UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

GABRIELA GENNARO

ANÁLISE DA PRESENÇA DE CITOCINAS NO PERIODONTO DE
RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CHÁ VERDE

BAURU
2012

GABRIELA GENNARO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ANÁLISE DA PRESENÇA DE CITOCINAS NO PERIODONTO DE
RATOS DIABÉTICOS TRATADOS COM CHÁ VERDE

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DE BAURU, DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE DOUTOR EM ODONTOLOGIA, PROGRAMA
DE CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS APLICADAS,

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ESTOMATOLOGIA E BIOLOGIA
ORAL.

ORIENTADOR: PROF. DR. GERSON FRANCISCO DE ASSIS

BAURU
2012

Gennaro, Gabriela
G 285a Análise da presença de citocinas no periodonto de
 ratos diabéticos tratados com chá verde / Gabriela
 Gennaro -- Bauru, 2012.
 144 p. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Autorizo, exclusivamente pra fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

Assinatura do autor:

Data:

Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da FOB-
USP: projeto de pesquisa aprovado em 15 de outubro de
2008.

Número do protocolo: 014/2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dedicatória

*Aos meus pais, Celso e Vitória;
Por todos os esforços imensuráveis e amor
incondicional
Pelos simples ensinamentos até a
complexa compreensão dos fatos...
Ao meu irmão, Lucas.
Pela cumplicidade absoluta!
E ao meu namorado, Fabiano.
Por diariamente estar ao meu lado com
toda sua serenidade.*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida privilegiada, o que permitiu a realização desse Doutorado. Obrigada pelo acalanto nos momentos difíceis, por iluminar meu caminho a cada dia e por todas as pessoas generosas que colocaste em minha jornada Terrena.

Imensamente sou grata aos meus pais Vitória e Celso pela segurança transmitida, incentivo diário e confiança depositada em todos os momentos da minha vida. Vocês me ensinaram com o exemplo os princípios de caráter e, acima de tudo, o caminho do sucesso, traduzido em trabalho intensificado por muita dedicação! Tenho muito orgulho da trajetória de vida de vocês e do quão nobre são os seus sentimentos em relação ao próximo. Obrigada pela tamanha generosidade que habita em seus corações!

Ao meu irmão Lucas que esteve ao meu lado desde nossa feliz infância até nossas primeiras experiências de vida adulta, longe da família. E assim, a cada dia nos tornamos mais seres humanos! Sua presença, mesmo distante, permanece fundamental em minha vida!

Minha gratidão por tudo que o meu namorado, Fabiano, faz por mim. Sua paciência, compreensão, cumplicidade e dedicação são fundamentais para que os meus planos se concretizem. Com o amadurecimento passamos a entender melhor que nem tudo acontece ao nosso tempo, mas sim no exato momento em que deve ser. Obrigada, Fá, por hoje fazer parte da minha vida!

Ao meu orientador Dr. Gerson Francisco de Assis, agradeço, primeiramente, por ter me aceitado como aluna de Doutorado e pela confiança depositada. Obrigada por todos os ensinamentos transmitidos, pelos materiais didáticos cedidos com tanto despreendimento e pela tranquilidade em que nos cobra. Sua profunda generosidade e paciência são exemplos a serem seguidos.

Agradeço ao Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, pela ajuda e oportunidades que engrandeceram imensamente minha formação. Obrigada por todo conhecimento transmitido e, principalmente, por ter colocado em mim “as lentes” para enxegar a beleza e a fundamental importância da osteoimunologia. Minha eterna devoção!

Ao Dr. Rumio Taga por transmitir humildemente o superior conhecimento que possui. Agradeço também pelos livros e materiais didáticos cedidos e por toda disponibilidade que tem quando precisamos das suas brilhantes explicações.

Agradeço a Dra. Ana Paula Campanelli, por todos os ensinamentos que contribuíram grandiosamente para a minha formação. O que era indecifrável se tornou parte da minha vida após a disciplina de “Tópicos em Imunologia Celular”. Como é bom entender aquilo que se estuda!

Obrigada aos Profs Drs Carlos Ferreira dos Santos e Flávio A. Cardoso de Faria por sedermem o laboratório de Farmacologia para o desenvolvimento de parte do meu trabalho.

Especialmente, agradeço ao Thiago Dionísio, técnico do laboratório de Farmacologia da FOB-USP, pela imensurável colaboração, disponibilidade, paciência e profundo conhecimento. Obrigada pela amizade e ajuda durante os vários momentos em que se dedicou ao meu trabalho. Não tenho como agradecer tamanha prontidão e ensinamentos!

Também agradeço especialmente às técnicas do laboratório de Histologia, Daniela Ceolin, Patrícia Germino e Tânia Mary Cestari, que tanto se dedicaram em me auxiliar. Com certeza, sem a ajuda de vocês, durante todos os passos do desenvolvimento do trabalho, seria impossível realizar qualquer pesquisa. Posso afirmar que ninguém se faz sozinho! Além disso, somado ao trabalho, compartilhei da amizade e alegria dessas “meninas” tão especiais. A minha leal gratidão a vocês!

Aos meus queridos amigos da pós-graduação, em especial Carlos Eduardo Repeke, Élcia Maria Varize Silveira, Marcela Claudino e Andreia Espíndola. O carinho e a amizade que nutrimos mutuamente fizeram de cada dia de trabalho, um dia de agradável convívio. A convivência intensa fez de nós uma família dentro do laboratório. Obrigada pelos momentos descontraídos e por todas as palavras de incentivo que me ajudaram nos momentos em que mais precisei!

