,25-di-hidroxivitamina D3, reduzindo assim a reabsorção óssea (TAKEDA *et al*., 2017). Sendo assim o objetivo deste trabalho é avaliar a influência da suplementação sistêmica com luteína na progressão da periodontite experimental em ratos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Sessenta ratos machos da raça Wistar (*Rattus novergicus albinus*), pesando de 250-300g, com 4 meses de idade, foram mantidos sob as condições de ciclo de 12h/12h de claro/escuro, em temperatura ambiente de 22±2˚C, sistema de ventilação/exaustão de 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar de 55±5%, alojados em gaiolas plásticas, com ração e água ad libitum. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comite de Ética de Uso de Animais (#0300/2021) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "*Júlio de Mesquita Filho*". Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o guia ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson & Alman, 2010).

2.2 Cálculo amostral

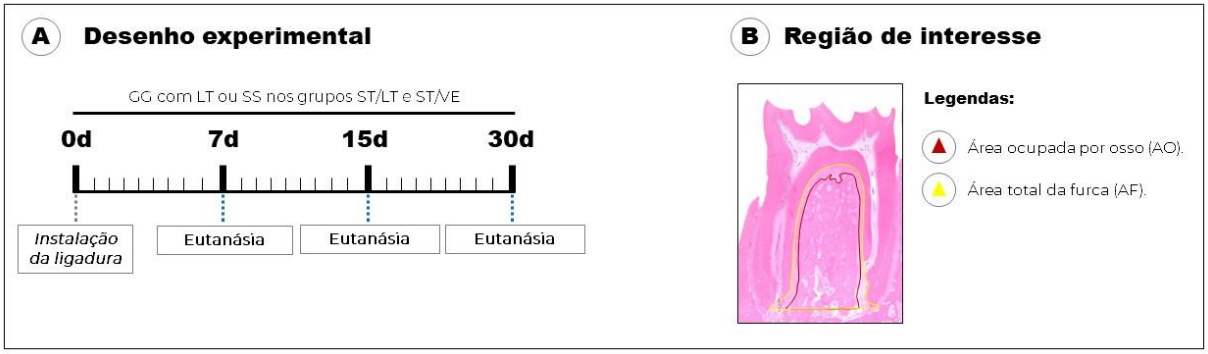
As diretrizes do NC3Rs (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010) foram respeitadas para determinação da amostra. Para determinação do tamanho amostral foi considerado estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório (de Almeida et al., 2019). Foi determinado o poder do teste de 80% com valor de α de 5%. Estes dados foram submetidos ao BioEstat 5.0 (BioEstat 5.0, Sociedade Civil de Mamirauá, Belém, PA, Brasil), que determinou um número mínimo de 8 repetições por tratamento em cada período. Desta forma, o número de animais em cada período experimental foi estabelecido em 10 animais para porcentagem de osso na furca (POF) e histopatológica da região de furca.

2.3 Randomização e grupos experimentais

O presente estudo seguiu um modelo controlado, randomizado e cego. Números de 1 a 60 foram marcados na porção superior da cauda dos animais utilizando caneta nankin. A sequência numérica foi carregada para o software Minitab® 17 (Minitab Inc., State College, PA, USA) e uma randomização simples (1:1 taxa de distribuição) dos animais para cada grupo e período foi realizada através de uma tabela numérica randômica gerada em computador por uma pessoa externa ao estudo e cega aos tratamentos.

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: **Grupo ST/VE** (n=30): Indução da PE por ligadura e início da administração diária de 0,7ml/kg de SS via GG, continuada até o final do experimento. A ligadura permaneceu até final do período experimental (Figura 1). **Grupo ST/LT** (n=30): Indução da PE por ligadura e início da suplementação diária de 250mg/kg de LT via GG, continuada até o final do experimento. A ligadura permaneceu até final do período experimental (Figura 1A).

Figura 1 – Imagem representativa do desenho experimental e da região de interesse



Fonte: dos próprios autores.

2.4 Protocolo anestésico

Para a indução da PE e as eutanásias, os animais foram anestesiados pela associação de cloridrato de cetamina (80 mg/kg, Francotar®, Virbac, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg, Rompum®, Bayer, RS, Brasil), por via intramuscular no bíceps femoral da perna direita dos ratos.

2.5 Indução da PE

Um examinador calibrado e cego aos períodos experimentais (O.A.P.V) realizou a indução da PE por meio da adaptação de um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão n°24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, mantido em posição subgengival por meio de nós cirúrgicos (Johnson, 1975; de Almeida et al., 2007).

2.6 Protocolo de suplementação com LT ou VE

A administração da VE ou suplementação da LT a 10% foi realizada por meio de GG diariamente, sempre no mesmo horário. Os animais pertencentes ao grupo ST/LT recebeu a suplementação com LT na dose de 250mg/kg (Sindhu, Preethi, & Kuttan, 2010; Sindhu, & Kuttan, 2012), enquanto os animais pertencentes ao grupo ST/VE recebeu 0,7 mL/kg de solução salina para corresponder ao volume de LT administrada.

