



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Araçatuba

OTÁVIO AUGUSTO PACHECO VITÓRIA

**Influência da suplementação dietética com luteína sobre a
progressão e no tratamento da periodontite experimental induzida
em ratos**

**Araçatuba
2023**

OTÁVIO AUGUSTO PACHECO VITÓRIA

**Influência da suplementação dietética com luteína sobre a
progressão e no tratamento da periodontite experimental induzida
em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista (Unesp), como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida.

Coorientadora: Profa. Dra. Vivian Cristina Noronha Novaes.

**Araçatuba
2023**

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V845i Vitória, Otávio Augusto Pacheco.
Influência da suplementação dietética com luteína sobre a
a progressão e no tratamento da periodontite experimental
induzida em ratos / Otávio Augusto Pacheco Vitória. –
Araçatuba, 2023
109 f.: il.; graf.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Juliano Milanezi de Almeida
Coorientadora: Profa. Vivian Cristina Noronha Novaes

1. Periodontite 2. Luteína 3. Raspagem dentária 4. Doenças
periodontais I.T.

Black D6
CDD 617.64

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dedicatória

Aos meu avós ***Dircen e Dorca,***

sem vocês não seria possível atingir este objetivo, desde a minha infância me apoiaram incondicionalmente em todos os meus objetivos e sempre acreditaram no que eu poderia me tornar. Vocês me acompanharam e viveram comigo toda essa caminhada, mesmo que árdua, da pós-graduação e hoje eu só estou atingindo esse objetivo graças a vocês.

À minha mãe ***Dilaine,***

a senhora sempre priorizou os meus sonhos e meu futuro, deixando o restante de lado. Você é meu maior exemplo de amor, carinho, honestidade, sinceridade e companheirismo. Juntos passamos por diversos obstáculos e dificuldades nos últimos anos, sempre superamos e continuaremos juntos. Obrigado por sempre me proteger e cuidar de mim, me escutar e aconselhar; não me imagino vivendo sem a senhora ao meu lado.

Agradecimentos especiais

Ao orientador e mentor **Professor. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, obrigado por ter me aceito como seu orientado no curso de Mestrado e me dar essa oportunidade em sua equipe. Quando entrei na equipe, vindo de uma realidade totalmente diferente e sem experiência com pesquisa, o senhor sempre se mostrou paciente e solícito em me ensinar. Obrigado por todo carinho, ajuda e confiança deposita em mim durante todo esse período assim como por todas as brincadeiras e momentos de descontração, o senhor fez com que me sentisse cada vez mais acolhido e feliz, em especial na reta final do mestrado. Maioria das vezes chegava na sala do senhor com a fisionomia de desespero pra resolver algum problema ou desabafar sobre algo que aconteceu, no final o senhor sempre enxergava o lado positivo de tudo, não medindo esforços para me ajudar com o que precisasse, independente do que fosse. Inclusive, desculpa novamente por gritar extremamente alto no ouvido do senhor quando me ligou para contar do resultado da FAPESP, nunca acreditei que conseguiria a aprovação da bolsa e ter recebido essa notícia do senhor foi a melhor coisa que aconteceu durante o mestrado, ainda mais de ver que o senhor estava feliz por mim também. Exímio profissional e exemplo de pessoa, extremamente humilde, empático e de um coração enorme, sempre protegendo seus orientados. Serei eternamente grato por toda confiança e oportunidades oferecidas, que sem dúvidas, o senhor foi fundamental para meu amadurecimento.

À minha coorientadora e mentora **Professora Dr. Vivian Cristina Noronha Novaes**, sou extremamente feliz e grato por ter a senhora na minha vida, desde a minha iniciação científica, a senhora sempre buscou me orientar e auxiliar em cada etapa com toda paciência, sabedoria, escutando minhas opiniões e os meus medos, o que foi fundamental para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, sempre me guiando para o melhor caminho. Com o tempo desenvolvemos uma relação de confiança e de carinho, quando cheguei em Araçatuba, um lugar totalmente novo, a senhora estava ali para me apoiar e me acolher. Obrigado a sua família, ao Pedro, Laura e Helena por todo carinho para comigo e por permitir dividir momentos

com vocês. Serei eternamente grato por toda confiança deposita em mim e por acreditar no meu potencial. A senhora sempre será meu maior exemplo de profissional, pesquisadora e pessoa. Assim como o Prof. Juliano, a senhora teve um papel fundamental para que eu conseguisse a bolsa de mestrado, desde o terceiro ano da faculdade trabalhamos juntos para preparar meu currículo e desenvolver meu senso crítico/científico cada vez mais, além de sempre ter acreditado que seria possível a bolsa, mesmo eu estando desanimado. Obrigado por tudo que faz por mim.

Ao **Professor Dr. Guilherme Oliveira**, obrigador por compor minha banca examinado da Defesa de Dissertação. Desculpa se constrangi o senhor ao pedir uma foto no congresso da SBPqO, acompanho seu trabalho e ter o senhor compondo minha banca é algo que nunca imaginei, achei que não seria possível, ainda mais presencialmente. Obrigado por todo carinho e paciência nessas últimas semanas por compreender algumas limitações e fatos que ocorreram.

Ao **Professor Dr. Edilson Ervolino**, agradeço imensamente por ter aceito o convite de compor minha banca examinadora no Exame de Qualificação Geral e na Defesa da Dissertação. Agradecê-lo também por todo o cuidado e paciência em me ensinar, o seu amor pela docência e pela pesquisa nos instiga e motiva a continuar. Serei grato por todo apoio e cuidado comigo desde o início do mestrado, o senhor foi fundamental para que esse trabalho fosse realizado.

À minha amiga, **Giovanna Lima Fortunato**, sou muito feliz e grato por ter você em minha vida, uma amizade que surgiu de uma conversa despretensiosa em um dia de micrótomo e desde de então sempre estivemos juntos, apoiando um ao outro independente do que acontecesse. Obrigado por todo cuidado e atenção para comigo, assim mencionei diversas vezes pra ti, sempre irei cuidar e proteger você.

Ao **Henrique Rinaldi Matheus**, desde quando nos conhecemos, você foi extremamente gentil e acolhedor comigo, mesmo em momento difícil na reta final do mestrado, você estava

ali para apoiar e motivar. Você foi uma pessoa fundamental no meu amadurecimento pessoal quanto profissional, obrigado por todos os conselhos e conversas que tivemos. Agradeço imensamente por todo carinho e atenção em me ajudar, você foi imprescindível no resultado final desta pesquisa, serei eternamente grato a tudo o que você fez por mim. Você é o exemplo de pesquisador que gostaria de me tornar no futuro, extremamente humilde e dedicado, não apenas isso, faz de tudo o que está em seu alcance para ensinar o próximo e ajudar. Muito obrigado por tudo.

Ao meu amigo **Halef Diego Turini**, um grande irmão da pós-graduação, desde o início sempre estivemos juntos ajudando um ao outro. Com você compartilhei diversos momentos felizes, tristes, angustia, medos e frustrações, sempre podíamos contar um com o outro. Agradeço imensamente por sua companhia e ajuda durante o meu mestrado, sem você seria muito mais difícil essa jornada da pós-graduação. Obrigado pela sua amizade e parceria.

A minha amiga **Bianca Rafaeli Piovezan**, serei eternamente grato por toda ajuda e suporte durante a pós-graduação, você me recepcionou na chegada na pós-graduação, apesar do seu jeito reservado, conquistou minha confiança e amizade, sempre ajudamos um ao outro seja no âmbito profissional durante a pós-graduação quanto pessoal. Obrigado por sua amizade.

Aos meus colegas de Pós-graduação, **Luiz Guilherme Fiorin, Ruan Barra e Elisa Mara de Abreu Furquim**, agradeço imensamente pela parceria e auxílio neste trabalho e em outros da equipe. Além do bom convívio e amizade, pela paciência e parceria em tudo.

Aos **membros suplentes** da banca avaliadora que se disponibilizaram a contribuir com esta etapa e trabalho

À Direção da **Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP**, em nome do Diretor, Prof. Titular

Glauco Issamu Miyahara e Vice-Diretor, Prof. Titular Carlos Alberto Botazo Delbem, por todo suporte oferecido no desenvolvimento deste trabalho.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Odontologia na pessoa do **Professor Dr. Wirley Gonçalves Assunção**, pela ajuda dada ao desenvolvimento do curso de Pós-graduação.

Ao Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, na pessoa do chefe de departamento **Prof. Dr. Francisley Ávila de Souza**, pelo auxílio na condução desta pesquisa.

A *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)*, pela concessão de bolsa regular de Mestrado (Processo n° 2021/05925-9).

Em nome do Pesquisador Chefe Professor **Dr. Edilson Ervolino**, agradeço ao Laboratório de Osteobiologia Aplicada a Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP pela disponibilidade para executar a análise de imunoistoquímica.

Aos *funcionários* da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, que diretamente ou indiretamente, auxiliaram e foram importantes na execução deste trabalho. Em específico aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **em nome da supervisora Cristiane**, pela disponibilidade e paciência para solucionar problemas e sanar dúvidas durante o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os **alunos de iniciação científica** do Departamento de Periodontia da equipe do Professor Juliano Milanezi de Almeida: **José Guilherme, Ester Santos, Leticia Ikejiri e Gabriela Carrara**, muito obrigado pela colaboração e ajuda durante as etapas do meu projeto de pesquisa. A ajuda de vocês foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **animais** utilizados neste trabalho, minha gratidão e respeito.

Epigrafe

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

Paulo Freire

Resumo

VITÓRIA, O. A. P. **Influência da suplementação dietética com luteína sobre a progressão e no tratamento da periodontite experimental induzida em ratos**. 2023. 109f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

RESUMO

O propósito deste estudo foi de avaliar os efeitos da suplementação dietética com luteína (LT) na progressão no tratamento da periodontite experimental (PE). 120 ratos machos (*Wistar*) foram divididos em quatro grupos. A indução da PE foi realizada por meio da instalação de uma ligadura de algodão no primeiro molar inferior esquerdo. Grupos: ST-SS (n=30): 0,7 ml/kg de SS via gavagem gástrica (GG) diariamente. ST-LT (n=30): GG com 250mg/kg de LT, por todo período experimental. RAR-SS: 0,7 ml/kg de SS via GG diariamente, após 7 dias a RAR é realizada. RAR-LT: LT via GG diariamente, após 7 dias a RAR foi realizada. A eutanásia foi realizada aos 7, 15 e 30 dias após a indução de PE (ST-SS e ST-LT) ou RAR (RAR-SS e RAR-LT). As hemimandíbulas foram removidas e submetidas ao processamento por desmineralização para análise histométrica para porcentagem de osso na furca (POF), análise histopatológica da região de furca, análise imunohistoquímica para detecção da IL-1 β , TNF α , IL-10, TRAP e OCN. Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Menor POF foi observado no grupo RAR/SS 7, 15 e 30 dias em relação ao grupo RAR/LT em todos os períodos ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças da POF no grupo ST/LT 7, 15 e 30 dias quando comparado ao grupo RAR/SS nos mesmos períodos. Na análise histopatológica, menor intensidade e extensão do processo inflamatório assim como maior estruturação do tecido conjuntivo e ósseo na região de furca foi observado no grupo RAR/LT e ST/LT aos 7, 15 e 30 dias quando comparado com o grupo RAR/SS e ST/SS nos mesmos períodos. Na análise imunoistoquímica, o grupo ST/LT 30 dias apresentou menor número de células TRAP-positivas quando comparadas ao grupo RAR/SS e RAR/LT no mesmo período ($p < 0,05$). O grupo RAR/SS 7 dias apresenta maior número de

células TRAP-positivas em relação ao grupo RAR/LT no mesmo período ($p<0,05$). O grupo ST/LT 30 dias apresentou maior densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o grupo RAR/LT no mesmo período ($p<0,05$). O grupo ST/LT 15 e 30 dias apresenta maior densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o grupo RAR/SS nos mesmos períodos ($p<0,05$). O grupo RAR/SS 15 e 30 dias apresentaram maior densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação ao grupo RAR/LT nos mesmos períodos ($p<0,05$). O grupo ST/LT 7, 15 e 30 dias apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação ao RAR/SS nos mesmos períodos ($p<0,05$). O grupo RAR/SS 15 e 30 dias apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-10 quando comparado com o grupo RAR/LT nos mesmos períodos ($p<0,05$). O grupo ST/LT 30 dias apresentou maior densidade de imunomarcção para IL-10 em relação ao grupo RAR/SS 30 dias ($p<0,05$). O grupo ST/LT 7 dias apresentou menor densidade de imunomarcção para TNF α em comparação ao grupo RAR/SS 7 dias e RAR/LT 7 dias. Conclui-se que a LT se mostrou efetiva no controle da progressão da PE e quando associada a RAR, apresentou melhores resultados em comparação a SS adjuvante a RAR.

Palavras-chave: Luteína. Doenças periodontais. Periodontite. Raspagem dentária.

Abstract

VITÓRIA, O. A. P. **Influence of dietary supplementation with lutein on the progression and treatment of experimental induced periodontitis in rats.** 2023. 109f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2023.

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of dietary lutein (LT) supplementation on progression in the treatment of experimental periodontitis (EP). 120 male rats (Wistar) were divided into four groups. PE induction was performed by installing a cotton ligature on the lower left first molar. Groups: ST-SS (n=30): 0.7 ml/kg of SS via gastric gavage (GG) daily. ST-LT (n=30): GG with 250mg/kg of LT, for the entire experimental period. RAR-SS: 0.7 ml/kg of SS via GG daily, after 7 days RAR is performed. RAR-LT: LT via GG daily, after 7 days RAR was performed. Euthanasia was performed at 7, 15 and 30 days after PE (ST-SS and ST-LT) or RAR (RAR-SS and RAR-LT) induction. The hemimandibles were removed and submitted to demineralization processing for histometric analysis for percentage of bone in the furcation (POF), histopathological analysis of the furcation region, immunohistochemical analysis for detection of IL-1 β , TNF α , IL-10, TRAP and OCN. Data were submitted to test Shapiro-wilk, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test ($p \leq 0.05$). Lower POF was observed in the RAR/SS group 7, 15 and 30 days compared to the RAR/LT group in all periods ($p < 0.05$). No POF differences were observed in the ST/LT 7, 15 and 30 days group when compared to the RAR/SS group in the same periods. In the histopathological analysis, lower intensity and extension of the inflammatory process, as well as greater structuring of connective and bone tissue in the furcation region, was observed in the RAR/LT and ST/LT group at 7, 15 and 30 days when compared to the RAR/SS group and ST/SS in the same periods. In the immunohistochemical analysis, the ST/LT 30 days group had a lower number of TRAP-positive cells when compared to the RAR/SS and RAR/LT groups in the same period ($p < 0.05$). The 7 day RAR/SS group has a higher number of TRAP-positive cells than the 7 day RAR/LT group

($p < 0.05$). The ST/LT 30 days group showed a higher density of immunostaining for OCN when compared to the RAR/LT group in the same period ($p < 0.05$). The ST/LT 15 and 30 days group showed a higher density of immunostaining for OCN when compared to the RAR/SS group in the same periods ($p < 0.05$). The RAR/SS 15 and 30 days group showed higher immunostaining density for IL-1 β compared to the RAR/LT group in the same periods ($p < 0.05$). The ST/LT 7, 15 and 30 days group showed lower immunostaining density for IL-1 β compared to RAR/SS in the same periods ($p < 0.05$). The 15 and 30 days RAR/SS group showed a lower immunostaining density for IL-10 when compared to the RAR/LT group in the same periods ($p < 0.05$). The ST/LT 30 days group showed a higher immunostaining density for IL-10 compared to the RAR/SS 30 days group ($p < 0.05$). The 7 day ST/LT group had a lower immunostaining density for TNF α compared to the 7-day RAR/SS and 7 day RAR/LT group. It is concluded that LT proved to be effective in controlling the progression of PE and when associated with RAR, it presented better results compared to SS adjuvanted with RAR.

Keywords: Lutein. Periodontitis. Periodontal disease. Dental scaling.

Lista de anexos

Lista de anexos

Anexo A	Normas para publicação no Periódico “ <i>Archives Oral Biology</i> ”	92
Anexo B	Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	107
Anexo C	Certificado de análise da Luteína	108
Anexo D	Certificado de Análise do óleo de girassol	109

Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental durante todo o período de execução dos grupos PE

83

Figura 2 – Delineamento experimental durante todo o período de execução dos grupos RAR

84

Figura 3 – Porcentagem de osso e características histopatológicas dos tecidos periodontais an região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de osso na furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); α , diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (B-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: 100 μ m.

85

Figura 4 – Imunomarcação de TNF-alpha na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcação de TNF-alpha para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); α , diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); σ , diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ∞ , diferença estatisticamente significativa com RAR/SS 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcação para TNF- alpha em cada grupo e período. Barras de escala: 100 μ m.

86

Figura 5 – Imunomarcação de IL-1beta na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcação de IL-1beta para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); α , diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); σ , diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias ($p \leq 0,05$) (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcação para IL-1beta em cada grupo e período. Barras de escala: 100 μ m.

87

Figura 6 –Imunomarcção de IL-10 na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcção de IL-10 para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); α , diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0.05$); σ , diferença estatisticamente significativa com RAR/SS 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcção para IL-10 em cada grupo e período. Barras de escala: 100 μ m.

88

Figura 7 – Imunomarcção de OCN na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcção de OCN para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcção para OCN em cada grupo e período. Barras de escala: 100 μ m.