Cadu, obrigada pela disponibilidade em sempre ajudar de imediato. Agradeço pelo conhecimento compartilhado, pelos desenhos lindos e elaborados que fez para minhas aulas e tese, por me socorrer nos momentos em que o computador insistia em “ter vida própria” e eu me apavorava... Não poderia deixar de agradecer também por ter me apresentado ao maravilhoso mundo da corrida. Vou me lembrar eternamente dos nossos longos treinos no Világio em que conversávamos da vida enquanto me incentivava a correr.

Élcia, obrigada pelas colocações mais sensatas, livres de qualquer julgamento e que tanto me fizeram pensar sobre a vida e os fatos cotidianos. Tenho a certeza que nossa amizade permanecerá fora dos limites do laboratório. Foi muito importante conviver com o seu coração generoso, seus ouvidos incansáveis e sua mente sábia. Obrigada por tudo que fez por mim e seu imenso carinho!

Marcela, sou extremamente grata por sua amizade sincera que aqui conquistei. Sua bondade, inteligência e força são realmente inspiradoras. Obrigada pelas conversas amigas, pela ajuda e incentivo profissionais e pela companhia tão alegre de todos os dias. Você realmente deixou saudades aqui em Bauru!

Andreia, obrigada por toda sua ajuda prestada de imediato nos diversos momentos em que precisei. Aos poucos, conquistou o seu espaço, o meu respeito e a minha admiração. Sua paciência, bom humor e prontidão contribuíram para a fácil convivência entre todos nós no laboratório. Sou sinceramente grata por tudo!

Também agradeço à Maria Teresa A. F. M. Silva, secretária da histologia, por toda disposição em ajudar, por tanta alegria emanada e pelo leve e prazeroso convívio.

Aos meus colegas da pós-graduação, especialmente à Bruna Bighetti, ao Ricardo Arantes, à Carol Franciscone, ao Bruno Viscelli e à Tamiris Valins por toda ajuda prestada, alegrias compartilhadas e por fazerem do laboratório de Histologia um ambiente muito bom de se trabalhar.

À Izabel Meneghetti e à Pâmela Andrade que fizeram parte deste trabalho durante a fase de experimentação animal.

À aluna de iniciação científica, Marília, por auxiliar nos procedimentos de imunohistoquímica.

Agradeço à Universidade de São Paulo, por me acolher como aluna há tantos anos, desde a graduação até o Doutorado. Posso dizer que FOB-USP tem uma parte enorme em minha vida, não só em minha formação profissional, mas também em minha vida pessoal. Sou eternamente grata à instituição e a todas as pessoas que nela trabalham.

Obrigada aos funcionários da manutenção, da limpeza, do bandejão, da informática, da portaria, da segurança, da biblioteca, do esporte e dos demais laboratórios, por manterem tudo perfeitamente funcionando de maneira que facilite o trabalho e a rotina diária.

Ao diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, Dr. José Carlos Pereira e à coordenadora da área de Biologia Oral Prof^a Dr^a Izabel Regina Fischer Rubira-Bullen

À secretária do Curso de Biologia Oral, Vera Lúcia Rosa Ruffino pela eficiência, disponibilidade e atenção dedicada ao nosso curso de pós-graduação e aos seus alunos.

À Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães que, acima de tudo, é uma amiga muito especial. Carol, muito obrigada por seu companheirismo, colaboração, amizade sincera, por todos os momentos de festa, descontração e de conversas intermináveis acompanhadas de muita “comilança”...

À Prof^a. Dr^a. Linda Wang por sua amizade e disponibilidade em ajudar sempre!

À Lúcia Andreatta por me dar a oportunidade de exercer as atividades clínicas que também amo tanto.

À minha amiga Aline Siqueira pela amizade sincera, sensatez, generosidade e colaboração.

À minha prima Brunna, que compartilha comigo o mesmo lar há mais de 10 anos. Obrigada pela companhia e amizade!

Às pessoas da minha família com quem posso conviver mais próximo, minha avó Esther, minha tia Valéria e o Luiz, por todos os auxílios prestados sempre de pronto, pelas muitas alegrias compartilhadas, juntamente com os almoços e jantares deliciosos.

À minha futura sogra Beth e ao meu futuro sogro Moacir por me acolherem como filha e por todos os momentos agradáveis que compartilhamos

À D. Jô por me auxiliar cuidadosamente nos afazeres domésticos, permitindo que eu tivesse mais tempo livre para me dedicar aos trabalhos de pesquisa e de execução da tese. Obrigada por todo carinho!

Ao Daniel Bonné por facilitar o meu trabalho, formatando e imprimindo a tese. Muito obrigada!