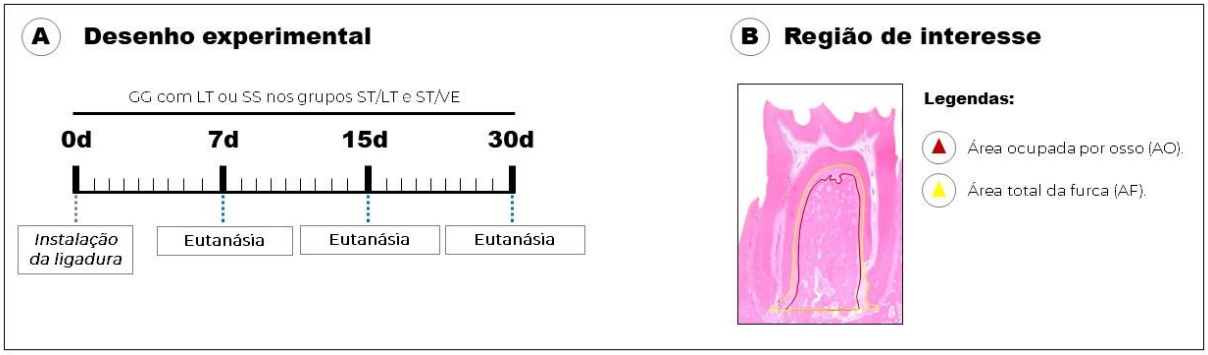
2.7 Eutanásia e processamento histológico

Os animais foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica com tiopental sódico (150mg/kg) (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) aos 7, 15 e 30 dias após a indução da PE (ST/VE e ST/LT) consistindo em 10 animais por grupo/período. As mandíbulas esquerdas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% por 48 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e imersas em solução desmineralizadora de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) tamponado à 10%, por 2 meses com 2 trocas semanais. Em seguida, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas e submetidos processamento histológico convencional com subsequente inclusão em parafina de alta fusão. Cortes histológicos com 4µm de espessura em uma progressão vestíbulo-lingual, paralelamente ao plano sagital foras obtidos para a realização das análises propostas. Seis cortes equidistantes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análises histológicas e histométricas.

2.8 Análise histométrica de POF

Foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany) para a realização da análise. Inicialmente foi determinada a área total da furca (AF) (mm2) foi demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A área ocupada por osso (AO) (mm2) teve o mesmo limite apical da AF e partir deste seguirá todo o contorno da superfície externa do tecido ósseo entre as raízes. A POF foi calculada multiplicando-se AO por 100 e dividindo-se por AF (POF = (AO x 100) / AF), conforme descrito por de Almeida et al., (2019). A POF foi realizada por pesquisador cego e calibrado aos períodos experimentais (J.G.P.G) (Figura 1B).

Figura 1 – Imagem representativa do desenho experimental e da região de interesse



Fonte: dos próprios autores.

2.9 Análise histopatológica

A análise foi realizada por um histologista certificado (E.E) cego aos períodos experimentais através de microscopia óptica de luz (AxioLab®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). Os seguintes parâmetros foram avaliados seguindo a metodologia de Zuza *et al.,* (2019): 1) intensidade da resposta inflamatória local; 2) extensão do processo inflamatório; 3) padrão de estruturação do tecido conjuntivo da região de furca; 4) padrão de estruturação do tecido ósseo alveolar da região de furca.

2.10 Desfecho primário e secundário

O desfecho primário foi definido como a porcentagem de osso na região de furca (POF), considerada a área de interesse. Os resultados secundários dizem respeito aos eventos histopatológicos relacionados com a área de interesse que foram observada cada período experimental.

2.11 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de um programa de software (BioStat versão 5.0, Belém, PA, Brasil). A normalidade de distribuição dos dados foi testada pelo teste de Shapiro Wilk. A análise da POF apresentou distribuição paramétrica dos dados, sendo submetidas a análise de variância pelo teste de ANOVA two-way e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