89

Figura 8 – Imunomarcção de TRAP na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão do número de células TRAP-positivas para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: σ , diferença estatisticamente significativa com o período de 15 dias ($p \leq 0.05$); ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatisticamente significativa com o grupo RAR/SS e ST/SS no mesmo período ($p \leq 0.05$); α , diferença estatisticamente significativa com os grupos ST/SS e ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da imunomarcção para TRAP em cada grupo e período. Cabeças de seta: células imunorreativas para TRAP. Contra-coloração: Hematoxilina de Harris. Barras de escala: 100 μ m.

90

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	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 ST-SS, ST-LT, RAR-SS e RAR-LT:	81
-----------------	--	----

Lista de siglas

LISTA DE SIGLAS

°C	Graus Celsius
AF	Área total de furca
AO	Área ocupada por osso
ARRIVE	Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments
BMP-2	Proteína óssea morfogenética 2
CAT	Carotenóide
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramas
HE	Hematoxilina e eosina
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
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- κ B	Fator nuclear kappa B
NOS1	Óxido nítrico sintase induzível
OCN	Osteocalcina
PE	Periodontite experimental
PE2	Prostaglandina E2
POF	Porcentagem de osso na furca
PQM-1	Proteína quimioatraente de monócitos 1
RANKL	Ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B
RAR	Raspagem e alisamento radicular

SS	Solução salina
ST	Sem tratamento
TM	Terapia modulatória
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VE	Veículo
μm	Micrômetro

Sumário

Sumário

<i>Manuscrito para publicação</i>	32
1. Introdução	38
2. Material e métodos	43
2.1 Animais	43
2.2 Cálculo amostral e randomização	43
2.3 Grupos experimentais	44
2.4 Indução da periodontite experimental	45
2.5 Protocolo de suplementação com LT ou administração da SS	45
2.6 Protocolo de tratamento com RAR	45
2.7 Eutanásia	46
2.8 Processamento histológico com desmineralização	46
2.9 Processamento imunoistoquímico	46
2.10 Análise histométrica de POF	47
2.11 Análise histopatológica	48
2.12 Análise imunoistoquímica	48
2.13 Desfecho primário e secundários	49
2.14 Análise estatística	49
3 Resultados	51
3.1 Análise histométrica da porcentagem de osso na furca (POF)	51
3.2 Análise histológica da região de furca	51
3.2.1 Análise histológica da região de furca do grupo ST/SS	51
3.2.2 Análise histológica da região de furca do grupo ST/LT	52
3.2.3 Análise histológica da região de furca do grupo RAR/SS	53
3.2.4 Análise histológica da região de furca do grupo RAR/LT	53
3.3 Análise imunoistoquímica	54
3.3.1 TNF- α	54
3.3.2 IL-1beta	55
3.3.3 IL-10	56
3.3.4 OCN	57
3.3.5 TRAP	57
4. Discussão	60
5. Conclusão	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

<i>Tabelas</i>	79
<i>Figuras</i>	82
ANEXOS	92
Anexo A – Normas para publicação no Periódico “Archives Oral Biology”.	92
Anexo B – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal	107
Anexo C – Certificado de análise da luteína	108
Anexo D – Certificado de análise do óleo de girassol	109

*Manuscrito para publicação**

- Manuscrito elaborado de acordo com as normas de publicação do periódico **Archives Oral Biology*

Título: Influência da suplementação dietética com luteína sobre a progressão e no tratamento da periodontite experimental induzida em ratos

Autores:

Otávio Augusto Pacheco Vitória^a

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: otavio.pacheco@unesp.br

Vivian Cristina Noronha Novaes^a

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: vcnnovaes@hotmail.com

Juliano Milanezi de Almeida^a

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil

e-mail: jumilanezi@hotmail.com

^aDepartamento de Diagnóstico e Cirurgia, Divisão de Periodontia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Declarações de interesse: Nenhum.

Fontes de financiamento: FAPESP - processo nº 2021/05925-9.

Título corrido: Luteína e periodontite

Palavras-chave: Periodontite. Luteína. Doenças periodontais. Raspagem dentária.

***Autor correspondente:** Juliano Milanezi de Almeida.

Endereço: Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP.

Rua José Bonifácio 1193, Vila Mendonça.

CEP: 16050-050 Araçatuba, SP, Brasil.

e-mail: jumilanezi@hotmail.com.

Telefone: (005518) 36362860.

RESUMO

O propósito deste estudo é de avaliar os efeitos da suplementação com luteína (LT), a progressão e o tratamento da periodontite experimental (PE). 120 ratos machos (Wistar), foram divididos em 4 grupos. Grupos: STSS: gavagem gástrica (GG) diária com 0,7 ml/kg de solução salina (SS). STLT: GG diária com LT por todo período experimental. RARSS: GG com SS, após 7 dias foi realizada a RAR. RARLT: GG com LT e RAR após 7 dias. Ligadura de algodão foi instalada no primeiro molar inferior esquerdo. Foi realizada análise histométrica por porcentagem de osso na furca (POF), histopatológica e imunoistoquímica para detecção de IL-1 β , TNF α , IL-10, TRAP e OCN na região de furca. A eutanásia foi realizada aos 7, 15 e 30 dias. A análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey foram realizados ($p \leq 0,05$). Menor POF no grupo RAR/SS 7, 15 e 30 dias em relação a RAR/LT nos mesmos períodos. Maior densidade imunomarcção de células TRAP-positivas em RAR/LT 7 dias em relação a RAR/SS em 7 dias. maior imunomarcção para OCN em RAR/LT em 7 e 15 dias em relação a RAR/VE no mesmo período. Maior imunomarcção para IL-10 no grupo RAR/LT em 15 e 30 dias quando comparados com RAR/SS. Menor imunomarcção para IL-1 β no RAR/LT 15 e 30 dias em relação a RAR/SS nos mesmos períodos. Menor imunomarcção para TNF-alfa no grupo RAR/LT em relação ao grupo RAR/SS no mesmo período. LT como terapia coadjuvante a RAR, reduziu a inflamação na área de furca e melhorou a POF.

Palavras-chave: Periodontite. Raspagem dentária. Luteína. Doença periodontal.

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the effects of lutein (LT) supplementation on the progression and treatment of experimental periodontitis (EP). 120 male rats (Wistar) were divided into 4 groups. Groups: STSS: daily gastric gavage (GG) with 0.7 ml/kg saline solution (SS). STLT: daily GG with LT for the entire experimental period. RARSS: GG with SS, after 7 days RAR was performed. RARLT: GG with LT and RAR after 7 days. Cotton ligature was placed on the lower left first molar. Histometric analysis by percentage of bone in the furcation (POF), histopathology and immunohistochemistry were performed to detect IL-1 β , TNF α , IL-10, TRAP and OCN in the furcation region. Euthanasia was performed at 7, 15 and 30 days. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-test were performed ($p \leq 0.05$). Lower POF in the RAR/SS 7, 15 and 30 days group compared to RAR/LT in the same periods. Higher immunostaining density of TRAP-positive cells in 7-day RAR/LT compared to 7-day RAR/SS. greater immunostaining for OCN in RAR/LT at 7 and 15 days compared to RAR/VE in the same period. Greater immunostaining for IL-10 in the RAR/LT group at 15 and 30 days when compared to RAR/SS. Lower immunostaining for IL-1 β in RAR/LT 15 and 30 days compared to RAR/SS in the same periods. Lower immunostaining for TNF-alpha in the RAR/LT group compared to the RAR/SS group in the same period. LT as adjunctive therapy to RAR, reduced inflammation in the furcation area and improved POF.

Keywords: Lutein. Periodontitis. Periodontal disease. Dental scaling.

Introdução

1. Introdução

A periodontite, de acordo com o relato do Global Burden of Disease Study, é a sexta doença mais prevalente em todo o mundo, com uma prevalência geral de 11,2% (cerca de 743 milhões de pessoas) (GBD, 2015), sendo a causa primária de perda dentária em adultos no mundo (Kassebaum et al., 2014). A periodontite não deve ser considerada como uma simples infecção bacteriana culminando com a destruição dos tecidos periodontais (Bartold, & Van Dyke, 2013). Representa um aglomerado de doenças complexas, interativas entre os sistemas imunológico e inflamatório do hospedeiro, a microbiota subgengival e fatores modificadores ambientais (Bartold, & Van Dyke, 2013). É reconhecido que a microbiota residente apresenta natureza comensal e mantém condição homeostática com o hospedeiro em condições de normalidade (Darveau, Hajishengallis, & Curtis, 2012; Sanz et al., 2017). Ainda que alterações nessa microbiota sejam passíveis de gerar um quadro disbiótico (Darveau, Hajishengallis, & Curtis, 2012; Sanz et al., 2017), o microambiente e um hospedeiro susceptível são essenciais para que haja manifestação da doença (Darveau, Hajishengallis, & Curtis, 2012; Sanz et al., 2017). Assim, a periodontite é considerada uma doença multifatorial na qual a presença bacteriana é necessária, mas não determinante na progressão e grau de destruição dos tecidos periodontais (Socransky, & Haffajee, 2005).

Raspagem e alisamento radicular (RAR) é a abordagem terapêutica convencional no tratamento da periodontite, eliminando de depósitos bacterianos, cálculo e cimento contaminados por microrganismos periodontopatogênicos e endotoxinas do sítio infectado, tendo por objetivo interromper a progressão da doença (Prates et al., 2011; Teles et al., 2006). Entretanto, alguns fatores anatômicos (e.i, região de furca e concavidades radiculares) podem reduzir a eficácia da RAR (Umeda et al., 2004; Noiri & Ebisu, 2000). Neste contexto, métodos coadjuvantes administrados localmente e/ou sistemicamente associados à RAR podem ser

empregados com o objetivo de aumentar a previsibilidade do tratamento mecânico, favorecendo a homeostase dos tecidos periodontais.

Inicialmente, Willians (1990), considerou que terapias modulatórias (TM) por meio de fármacos poderiam apresentar efeitos positivos sobre os tecidos periodontais, favorecendo sua homeostase. Diversos fármacos foram utilizados como TM da doença periodontal, dentre eles pode-se citar anti-inflamatórios não esteroidais (Holzhausen, et al., 2002; Bezerra et al., 2000), bifosfonatos (Reddy et al., 1995; Shoji et al., 1995), fármacos inibidores de metaloproteinases da matriz (MMP) (Reddy, Geus, & Gunsolley, 2003; Caton et al., 2000; Golub et al., 1983), medicamentos anticitocinas (Savioli et al., 2012), mediadores lipídicos (Gao et al., 2013; Hasturk et al., 2007), probióticos (Teughels et al., 2013; Pelekos et al., 2019) e fitoterápicos (Chava, & Vedula, 2013; de Almeida et al., 2019).

A fitoterapia tem ganhado interesse como alternativa à medicina tradicional pelo fato de não induzir dependência ou tolerância, reduzir os efeitos colaterais e ter baixo custo. Esses produtos, por sua vez, podem ser categorizados de diversas formas, dentre os principais cita-se os polifenóis (Yoshinaga et al., 2014), triterpenos (Nowwarote et al., 2013), cumarinas (Gao et al., 2013) e carotenóides (Arora, Avula, & Avula, 2013) (CAT). Os CAT são pigmentos orgânicos sintetizados por microorganismos e plantas, sendo catalogados mais de 850 tipos na natureza (Maoka, 2020; Chetan et al., 2016), contudo, apenas 50 deles estão disponíveis na dieta humana (Krinsky, & Johnson, 2005). Diversos estudos na literatura investigaram os efeitos dos CAT, incluindo β -caroteno, β -criptoxantina, astaxantina e fucoxantina nos tecidos periodontais, demonstrando que estes fitoquímicos apresentaram diminuição da atividade osteoclástica, assim como redução na expressão produtos inflamatórios como interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) -6, IL-8 e aumento na atividade osteoblástica (Balci et al., 2018; Hwang et al 2018; Hirata et al., 2019; Matsumoto et al., 2013; Nishigaki et al., 2013; Dodington et al., 2015; Kose et al., 2016).

A luteína (LT) é classificada dentro do grupo das xantofilas dos CAT devido à sua composição química, a qual apresenta componentes oxigenados e hidroxilas em suas ligações químicas, sendo que os carotenos, outra classe dos CAT, apresenta apenas hidrocarbonetos em sua estruturação (Krinsky, & Johnson, 2005; Parker, 1989). A LT não é sintetizada pelo organismo sendo necessária sua obtenção por outras fontes nutricionais (Alisa et al., 2009). A LT pode ser encontrada em fontes dietéticas, como frutas e vegetais, especificamente em alimentos com pigmentação laranja, vermelha e amarela (Alisa et al., 2009; Sommerburg et al., 1998). Acrescenta-se ainda que LT é considerada um pigmento macular, apesar de ser obtido por via exógena, encontra-se em alta concentração no tecido retinal (Mangels et al., 1993; Bernstein et al., 2016), onde atua na prevenção da degeneração macular relacionada à idade e na retinopatia promovida pela diabetes mellitus (Chong et al., 2007; Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2000; Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007; Tan et al., 2004), sendo recomendada na prevenção e tratamento de doenças crônicas (Aune et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória da LT concentra-se diretamente na via inflamatória mediada pela ciclooxygenase (COX)-2, promovendo a inibição do ácido araquidônico e fator nuclear kappa B (NF- κ B), um dos principais reguladores da COX-2 (Qiao, Jiang, & Gao, 2018; Kim et al., 2008; Chapple et al., 1997; Kou et al., 2008). Além disso, promove a regulação de citocinas pro-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α (Aune et al., 2012; Chung et al., 2017; Li et al., 2018), diminuição da proteína quimioatraente de monócitos 1 (PQM-1) (Du et al., 2015), prostaglandina E2 (Nidhi et al., 2015) e inibição da expressão de MMP-1 (Philips et al., 2007).

Estudos sugerem que os CAT podem atuar positivamente no metabolismo ósseo, promovendo a diminuição do risco do desenvolvimento da osteoporose e permitir aumento da densidade óssea (Zhang et al., 2016; Dai et al., 2014). Estudos na literatura, como de Li et al.,

(2018), demonstraram que a LT reduziu a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-8, bem como suprimiu o estresse oxidativo e reduziu a expressão de marcadores específicos de osteoclastos (NFATc1) em ratas ovariectomizadas. Tominari et al., (2017) relataram por meio de um estudo in vitro que a LT suprimiu a diferenciação de osteoclastos induzida por IL-1 e ao adicionar a LT em culturas de osteoblastos, a LT aumentou a formação de nódulos de mineralização, elevação na expressão de proteína morfogenética óssea (BMP) 2 e inibição a expressão de esclerostina. Ao mapear outra via relacionada com o metabolismo ósseo, Takeda et al., (2017) demonstraram que a LT estimula células osteoblásticas por meio da supressão de macrófagos quando expostos a RANKL, além de impedir a expressão de mRNA de RANKL em osteoblastos.

Diante do exposto, há indicativos que a TM com LT possa ter impacto sobre a PE, uma vez que a LT age na modulação diversos mediadores envolvidos na patogênese e resposta ao tratamento da periodontite experimental (PE). Considera-se a hipótese que a suplementação sistêmica com LT reduzirá a progressão e permitirá melhor resultado quando associada à raspagem e alisamento radicular (RAR), diminuindo a perda óssea alveolar; sendo, a hipótese nula primária a ausência de diferença na suplementação sistêmica com LT na progressão da PE quando considerado a perda óssea alveolar e, a hipótese nula secundária, a ausência de diferença entre a suplementação sistêmica com LT associada a RAR e a RAR isolada para redução da perda óssea alveolar. O objetivo primário deste estudo é se suplementação sistêmica com LT reduzirá a progressão da PE, controlando a resposta inflamatória local, e como objetivo secundário se a LT quando associada a RAR permitirá melhor resultado quando comparado com RAR apenas.

Materiais e métodos

2. Material e métodos

2.1 Animais

Cento e vinte ratos machos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), pesando aproximadamente 250-300g, com 4 meses de idade, foram mantidos sob as condições de ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, em temperatura ambiente de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, sistema de ventilação/exaustão de 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar de $55\pm 5\%$, alojados em gaiolas plásticas, sendo 4 animais por gaiola com ração e água ad libitum. As gaiolas eram higienizadas duas vezes por semana. O experimento foi realizado no período que compreende setembro de 2022 e janeiro de 2023. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (#0300/2021) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista dentro das normas vigentes adotadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). 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 e randomização

As diretrizes do NC3Rs (NC3Rs Reporting Guidelines Working Group, 2010) foram respeitadas para determinação da amostra assim como foi considerado estudos prévios com metodologia semelhante realizados em nosso laboratório para determinação da amostragem (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), análises histológicas e imuno-

histoquímicas, sendo assegurar relevância estatística. O presente estudo seguiu um modelo controlado, randomizado e cego.