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

E, por fim, agradeço a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Gabriela Gennaro

Epígrafe

*“Renova-te.
Renasce em ti mesmo.
Multiplica os teus olhos, para verem mais.
Multiplica os teus braços para semeares tudo.
Destrói os olhos que tiverem visto.
Cria outros, para as visões novas.
Sê sempre o mesmo.
Sempre outro. Mas sempre alto.
Sempre longe.
E dentro de tudo.”*

Cecília Meireles

Resumo

Resumo

As doenças periodontais (DPs) são alterações inflamatórias crônicas que acometem os tecidos de sustentação do órgão dental. A presença do diabetes é refletida em maior severidade e prevalência das DPs tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Contudo, os mecanismos biológicos envolvidos no aumento da prevalência e da severidade permanecem pouco conhecidos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o número de células marcadas por imunohistoquímica para TNF- α , RANKL, OPG, IL-10 e para o fator de transcrição RUNX-2, na doença periodontal experimental decorrente da indução do diabetes em ratos. Além disso, avaliamos os possíveis efeitos do tratamento com chá verde sobre o periodonto dos animais. Inicialmente, os ratos (n=80) foram submetidos à indução do diabetes por administração intraperitoneal de estreptozotocina (50mg/kg) e, juntamente com o grupo controle (n=40), foram subdivididos em animais tratados com chá verde ou com água, acompanhados durante o período de 15, 30, 60 ou 90 dias. Após o sacrifício dentro do tempo determinado para cada grupo, as hemimaxilas coletadas passaram pelos procedimentos de imunohistoquímica. Os resultados revelaram que a presença do diabetes causou perda óssea alveolar, compatível com o desenvolvimento da doença periodontal e resultou em alterações significativas no número de células imunomarcadas para diferentes mediadores do processo inflamatório. Entretanto, o chá verde apresentou efeitos benéficos para o periodonto, alterando a marcação das citocinas envolvidas. Nos animais diabéticos, independente do tratamento, foi observado aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$ ANOVA) no número de células imunomarcadas para TNF- α e RANKL. Inversamente, houve menor marcação para OPG (60 e 90 dias), RUNX-2 (30, 60 e 90 dias) e para IL-10 (30, 60 e 90 dias) nos animais que ingeriram água. Porém, os diabéticos tratados com chá não demonstraram diferenças significativas em relação ao seu respectivo controle. Assim, quando comparados os grupos diabéticos tratados com água e chá, os animais que receberam o chá demonstraram significativamente ($p < 0,05$ ANOVA) menor quantidade de células imunomarcadas para TNF- α e RANKL em relação aqueles diabéticos tratados com água, enquanto que a marcação para OPG, RUNX-2 e IL-10 foi maior. Portanto, a desregulação na expressão de citocinas e do fator de transcrição osteoblástico parece ser um dos

mecanismos biológicos envolvidos no aumento da prevalência e da severidade das doenças periodontais decorrentes do diabetes. Entretanto, o chá verde modulou a inflamação no periodonto dos animais diabéticos, apresentando-se, possivelmente, como uma alternativa terapêutica e coadjuvante ao tratamento das doenças periodontais correlacionadas ao diabetes.

Descritores: diabetes mellitus, estreptozocina, periodontite, *Camellia sinensis* ratos, imunoistoquímica.

Abstract

Abstract

Cytokines expression analyses in periodontium of diabetic rats treated with green tea

Periodontal diseases (PD) are chronic inflammatory diseases leading the destruction of connective tissue and alveolar bone supporting the teeth. The establishment of diabetes increases PD prevalence and severity in humans and experimental model. However, biological mechanisms regarding to increase of prevalence and severity remains poorly known. The aim of this study was to evaluate the number of immuno-staining cells to TNF- α , RANKL, OPG, IL-10 and transcription factor RUNX-2 in experimental periodontal disease in diabetic rats. Furthermore, the possible green tea effects were evaluated in periodontium of the rats. Diabetes was induced in Wistar rats (n=120) by intraperitoneal administration of 50 mg/kg of streptozotocin and together with control animals (n=80), the rats were subdivided in water or green tea treated group, that were analyzed at 15, 30, 60 and 90 days after diabetes induction. The animals were sacrificed and the hemimaxillae were removed and submitted to immunohistochemistry procedures. Our data demonstrated that diabetes induction and progression resulted in significant bone loss and alterations in number of immuno-staining cells to different mediators of inflammatory process. However, the green tea showed positive effects in periodontium through inflammation modulation. In diabetic rats, regardless of treatment, we observed an increased number of immuno-staining cells to TNF- α , IL-1 β and RANKL (p<0,05 ANOVA). On the other hand, in water treated diabetic rats, there were a decreased number of immuno-staining cells to OPG (60 e 90 days), RUNX-2 (30, 60 e 90 days) and IL-10 (30, 60 e 90 days). However, the green tea treated rats did not showed statistical differences between control and experimental groups in those staining. When we compared both diabetic groups, green tea and water treated, the animals that drank the green tea showed decreased number of immuno-staining cells to TNF- α and RANKL (p<0,05 ANOVA) whereas the number of immuno-staining cells to OPG, RUNX-2 e IL-10 were increased. Taken together, desregulation of inflammatory cytokines and osteoblastic transcription factor seem to be one of biological

mechanisms involved in the increase of periodontal disease prevalence and severity associated with diabetes. However the green tea was able to modulate inflammation in diabetic rats periodontium and it seems to be a possible therapeutic agent to periodontal disease treatment associated with diabetes.

Keywords: diabetes mellitus, streptozocin, periodontitis, *Camellia sinensis*, rats, immunohistochemistry.

Lista de Abreviaturas e Siglas

°: graus.

”: polegadas

%: por cento.

µm: micrômetro.

AGEs: advanced glycation end products, produtos finais de glicosilação avançada.

ANVISA: agência nacional de vigilância sanitária

cm: centímetro.

Cbfa1: fator nuclear ligante da subunidade alpha 1

COA: crista óssea alveolar

CRP: proteína C reativa

Ctle: controle

d: distância

DAB: cromógeno diaminobenzidina.

Diab: diabético

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNMT: DNA metiltransferase

DPs: doenças periodontais.