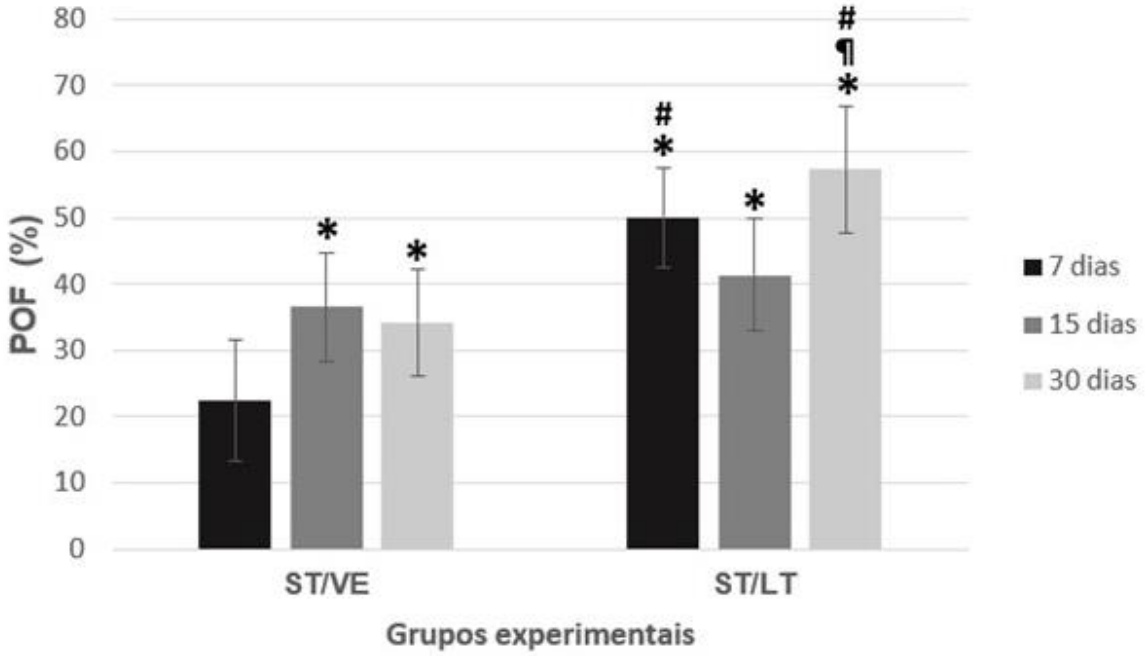
Não foram observadas complicações durante todo o período experimental e os animais estavam saudáveis sem alteração em relação ao peso inicial do experimento. Nenhuma ligadura foi perdida.

3.1 Análise histométrica da porcentagem de osso na furca

O grupo ST/VE aos 7 dias apresentou menor POF quando comparado com o período de 15 e 30 dias ($p \leq 0,05$), o mesmo é observado quando comparado com o período de 7, 15 e 30 dias no grupo ST/LT ($p \leq 0,05$). No grupo ST/VE aos 30 dias foi observado menor POF quando comparado com ST/LT aos 7 e 30 dias ($p \leq 0,05$) (Figura 2).

Figura 2- Gráfico mostrando as médias ± desvios padrão da porcentagem de osso na

furca para cada grupo e período.



Legenda: Porcentagem de osso e características histopatológicas dos tecidos periodontais na região de furca. Gráfico mostrando as médias ± desvios padrão da porcentagem de osso na furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA *two-way* e Tukey (p≤0.05). Símbolos: *, diferença estatisticamente significante com ST/VE 7 dias (p≤0,05); ¶, diferença estatisticamente significante com ST/VE 15 dias (p≤0,05); #, diferença estatisticamente significante com ST/VE 30 dias (p≤0,05).

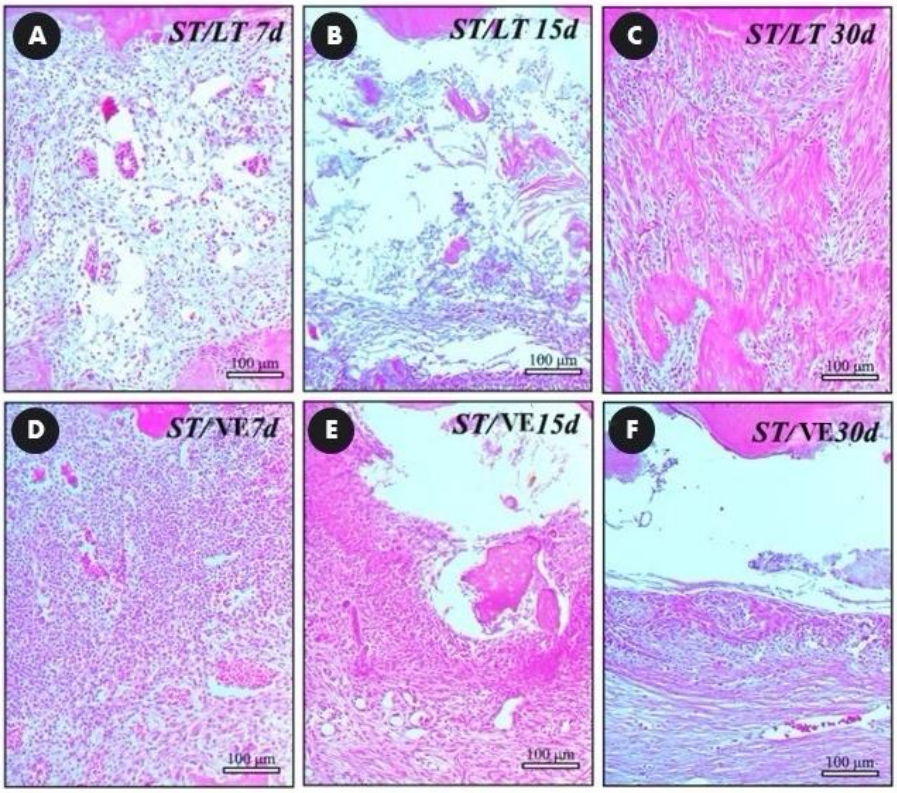
Fonte: dos próprios autores.