Números de 1 a 120 foram marcados na porção superior da cauda dos animais utilizando caneta nanquin. 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

2.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grandes grupos, o grupo sem tratamento (ST) avaliando apenas a progressão da doença, e o grupo tratamento avaliando a resposta dos animais submetidos ao tratamento periodontal convencional de RAR. Posteriormente, cada grupo foi dividido em dois subgrupos, como demonstrado abaixo:

Grupo RAR/LT (n=30): os animais receberam a indução da PE com ligadura e início da suplementação diária de 250ml/kg de LT via gavagem gástrica (GG), continuada até o final do experimento. Decorridos 7 dias da indução (dia zero para os grupos com tratamento), foi realizada remoção da ligadura e RAR no primeiro molar inferior esquerdo. **Figura 1.**

Grupo RAR/SS (n=30): os animais receberam a indução da PE com ligadura e início da administração diária de 0,7ml/kg de solução salina (SS) via GG, continuada até o final do experimento. Decorridos 7 dias da indução (dia zero para os grupos com tratamento), será realizada remoção da ligadura e RAR do primeiro molar inferior esquerdo. **Figura 1.**

Grupo ST/SS (n=30): No dia zero, os animais foram submetidos a 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 2.**

Grupo ST/LT (n=30): No dia zero, os animais foram submetidos a 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 2.**

2.4 Indução da periodontite experimental

Para a execução de todos os procedimentos experimentais, 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. A indução da PE foi executada por meio da adaptação de um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº24, Coats Corrente, São Paulo, SP, Brasil) ao redor do primeiro molar inferior esquerdo, mantido em posição subgingival por meio de nós cirúrgicos (Johnson, 1975; de Almeida et al., 2007).

2.5 Protocolo de suplementação com LT ou administração da SS

A administração da SS ou suplementação da LT foi realizada por meio de GG, diariamente, iniciando no dia 0 da indução da PE. Os animais pertencentes aos grupos ST/LT e RAR/LT receberam a suplementação com LT na dose de 250mg/kg (Sindhu, Preethi, & Kuttan, 2010; Sindhu, & Kuttan, 2012), enquanto os animais pertencentes aos grupos ST/SS e RAR/SS receberam 0,7 mL/kg de solução salina com objetivo de serem submetidos ao mesmo estresse causado pela GG.

2.6 Protocolo de tratamento com RAR

A RAR foi executada por um operador calibrado e cego aos grupos experimentais (OAPV). Transcorridos 7 dias após a indução da PE, a ligadura foi removida e o tratamento local de RAR foi realizado com curetas manuais específicas (1–2 minifive curetas Gracey, Hu-Friedy, Chicago, IL) conforme preconizado por de Almeida et al., (2008). Posteriormente, a

bolsa periodonral ao redor do primeiro molar inferior esquerdo foi irrigada cuidadosamente com 1 mL de SS à 0,9% (Equiplex Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil).

2.7 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados por meio de superdosagem anestésica com tiopental sódico (150mg/kg) (Cristália, Itapira, São Paulo, Brazil) aos 7, 15 e 30 dias após a indução da PE (ST/SS e ST/LT) e aos 7, 15 e 30 dias após tratamento periodontal (RAR/SS e RAR/LT) consistindo em 10 animais por grupo/período. As hemi-mandíbulas foram removidas e fixadas em solução de formaldeído tamponado 4% por 48 horas.

2.8 Processamento histológico com desmineralização

Após fixação, as hemi-mandíbulas esquerdas foram 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 a processamento histológico convencional com subsequente inclusão em parafina de alta fusão. A microtomia foi executada para obtenção dos cortes histológicos com 4µm de espessura em uma progressão vestibulo-lingual, paralelamente ao plano sagital. Seis cortes equidistantes foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para análises histológicas e histométricas; cinco cortes foram submetidos à imunoistoquímica para detecção de IL-1β, TNF-α, IL-10, osteocalcina (OCN) e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).

2.9 Processamento imunoistoquímico

Foi adotada a técnica da imunoperoxidase indireta para detecção dos antígenos proposto, conforme proposto por Garcia et al., (2013). Seis secções foram desparafinizadas em xilol e hidratadas em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão

específico (Diva decloaker, Biocare Medical, Concord, CA, EUA), em câmara pressurizada (Decloaking chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95°C, por 20 minutos. No final de cada etapa as lâminas histológicas foram lavadas em PBS 0,1 M, pH 7,4. Posteriormente, as lâminas então, foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e 1% de soro albumina bovina por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em cinco lotes e cada lote incubado com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TRAP, anti-TNF-alpha, anti-IL10, anti-IL1beta e anti-OCN. Os cortes serão incubados com anticorpo secundário biotinilado por 2 horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por 1 hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit, Dako Laboratories, CA, EUA). Em virtude da técnica de análise de imunomarcação por densidade óptica, apenas as lâminas destinadas a marcação de TRAP foram submetidas a contracoloração com hematoxilina de Harris para permitir uma visualização adequada da citoarquitetura, em seguida todas as lâminas foram desidratação em etanol, diafanização em xilol, e cobertura com meio de montagem (Permount, Fisher Scientific, San Diego, CA, EUA) e lamínulas de vidro. Como controle negativo, os espécimes serão submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

2.10 Análise histométrica de POF

Para a determinação da Porcentagem de Osso na Furca (POF) foi utilizado um sistema de análise de imagem (Axiovision 4.8.2, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, 07740 Jena, Germany) para a mensuração da área total da furca (AF) (mm²) e área ocupada por osso (AO) (mm²). A AF será demarcada apicalmente por uma linha reta traçada a partir do ápice da raiz mesial em direção ao ápice da raiz distal. A AO terá 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 ($POF = (AO \times 100) / AF$), conforme descrito por de Almeida et al., (2019). A POF de cada espécime foi mensurada três vezes, em três dias diferentes, pelo mesmo examinador, calibrado e cego aos grupos experimentais (OAPV).

2.11 Análise histopatológica

A análise foi realizada por método score das características histopatológicas observadas na região de furca por um histologista certificado (EE) cego aos grupos e períodos experimentais através de microscopia óptica de luz (AxioLab®; Carl Zeiss, Gottingen, Alemanha). Os seguintes parâmetros foram avaliados: 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.

2.12 Análise imunoistoquímica

A técnica de imunomarcção por densidade óptica foi empregada para analisar as imagens dos cortes histológicos imunomarcados, como preconizado por King et al., (2002). Para as imagens dos cortes histológicos com imunomarcção de TNF- α , IL-1 β , IL-10, MMP-2 e MMP-9, considerou como área de interesse o teto da furca e a partir da qual se estendia apicalmente por uma distância de 1000 μ m, área de 1000 $\times$ 1000 μ m e com aumento de 20x. A região de interesse da imunomarcção da OCN estabeleceu-se a mesma área de interesse para as células TRAP-positivas, como será descrito posteriormente. A análise de TNF- α , IL-1 β , IL-10, OCN, MMP-2 e MMP-9 foi realizada através da ferramenta de limiar de cor do software ImagJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), sendo a porcentagem da densidade de imunomarcção óptica expressa como média $\pm$ desvio padrão.

As células TRAP-positivas multinucleadas foram quantificadas no centro do septo interradicular, correspondente a uma área de $1000 \times 1000\mu\text{m}$, com aumento de $20\times$. O limite coronário dessa área foi o contorno externo do tecido ósseo alveolar na região da furca, a partir do qual se estendia apicalmente por uma distância de $1000\mu\text{m}$. A quantidade de células TRAP-positivas foi expressa em média $\pm$ desvio padrão.

2.13 Desfecho primário e secundários

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 celulares (resposta dos tecidos e densidade de imunomarcção) relacionados com a área de interesse que observada durante todo período experimental.

2.14 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. As análises da POF e densidade de imunomarcção apresentaram distribuição paramétrica dos dados, sendo submetidas a análise de variância pelo teste de ANOVA *one-way* e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados

3 Resultados

3.1 *Análise histométrica da porcentagem de osso na furca (POF)*

Os resultados da análise da porcentagem de osso na furca estão apresentadas na **Figura 3**. Na análise intragrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($22,37\% \pm 9,18$) apresentou menor POF quando comparado com o período de 15 e 30 dias ($36,58\% \pm 8,26$; $34,31\% \pm 8,31$) ($p \leq 0,05$). Na análise intergrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($22,37\% \pm 9,18$) apresentou menor POF em relação aos grupos ST/LT, RAR/SS e RAR/LT ($50,15\% \pm 7,55$; $62,79\% \pm 5,68$; $70,22\% \pm 5,14$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 15 dias ($36,58\% \pm 8,26$) apresentou menor POF ao comparar com o grupo RAR/SS e RAR/LT ($55,68\% \pm 6,279$; $70,90\% \pm 7,88$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 30 dias ($34,21\% \pm 8,13$) apresenta menor POF na comparação com o grupo ST/LT, RAR/SS e RAR/LT ($53,38\% \pm 9,60$; $56,741\% \pm 7,78$; $77,49\% \pm 4,14$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 7, 15 e 30 dias ($50,15\% \pm 7,55$; $41,41\% \pm 8,41$; $57,38\% \pm 9,60$) apresentou menor POF em relação ao grupo RAR/LT ($70,22\% \pm 5,14$; $70,90\% \pm 7,88$; $77,49\% \pm 4,14$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 7, 15 e 30 dias ($62,79\% \pm 5,68$; $55,683\% \pm 6,279$; $56,741\% \pm 7,78$) apresentou menor POF na comparação com o grupo RAR/LT 7, 15 e 30 dias ($70,22\% \pm 5,14$; $70,90\% \pm 7,88$; $77,49\% \pm 4,14$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$).

3.2 *Análise histológica da região de furca*

Os resultados da análise histopatológica estão apresentados na **Figura 3** e **Tabela 1**. A característica histopatológica dos tecidos periodontais na região de furca do primeiro molar inferior, serão apresentadas de acordo com o parâmetro avaliado e a porcentagem/score de ocorrência nos espécimes.

3.2.1 *Análise histológica da região de furca do grupo ST/SS*

O período de 7 dias apresentou intenso infiltrado inflamatório (100%), estendendo por todo tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca (100%), pequena quantidade tanto de

fibroblastos quanto de fibras colágenas (40%), desestruturação tecidual severa com áreas de necrose (60%), trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos (40%) ou áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (60%). Aos 15 dias foi observado diminuição da intensidade e extensão do processo inflamatório, com inflamação intensa (80%) a inflamação moderada (20%), estendendo por todo tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca (80%) ou apenas no tecido conjuntivo da região de furca (20%), apresentando o mesmo padrão de estruturação de tecido conjuntivo e ósseo na região de furca que o período de 7 dias. Aos 30 dias foi observado diminuição da intensidade e extensão do processo inflamatório em relação ao período de 7 e 15 dias, com inflamação intensa (60%) a inflamação moderada (40%), estendendo por todo tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca (60%) ou apenas no tecido conjuntivo da região de furca (20%), apresentando o mesmo padrão de estruturação de tecido conjuntivo e ósseo na região de furca que o período de 7 e 15 dias.

3.2.2 Análise histológica da região de furca do grupo ST/LT

O período de 7 dias apresentou inflamação intensa (80%) a moderada (20%), estendendo por todo tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca (40%) ou apenas no tecido conjuntivo da região de furca (60%). O período de 15 dias apresentou redução na intensidade da inflamação nos espécimes de intensa (60%) a moderada (40%), com semelhança na extensão do processo inflamatório e padrão de estruturação do tecido conjuntivo na região de furca quando comparado com o período de 7 dias. Aos 30 dias foi observado diminuição da intensidade e extensão do processo inflamatório em relação ao período de 7 e 15 dias, com inflamação intensa (60%) a inflamação moderada (40%), estendendo por todo tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca (80%) ou apenas no tecido conjuntivo da região de furca (20%). Foi observado o mesmo padrão estruturação do tecido conjuntivo na região de furca nos períodos de 7, 15 e 30 dias, pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas

(60%) ou desestruturação tecidual severa com áreas de necrose (40%). Além disso, o período de 30 dias apresentou o mesmo padrão de estruturação do tecido ósseo na região de furca em relação aos 15 dias, com trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos (80%) ou áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos (20%).

3.2.3 Análise histológica da região de furca do grupo RAR/SS

O período de 7 dias apresentou inflamação discreta (20%) a moderada (80%), estendendo-se parcialmente (40%) ou totalmente (60%) do tecido conjuntivo da região de furca com pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (40%) ou desestruturação tecidual severa com áreas de necrose (60%), e trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos (100%). Aos 15 dias foi observado inflamação discreta (60%) a moderada (40%), estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca (100%), pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (100%) e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos (100%). Em 30 dias, observou-se ausência de inflamação (60%) ou inflamação discreta (40%), estendendo apenas em parte do tecido conjuntivo, com predomínio moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso), e trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea ou trabéculas ósseas de contorno irregular.

3.2.4 Análise histológica da região de furca do grupo RAR/LT

Em 7 dias, foi observado inflamação discreta (60%) a moderada (40%), estendendo-se apenas em parte ou totalmente no tecido conjuntivo da região de furca (40%), pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (80%), trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos (100%). O

período de 15 dias, apresentou inflamação discreta (100%), estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca (100%), com pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas (100%), e trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos (100%). Aos 30 dias, foi observado ausência de inflamação (80%) ou inflamação moderada (20%), moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso) (80%), com trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos (80%).

3.3 Análise imunoistoquímica

3.3.1 TNF- α

Os resultados da análise da imunoistoquímica por densidade de imunomarcacão para TNF- α estão apresentadas na **Figura 4**. Na análise intragrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($31,24\% \pm 3,52$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para TNF- α em comparacão aos períodos de 15 dias e 30 dias ($25,33\% \pm 2,25$; $20,56\% \pm 2,55$) ($p \leq 0,05$), o mesmo é observado entre os períodos de 15 e 30 dias do respectivo grupo ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT de 7 dias ($19,50\% \pm 1,92$) demonstrou menor densidade de imunomarcacão para TNF- α em relacão ao período de 30 dias ($22,19\% \pm 1,57$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/LT 7 dias ($16,24\% \pm 1,63$) apresentou menor densidade de imunomarcacão para TNF- α em relacão aos períodos de 15 e 30 dias ($20,48\% \pm 2,23$; $19,24\% \pm 1,33$) ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupos, o grupo ST/SS 7 dias ($31,24\% \pm 3,52$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para TNF- α em comparacão ao grupo RAR/SS 7 dias ($24,19\% \pm 0,81$) e RAR/LT 7 dias ($19,24\% \pm 1,33$) ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 15 dias ($25,33\% \pm 2,25$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para TNF α em relacão ao grupo RAR/LT ($20,48\% \pm 2,23$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 7 dias ($24,19\% \pm 0,81$) apresentou menor densidade de imunomarcacão para TNF- α quando comparado ao grupo

RAR/SS 30 dias ($19,24\% \pm 1,33$) e RAR/LT 7 dias ($19,24\% \pm 1,33$) ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 30 dias ($22,19\% \pm 1,57$) apresentou maior densidade de imunomarcção para TNF- α em relação ao grupo RAR/LT ($19,24\% \pm 1,33$), no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 7 dias ($19,50\% \pm 1,92$) apresentou menor densidade de imunomarcção para TNF- α em comparação ao grupo RAR/SS 7 dias ($24,19\% \pm 0,81$) e RAR/LT 7 dias ($19,24\% \pm 1,33$) ($p \leq 0,05$).

3.3.2 IL-1 β

Os resultados da análise da imunoistoquímica por densidade de imunomarcção para IL-1 β estão apresentadas na **Figura 5**. Na análise intragrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($27,49\% \pm 2,82$) apresentou maior densidade de imunomarcção para IL-1 β em comparação aos períodos de 15 e 30 dias ($18,29\% \pm 1,31$; $17,05\% \pm 0,97$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/LT 7 dias ($20,46\% \pm 3,35$) apresentou maior densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação aos períodos de 15 e 30 dias ($15,42\% \pm 1,41$; $15,13\% \pm 0,81$) ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($27,49\% \pm 2,82$) apresentou maior densidade de imunomarcção de IL-1 β em comparação ao grupo ST/LT, RAR/SS e RAR/LT no período de 7 dias ($16,85\% \pm 2,09$; $22,17\% \pm 3,45$; $20,46\% \pm 3,35$) ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 15 dias ($18,29\% \pm 1,31$) apresentou maior densidade de imunomarcção para IL-1 β em comparação ao grupo RAR/LT 15 dias ($15,42\% \pm 1,41$) ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 7, 15 e 30 dias ($16,85\% \pm 2,09$; $16,49\% \pm 1,53$; $16,16\% \pm 1,55$) apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação ao grupo RAR/SS ($22,17\% \pm 3,45$; $21,62\% \pm 4,23$; $18,67\% \pm 0,98$) nos mesmos períodos experimentais. ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 15 e 30 dias ($21,62\% \pm 4,23$; $18,67\% \pm 0,98$) apresentaram maior densidade de imunomarcção para IL-1 β quando comparado com o RAR/LT ($15,42\% \pm 1,41$; $15,13\% \pm 0,81$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/LT 30 dias ($15,13\% \pm 0,81$) apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação aos grupos RAR/SS e ST/SS ($18,67\% \pm 0,98$; $17,05\% \pm 0,97$) no mesmo período ($p \leq 0,05$).