EDTA: etilenodiaminotetra acético sal dissódico.

EG: epicatequina galate

EGC: epigallocatequina

EGCG: epigallocatequina galate

ERK: quinase reguladora de sinais extra celulares

FGF: fator de crescimento fibroblástico

Foxp3: fator de transcrição forkhead Box P3

FOB: Faculdade de Odontologia de Bauru

g: gramas.

HDAC: histona desacetilase

H₂O: água

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente

IL: interleucina.

IFN: interferon

Ig: imunoglobulina

IGF: Fator de Crescimento Insulínico

JAC: junção amelo-cementária

LED: luz emitente diodo

LPS: lipopolissacarídeos.

MAPK: proteína quinase mitógena ativada

MCP-1: proteínas quimioatraentes de monócitos

mg/kg: miligramas por kilo.

mg/dl: miligramas por decilitro.

mg/ml: miligramas por mililitros

ml: mililitros.

mm: milímetros.

mm²: milímetros quadrados

MMP: matrix metalloproteinase, metaloproteinase da matriz.

M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos

NF-κB: nuclear factor *kappa* B, fator de transcrição nuclear *kappa* B.

nm: nanômetro

NO: óxido nítrico

iNOS: isoforma do óxido nítrico sintase

OPG: osteoprotegerina.

p: nível de significância, probabilidade.

PBS: phosphate buffered saline, tampão fosfato-salino.

PCR: reação em cadeia polimerase

PGE: prostaglandina E.

pH: potencial hidrogeniônico.

PLC: fosfolipase C

PKC: proteína quinase C

RAGE: receptor of advanced glycation end products, receptor dos produtos finais de glicosilação avançada.

RANK: receptor activator of NFκappa B, receptor de ativação associado ao NF-kappa B.

RANKL: receptor activator of NFkappa B ligand, ligante do receptor de ativação associado ao NF-kappa B.

mRNA: ácido ribonucleio mensageiro

rpm: rotações por minuto

RUNX-2: fator 2 relacionado a transcrição

TGF: Fator de Crescimento Tecidual

Th1: célula T helper do tipo 1

Th2: célula T helper do tipo 2

TIMP: tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, inibidores teciduais das metaloproteinases da matriz.

TLRs: Toll like receptors, receptores do tipo Toll.

TNF- α : tumor necrosis factor alpha, fator de necrose tumoral alfa.

TNFSF14: membro da superfamília de ligante do fator de necrose tumoral

TRAP: ácido fosfatase tartarato resistente

Treg: célula T reguladora

USP: Universidade de São Paulo

Lista De Figuras

Figura 1	- Delineamento experimental para indução do diabetes e coleta das amostras	51
Figura 2	- Análise morfométrica da crista óssea alveolar.	55
Figura 3	- Esquema das etapas de imunomarcção pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase.....	58
Figura 4	- Distribuição dos campos para a análise de imunohistoquímica nos tecidos periodontais.....	63
Figura 5	- Ingestão líquida de água e chá dos animais do grupo controle e diabético..	67
Figura 6	- Perda ou ganho de massa corporal (g), de acordo com o estado glicêmico, nos diferentes seguimentos do estudo.	69
Figura 7	- Índice glicêmico médio.	71
Figura 8	- Cinética da distância entre a Junção Amelo-Cementária (JAC) e a Crista Óssea Alveolar (COA).	73
Figura 9	- Fotomicrografias representativas da análise morfométrica, comparando o período inicial de indução do diabetes, 15 dias, com o final, após 90 dias.....	75
Figura 10	- Cinética da expressão de TNF- α nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle, tratados com água ou chá.....	78
Figura 11	- Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	79
Figura 12	- Cinética da expressão de RANKL nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde.	82
Figura 13	- Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	83

Figura 14 - Cinética da expressão de OPG nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde.....	86
Figura 15 - Fotomicrografias representativas das imunomarcações para OPG no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	87
Figura 16 - Cinética da expressão de RUNX-2 nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde.....	90
Figura 17 - Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RUNX-2 no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	91
Figura 18 - Cinética da expressão de IL-10 nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde.....	94
Figura 19 - Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-10 no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias.....	95
Figura 20 - Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre o gene <i>foxp3</i>	112
Figura 21 - Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre o fator de transcrição NF-κB.....	113
Figura 22 - Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre a enzima Histona Desacetilase (HDAC).....	114

Sumário

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1.	Doença Periodontal	27
2.1.1.	Remodelação óssea e a doença periodontal.....	30
2.2.	Diabetes.....	32
2.2.1.	O processo de formação e reabsorção óssea em diabéticos	33
2.3.	Diabetes e Doença Periodontal	34
2.4.	Chá Verde.....	36
2.4.1	Efeitos do Chá Verde sobre o diabetes	37
3	JUSTIFICATIVA	39
4	PROPOSIÇÃO	43
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.1	Tratamento dos animais de experimentação	49
5.2	Grupos experimentais e indução do diabetes.....	50
5.3	Avaliações clínica e laboratorial.....	52
5.4	Eutanásia dos animais, coleta e fixação das hemimaxilas	53
5.5	Procedimentos histotécnicos	53
5.6	Procedimentos imunohistoquímicos	57
5.7	Avaliação imunohistoquímica	62
5.8	Análise estatística dos dados	63
6	RESULTADOS	65
6.1	Indução do diabetes	67
6.2	Análise histomorfométrica.....	72
6.3	Análise imunohistoquímica	77
6.3.1	Marcações para TNF- α	77
6.3.2	Marcações para RANKL	81
6.3.3	Marcações para OPG	85
6.3.4	Marcações para RUNX-2.....	89
6.3.5	Marcações para IL-10	93
7	DISCUSSÃO	97
8	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIAS.....	125
	ANEXOS.....	141