3.2 Análise histopatológica da região de furca

Os parâmetros, pontuações e distribuição dos espécimes de acordo com as análises da região de furca são apresentadas na Figura 3. Não houve diferença estatística na análise inter e intra-grupo. Contudo, foi possível observar em todos os períodos experimentais que os espécimes do grupo ST/LT apresentaram maior estruturação do tecido ósseo e conjuntivo na região de furca com trabéculas ósseas de contorno irregular, presença de osteoclastos ativos com pequenas quantidades de fibroblastos quanto de fibras colágenas em comparação com o grupo ST/VE que apresentou tecido ósseo e conjuntivo com áreas necróticas, e com osteoclastos ativos/inativos. O grupo ST/LT demonstrou diminuição progressiva na intensidade da resposta inflamatória de acordo com os períodos experimentais, estendendo-se por todo tecido conjuntivo da região de furca. Enquanto o grupo ST/VE, apresentou

intenso infiltrado inflamatório a qual se estendia por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca.

Figura 2- Fotomicrografias das características histopatológicas.



Legenda: (A-F) fotomicrografias representativas das características histopatológicas dos tecidos periodontais na região de furca em cada grupo e período. Coloração: Hematoxilina e Eosina. Barras de escala: 100µm.

Fonte: dos próprios autores.

4. DISCUSSÃO

O avanço no entendimento e na elucidação dos mecanismos do hospedeiro relacionados patogênese da periodontite resultou no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, visando à modulação do hospedeiro através da inibição de mediadores inflamatórios e controle da atividade oxidativa (ELAVARASU; SEKAR MURUGAN, 2012). Neste aspecto, existe uma variabilidade fitoterápicos que apresentam resposta imunomoduladora, exercendo efeito positivo sobre a atividade oxidativa bem como na redução da atividade inflamatória (*e.g.* chá verde, fucoxantina, cúrcuma, Aloe vera, *Salvia officinalis L, Matricaria chamomilla) (*RANI *et al*., 2022*)*. De acordo com os resultados obtidos, a LT favoreceu o reparo periodontal no estágio crônico da periodontite por meio do aumento da porcentagem de tecido ósseo na região de furca, restaurando o padrão de estruturação do tecido ósseo e conjuntivo

assim como possibilitou a diminuição da intensidade e extensão do infiltrado inflamatório local.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para induzir periodontite experimental (PE), como a utilização de ligadura isolada ou em associação com lipopolissacarídeo (LPS) e/ou patógeno-chave reconhecidamente participativo na patogênese da doença periodontal (*e.g. P. gengivalis*) (HAJISHENGALLIS; ABE, 2013; DUMITRESCU et al., 2004; ZHANG *et al*., 2014). No presente estudo, foi adotado o método de instalação de ligadura isolada com fio de algodão para avaliar o impacto da luteína na modulação imunoinflamatória da PE. A utilização do fio de algodão facilita a adesão da placa bacteriana favorecendo a ulceração do epitélio do sulco, penetração de bactérias no tecido epitelial e conjuntivo, promovendo a migração apical do epitélio juncional assim como uma resposta imunoinflamatória e ruptura do tecido ósseo.

Quando consideramos a periodontite, está evidenciado na literatura o efeito dos carotenoides nos tecidos periodontais favorecendo o processo de reparação tecidual através da modulação imunoinflamatória e redução da perda óssea alveolar (*e.g.* fucoxantina, criptoxantina, astaxantina). Kose *et al.,* (2016) demonstrou que a fucoxantina promoveu a redução nos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias (*e.g.* TNF-α, IL-1β e IL-6), reduzindo assim a intensidade da inflamação e inibiu a osteoclastogênese mediada por RANKL. Matsumoto et al., (2013), observaram que a criptoxantina suprimiu a formação de osteoclastos induzida por LPS em culturas de células da medula óssea assim como reduziu a perda óssea alveolar induzida por LPS em modelo in vivo. Yuce et al., (2017) relataram que a astaxantina, semelhante a LT, inibiu a resposta pró-inflamatória e houve o aumento no número de células osteoblásticas em um modelo in vivo de PE induzida por ligadura. Os dados dos estudos anteriormente mencionados estão em concordância com nossos resultados que apresentaram redução na intensidade da resposta inflamatória e aumento da porcentagem de osso na região de furca no grupo da LT, evidenciando o efeito dos CAT nos tecidos periodontais. Além disso, estudos como de Qiao, Jiang e Gao (2018) demonstraram que a LT reduziu significativamente a expressão de TNF-α e IL-1β em um modelo experimental de osteoartrite induzida por iodoacetato monossódico em células primárias de condrócitos assim como Li et al., (2018) que observaram uma

diminuição nos níveis de TNF-α em ratas ovariectomizadas e suplementadas sistemicamente com LT.