3.3.3 IL-10

Os resultados da análise da imunoistoquímica por densidade de imunomarcacão de IL-10 estão apresentados na **Figura 6**. Na análise intragrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($23,52\% \pm 1,17$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para IL-10 em comparacão aos períodos de 15 e 30 dias ($17,56\% \pm 1,01$; $14,50\% \pm 1,90$) ($p \leq 0,05$), o mesmo é observado entre os períodos de 15 e 30 dias do respectivo grupo ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 7 dias ($28,87\% \pm 3,59$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para IL-10 em comparacão aos períodos de 15 e 30 dias ($17,93\% \pm 1,93$; $23,00\% \pm 1,88$), o mesmo é observado entre os períodos de 15 e 30 dias do respectivo grupo ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 7 dias ($24,62\% \pm 2,07$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para IL-10 quando comparado ao período de 15 e 30 dias ($18,84\% \pm 1,36$; $13,97\% \pm 1,98$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/LT 7 dias ($26,70\% \pm 2,12$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para IL-10 em relacão aos períodos de 15 e 30 dias ($21,21\% \pm 1,50$; $21,85\% \pm 1,91$) ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupo, o grupo ST/SS 7, 15 e 30 dias ($23,52\% \pm 1,17$; $17,56\% \pm 1,01$; $14,50\% \pm 1,90$), apresentou menor densidade de imunomarcacão para IL-10 quando comparado ao grupo RAR/LT nos mesmos períodos ($26,70\% \pm 2,12$; $21,21\% \pm 1,50$; $21,85\% \pm 1,91$) ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 30 dias ($14,50\% \pm 1,90$) apresentou menor densidade de imunomarcacão para IL-10 quando comparado ao grupo RAR/LT ($21,85\% \pm 1,91$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 15 dias ($17,93\% \pm 1,79$) apresentou menor densidade de imunomarcacão para IL-10 quando comparado ao grupo RAR/LT ($21,21\% \pm 1,50$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 15 e 30 dias ($18,84\% \pm 1,36$; $13,97\% \pm 1,98$) apresentou menor densidade de imunomarcacão para IL-10 quando comparado com o grupo RAR/LT ($21,21\% \pm 1,50$; $21,85\% \pm 1,91$) nos mesmos períodos experimentais ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 30 dias ($23,00\% \pm 1,88$) apresentou maior densidade de imunomarcacão para IL-10 em relacão ao grupo RAR/SS 30 dias ($13,97\% \pm 1,98$) ($p \leq 0,05$).

3.3.4 OCN

Os resultados da análise da imunoistoquímica por densidade de imunomarcção para OCN estão apresentados na **Figura 7**. Na análise intragrupo, o grupo ST/LT 7 dias ($14,40\% \pm 1,62$) apresentou menor densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o período de 30 dias ($19,23\% \pm 1,79$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/LT 7 e 15 dias ($21,81\% \pm 2,87$; $21,33\% \pm 2,32$) apresentou maior densidade de imunomarcção para OCN em relação ao grupo RAR/LT 30 dias ($15,68\% \pm 1,08$) ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupo, o grupo ST/SS 7 e 15 dias ($14,17\% \pm 1,76$; $14,34\% \pm 2,05$) apresentou menor densidade de imunomarcção para OCN na comparação com o grupo RAR/LT 7 30 dias ($21,81\% \pm 2,37$; $21,33\% \pm 2,32$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 7 e 15 dias ($14,76\% \pm 3,73$; $11,35\% \pm 3,29$) apresentou menor densidade de imunomarcção para OCN em relação ao grupo RAR/LT ($21,81\% \pm 2,37$; $21,33\% \pm 2,32$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 15 e 30 dias ($18,42\% \pm 4,28$; $19,23\% \pm 1,79$) apresenta maior densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o grupo RAR/SS ($11,35\% \pm 3,29$; $14,14\% \pm 1,77$) nos mesmos períodos ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 7 dias ($14,40\% \pm 1,62$) apresentou menor densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o grupo RAR/LT ($21,81\% \pm 2,37$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 30 dias ($19,23\% \pm 1,79$) apresentou maior densidade de imunomarcção para OCN quando comparado com o grupo RAR/LT ($15,68\% \pm 1,08$) no mesmo período ($p \leq 0,05$).

3.3.5 TRAP

Os resultados da análise de imunoistoquímica da quantificação de células TRAP-positivas está apresentado na **Figura 8**. Na análise intragrupo, o grupo ST/LT 7 dias ($12 \pm 2,12$) apresentou menor número de células TRAP-positivas quando comparado ao grupo ST/LT 15 dias ($22 \pm 2,00$) ($p \leq 0,05$), o período de 30 dias ($9,2 \pm 1,92$) apresentou menor número de células

TRAP-positivas em relação aos 15 dias do mesmo grupo ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 15 dias ($30,2 \pm 7,01$), apresenta maior número de células TRAP-positivas em relação ao período de 30 dias ($21,6 \pm 1,82$) ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 15 dias ($13,2 \pm 2,17$) apresenta menor número de células TRAP-positivas em relação ao período de 30 dias ($18,6 \pm 2,61$) ($p \leq 0,05$).

Na análise intergrupo, o grupo ST/SS 7 dias ($31 \pm 7,28$) apresenta maior número de células TRAP-positivas quando comparado ao grupo ST/LT, RAR/SS e RAR/LT ($12 \pm 2,12$; $20 \pm 6,20$; $14,2 \pm 1,30$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 15 dias ($30,2 \pm 7,01$) apresentou maior número de células TRAP-positivas em relação aos grupos ST/LT, RAR/SS e RAR/LT ($22 \pm 2,00$; $13,2 \pm 2,17$; $12,4 \pm 1,82$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/SS 30 dias apresentou maior número de células TRAP-positivas quando comparado com os grupos ST/LT e RAR/LT ($9,2 \pm 1,92$; $15,4 \pm 2,30$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 15 dias ($22 \pm 2,0$) apresentou maior número de células TRAP-positivas em relação aos grupos RAR/SS e RAR/LT ($13,2 \pm 2,17$; $12,4 \pm 1,82$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo ST/LT 30 dias ($9,2 \pm 1,92$) apresentou menor número de células TRAP-positivas quando comparadas ao grupo RAR/SS e RAR/LT ($18,6 \pm 2,61$; $15,4 \pm 2,30$) no mesmo período ($p \leq 0,05$). O grupo RAR/SS 7 dias ($20 \pm 6,20$) apresenta maior número de células TRAP-positivas em relação ao grupo RAR/LT ($14,2 \pm 1,30$) no mesmo período ($p \leq 0,05$).

Discussão

4. Discussão

A LT apresenta-se como um fitoquímico capaz de modular a resposta do hospedeiro devido sua capacidade anti-inflamatória, antioxidante e atuar positivamente sobre o metabolismo ósseo. Dessa forma, o presente estudo avaliou a hipótese que a suplementação sistêmica com LT teria a capacidade de reduzir a progressão da PE, associada ou não a terapia de raspagem e alisamento radicular (RAR). Diante dos dados obtidos, podemos considerar que o presente estudo rejeita as hipóteses nulas primária e secundária, demonstrando que a suplementação de LT reduz a progressão da PE e melhora os resultados da POF nos grupos com ou sem RAR.

De acordo com a literatura, diversas metodologias podem ser utilizadas para a induzir PE, desde a utilização da ligadura isolada ou em associação com aplicação de lipopolissacarídeo (LPS) e/ou por patógeno-chave (e.g. *P. gingivalis*) (Hajishengallis & Abe, 2013; Dumitrescu, El-Aleem, Morales-Aza & Donaldson, 2004; Zhang, Jum Rigney & Tribble, 2014). No presente estudo, para avaliar o impacto da LT na modulação da patogênese e no tratamento da PE foi adotado o método instalação de ligadura isolada com fio de algodão, tanto o fio seda ou de algodão são caracterizados como fios multifilamentares com alta capilaridade, permitindo maior adesão da placa bacteriana e ulceração do epitélio do sulco, favorecendo penetração de bactérias periodontopatogênicas no tecido epitelial e conjuntivo (Klausen, 1991; Gravis et al., 2008), tendo desta forma, migração apical do epitélio juncional, estabelecendo uma resposta imunoinflamatória, perda de fibras do ligamento periodontal e destruição do tecido ósseo (Klausen, 1991; Gravis et al., 2008). Ao considerar o modelo animal, foram utilizados ratos machos da raça Wistar, da linhagem *Rattus norvegicus albinus*, sendo comumente utilizados para avaliar a patogênese e a resposta do hospedeiro ao tratamento da PE, este modelo animal compartilha características anatômicas semelhantes à dos seres humanos, principalmente na região de molares, além de apresentar baixo custo, fácil manuseio e por garantir

reprodutibilidade quando comparado com outros modelos de animais (e.g. camundongo) (Oz & Puleo, 2011).

Ao observar o período de permanência da ligadura, estudos como de Vargas-Sanchez et al., (2017), evidenciaram que em 3 a 7 dias se configura o período mínimo para promover a destruição tecidual na região de interesse, principalmente devido a localização da ligadura em região subgengival próximo da crista óssea e por promover maior resposta imunoinflamatória local, sendo que o presente estudo manteve a ligadura por todo o período experimental não removendo a mesma após 7 dias, visto que a remoção da ligadura no período anteriormente mencionado indicaria um tratamento local o que poderia influenciar a resposta tecidual frente a proposta terapêutica de teste. Ademais, estudos como de Kuhr et al., (2004) e de Molon et al., (2018), demonstram que a partir do 15º dia, existe uma estabilização da destruição do tecidual, considerando a hipótese de perpetuação de um estágio crônico da doença. Contudo, ao considerando a POF como variável primária, observou-se um processo de reparação tecidual aos 30 dias de indução da doença, como pode ser evidenciado nos grupos de ST/LT e RAR/LT, contrapondo os estudos anteriores de Kuhr et al., (2004) e de Molon et al., (2018), denotando que a suplementação sistêmica com LT foi capaz de minimizar os danos da PE e reduzir a perda óssea alveolar, representada pela POF nos períodos de avaliação.

Estudos como de Takeda et al., (2017), demonstraram que a LT estimula células osteoblásticas por meio da supressão de macrófagos quando expostos a RANKL, e Chung et al., (2017), relataram a atividade anti-inflamatória da LT por meio da redução da secreção de TNF, IL-1 β e IL-6 através cultura de células mononucleares do sangue periférico pré-tratados com LT e incubadas com LPS, este mesmo autor considerara que a LT poderia ser participativa na resolução de inflamações crônicas. Ao avaliar os resultados da variável primária e as características histológicas, observou-se que o grupo ST/LT apresentou significativamente maior POF aos 7 e 30 dias quando comparado ao grupo ST/SS, assim como o grupo ST/LT

apresentou uma menor intensidade e extensão do processo inflamatório comparado com o grupo ST/SS nos períodos de 7 e 30 dias. Ao considerar os grupos submetidos a RAR, o grupo RAR/LT, apresentou significativamente maior POF aos 15 e 30 dias em comparação ao RAR/SS, corroborando com os resultados histológicos que demonstraram menor características inflamatórias e menor destruição tecidual no grupo RAR/LT. Diante do exposto, em ambos os grupos ST/LT e RAR/LT, podemos inferir que a LT contribuiu positivamente no processo de reparação tecidual e resolução da inflamação, corroborando com os estudos anteriormente mencionados, evidenciando a atuação positiva da LT sobre mecanismos relacionado a patogênese da periodontite.

Sabe-se que a Fosfatase Ácida Tartarato Resistente (TRAP) é uma enzima localizada no compartimento lisossomal de osteoclastos sendo comumente empregada em análises imunoistoquímica para observar e quantificar células osteoclastivas em atividade (Haberman et al., 2007). De acordo com os resultados, o grupo ST/LT 15 e 30 dias apresentou significante menor número de células TRAP-positivas quando comparadas ao grupo RAR/SS e RAR/LT nos mesmos períodos, o mesmo pode ser observado no grupo RAR/LT aos 7 dias comparados ao RAR/SS. Observa-se ainda que a utilização da LT isolada como tratamento da PE apresentou resultados semelhantes com os grupos de tratamento mecânico de RAR, considerado o tratamento padrão ouro da doença periodontal. Os resultados apresentados pela TRAP podem ser justificados na capacidade antioxidativa da LT, como evidenciado na literatura, capaz de promover a inativação de EROS e peroxidação lipídica (Polyakov et al., 2001; Rodriguez-Amaya, 2001). Além disso, a LT suprime o estresse oxidativo assim como diminuiu a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-8; e a diferenciação de osteoclastos (Tominari et al., 2017; Li et al., 2018).

Sabendo que a OCN é uma proteína expressa por osteoblastos e cementoblastos, atuando especificamente na atividade osteoblástica (Gallop et al., 1980; Hauschka et al., 1989; Seibel, 2000; Zoch, Clemens & Riddle, 2016), nossos resultados demonstraram maior densidade de

imunomarcção para OCN nos grupos que receberam LT. Notou-se que o grupo ST/LT apresentou maior densidade de imunomarcção para OCN com aumento progressivo nos períodos experimentais, enquanto o grupo RAR/LT apresentou maior densidade de imunomarcção para OCN nos períodos experimentais de 7 e 15 dias, com diminuição aos 30 dias. Dessa forma, podemos inferir que o desbridamento mecânico associado à LT contribuiu para aceleração do processo de reparo tecidual assim como na intensificação nos primeiros períodos.

A IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias reconhecidamente participativa na patogênese da periodontite, influenciando negativamente na progressão e na destruição tecidual (Tawfig, 2016; Buduneli, 2019). Ao observar os resultados para densidade de imunomarcção de IL-1 β , notou-se que o grupo ST/LT aos 7 dias apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-1 β em relação ao grupo ST/SS. O mesmo foi observado no grupo RAR/LT 15 e 30 dias que apresentou menor densidade de imunomarcção para IL-1 β quando comparado com o RAR/SS nos mesmos períodos. Quando se avaliou a TNF- α , o grupo ST/SS 7 dias apresentou maior densidade de imunomarcção para TNF- α quando comparado com os demais grupos. Por outro lado, o grupo RAR/LT aos 7 dias apresentou menor densidade de imunomarcção quando comparado ao grupo RAR/SS, denotando influencia na reposta inflamatória em seu estágio agudo. Os dados apresentados corroboram com estudos na literatura os quais demonstraram papel anti-inflamatório da LT por meio da redução da expressão de IL-1 β TNF- α , IL-6, IL-8 (Li et al., 2018; Chung et al., 2017). Estes resultados são condizentes com a análise histopatológica que demonstrou que o grupo RAR/LT apresentou uma menor intensidade e extensão do processo inflamatório na região de interesse. Zhang et al., (2014) e Claudino et al., (2010) relataram que a IL-10 é participativa na reabsorção óssea inflamatória, inibindo a osteoclastogênese e estimulando a diferenciação osteoblástica. Ao avaliar os resultados, observa-se uma maior densidade de imunomarcção para IL-10 no grupo RAR/LT

em 15 e 30 dias quando comparados com RAR/SS nos mesmos períodos, caracterizando uma melhor resolução do processo inflamatório.

Conforme relatado por Grainger et al., (2022), a biodisponibilidade dos carotenóides (e.g, LT), pode ser influenciada por características do hospedeiro, como a eficiência digestiva e estado nutricional, o que pode influenciar alguns resultados obtidos neste estudo em virtude do modelo animal utilizado. Ademais, a LT apresenta pequena biodisponibilidade em decorrência da sua característica de lipofilicidade e uma baixa estabilidade, tornando-a menos solúvel em meio aquoso (e.g. fluido gastrointestinal), reduzindo sua concentração plasmática (Algan, Gungor-Ak & Karatas, 2022), tendo a necessidade de diluição em meio gorduroso (e.g. óleo de girassol). Diante dos resultados apresentados e as possíveis limitações observadas, considera-se como possíveis estudos futuros a execução de protocolos experimentais com aplicação local do medicamento com sistema de entrega em nanoestruturados (e.g. nanoemulsões, nanopartículas de polímero e nanopartículas híbridas de polímero-lipídio), conforme relatado por Algan, Gungor-Ak e Karata (2022), para avaliar o reparo dos tecidos periodontais no mesmo modelo experimental, visto que se avaliou apenas a aplicação sistêmica da LT. Ademais, sugere-se a realização de estudo pré-clínico para avaliar se a LT quando obtida por microalgas poderia apresentar melhores resultados quando comparada com a LT extraída por folhas de calêndula, como empregado neste estudo. A sugestão anteriormente mencionada, se baseia nos estudos de Lin, Lee e Chang (2015) e Fernández-Sevilla, Acien e Molina (2010), a qual pode-se obter maior teor de LT quando extraído de microalgas, o que poderia influenciar em sua eficácia terapêutica. Os resultados do presente estudo elucidam alguns pontos do verdadeiro potencial terapêutico do uso sistêmico da LT como terapia coadjuvante a RAR para o tratamento da doença periodontal. Tendo em vista que a patogênese da doença periodontal envolve diversos eventos com mecanismos complexos, nos quais abrangem tanto a ação direta das bactérias nos tecidos periodontais como a destruição tecidual de maneira indireta ativada pelo sistema de

defesa do hospedeiro, são necessários outros estudos pré-clínicos para melhor elucidar os mecanismos pelo qual a LT atua no tratamento da doença periodontal.