Introdução

1 Introdução

O *diabetes mellitus* é uma desordem metabólica complexa, caracterizada por anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (Standards of medical care in diabetes--2012). Os diabéticos apresentam numerosas e sérias complicações, que incluem nefropatia, neuropatia e doenças cardiovasculares (Standards of medical care in diabetes--2010). Porém, em 1993, a doença periodontal foi caracterizada como a sexta complicação sistêmica mais frequente do diabetes (Loe, 1993), devido aos pacientes comumente apresentarem maior prevalência e severidade da doença (Pucher e Otomo-Corgel, 2002). Sabe-se, portanto, que nos diabéticos com controle glicêmico deficiente, os indicativos de periodontite tendem a ser mais pronunciados (Sastrowijoto, Van Der Velden *et al.*, 1990), pois a resposta inflamatória frente aos patógenos não é a mesma. Assim, os níveis de mediadores pró-inflamatórios podem estar aumentados, tanto sistemicamente quanto no ambiente periodontal, o que leva a uma maior destruição do periodonto cronicamente infectado e caracteriza o risco elevado de desenvolver doenças periodontais (Liu, Bal *et al.*, 2006; Mealey, 2006).

Os efeitos deletérios do diabetes sobre o periodonto são amplamente descritos na literatura, entretanto, os mecanismos que regulam o estabelecimento e a progressão da doença periodontal permanecem pouco elucidados. Sendo assim, propusemos uma análise por imunohistoquímica do número de células marcadas em relação aos mediadores envolvidos na doença periodontal, decorrente da indução do diabetes em ratos.

Além disso, sabe-se atualmente, que o chá verde contém diversos polifenóis, que em sua maioria, são componentes flavonólicos conhecidos como catequinas (Chacko, Thambi *et al.* 2010). Porém, vários estudos têm proposto efeitos antiinflamatórios e antidiabéticos a essas catequinas (Crouvezier, Powell *et al.*, 2001; Iso, Date *et al.*, 2006). Baseado nessas informações e na relação que o diabetes tem com o desenvolvimento da doença periodontal, propusemos um estudo que tratasse os ratos diabéticos com ingestão de chá verde, para que fosse possível observar os efeitos da bebida sobre o periodonto desses animais. Assim, por meio

de análise imunohistoquímica foi possível verificar a presença ou modulação de citocinas pró e antiinflamatórias na região periodontal dos ratos estudados.

Revisão de Literatura

2 Revisão de Literatura

2.1. Doença Periodontal

A doença periodontal é caracterizada como uma inflamação crônica que acomete os tecidos de sustentação do dente, sendo uma das principais causas de perda dentária nos adultos e a forma mais prevalente de patologia óssea humana (Garlet, Cardoso *et al.*, 2006).

O biofilme bacteriano aderido à superfície do dente desencadeia uma intensa reação inflamatória, geração de proteases que degradam matriz extracelular e reabsorção do osso alveolar, levando à perda irreversível dos tecidos de sustentação no periodonto (Baker, 2000). Além da presença dos patógenos, a progressão deste processo é altamente dependente da reação imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou aos seus subprodutos (Cochran, 2008; Lee, Andrian *et al.*, 2009).

Dentre as proteases envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular, estão as metaloproteases de matriz (MMPs). A ativação das MMPs é regulada por um grupo de proteínas endógenas, chamado de inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), conduzindo o processo de remodelação da matriz extracelular de forma extremamente controlada. Contudo, em diversos estados patológicos, verifica-se a elevação dos níveis de MMPs sem o aumento concomitante na expressão dos TIMPs, acentuando a degradação da matriz extracelular (Reynolds, 1996; Verstappen e Von Den Hoff, 2006).

Além da destruição de tecido conjuntivo, a reabsorção óssea alveolar é um evento de extrema importância nas doenças periodontais. A integridade do tecido ósseo depende da manutenção de um delicado equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. O RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B), seu receptor celular RANK (receptor de ativação do fator nuclear κ B), e a osteoprotegerina (OPG), receptor “decoy” de RANKL, foram identificados como os principais componentes moleculares do sistema de remodelação óssea (Takayanagi, 2005; Cochran, 2008).

A ligação de RANKL, expresso por diversas células, inclusive osteoblastos, ao RANK, expresso nos precursores de osteoclastos, é o principal evento estimulatório para diferenciação desses precursores em osteoclastos maduros, bem como sua posterior ativação. A regulação da interação entre RANK e RANKL é realizada pela OPG, uma vez que esta proteína é capaz de se ligar ao RANKL, impedindo sua interação com RANK, o que inibe a diferenciação e ativação dos osteoclastos, regulando negativamente a reabsorção óssea alveolar (Takayanagi, 2005; Cochran, 2008; Leibbrandt e Penninger, 2008). Portanto, um desequilíbrio nesse sistema é o componente principal da etiologia de algumas desordens ósseas. Na doença periodontal, são encontrados níveis aumentados de RANKL nos tecidos e o equilíbrio com a expressão de OPG é quem determina a severidade da doença (Liu, Xu *et al.*, 2003; Garlet, Martins *et al.*, 2004; Mogi, Otogoto *et al.*, 2004).