Contudo, o presente estudo apresentou algumas limitações principalmente devido a característica lipofílica dos CAT, apresentando propriedades significativas de solubilidade, baixa estabilidade química e compatibilidade apenas com compostos lipídicos. Estudos na literatura evidenciaram que os CAT apresentam baixa biodisponibilidade, a qual é diretamente influenciada pela eficiência digestiva (GRAINGER *et al.,* 2022; ALGAN, GUNGOR-AK; KARATAS, 2022). Como mencionado anteriormente, os CAT (*e.g.* LT) não é solúvel em meio aquoso, sendo diluído apenas em meio lipídio (*e.g.* óleo de girassol), o poderia reduzir sua concentração plasmática influenciando na sua capacidade terapêutica (ALGAN, GUNGOR-AK; KARATAS, 2022). Além disso, sugere-se a realização de estudos com administração de LT utilizando outros sistemas de entrega nanoestruturados (*e.g.* nanoemulsões, nanopartículas de polímero e híbridas de polímero-lipídio) devem ser realizados para avaliar se estes métodos favorecem biodisponibilidade da LT assim como sua eficácia (ALGAN, GUNGOR-AK; KARATAS, 2022).

5. CONCLUSÃO

Sendo assim, concluímos que a suplementação sistêmica com luteína foi capaz de aumentar a porcentagem de osso e reduzir a inflamação na região de furca em ratos com periodontite experimental.

Referências bibliográficas

ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of Immunological Methods**, v. 394, n. 1-2, p. 49–54, ago. 2013.

ALGAN, A. H.; GUNGOR-AK, A.; KARATAS, A. Nanoscale Delivery Systems of Lutein: An Updated Review from a Pharmaceutical Perspective. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1852, 2 set. 2022.

ARMITAGE, G. C. et al. Relationship Between the Percentage of Subgingival Spirochetes and the Severity of Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**, v. 53, n. 9, p. 550–556, set. 1982.

ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 1, p. 403–409, 1 jan. 1998.

BALCI YUCE, H. et al. Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontal Research**, v. 53, n. 1, p. 131–138, 17 out. 2017.

BJØRKLUND, G.; CHIRUMBOLO, S. Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health. **Nutrition**, v. 33, n. 33, p. 311–321, jan. 2017.

BLIUC, D. et al. Accelerated bone loss and increased post-fracture mortality in elderly women and men. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 4, p. 1331–1339, 20 jan. 2015.

BOSSHARDT, D. D.; LANG, N. P. The Junctional Epithelium: from Health to Disease. **Journal of Dental Research**, v. 84, n. 1, p. 9–20, jan. 2005.

CHANG, J. et al. NrF2/ARE and NF-κB pathway regulation may be the mechanism for lutein inhibition of human breast cancer cell. **Future Oncology**, v. 14, n. 8, p. 719–726, abr. 2018.

CHUNG, R. W. S. et al. Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 262, p. 87–93, jul. 2017.

CURTIS, M. A. Periodontal Microbiology—The Lid's off the Box Again. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 9, p. 840–842, 29 jul. 2014.

CURTIS, M. A.; DIAZ, P. I.; VAN DYKE, T. E. The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontology 2000**, v. 83, n. 1, p. 14–25, 1 jun. 2020.

DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 14, n. 1, p. 12–32, jun. 1997.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Influence of Photodynamic Therapy on the Development of Ligature-Induced Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, v. 78, n. 3, p. 566–575, mar. 2007.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Influence of adjuvant therapy with green tea extract in the treatment of experimental periodontitis. **Archives of Oral Biology**, v. 102, p. 65–73, jun. 2019.

DIAZ, P.; HOARE, A.; HONG, B.-Y. Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. **Journal of the California Dental Association**, v. 44, n. 7, jul. 2016.

DUMITRESCU, A. L. et al. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 8, p. 596–603, 15 jul. 2004.

EROGLU, A.; HARRISON, E. H. Carotenoid metabolism in mammals, including man: formation, occurrence, and function of apocarotenoids. **Journal of Lipid Research**, v. 54, n. 7, p. 1719–1730, jul. 2013.

FIEDOR, J.; BURDA, K. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466–488, 27 jan. 2014.