Conclusão

5. Conclusão

Dentro dos limites do presente estudo podemos concluir que a suplementação sistêmica com LT reduziu a progressão da PE, controlando a resposta inflamatória local e quando a LT foi associada a RAR, reduziu a inflamação na área de furca apresentando maior POF quando comparado com os demais grupos de RAR, mostrando ser uma terapia coadjuvante segura aos tecidos periodontais e promissora para o tratamento da doença periodontal.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Algan AH, Gungor-Ak A, Karatas A. Nanoscale Delivery Systems of Lutein: An Updated Review from a Pharmaceutical Perspective. *Pharmaceutics*, 2022, 14(9), 1852.
- Abe, T., & Hajishengallis, G. (2013). Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *Journal of immunological methods*, 394(1-2), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2013.05.002>
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. (2000). Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3. *Ophthalmology*, 107(12), 2224–2232. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(00\)00409-7](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(00)00409-7)
- Age-Related Eye Disease Study Research Group, SanGiovanni, J. P., Chew, E. Y., Clemons, T. E., Ferris, F. L., 3rd, Gensler, G., Lindblad, A. S., Milton, R. C., Seddon, J. M., & Sperduto, R. D. (2007). The relationship of dietary carotenoid and vitamin A, E, and C intake with age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 22. *Archives of Ophthalmology*, 125(9), 1225–1232. <https://doi.org/10.1001/archophth.125.9.1225>
- Arora, N., Avula, H., & Avula, J. K. (2013). The adjunctive use of systemic antioxidant therapy (lycopene) in nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a short-term evaluation. *Quintessence International*, 44(6), 395–405. <https://doi.org/10.3290/j.qi.a29188>
- Aune, D., Chan, D. S. M., Vieira, A. R., Navarro Rosenblatt, D. A., Vieira, R., Greenwood, D. C., & Norat, T. (2012). Dietary compared with blood concentrations of carotenoids and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(2), 356–373. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034165>
- Balci Yuce, H., Lektemur Alpan, A., Gevrek, F., & Toker, H. (2018). Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 53(1), 131–138. <https://doi.org/10.1111/jre.12497>
- Bartold, P. M., & Van Dyke, T. E. (2013). Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts: Unlearning learned concepts. *Periodontology 2000*, 62(1), 203–217. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00450.x>
- Bernstein, P. S., Li, B., Vachali, P. P., Gorusupudi, A., Shyam, R., Henriksen, B. S., & Nolan, J. M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 50, 34–66. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.10.003>

- Bezerra, M. M., de Lima, V., Alencar, V. B., Vieira, I. B., Brito, G. A., Ribeiro, R. A., & Rocha, F. A. (2000). Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 71(6), 1009–1014. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.6.1009>
- Buduneli, N. (2020). *Biomarkers in periodontal health and disease: Rationale, benefits, and future directions*. Springer International Publishing.
- Caton, J. G., Ciancio, S. G., Blieden, T. M., Bradshaw, M., Crout, R. J., Hefti, A. F., Massaro, J. M., Polson, A. M., Thomas, J., & Walker, C. (2000). Treatment with subantimicrobial dose doxycycline improves the efficacy of scaling and root planing in patients with adult periodontitis. *Journal of Periodontology*, 71(4), 521–532. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.4.521>
- Chapple, I. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(5), 287–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb00760.x>
- Chava, V. K., & Vedula, B. D. (2013). Thermo-reversible green tea catechin gel for local application in chronic periodontitis: a 4-week clinical trial. *Journal of Periodontology*, 84(9), 1290–1296. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120425>
- Chetan, P., Tonmoy, G., Basil, G., Imran, P., Rahulkumar, M., Kaumeel, C., Ghosh, A., & Mishra, S. (2016). Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. *Algal Research*, 15, 24–31.
- Chong, E. W.-T., Wong, T. Y., Kreis, A. J., Simpson, J. A., & Guymer, R. H. (2007). Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 335(7623), 755. <https://doi.org/10.1136/bmj.39350.500428.47>
- Chung, R. W. S., Leanderson, P., Lundberg, A. K., & Jonasson, L. (2017). Lutein exerts anti-inflammatory effects in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 262, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.05.008>
- Claudino, M., Garlet, T. P., Cardoso, C. R. B., de Assis, G. F., Taga, R., Cunha, F. Q., Silva, J. S., & Garlet, G. P. (2010). Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *European Journal of Oral Sciences*, 118(1), 19–28. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2009.00706.x>
- Dai, Z., Wang, R., Ang, L.-W., Low, Y.-L., Yuan, J.-M., & Koh, W.-P. (2014). Protective effects of dietary carotenoids on risk of hip fracture in men: the Singapore Chinese Health Study: Dietary carotenoids in relation to hip fracture risk in men. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 29(2), 408–417. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2041>
- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. A. (2012). *Porphyromonas gingivalis* as a potential community activist for disease. *Journal of Dental Research*, 91(9), 816–820. <https://doi.org/10.1177/0022034512453589>

- de Almeida, J. M., Marques, B. M., Novaes, V. C. N., de Oliveira, F. L. P., Matheus, H. R., Fiorin, L. G., & Ervolino, E. (2019). Influence of adjuvant therapy with green tea extract in the treatment of experimental periodontitis. *Archives of Oral Biology*, 102, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.03.028>
- de Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Bonfante, S., & Garcia, V. G. (2008). Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *Journal of Periodontology*, 79(11), 2156–2165. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.080103>
- de Almeida, J. M., Theodoro, L. H., Bosco, A. F., Nagata, M. J. H., Oshiiwa, M., & Garcia, V. G. (2007). Influence of photodynamic therapy on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 78(3), 566–575. <https://doi.org/10.1902/jop.2007.060214>
- de Molon, R. S., Park, C. H., Jin, Q., Sugai, J., & Cirelli, J. A. (2018). Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. Microscopy research and technique, 81(12), 1412–1421. <https://doi.org/10.1002/jemt.23101>
- Dodington, D. W., Fritz, P. C., Sullivan, P. J., & Ward, W. E. (2015). Higher intakes of fruits and vegetables, β -carotene, vitamin C, α -tocopherol, EPA, and DHA are positively associated with periodontal healing after nonsurgical periodontal therapy in nonsmokers but not in smokers. *The Journal of Nutrition*, 145(11), 2512–2519. <https://doi.org/10.3945/jn.115.211524>
- Du, S.-Y., Zhang, Y.-L., Bai, R.-X., Ai, Z.-L., Xie, B.-S., & Yang, H.-Y. (2015). Lutein prevents alcohol-induced liver disease in rats by modulating oxidative stress and inflammation. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(6), 8785–8793.
- Dumitrescu, A. L., Abd-El-Aleem, S., Morales-Aza, B., & Donaldson, L. F. (2004). A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *Journal of clinical periodontology*, 31(8), 596–603. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2004.00528.x>
- Ek-Rylander, B., Flores, M., Wendel, M., Heinegård, D., & Andersson, G. (1994). Dephosphorylation of osteopontin and bone sialoprotein by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. Modulation of osteoclast adhesion in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(21), 14853–14856. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)36541-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)36541-9)
- Fernández-Sevilla JM, Acien Fernández FG, Molina Grima E. Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 2010, 86(1), 27–40.
- Gallop, P. M., Lian, J. B., & Hauschka, P. V. (1980). Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin K. *The New England Journal of Medicine*, 302(26), 1460–1466. <https://doi.org/10.1056/NEJM198006263022608>

- Gao, L., Faibish, D., Fredman, G., Herrera, B. S., Chiang, N., Serhan, C. N., Van Dyke, T. E., & Gyurko, R. (2013). Resolvin E1 and chemokine-like receptor 1 mediate bone preservation. *The Journal of Immunology*, 190(2), 689–694. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103688>
- Gao, L. N., An, Y., Lei, M., Li, B., Yang, H., Lu, H., Chen, F. M., & Jin, Y. (2013). The effect of the coumarinlike derivative osthole on the osteogenic properties of human periodontal ligament and jaw bone marrow mesenchymal stem cell sheets. *Biomaterials*, 34(38), 9937–9951.
- Garcia, V. G., Gualberto Júnior, E. C., Fernandes, L. A., Bosco, A. F., Hitomi Nagata, M. J., Casatti, C. A., Ervolino, E., & Theodoro, L. H. (2013). Adjunctive antimicrobial photodynamic treatment of experimentally induced periodontitis in rats with ovariectomy. *Journal of Periodontology*, 84(4), 556–565. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120163>
- Golub, L. M., Lee, H. M., Lehrer, G., Nemiroff, A., McNamara, T. F., Kaplan, R., & Ramamurthy, N. S. (1983). Minocycline reduces gingival collagenolytic activity during diabetes. Preliminary observations and a proposed new mechanism of action. *Journal of Periodontal Research*, 18(5), 516–526. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1983.tb00388.x>
- Graves, D. T., Fine, D., Teng, Y.-T. A., Van Dyke, T. E., & Hajishengallis, G. (2008). The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases: Rodent models for periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(2), 89–105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2007.01172.x>
- Grainger EM, Webb MZ, Simpson CM, Chitchumroonchokchai C, Riedl K, Moran NE, Clinton, SK. Assessment of dietary carotenoid intake and biologic measurement of exposure in humans. *Methods in enzymology*, 2022, 674, 255–295.
- Habermann, B., Eberhardt, C., Feld, M., Zichner, L., & Kurth, A. A. (2007). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. *Acta Orthopaedica*, 78(2), 221–225. <https://doi.org/10.1080/17453670710013717>
- Hasturk, H., Kantarci, A., Goguet-Surmenian, E., Blackwood, A., Andry, C., Serhan, C. N., & Van Dyke, T. E. (2007). Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. *The Journal of Immunology*, 179(10), 7021–7029. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.7021>
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D. E., & Gundberg, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological Reviews*, 69(3), 990–1047. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.3.990>
- Hayman, A. R. (2008). Tartrate - resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity*, 41(3), 218–223.
- Hirata, N., Ichimaru, R., Tominari, T., Matsumoto, C., Watanabe, K., Taniguchi, K., Hirata, M., Ma, S., Suzuki, K., Grundler, F., Miyaura, C., & Inada, M. (2019). Beta-

- cryptoxanthin inhibits lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation and bone resorption via the suppression of inhibitor of NF- κ B kinase activity. *Nutrients*, 11(2), 368. <https://doi.org/10.3390/nu11020368>
- Holzhausen, M., Rossa Júnior, C., Marcantonio Júnior, E., Nassar, P. O., Spolidório, D. M. P., & Spolidório, L. C. (2002). Effect of selective cyclooxygenase-2 inhibition on the development of ligature-induced periodontitis in rats. *Journal of Periodontology*, 73(9), 1030–1036. <https://doi.org/10.1902/jop.2002.73.9.1030>
- Hwang, Y.-H., Kim, K.-J., Kim, S.-J., Mun, S.-K., Hong, S.-G., Son, Y.-J., & Yee, S.-T. (2018). Suppression effect of astaxanthin on osteoclast formation in vitro and bone loss in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 912. <https://doi.org/10.3390/ijms19030912>
- Johnson, I. H. (1975). Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *Journal of Periodontal Research*, 10(6), 332–345. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1975.tb00042.x>
- Kassebaum, N. J., Bernabé, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J. L., & Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1045–1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Lin JH, Lee DJ, Chang JS. Lutein production from biomass: marigold flowers versus microalgae. *Bioresource technology*, 2015, 184, 421–428.
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *The Journal of Gene Medicine*, 12(7), 561–563. <https://doi.org/10.1002/jgm.1473>
- Kim, J.-H., Na, H.-J., Kim, C.-K., Kim, J.-Y., Ha, K.-S., Lee, H., Chung, H.-T., Kwon, H. J., Kwon, Y.-G., & Kim, Y.-M. (2008). The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation. *Free Radical Biology & Medicine*, 45(6), 885–896. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.06.019>
- King, T. W., Brey, E. M., Youssef, A. A., Johnston, C., & Patrick, C. W. (2002). Jr Quantification of vascular density using a semiautomated technique for immunostained specimens. *Anal. Quant. Cytol. Histol*, 24, 39–48.
- Klausen, B. (1991). Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: A review article. *Journal of Periodontology*, 62(1), 59–73. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.1.59>
- Kose, O., Arabaci, T., Yemenoglu, H., Kara, A., Ozkanlar, S., Kayis, S., & Duymus, Z. (2016). Influences of fucoxanthin on alveolar bone resorption in induced periodontitis in rat molars. *Marine Drugs*, 14(4), 70. <https://doi.org/10.3390/md14040070>

- Kou, Y., Inaba, H., Kato, T., Tagashira, M., Honma, D., Kanda, T., Ohtake, Y., & Amano, A. (2008). Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *Journal of Periodontology*, 79(1), 174–180. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070364>
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- Kuhr, A., Popa-Wagner, A., Schmoll, H., Schwahn, C., & Kocher, T. (2004). Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *Journal Of Periodontal Research*, 39(2), 101–106. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00710.x>
- Li, H., Huang, C., Zhu, J., Gao, K., Fang, J., & Li, H. (2018). Lutein suppresses oxidative stress and inflammation by Nrf2 activation in an osteoporosis rat model. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 5071–5075. <https://doi.org/10.12659/msm.908699>
- Lim, S. S., Allen, K., Bhutta, Z. A., Dandona, L., Forouzanfar, M. H., Fullman, N., Gething, P. W., Goldberg, E. M., Hay, S. I., Holmberg, M., Kinfu, Y., Kutz, M. J., Larson, H. J., Liang, X., Lopez, A. D., Lozano, R., McNellan, C. R., Mokdad, A. H., Mooney, M. D., ... Murray, C. J. L. (2016). Measuring the health-related Sustainable Development Goals in 188 countries: a baseline analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388(10053), 1813–1850. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)31467-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)31467-2)
- Mangels, A. R., Holden, J. M., Beecher, G. R., Forman, M. R., & Lanza, E. (1993). Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *Journal of the American Dietetic Association*, 93(3), 284–296. [https://doi.org/10.1016/0002-8223\(93\)91553-3](https://doi.org/10.1016/0002-8223(93)91553-3)
- Maoka, T. (2020). Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines*, 74(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s11418-019-01364-x>
- Matsumoto, C., Ashida, N., Yokoyama, S., Tominari, T., Hirata, M., Ogawa, K., Sugiura, M., Yano, M., Inada, M., & Miyaura, C. (2013). The protective effects of β -cryptoxanthin on inflammatory bone resorption in a mouse experimental model of periodontitis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(4), 860–862. <https://doi.org/10.1271/bbb.120791>
- Nidhi, B., Sharavana, G., Ramaprasad, T. R., & Vallikannan, B. (2015). Lutein derived fragments exhibit higher antioxidant and anti-inflammatory properties than lutein in lipopolysaccharide induced inflammation in rats. *Food & Function*, 6(2), 450–460. <https://doi.org/10.1039/c4fo00606b>
- Nishigaki, M., Yamamoto, T., Ichioka, H., Honjo, K.-I., Yamamoto, K., Oseko, F., Kita, M., Mazda, O., & Kanamura, N. (2013). β -cryptoxanthin regulates bone resorption related-cytokine production in human periodontal ligament cells. *Archives of Oral Biology*, 58(7), 880–886. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2013.01.005>

- Noiri, Y., & Ebisu, S. (2000). Identification of periodontal disease-associated bacteria in the “plaquefree zone”. *J Periodontol*, 71(8), 1319–1326.
- Nowwarote, N., Osathanon, T., Jitjaturunt, P., Manopattanasoontorn, S., & Pavasant, P. (2013). Asiaticoside induces type I collagen synthesis and osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells: ASIATICOSIDE INDUCES DIFFERENTIATION OF HPDLs. *Phytotherapy Research: PTR*, 27(3), 457–462. <https://doi.org/10.1002/ptr.4742>
- Oz, H. S., & Puleo, D. A. (2011). Animal models for periodontal disease. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 754857. <https://doi.org/10.1155/2011/754857>
- Parker, R. S. (1989). Carotenoids in human blood and tissues. *The Journal of Nutrition*, 119(1), 101–104. <https://doi.org/10.1093/jn/119.1.101>
- Pelekos, G., Ho, S. N., Acharya, A., Leung, W. K., & McGrath, C. (2019). A double-blind, paralleled-arm, placebo-controlled and randomized clinical trial of the effectiveness of probiotics as an adjunct in periodontal care. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(12), 1217–1227. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13191>
- Perry, A., Rasmussen, H., & Johnson, E. J. (2009). Xanthophyll (lutein, zeaxanthin) content in fruits, vegetables and corn and egg products. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 22(1), 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.07.006>
- Philips, N., Keller, T., Hendrix, C., Hamilton, S., Arena, R., Tuason, M., & Gonzalez, S. (2007). Regulation of the extracellular matrix remodeling by lutein in dermal fibroblasts, melanoma cells, and ultraviolet radiation exposed fibroblasts. *Archives of Dermatological Research*, 299(8), 373–379. <https://doi.org/10.1007/s00403-007-0779-0>
- Polyakov, N. E. (2001). Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? *Free Radical Biol. Med.*, v, 31, 398–404.
- Prates, R. A., Yamada, A. M., Suzuki, L. C., França, C. M., Cai, S., Mayer, M. P. A., Ribeiro, A. C., & Ribeiro, M. S. (2011). Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomedicine and Laser Surgery*, 29(12), 835–844. <https://doi.org/10.1089/pho.2010.2984>
- Qiao, Y.-Q., Jiang, P.-F., & Gao, Y.-Z. (2018). Lutein prevents osteoarthritis through Nrf2 activation and downregulation of inflammation. *Archives of medical science: AMS*, 14(3), 617–624. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.59871>
- Reddy, M. S., Weatherford, T. W., 3rd, Smith, C. A., West, B. D., Jeffcoat, M. K., & Jacks, T. M. (1995). Alendronate treatment of naturally-occurring periodontitis in beagle