Também é importante estabelecer os fatores que regulam a quebra da homeostasia dos tecidos conjuntivo e ósseo, dando início à doença periodontal. De modo geral, as citocinas inflamatórias atuam tanto na iniciação quanto na manutenção da resposta imune frente aos desafios bacterianos. Assim, mediadores inflamatórios e citocinas expressas por células do tipo Th1, como Interleucina (IL)-1 β , Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α e Interferon (IFN)- γ , apresentam um papel catabólico no tecido periodontal, pois são reguladores positivos da expressão de MMPs e da osteoclastogênese; por isso, quando presentes na área, levam os osteoblastos a expressarem RANKL. Porém, o efeito reverso é exercido quando células do tipo Th2 liberam citocinas como IL-4 e IL-10, modulando a resposta imune (Taubman e Kawai, 2001; Graves e Cochran, 2003). Portanto, nas lesões periodontais, o balanço entre a expressão dos mediadores do tipo Th1 e Th2 é conhecido por ser um fator relevante no desenvolvimento da doença, por, possivelmente, regular a proporção MMPs/TIMPs e RANKL/OPG (Garlet, Martins *et al.*, 2004; Garlet, Cardoso *et al.*, 2006).

O TNF- α é uma citocina multifuncional sintetizada principalmente pelos macrófagos durante a inflamação e apresenta um potente fator osteoclastogênico. Assim, o TNF- α medeia a diferenciação do osteoclasto, estimulando a expressão de RANKL, por meio de um mecanismo autócrino (Assuma, Oates *et al.*, 1998; Graves e Cochran, 2003). Tem-se demonstrado o envolvimento dessa citocina com a perda óssea em periodontites, fallhas de implantes ortopédicos e outras formas de osteólises inflamatórias crônicas (Graves e Cochran, 2003).

Atuando junto ao TNF- α , a IL-1 β pode desempenhar um papel importante na reabsorção óssea durante as doenças inflamatórias. Por sua vez, estimula a produção de mediadores secundários como quimiocinas, cicloxigenases, prostaglandinas e metaloproteases, envolvidas na reabsorção alveolar e na degradação da matriz extracelular, além de amplificar e sustentar a resposta inflamatória (Graves, Fine *et al.*, 2008; Offenbacher, Barros *et al.*, 2008; Van Dyke e Kornman, 2008).

Por outro lado, quando se eliminam os patógenos periodontais, a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias tende a diminuir ou cessar. Além disso, as células apoptóticas presentes no tecido periodontal danificado são removidas pelos fagócitos, o que induz ativamente a geração de mediadores antiinflamatórios, como Fator de Crescimento Tecidual (TGF)- α e IL-10. Sendo assim, observa-se que defeitos no reconhecimento e remoção de células apoptóticas podem contribuir para a persistente inflamação e autoimunidade (Freire-De-Lima, Xiao *et al.*, 2006).

Considerando que a doença periodontal é uma infecção crônica em que periodontopatógenos desencadeiam um processo inflamatório, o tipo de resposta imune gerada é quem vai orientar o curso clínico da doença. Assim, o padrão de citocinas expressas determina o modo estável ou progressivo da lesão e regula a severidade da periodontite. Pois, na presença de doenças periodontais, observa-se uma elevada expressão de TNF- α , IL-1 β e IFN- γ correlacionada positivamente com os níveis aumentados de MMPs e RANKL, em períodos caracterizados por intensa reação inflamatória e perda óssea alveolar. Por outro lado, a expressão de TIMPs e OPG é menor, associada a pequenas quantidades expressas de IL-10 e IL-4 (Garlet, Martins *et al.*, 2004; Garlet, Cardoso *et al.*, 2006).

Diversos modelos animais forneceram evidências mais claras para o papel de alguns fatores imune-inflamatórios envolvidos na progressão da doença periodontal. Quando a resposta do hospedeiro é alterada por tratamento com inibidores inflamatórios específicos ou manipulação genética, a severidade da destruição periodontal é claramente reduzida frente ao estímulo bacteriano. A primeira evidência concreta que a inibição da resposta inflamatória reduz a doença periodontal foi realizada em um modelo com cães, no qual, a inibição com prostaglandina reduziu significativamente a perda óssea alveolar (Williams, Jeffcoat *et al.*, 1985). Subsequentes estudos usaram diferentes técnicas para demonstrarem que citocinas desempenham um papel importante na periodontite. Primatas não-

humanos tratados com inibidores para as duas principais citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α , exibiram reduzida perda de osso e de inserção periodontal (Assuma, Oates *et al.*, 1998; Delima, Oates *et al.*, 2001; Delima, Karatzas *et al.*, 2002). Similarmente, a inibição de RANKL diminuiu a reabsorção óssea alveolar em diversos modelos de periodontite (Teng, Nguyen *et al.*, 2000; Han, Kawai *et al.*, 2006; Jin, Cirelli *et al.*, 2007). Dessa forma, fica evidente que a progressão da doença periodontal pode ser atribuída à combinação de vários fatores, incluindo a presença de periodontopatógenos, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, produção e ativação de MMPs e RANKL associada a baixos níveis de IL-10, TGF- β , TIMPs e OPG (Graves, Oates *et al.*, 2011; Graves, 2008).