FUJITA, T. et al. Regulation of defensive function on gingival epithelial cells can prevent periodontal disease. **The Japanese Dental Science Review**, v. 54, n. 2, p. 66–75, 1 maio 2018.

GAINET, J. et al. Interleukin-8 production by polymorphonuclear neutrophils in patients with rapidly progressive periodontitis: an amplifying loop of polymorphonuclear neutrophil activation. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology** , v. 78, n. 6, p. 755–62, 1998.

GRAINGER, E. M. et al. Assessment of dietary carotenoid intake and biologic measurement of exposure in humans. **Methods in Enzymology**, p. 255–295, 2022.

HASTURK, H. et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclastmediated bone destruction in periodontitis. **The FASEB Journal**, v. 20, n. 2, p. 401–403, 22 dez. 2005.

HASTURK, H. et al. Resolvin E1 Regulates Inflammation at the Cellular and Tissue Level and Restores Tissue Homeostasis In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 10, p. 7021–7029, 2 nov. 2007.

HAYHOE, R. P. G. et al. Carotenoid dietary intakes and plasma concentrations are associated with heel bone ultrasound attenuation and osteoporotic fracture risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk cohort. **British Journal of Nutrition**, v. 117, n. 10, p. 1439–1453, 28 maio 2017.

JOHNSON, I. H. Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. **Journal of Periodontal Research**, v. 10, n. 6, p. 332–345, dez. 1975.

JUNGHANS, A.; SIES, H.; STAHL, W. Macular Pigments Lutein and Zeaxanthin as Blue Light Filters Studied in Liposomes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 391, n. 2, p. 160–164, jul. 2001.

KHACHIK, F.; CHANG, A.-N. Total Synthesis of (3*R*,3′*R*,6′*R*)-Lutein and Its Stereoisomers. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 74, n. 10, p. 3875–3885, 24 abr. 2009.

KIJLSTRA, A. et al. Lutein: More than just a filter for blue light. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 31, n. 4, p. 303–315, jul. 2012.

KILKENNY, C. et al. Animal Research: Reporting In Vivo Experiments: The ARRIVE Guidelines. **The Journal of Gene Medicine**, v. 12, n. 7, p. 561–563, 5 jul. 2010.

KIM, S. R. et al. Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin. **Experimental Eye Research**, v. 82, n. 5, p. 828–839, maio 2006.

KLEIN, D. C.; RAISZ, L. G. Prostaglandins: Stimulation of Bone Resorption in Tissue Culture. **Endocrinology**, v. 86, n. 6, p. 1436–1440, 1 jun. 1970.

KOLENBRANDER, P. E. et al. Bacterial interactions and successions during plaque development. **Periodontology 2000**, v. 42, p. 47–79, 2006.

KOSE, O. et al. Influences of Fucoxanthin on Alveolar Bone Resorption in Induced Periodontitis in Rat Molars. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, p. 70, 30 mar. 2016.

LI, H. et al. Lutein Suppresses Oxidative Stress and Inflammation by Nrf2 Activation in an Osteoporosis Rat Model. **Medical Science Monitor**, v. 24, p. 5071–5075, 21 jul. 2018.

LI, S. et al. Lutein has a protective effect on hepatotoxicity induced by arsenic via Nrf2 signaling. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 315205, 2015.

LIMA, V. C.; ROSEN, R. B.; FARAH, M. Macular pigment in retinal health and disease. **International Journal of Retina and Vitreous**, v. 2, n. 1, 15 ago. 2016.

LIU, T. et al. Lutein protects against β-amyloid peptide-induced oxidative stress in cerebrovascular endothelial cells through modulation of Nrf-2 and NF-κb. **Cell biology and toxicology**, v. 33, n. 1, p. 57–67, 22 nov. 2016.

MARÍA MURIACH et al. Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells in vivo and in vitro. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 149–157, 1 jun. 2008.

MATSUMOTO, C. et al. The Protective Effects of β-Cryptoxanthin on Inflammatory Bone Resorption in a Mouse Experimental Model of Periodontitis. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 77, n. 4, p. 860–862, 1 jan. 2013.

NARUISHI, K. Carotenoids and Periodontal Infection. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 269, 1 jan. 2020.

NEWMAN, M. G. et al. **Carranza's Clinical Periodontology**. London: Elsevier Health Sciences, 2011.

OFFENBACEER, S.; ODLE, B. M.; DYKE, T. E. The use of crevicular fluid prostaglandin E2 levels as a predictor of periodontal attachment loss. **Journal of Periodontal Research**, v. 21, n. 2, p. 101–112, mar. 1986.

PATIL, V.; MALI, R.; MALI, A. Systemic anti-microbial agents used in periodontal therapy. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 17, n. 2, p. 162, 2013.

PÉREZ-CHAPARRO, P. J. et al. Newly Identified Pathogens Associated with Periodontitis. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 9, p. 846–858, 29 jul. 2014.