- dogs. *Journal of Periodontology*, 66(3), 211–217.
<https://doi.org/10.1902/jop.1995.66.3.211>
- Reddy, Michael S., Geurs, N. C., & Gunsolley, J. C. (2003). Periodontal host modulation with antiproteinase, anti-inflammatory, and bone-sparing agents. A systematic review. *Annals of Periodontology*, 8(1), 12–37.
<https://doi.org/10.1902/annals.2003.8.1.12>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods* (Vol. 64). ILSI - International Life Sciences Institute.
- Sanz, M., Bighton, D., Curtis, M. A., Cury, J. A., Dige, I., Dommisch, H., Ellwood, R., Giacaman, R. A., Herrera, D., Herzberg, M. C., Könönen, E., Marsh, P. D., Meyle, J., Mira, A., Molina, A., Mombelli, A., Quirynen, M., Reynolds, E. C., Shapira, L., & Zaura, E. (2017). Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 44, S5–S11.
<https://doi.org/10.1111/jcpe.12682>
- Seibel, M. J. (2000). Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 11 Suppl 6, S18–29.
<https://doi.org/10.1007/s001980070003>
- Shoji, K., Horiuchi, H., & Shinoda, H. (1995). Inhibitory effects of a bisphosphonate (risedronate) on experimental periodontitis in rats. *Journal of Periodontal Research*, 30(4), 277–284. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1995.tb02134.x>
- Sindhu, E. R., & Kuttan, R. (2012). Carotenoid lutein protects rats from gastric ulcer induced by ethanol. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 23(1), 33–37. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2011-0032>
- Sindhu, E. R., Preethi, K. C., & Kuttan, R. (2010). Antioxidant activity of carotenoid lutein in vitro and in vivo. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(8), 843–848.
- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (2005). Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2000, 38(1), 135–187. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00107.x>
- Sommerburg, O., Keunen, J. E., Bird, A. C., & van Kuijk, F. J. (1998). Fruits and vegetables that are sources for lutein and zeaxanthin: the macular pigment in human eyes. *The British Journal of Ophthalmology*, 82(8), 907–910.
<https://doi.org/10.1136/bjo.82.8.907>
- Takeda, H., Tominari, T., Hirata, M., Watanabe, K., Matsumoto, C., Grundler, F. M. W., Inada, M., & Miyaura, C. (2017). Lutein enhances bone mass by stimulating bone formation and suppressing bone resorption in growing mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 40(5), 716–721. <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00897>

- Tan, J. S. L., Wang, J. J., Flood, V., Rochtchina, E., Smith, W., & Mitchell, P. (2008). Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, 115(2), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.03.083>
- Teles, R. P., Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (2006). Microbiological goals of periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 42(1), 180–218. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00192.x>
- Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., & Haytac, M. C. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12155>
- Tominari, T., Matsumoto, C., Watanabe, K., Hirata, M., Grundler, F. M. W., Inada, M., & Miyaura, C. (2017). Lutein, a carotenoid, suppresses osteoclastic bone resorption and stimulates bone formation in cultures. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(2), 302–306. <https://doi.org/10.1080/09168451.2016.1243983>
- Umeda, M., Takeuchi, Y., Noguchi, K., Huang, Y., Koshy, G., & Ishikawa, I. (2004). Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. *Periodontology 2000*, 36(1), 98–120. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2004.03675.x>
- Vargas-Sanchez, P. K., Moro, M. G., Santos, F. A. dos, Anbinder, A. L., Kreich, E., Moraes, R. M., Padilha, L., Kusiak, C., Scomparin, D. X., & Franco, G. C. N. (2017). Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *Journal of applied oral science*, 25(5), 490–497. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2016-0517>
- Williams, R. C. (1990). Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine*, 322(6), 373–382. <https://doi.org/10.1056/nejm199002083220606>
- Yoshinaga, Y., Ukai, T., Nakatsu, S., Kuramoto, A., Nagano, F., Yoshinaga, M., Montenegro, J. L., Shiraishi, C., & Hara, Y. (2014). Green tea extract inhibits the onset of periodontal destruction in rat experimental periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 49(5), 652–659. <https://doi.org/10.1111/jre.12147>
- Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., & Yang, W. (2014). Interleukin-10 inhibits bone resorption: A potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Research International*, 2014, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>
- Zhang, W., Ju, J., Rigney, T., & Tribble, G. (2014). *Porphyromonas gingivalis* infection increases osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation in a periodontitis mouse model. *BMC Oral Health*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-89>
- Zhang, Z.-Q., Cao, W.-T., Liu, J., Cao, Y., Su, Y.-X., & Chen, Y.-M. (2016). Greater serum carotenoid concentration associated with higher bone mineral density in Chinese adults. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation*

between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 27(4), 1593–1601. <https://doi.org/10.1007/s00198-015-3425-2>

Zoch, M. L., Clemens, T. L., & Riddle, R. C. (2016). New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.046>

Tabelas

Tabela 1. 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 ST VE, ST LT, RAR VE e RAR LT:

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA												
PARÂMETROS E RESPECTIVOS ESCORES	PORCENTAGEM DE ESPÉCIMES											
	GRUPOS EXPERIMENTAIS											
	ST SS			ST LT			RAR SS			RAR LT		
	7d	15d	30d	7d	15d	30d	7d	15d	30d	7d	15d	30d
INTENSIDADE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA LOCAL												
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	60%	-	-	80%
2) inflamação discreta (até 1/3 das células são inflamatórias)	-	-	-	-	-	-	20%	60%	40%	60%	100%	20%
3) inflamação moderada (de 1/3 até 2/3 das células são inflamatórias)	-	20%	40%	20%	40%	60%	80%	40%	-	40%	-	-
4) inflamação intensa (mais de 2/3 das células são inflamatórias)	100%	80%	60%	80%	60%	40%	-	-	-	-	-	-
MEDIANA	4	4	4	4	4	3	3	2	1	2	2	1
EXTENSÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO												
1) ausência de inflamação	-	-	-	-	-	-	-	-	60%	-	-	80%
2) estendendo-se apenas em parte do tecido conjuntivo da região de furca	-	-	-	-	-	-	40%	100%	40%	60%	100%	20%
3) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo da região de furca	-	20%	40%	60%	60%	80%	60%	-	-	40%	-	-
4) estendendo-se por todo o tecido conjuntivo e tecido ósseo da região de furca	100%	80%	60%	40%	40%	20%	-	-	-	-	-	-
MEDIANA	4	4	4	3	3	3	3	2	1	2	2	1
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO CONJUNTIVO DA REGIÃO DE FURCA												
1) moderada quantidade de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas (tecido conjuntivo denso)	-	-	-	-	-	-	-	-	60%	-	-	80%
2) moderada quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-	40%	-	-	20%
3) pequena quantidade tanto de fibroblastos quanto de fibras colágenas	40%	40%	40%	60%	60%	60%	80%	100%	-	80%	100%	-
4) desestruturação tecidual severa com áreas de necrose	60%	60%	60%	40%	40%	40%	20%	-	-	20%	-	-
MEDIANA	4	4	4	3	3	3	3	2	1	3	2	1
PADRÃO DE ESTRUTURAÇÃO DO TECIDO ÓSSEO DA REGIÃO DE FURCA												
1) trabéculas ósseas de contorno regular e repletas de osteoblastos ativos, incluindo áreas de neoformação óssea	-	-	-	-	-	-	-	-	20%	-	-	20%
2) trabéculas ósseas de contorno irregular e recobertas tanto por osteoblastos quanto por osteoclastos ativos	-	-	-	-	-	-	100%	100%	80%	100%	100%	80%

3) trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos	40%	40%	40%	60%	80%	80%	-	-	-	-	-	-
4) áreas de osso necrótico e trabéculas ósseas de contorno irregular repletas de osteoclastos ativos e/ou inativos	60%	60%	60%	40%	20%	20%	-	-	-	-	-	-
MEDIANA	4	4	4	3	3	3	2	2	2	2	2	2

Figuras

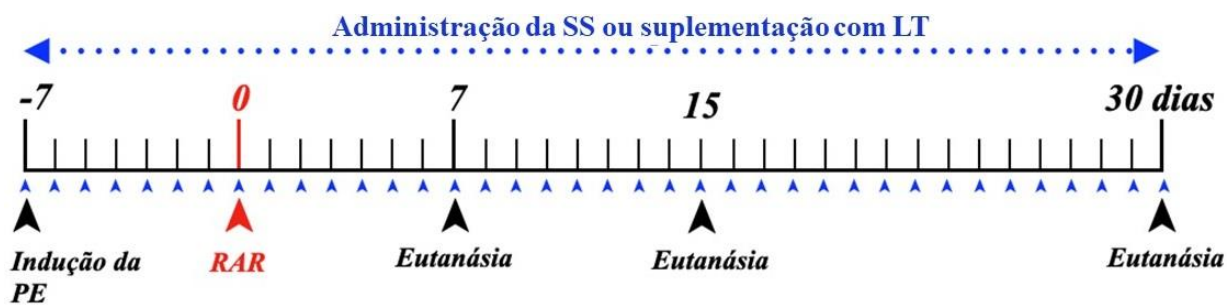


Figura 2: Delineamento experimental do grupo de RAR.

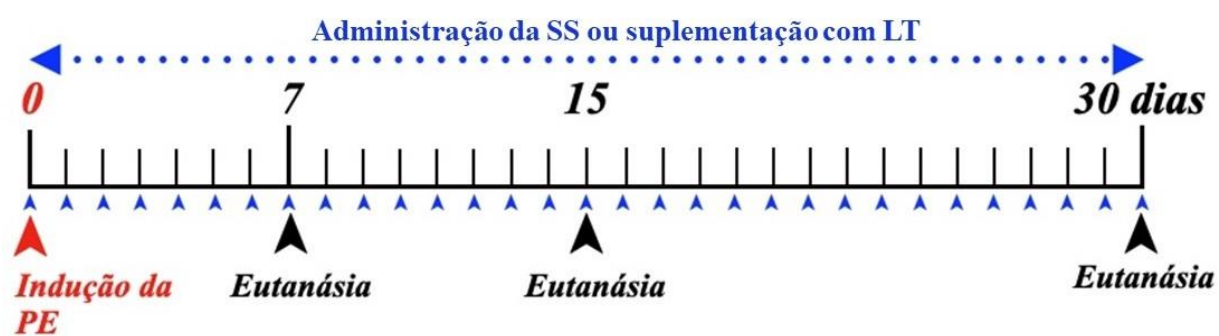


Figura 1: Delineamento experimental do grupo de progressão.

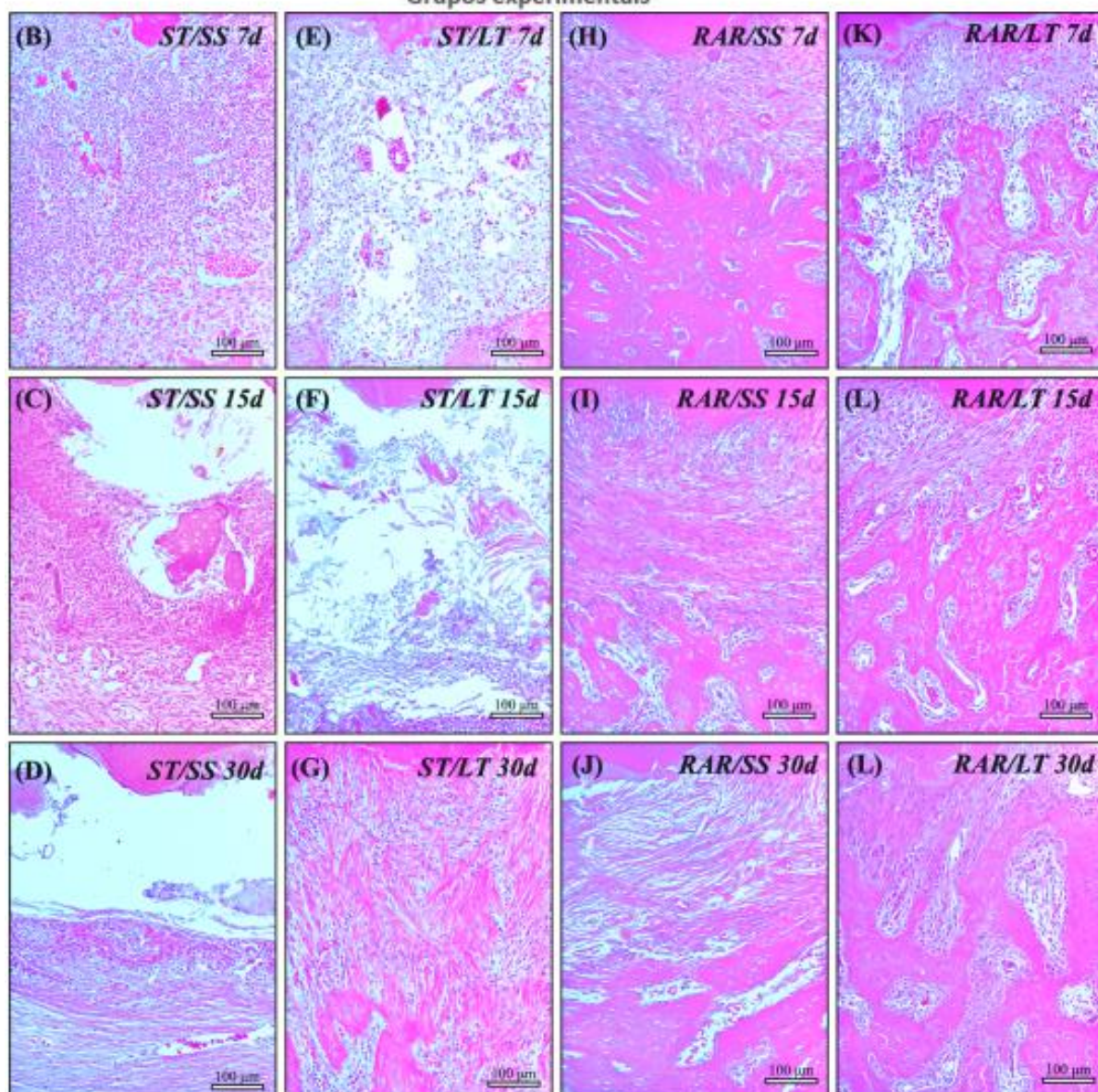
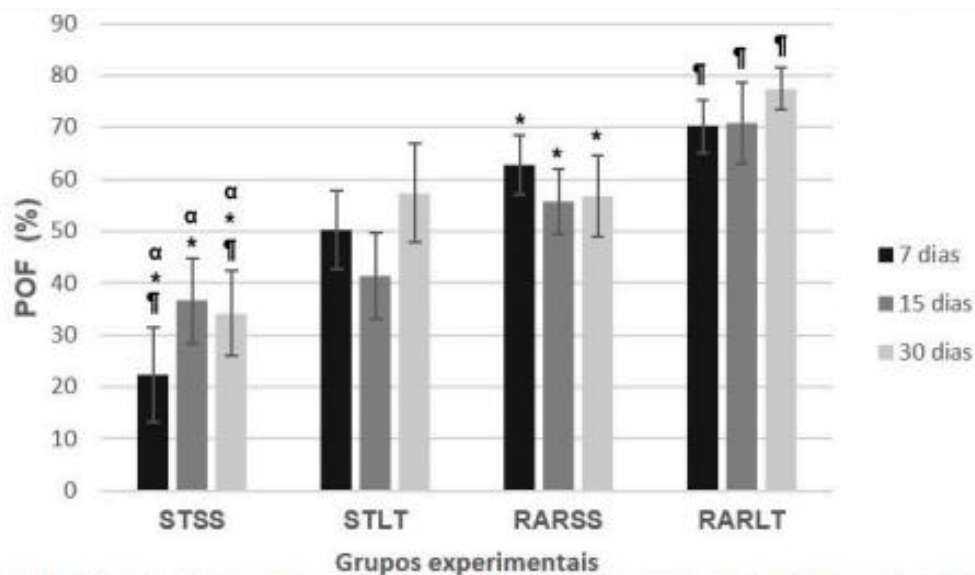


Figura 3: Porcentagem de osso e características histopatológicas dos tecidos periodontais an região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da porcentagem de osso na furca para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); α, diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$). (B-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.