2.1.1. Remodelação óssea e a doença periodontal

A remodelação óssea fisiológica consiste em um processo de reabsorção acompanhado por neoformação. Em outras palavras, o osso é magistralmente programado para reparar-se completamente, após o episódio de reabsorção (Graves, Li *et al.*, 2011). A partir desse conceito, a perda óssea, induzida por bactérias, em um adulto saudável, deveria ser seguida por uma neoformação equivalente. Entretanto, na periodontite, ocorre uma falha na quantidade adequada de novo osso formado após a reabsorção, resultando em uma perda óssea final (Graves, Oates *et al.*, 2011).

O balanço entre reabsorção e formação requer uma viabilidade adequada de células precursoras de osteoblastos, diferenciação destas e formação de matriz óssea em resposta a sinais indutores. No entanto, o processo patológico que leva à perda óssea periodontal, logicamente, reside na inabilidade completa ou parcial de formar novo osso, na quantidade equivalente ao que foi reabsorvido. Então, fatores de crescimento e de diferenciação produzidos durante a reabsorção podem não ser suficientes para estimular a completa neoformação. Além disso, mediadores inflamatórios também podem interferir nesse processo, levando ao reparo incompleto (Graves, Li *et al.*, 2011; Graves, Oates *et al.*, 2011).

Portanto, a inflamação, que leva à osteoclastogênese e à consequente reabsorção óssea, pode ser a responsável pela falha na formação de um novo osso. Assim, se a inflamação for prolongada, a ponto de estar presente durante a fase de transição entre os períodos de reabsorção e neoformação, os mediadores

inflamatórios vão interferir na capacidade de formar novo osso (Graves, Li *et al.* 2011; Behl, Siqueira *et al.*, 2008). Essa interpretação é adicionalmente suportada pela evidência de que a aplicação de citocinas *in vivo* estimula a reabsorção, bem como limita a formação óssea. Pois, a inflamação pode não somente estimular a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea, mas também alterar a função dos osteoblastos e limitar o reparo (Wei, Kitaura *et al.*, 2005; Kawai, Matsuyama *et al.*, 2006). Em modelos experimentais, a injeção de *Porphyromonas gingivalis* dentro do tecido conjuntivo induz a reabsorção óssea seguida de neoformação (Liu, Bal *et al.*, 2006; Behl, Siqueira *et al.*, 2008). No entanto, quando a inflamação é prolongada por uma condição como o diabetes, de maneira que o processo inflamatório se estenda até a fase de reparo, a capacidade de formar novo osso fica reduzida (Al-Mashat, Kandru *et al.*, 2006; Liu, Bal *et al.*, 2006). Porém, se a produção de TNF- α é inibida nesses mesmos animais, o nível de inflamação reduz e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de formação óssea nos diabéticos (Liu, Bal *et al.*, 2006).

Como foi visto, as citocinas pró-inflamatórias podem afetar o reparo ósseo por ativarem o processo de osteoclastogênese, bem como, por dificultarem a formação de um novo osso. Portanto, para esclarecer como os mediadores inflamatórios podem afetar a formação óssea, deve-se considerar o impacto deles sobre os precursores de osteoblastos e sobre essas células diferenciadas. Estudos sugerem que o TNF- α , em alta quantidade no tecido, pode inibir a proliferação de osteoblastos e a diferenciação de seus precursores (Frost, Jonsson *et al.*, 1997; Gilbert, He *et al.*, 2000; Gilbert, He *et al.*, 2002). Além disso, a sobrevivência dessas células é um aspecto importante no processo de neoformação. Sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias podem diretamente estimular os osteoblastos ou as células precursoras à apoptose (Tsuboi, Kawakami *et al.*, 1999). Na remodelação óssea periodontal, o ligamento é uma fonte importante de osteoblastos indiferenciados (Lin, McCulloch *et al.*, 1994); então, a ocorrência de apoptose, induzida por TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , pode afetar a quantidade de células indiferenciadas, o que resulta na dificuldade de neoformação óssea após reabsorção sofrida, durante o curso da doença periodontal (Kuzushima, Mogi *et al.*, 2006; Thammasitboon, Goldring *et al.*, 2006).

Nesse contexto, é importante considerar que, o processo de remodelação óssea representa um delicado balanço entre mediadores inflamatórios, que

desencadeiam a reabsorção, e a manutenção de células viáveis responsáveis pela neoformação.

2.2. Diabetes

A incidência do diabetes está aumentando consideravelmente e em paralelo com a tendência observada à obesidade (Wild, Roglic *et al.*, 2004). O diabetes apresenta numerosas e sérias complicações, que incluem nefropatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e periodontite (Standards of medical care in diabetes--2012; Standards of medical care in diabetes--2010). Muitos fatores são conhecidos por contribuírem para o desenvolvimento do diabetes e suas complicações, incluindo genética, tipo de dieta, sedentarismo, idade, obesidade e fatores perinatais (King, 2008). Além disso, processos inflamatórios estão associados ao Diabetes tipo I e II, porém, a etiologia distinta para os dois subtipos sugere que diferentes mecanismos causais estão envolvidos com a doença (King, 2008). O Diabetes tipo I, frequentemente encontrado em crianças e adultos jovens, é causado por destruição auto-imune das células da ilhota pancreática, impossibilitando a produção de insulina. O Diabetes tipo II é a forma mais comum e ocorre principalmente em adultos, embora a prevalência em pessoas jovens esteja aumentando em conjunção com a obesidade infantil; é caracterizado por uma resistência à entrada de insulina nas células corporais associada à inabilidade das células β do pâncreas de secretar o hormônio em quantidade suficiente (Singh, Shaw *et al.*, 2004).