PRESHAW, P. M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. **Periodontology 2000**, v. 76, n. 1, p. 131–149, 29 nov. 2017.

QIAO, Y.-Q.; JIANG, P.-F.; GAO, Y.-Z. Lutein prevents osteoarthritis through Nrf2 activation and downregulation of inflammation. **Archives of Medical Science**, v. 14, n. 3, p. 617–624, 2018.

RAFI, M. M.; SHAFAIE, Y. Dietary lutein modulates inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene and protein expression in mouse macrophage cells (RAW 264.7). **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 3, p. 333–340, mar. 2007.

RAISZ, L. G.; KOOLEMANS-BEYNEN, A. R. Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E2 in organ culture. **Prostaglandins**, v. 8, n. 5, p. 377–385, 1 dez. 1974.

RANI, N. et al. Medicinal Plants Used as an Alternative to Treat Gingivitis and Periodontitis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, p. 1–14, 6 set. 2022.

RAO, A.; RAO, L. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207–216, mar. 2007.

REGU, G. et al. Association between Dietary Carotenoid Intake and Bone Mineral Density in Korean Adults Aged 30–75 Years Using Data from the Fourth and Fifth Korean National Health and Nutrition Examination Surveys (2008–2011). **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1025, 16 set. 2017.

ROMANELLI, R. et al. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2319–2326, 1 maio 1999.

SANZ, M. European workshop in periodontal health and cardiovascular disease. **European Heart Journal Supplements**, v. 12, n. Suppl B, p. B2–B2, 1 abr. 2010.

SANZ, M. et al. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. S22, p. 4–60, jul. 2020.

SHEGOKAR, R.; MITRI, K. Carotenoid Lutein: A Promising Candidate for Pharmaceutical and Nutraceutical Applications. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 3, p. 183–210, 14 ago. 2012.

SINDHU, E. R.; PREETHI, K. C.; KUTTAN, R. Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. **Indian journal of experimental biology**, v. 48, n. 8, p. 843–848, 2010.

SINDHU, E. R.; RAMADASAN KUTTAN. Carotenoid lutein protects rats from gastric ulcer induced by ethanol. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology/Journal of basic & clinical physiology & pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 33–37, 19 jan. 2012.

SOLOMON, L.; JUHLIN, L.; KIRSCHENBAUM , M. Prostaglandin in the cutaneous vasculature. **Journal of investigative dermatology**, v. 51, n. 4, p. 280–282, 1968.

TAKEDA, H. et al. Lutein Enhances Bone Mass by Stimulating Bone Formation and Suppressing Bone Resorption in Growing Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 5, p. 716–721, 2017.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 58, n. 2, p. 100–110, mar. 2004.

THEILADE, E. et al. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontal Research**, v. 1, n. 1, p. 1–13, fev. 1966.

TIAN, Y. et al. Lutein supplementation leads to decreased soluble complement membrane attack complex sC5b-9 plasma levels. **Acta Ophthalmologica**, v. 93, n. 2, p. 141–145, 27 ago. 2014.

TOMINARI, T. et al. Lutein, a carotenoid, suppresses osteoclastic bone resorption and stimulates bone formation in cultures. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 81, n. 2, p. 302–306, 1 fev. 2017.

TONETTI, M. S. et al. Dental caries and periodontal diseases in the ageing population: call to action to protect and enhance oral health and well-being as an essential component of healthy ageing - Consensus report of group 4 of the joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44 Suppl 18, n. 18, p. S135–S144, 1 mar. 2017a.

TONETTI, M. S. et al. Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 44, n. 5, p. 456–462, maio 2017b.

VAN DYKE, T. E.; SERHAN, C. N. Resolution of Inflammation: A New Paradigm for the Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Journal of Dental Research**, v. 82, n. 2, p. 82–90, fev. 2003.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and Prooxidant Properties of Carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20–27, jan. 2001.

ZHANG, W. et al. Porphyromonas gingivalis infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. **BMC Oral Health**, v. 14, n. 1, 15 jul. 2014.

ZUZA, E. P. et al. Influence of obesity on experimental periodontitis in rats: histopathological, histometric and immunohistochemical study. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 3, p. 1197–1208, 19 set. 2017.

Anexo A – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Influência da suplementação dietética com luteína sobre a progressão e no tratamento da periodontite experimental induzida em ratos"**, Processo FOA nº 0300-2021, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 24 de Junho de 2021.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 03 de Junho de 2024.
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 03 de Julho de 2024.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of dietary supplementation with lutein on the progression and treatment of experimental periodontitis induced in rats"**, Protocol FOA nº 0300-2021, under the supervision of Juliano Milanezi de Almeida presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 24, 2021.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: June 03, 2024.
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: July 03, 2024.