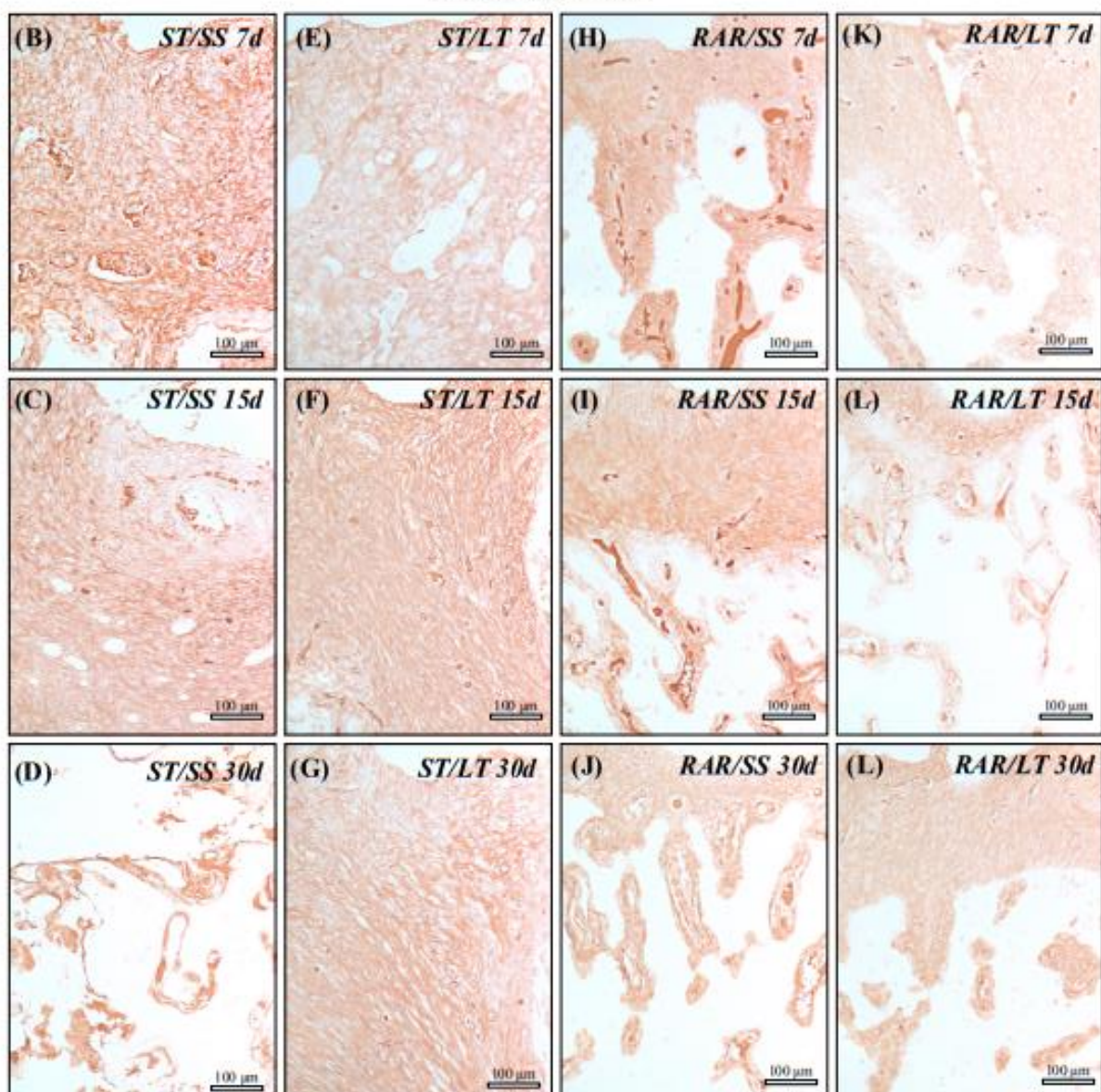
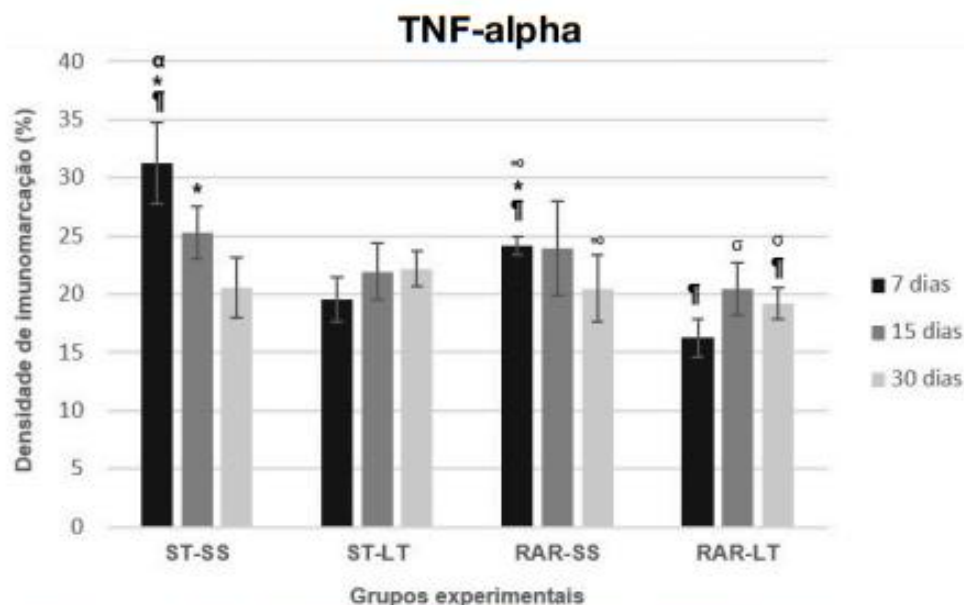


Figura 4: Imunomarcção de TNF-alpha na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcção de TNF-alpha para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0,05$); α, diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0,05$); σ, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$); ∞, diferença estatisticamente significativa com RAR/SS 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0,05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcção para TNF-alpha em cada grupo e período. Barras de escala: 100μm.

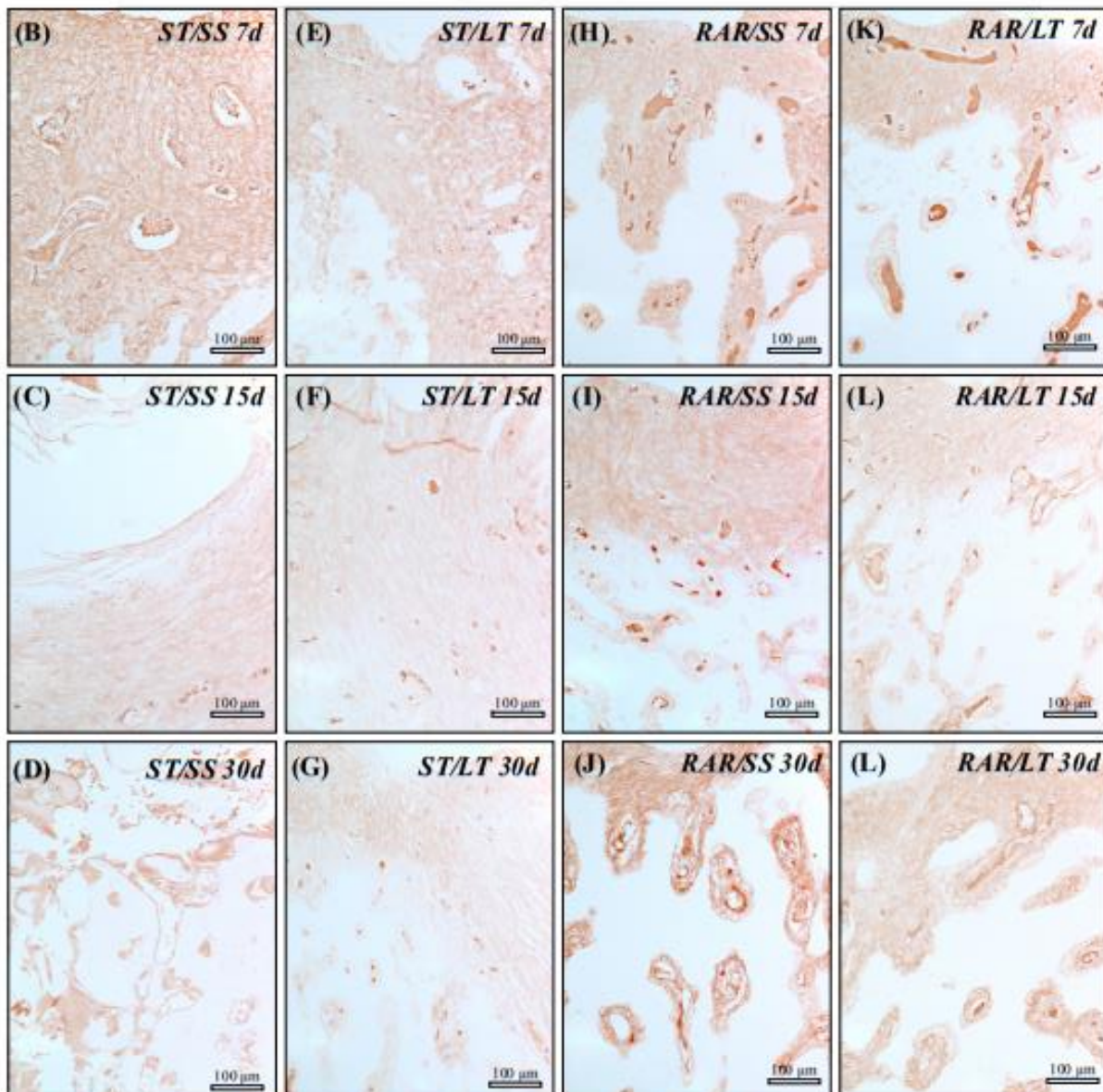
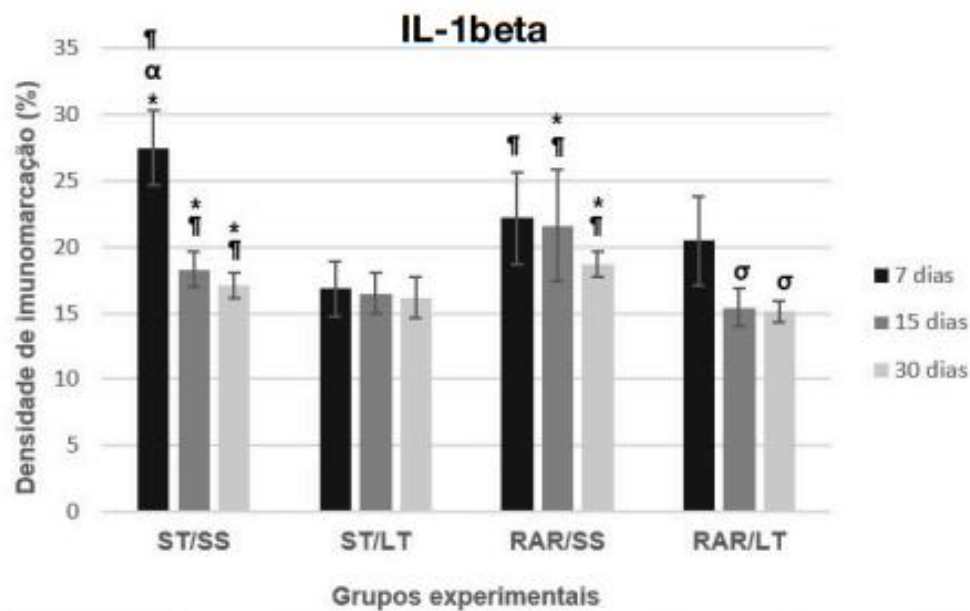


Figura 5: Imunomarcacão de IL-1beta na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcacão de IL-1beta para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); α, diferença estatisticamente significativa com RAR/SS no mesmo período ($p \leq 0.05$); σ, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcacão para IL-1beta em cada grupo e período. Barras de escala: 100μm.

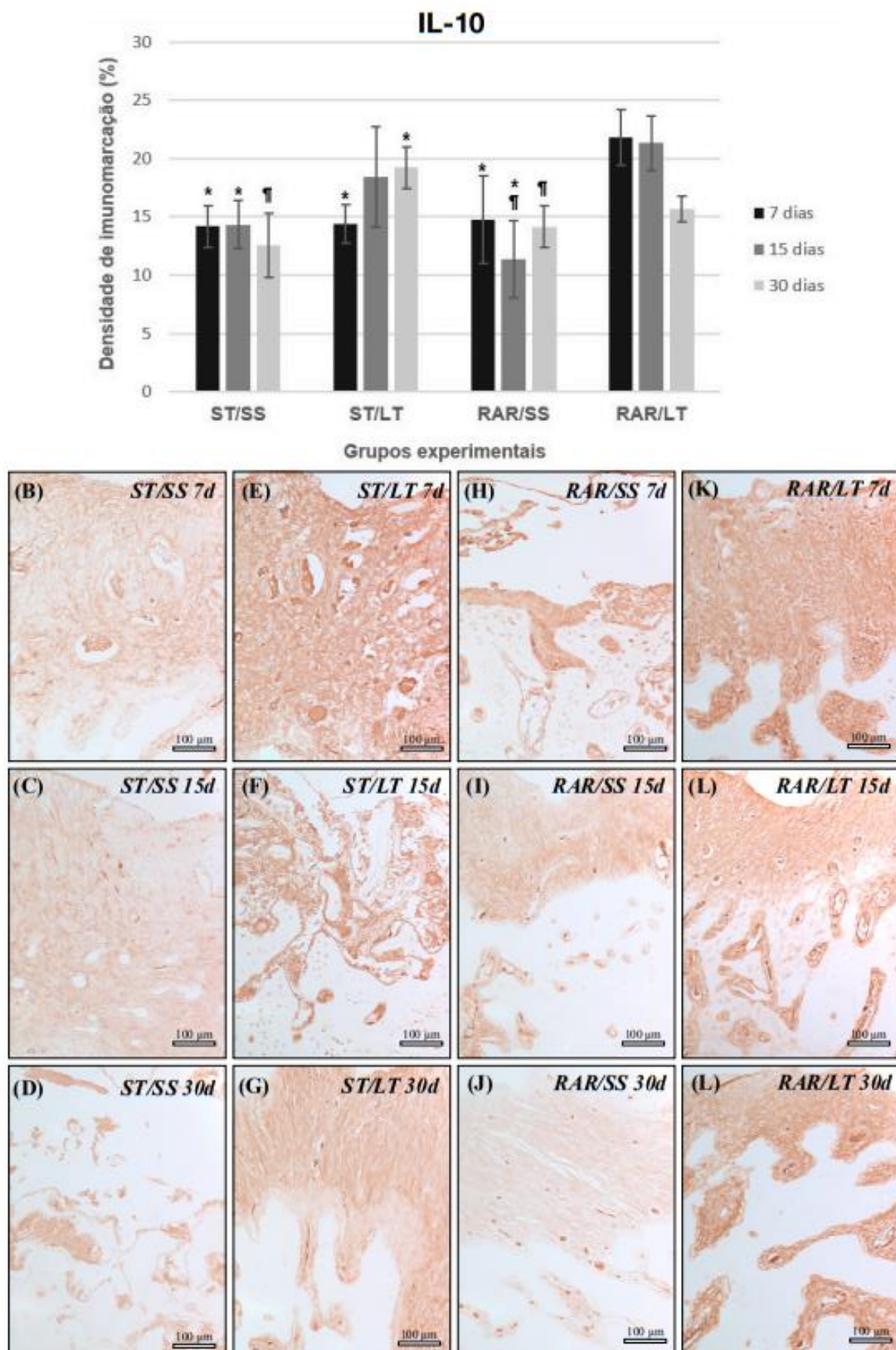


Figura 6: Imunomarcção de IL-10 na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcção de IL-10 para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: ¶, diferença estatisticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); α, diferença estatisticamente significativa com RAR/LT 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0.05$); σ, diferença estatisticamente significativa com RAR/SS 7 dias no mesmo grupo ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcção para IL-10 em cada grupo e período. Barras de escala: 100µm.

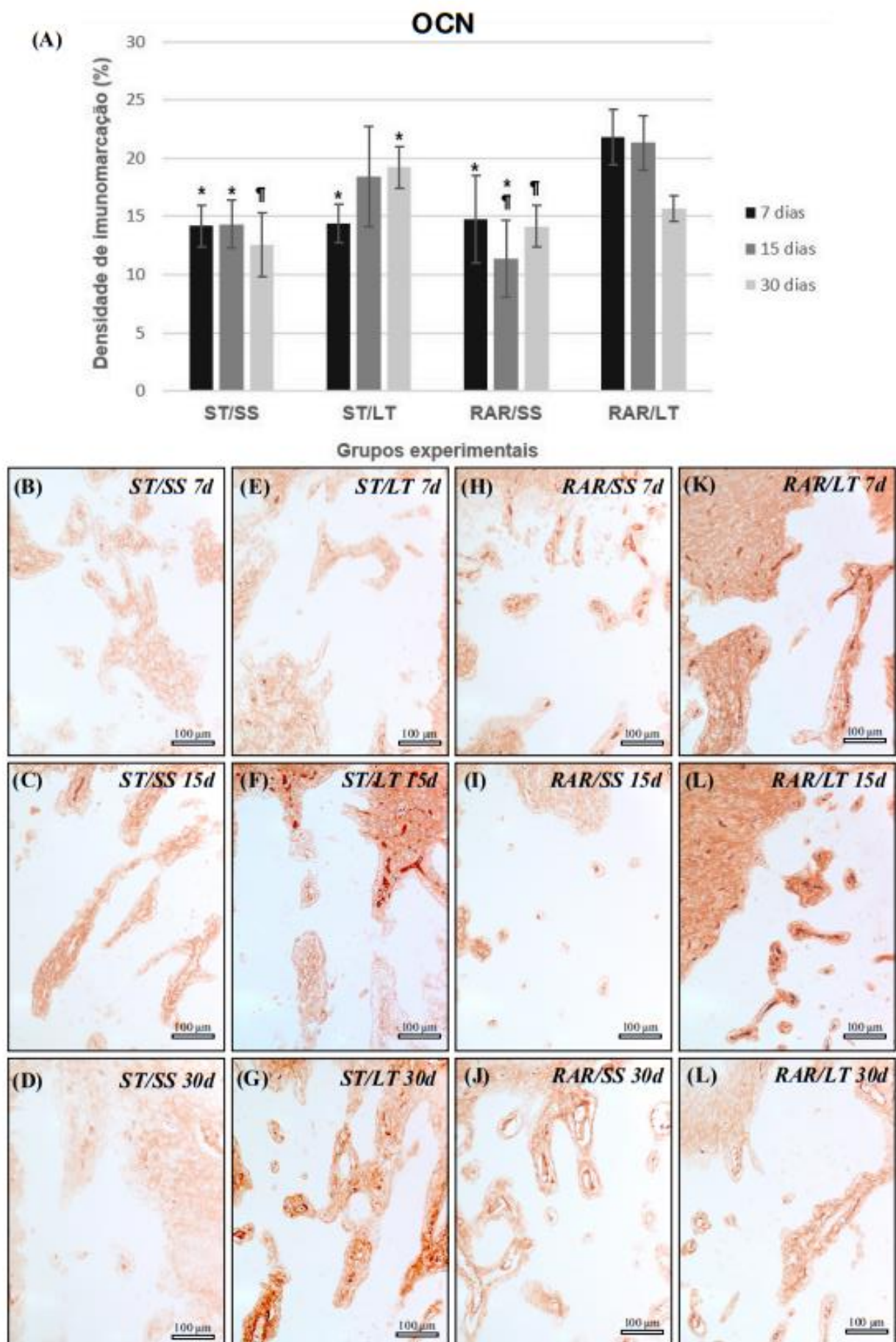


Figura 7: Imunomarcacão de OCN na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão da densidade de imunomarcacão de OCN para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: η , diferença estatísticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatísticamente significativa com RAR/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da densidade de imunomarcacão para OCN em cada grupo e período. Barras de escala: 100 μ m.