Prof. Associado João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br

Anexo B – Certificado de análise da luteína

C-38478
FC 10,2%

Pnfarma

CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:	LUTEINA 10%		Pág 1
DCB:	09482	CAS:	127-40-2
ORIGEM:	CHINA		
Nº LOTE FABRICANTE:	C3-0223-210906	LOTE PN:	22110040-A
DATA DE FABRICAÇÃO:	Setembro/2021	DATA DE VALIDADE:	Setembro/2024
Nº ORDEM FRACIONAMENTO:	1052-22	DATA DE ANÁLISE:	10/11/2022
DATA DE EMISSÃO:	11/11/2022	NF:	100-009.432

CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:	MANTER AO ABRIGO DA LUZ, UMIDADE E CALOR

INFORMAÇÕES ADICIONAIS:
Fórmula Molecular: C40H56O2
Peso Molecular: 568,9g/mol
Nome Científico Planta: Tagetes Erecta L
Parte Da Planta Utilizada: Flor

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS
DESCRIÇÃO	Pó laranja amarelado.	Conforme	In House
TAMANHO DE PARTÍCULA	≥95% passa em 80 mesh	>95%	In House
PERDA POR DESSECAÇÃO (5g/ 105°C/ 2 horas)	≤6,0%	5,08%	In House
RESÍDUO POR IGNIÇÃO (3g/ 550°C/ 4 horas)	≤1,0%	<1,0%	In House
N-HEXANO	≤50mg/kg	<12,3mg/kg	In House
CHUMBO	≤1mg/kg	<1mg/kg	In House
ARSÊNICO	≤1mg/kg	<1mg/kg	In House
MERCÚRIO	≤0,1mg/kg	<0,1mg/kg	In House
CÁDMIO	≤1mg/kg	<1mg/kg	In House
TOTAL CAROTENÓIDES (UV)	≥10%	11,42%	In House
LUTEÍNA	≥10%	10,23%	In House
ZEAXANTINA	≤1,1%	0,78%	In House
CONTROLE MICROBIOLÓGICO			
CONTAGEM TOTAL EM PLACA	≤1000UFC/g	<1000UFC/g	In House
FUNGOS E LEVEDURAS	≤100UFC/g	<100UFC/g	In House
GRUPO DE COLIFORMES	≤3,0NMP/g	<3,0NMP/g	In House

Notas: (1) Insumo distribuído na embalagem original do fabricante/ fornecedor.

REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / In house (conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ PN, na ausência de especificação oficial ou do fabricante) .

CONCLUSÃO: (X) Aprovado ( ) Reprovado

Coordenadora do Lab. Controle da Qualidade
Leticia Schroeder – CRF-SC 18690

Farmacêutica Responsável
Solange Magre de Brito – CRF- SC 18010

PN FARMACÊUTICA LTDA - CNPJ 36.631.607/0001-17
+55 48 3995 0113 • 0800 580 2664 www.pnfarma.com.br

SANTA CATARINA
RUA ALÇA DE ACESSO, 110 - PACHECOS, PALHOÇA - SANTA CATARINA • CEP: 88.135-010

RIO DE JANEIRO
AV. JOÃO CABRAL DE MELLO NETO, 850 | CEO CORPORATE - SALA 720, BLOCO 3 - BARRA DA TIJUCA - R[illegible]

Anexo C – Certificado de análise do veículo

C·38682
5/FC

henrifarma exata

Av. de Aldeia, 338 • Jardim Iracema • Barueri - SP • CEP 06.444-000
Av. Casa Verde, 2252 • Casa Verde • São Paulo - SP • CEP 02.520-300
(11) 3199.7600 // 0800 878 23 88 gqt@henrifarma.com.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Emissão: 19/01/2023

Produto	OLEO DE GIRASSOL ESPECIAL
Especificação	FABRICANTE
C.A.S.	8001-21-6
País de Origem	BRASIL
Lote Henrifarma Nº	0029/22-C *001941722
Lote Fabricante Nº	0029/22-C
Data de Fabricante	27/09/2022
Data de Validade	27/03/2024
Conservação	

Determinação Física	Especificações	Unidades	Resultados
PESO ESPECIFICO	ENTRE 0,918 - 0,923	G/CM3	CUMPRE TESTES

Determinação Química	Especificações	Unidades	Resultados
INDICE DE IODO	ENTRE 116 - 145	G I2/100G	128
INDICE DE SAPONIFICAÃ‡AO	ENTRE 188 - 194	MG KOH/G	190
SUBSTÂNCIAS INSAPONIFICAVEIS	MAXIMO 1,5	%	CUMPRE TESTES
ACIDEZ, OLEO REFINADO	MAXIMO 0,3	%	0,085
INDICE DE PEROXIDO	MAXIMO 10,0	%	0,5

*LAUDO TRANSCRITO DO LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE

Claudiane Martins Vital
Farmacêutico Responsável
CRF/SP 79.661