(A)

TRAP

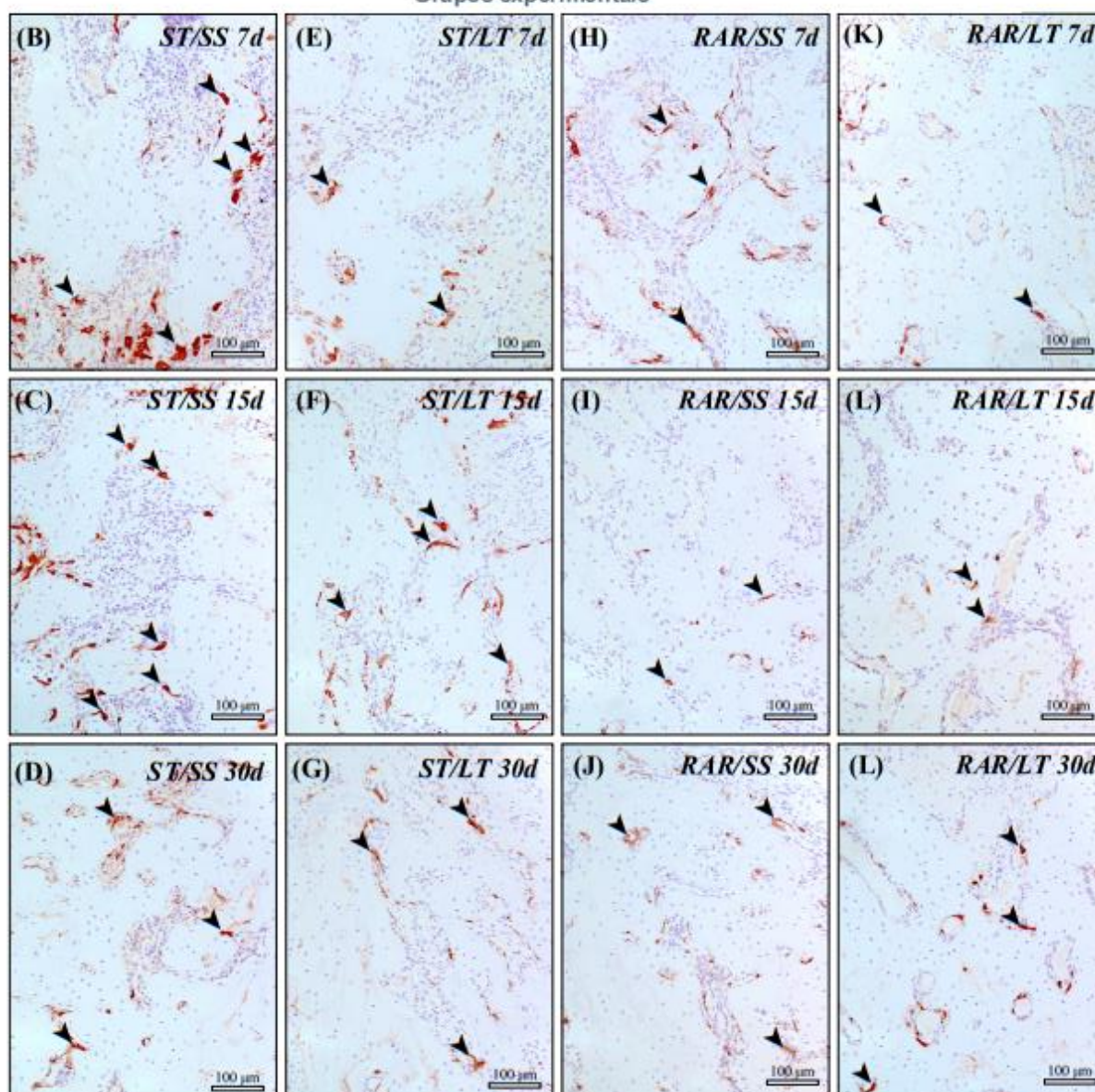
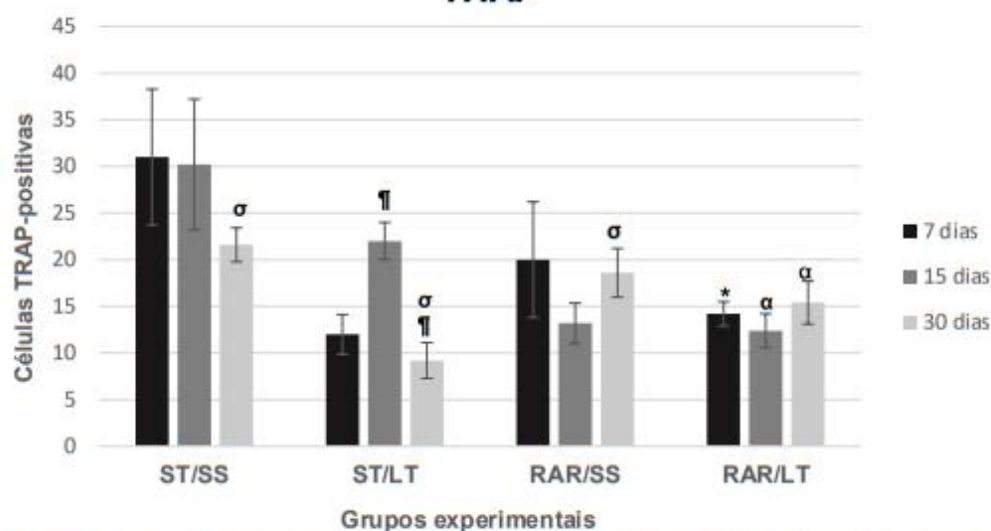


Figura 8: Imunomarcacão de TRAP na região de furca. (A) Gráfico mostrando as médias $\pm$ desvios padrão do número de células TRAP-positivas para cada grupo e período. Testes estatísticos: ANOVA e Tukey ($p \leq 0.05$). Símbolos: σ , diferença estatísticamente significativa com o período de 15 dias ($p \leq 0.05$); $\parallel$, diferença estatísticamente significativa com ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$); *, diferença estatísticamente significativa com o grupo RAR/SS e ST/SS no mesmo período ($p \leq 0.05$); α , diferença estatísticamente significativa com os grupos ST/SS e ST/LT no mesmo período ($p \leq 0.05$). (B-F) fotomicrografias representativas da imunomarcacão para TRAP em cada grupo e período. Cabeças de seta: células imunoreativas para TRAP. Contra-colorac o: Hematoxilina de Harris. Barras de escala: 100 μ m.

Anexos

ANEXOS

Anexo A – Normas para publicação no Periódico “Archives Oral Biology”.

Archives of Oral Biology will also publish expert reviews and articles concerned with advancement in relevant methodologies. The journal will consider clinical papers only where they make a significant contribution to the understanding of a disease process.

These guidelines generally follow the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

Types of Contribution

Original papers and review articles are welcomed. There will be no differentiation on the basis of length into full or short communications. Editorial commentaries will also be considered but only by invitation. All submissions will be refereed.

Submission checklist

You should use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check all relevant sections in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts (where applicable)

Highlights (mandatory)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Declarations of authors' contributions have been made if there are four or more authors
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#)

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Research Council's [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding

output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article is likely to be checked by the originality detection service CrossCheck.

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or

"he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author contributions

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted. If any individual contributed to a paper but did not meet all three of these criteria, they should be mentioned in an Acknowledgements section but must not be listed as an author (see Acknowledgements section below).

For transparency, and to show that they met the above criteria, authors should submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review and editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example. [More details and an example](#).

Changes to Authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and to provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

REVISED SUBMISSIONS

When submitting the revised manuscript, please make sure that you upload the final version of the paper with the changes highlighted. Please remove the old version(s) of the manuscript before submitting the revised version.

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To minimize unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscript Structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Keywords, Main text (Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion for an original paper), Acknowledgments, Appendix, References, Tables and then Figure Captions. Do not import the Figures or Tables into your text. The corresponding author should be identified with an asterisk and footnote. All other footnotes (except for table footnotes) should be identified with superscript Arabic numbers.

Introduction

This should be a succinct statement of the problem investigated within the context of a brief review of the relevant literature. Literature directly relevant to any inferences or argument presented in the Discussion should in general be reserved for that section. The introduction may conclude with the reason for doing the work but should not state what was done nor the findings.

Materials and Methods

Enough detail must be given here so that another worker can repeat the procedures exactly. Where the materials and methods were exactly as in a previous paper, it is not necessary to repeat all the details but sufficient information must be given for the reader to comprehend what was done without having to consult the earlier work.

Authors are requested to make plain that the conditions of animal and human experimentation are as outlined in the "Ethics" and "Studies on Animals" sections above

Results or Findings

These should be given clearly and concisely. Care should be taken to avoid drawing inferences that belong to the Discussion. Data may be presented in various forms such as histograms or tables but, in view of pressure on space, presentation of the same data in more than one form is unacceptable.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is occasionally appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

As titles frequently stand alone in indexes, bibliographic journals etc., and indexing of papers is, to an increasing extent, becoming computerized from key words in the titles, it is important that titles should be as concise and informative as possible. Thus the animal species to which the observations refer should always be given and it is desirable to indicate the type of method on which the observations are based, e.g. chemical, bacteriological, electron-microscopic,

histochemical, etc. A "running title" of not more than 40 letters and spaces must also be supplied. A keyword index must be supplied for each paper.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Structured abstract

The paper should be prefaced by an abstract aimed at giving the entire paper in miniature. Abstracts should be no longer than 250 words and should be structured as per the guidelines published in the Journal of the American Medical Association (JAMA 1995; 273: 27-34). In brief, the abstract should be divided into the following sections: (1) Objective; (2) Design - if clinical, to include setting, selection of patients, details on the intervention, outcome measures, etc.; if laboratory research, to include details on methods; (3) Results; (4) Conclusions.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

As Archives of Oral Biology is a journal with a multidisciplinary readership, abbreviations, except those universally understood such as mm, g, min. u.v., w/v and those listed below, should be avoided if possible. Examples of abbreviations which may be used without definition are: ADP, AMP, ATP, DNA, RNA, EDTA, EMG, tris.

Other abbreviations used to improve legibility should be listed as a footnote on the title page as well as being defined in both the abstract and the main text on first usage. Chemical symbols may be used for elements, groups and simple compounds, but excessive use should be avoided. Abbreviations other than the above should not be used in titles and even these should be avoided if possible.

Statistical analysis

Authors should ensure that the presentation and statistical testing of data are appropriate and should seek the advice of a statistician if necessary. A number of common errors should be avoided, e.g.: -

- Use of parametric tests when non-parametric tests are required

- Inconsistencies between summary statistics and statistical tests such as giving means and standard deviations for data which were analysed with non-parametric tests.
- Multiple comparisons undertaken with multiple t tests or non-parametric equivalents rather than with analysis of variance (ANOVA) or non-parametric equivalents.
- Post hoc tests being used following an ANOVA which has yielded a non-significant result.
- Incomplete names for tests (e.g. stating "Student's t test" without qualifying it by stating "single sample", "paired" or "independent sample")
- n values being given in a way which obscures how many independent samples there were (e.g. stating simply n=50 when 10 samples/measurements were obtained from each of 5 animals/human subjects).
- Stating that $P=0.000$ (a figure which is generated by some computer packages). The correct statement (in this case) is $P<0.0005$.
- Bar charts should only be used to show frequencies (absolute or relative/%); for means and SD, use dot plots and/or error bars.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.) but who did not meet all the criteria for authorship (see Authorship section above).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Bacterial nomenclature

Organisms should be referred to by their scientific names according to the binomial system.

When first mentioned the name should be spelt in full and in italics. Afterwards the genus should be abbreviated to its initial letter, e.g. '*S. aureus*' not 'Staph. aureus'. If abbreviation is likely to cause confusion or render the intended meaning unclear, the names of microbes should be spelt in full. Only those names which were included in the Approved List of Bacterial Names, Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 225-420 and those which have been validly published in the Int J Syst Bacteriol since 1 January 1980 have standing in nomenclature. If there is good reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the names should be enclosed in quotation marks and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text (for an example see Int J Syst Bacteriol 1980; 30: 547-556). When the genus alone is used as a noun or adjective, use lower case Roman not italic, e.g. 'organisms were staphylococci' and 'streptococcal infection'. If the genus is specifically referred to use italics e.g. 'organisms of the genus *Staphylococcus*'. For genus in plural, use lower case roman e.g. '*salmonellae*'; plurals may be anglicized e.g. '*salmonellas*'. For trivial names, use lower case Roman e.g. '*meningococcus*'

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given

below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be placed on separate page(s) towards the end of the manuscript (see Manuscript Structure, above). Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Reference style

Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Seventh Edition, ISBN 978-1-4338-3215-4, copies of which may be ordered online.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51–59.
<https://doi.org/10.1016/j.sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2018). The art of writing a scientific article. *Heliyon*, 19, Article e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style* (4th ed.). Longman (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281–304). E-Publishing Inc.

Reference to a website:

Powertech Systems. (2015). *Lithium-ion vs lead-acid cost analysis*. Retrieved from <http://www.powertechsystems.eu/home/tech-corner/lithium-ion-vs-lead-acid-cost-analysis/>. Accessed January 6, 2016

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., & Nakashizuka, T. (2015). *Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions*. Mendeley Data, v1.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to a conference paper or poster presentation:

Engle, E.K., Cash, T.F., & Jarry, J.L. (2009, November). *The Body Image Behaviours Inventory-3: Development and validation of the Body Image Compulsive Actions and Body Image Avoidance Scales*. Poster session presentation at the meeting of the Association for Behavioural and Cognitive Therapies, New York, NY.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S. (2020, March 25). *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research

data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article.

When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#). For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Research Elements

This journal enables you to publish research objects related to your original research – such as data, methods, protocols, software and hardware – as an additional paper in a [Research Elements journal](#).

Research Elements is a suite of peer-reviewed, open access journals which make your research objects findable, accessible and reusable. Articles place research objects into context by providing detailed descriptions of objects and their application, and linking to the associated original research articles. Research Elements articles can be prepared by you, or by one of your collaborators.

During submission, you will be alerted to the opportunity to prepare and submit a manuscript to one of the Research Elements journals.

More information can be found on the [Research Elements page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

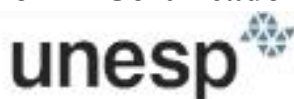
If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Anexo B – Certificado da Comissão de Ética na Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o 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 Aracatuba

Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba

Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP

Fone (18) 3636-3234

Email CEUA: ceua.fua@unesp.br

Anexo C – Certificado de análise da luteína



CERTIFICADO DE ANÁLISE

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

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

INFORMAÇÕES ADICIONAIS: Fórmula Molecular: C ₄₀ H ₅₆ O ₂ 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
LUTEINA	≥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 - RACHECOS, PALHOÇA - SANTA CATARINA • CEP: 88.135-010

RIO DE JANEIRO

AV. JOÃO CARVAL DE MELLO NETO, 850 | CEO CORPORATE - SALA 720, BLOCO 3 - BARRA DA TIJUCA - RJ • CEP: 22250-000

Anexo D – Certificado de análise do óleo de girassol

L 38682
5/FC



Av. do Aldeia, 335 • Jardim Ipiranga • Barueri - SP • CEP 06.644-000
Av. Casa Verde, 2252 • Casa Verde • São Paulo - SP • CEP 02.520-300
F: 3199 7600 / 0800 870 23 88 • gal@henrifarma.com.br

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Emissão: 19/01/2023

Produto	OLEO DE GIRASSOL ESPECIAL
Especificação	FABRICANTE
C.A.S.	8901-21-6
País de Origem	BRASIL
Lote Henrifarma Nº	0029/22-C *001941/22
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 ESPECÍFICO	ENTRE 0,918 - 0,923	G/CM3	CUMPRE TESTES

Determinação Química	Especificações	Unidades	Resultados
ÍNDICE DE IODO	ENTRE 118 - 145	G I2/100G	128
ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	ENTRE 188 - 194	MG KOH/G	190
SUBSTÂNCIAS INSAPONIFICÁVEIS	MAXIMO 1,5	%	CUMPRE TESTES
ACIDEZ, OLEO REFINADO	MAXIMO 0,3	%	0,085
ÍNDICE DE PEROXÍDO	MAXIMO 10,0	%	0,5

*LAUDO TRANSCRITO DO LAUDO ORIGINAL DO FABRICANTE


Claudagildo André Vital
Farmacêutico Responsável
CRF/SP 79.661

RUA FREIRE DA SILVA, Nº 209 / 217 - CAMBUCI - SÃO PAULO - SP - CEP 01523020 - INSCR. EST. 105.285.583.114 - C.N.P.J. 01.074.662/0001-09
FONE: 3385-2007 - FAX: 3385-2001
WEB SITE: <http://www.henrifarma.com.br> - E-MAIL: henrifarma@henrifarma.com.br