Além dos fatores acima comentados, uma base inflamatória tem sido incluída dentre as causas do diabetes. Pois, foi detectado um aumento nos marcadores inflamatórios em indivíduos aparentemente saudáveis e que posteriormente vieram a desenvolver o diabetes (Vozarova, Weyer *et al.*, 2002), sugerindo que a inflamação ocorre previamente à instalação completa da doença, ou seja, na fase inicial em que a tolerância à glicose está reduzida. Além disso, a obesidade e a conseqüente ativação do tecido adiposo podem aumentar a liberação de fatores inflamatórios que acentuam a resistência à insulina. Pois, os adipócitos, uma vez ativados, liberam níveis anormais de moléculas bioativas, como lipídios, ácidos graxos, proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1) e várias citocinas inflamatórias, como proteína C reativa (CRP) e TNF- α (Hotamisligil, 2006; Shoelson, Lee *et al.*, 2006).

Consequentemente, a liberação dessas citocinas e de outros mediadores inflamatórios, resulta no recrutamento local de monócitos, que se diferenciam em macrófagos, os quais liberam mais fatores pró-inflamatórios e quimiocinas, não só localmente, mas dentro do tecido adiposo, bem como sistemicamente, propagando a resposta inflamatória a vários outros tecidos (Shoelson, Lee *et al.*, 2006).

2.2.1. O processo de formação e reabsorção óssea em diabéticos

Em humanos, o diabetes está relacionado à diminuição da massa esquelética e ao atraso no reparo de fraturas (Soejima e Landing, 1986; Herskind, Christensen *et al.*, 1992). Pacientes diabéticos exibem reduzida densidade e formação óssea, sugerindo uma menor atividade osteoblástica (Krakauer, McKenna *et al.*, 1995; Munoz-Torres, Jodar *et al.*, 1996). Nos diabéticos tipo I, observou-se uma remodelação reduzida e uma mineralização deficiente (Funk, Hale *et al.*, 2000).

Por isso, vários mecanismos têm sido propostos para justificar as anormalidades ósseas nesses pacientes, como a menor expressão do Fator de Crescimento Insulínico (IGF-1) ou do Fator de Crescimento Fibroblástico (FGF) que pode contribuir para a redução na síntese de matriz osteóide (Verhaeghe, Suiker *et al.*, 1992; Kawaguchi, Kurokawa *et al.*, 1994). Além disso, fatores de transcrição que coordenam a diferenciação celular para o fenótipo de osteoblastos, como o RUNX-2, podem estar envolvidos com o processo alterado de formação óssea. Pois, quando se investigou a expressão de RUNX-2 em camundongos diabético-induzidos por estreptozotocina, observou-se uma quantidade diminuída desse fator de transcrição; entretanto, o uso de insulina reverteu os padrões de expressão para níveis comparados aos normais (Lu, Kraut *et al.*, 2003). Isso indica que, os animais diabéticos produzem quantidade suficiente de células mesenquimais indiferenciadas, mas falham em expressar adequadamente genes que regulam a diferenciação osteoblástica, o que, por sua vez, resulta em formação óssea reduzida (Lu, Kraut *et al.*, 2003).

Em experimento realizado em ratos diabéticos com doença periodontal induzida por ligadura, observou-se que, após a remoção dessa ligadura, o grupo diabético manteve altos níveis de inflamação, comparado ao grupo normoglicêmico. Como resultado, os animais diabéticos continuaram a perder osso e tiveram uma capacidade significativamente menor de reparo. Isto pode ter sido consequência da

produção reduzida de matriz óssea *per* célula ou da diminuição no próprio número de osteoblastos capazes de secretarem essa matriz. Pois, os ratos diabéticos apresentaram significativamente mais osteoblastos apoptóticos, sugerindo que a morte celular elevada interferiu no reparo do osso reabsorvido (Liu, Bal *et al.*, 2006).

Especificamente no ligamento periodontal, a apoptose pode afetar esse processo de reparo, uma vez que o ligamento é conhecido por ser uma fonte rica de células capazes de se diferenciarem em osteoblastos (Isaka, Ohazama *et al.*, 2001). Entretanto, a taxa elevada de células apoptóticas encontradas no periodonto de diabéticos pode ser devido aos mesmos mediadores implicados na inflamação, ou seja, às citocinas pró-inflamatórias. Por isso, a presença desses mediadores em níveis aumentados resultaria em morte celular, o que dificultaria a remodelação óssea, causando um desequilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido e neoformado (Alikhani, Alikhani *et al.*, 2004; Alikhani, Alikhani *et al.*, 2005).

2.3. Diabetes e Doença Periodontal

A resistência à insulina e a deficiência em produzi-la, resultam em hiperglicemia, a qual é o maior fator de risco para o desenvolvimento das complicações relacionadas ao diabetes. Assim, níveis elevados de glicemia contribuem para problemas microvasculares como retinopatia, neuropatia e nefropatia, sendo também um fator de risco para doenças cardiovasculares (Mealey, 2006). Além dessas complicações citadas, a periodontite está comumente associada ao diabetes, estando 2,9 vezes mais presente em indivíduos com controle glicêmico deficiente (Tsai, Hayes *et al.*, 2002). Os indicadores de doença periodontal incluem profundidade de sondagem aumentada, perda óssea alveolar e dentária. Sabe-se, portanto, que nos diabéticos com glicemia não controlada, os indicadores periodontais tendem a ser mais pronunciados, havendo maior perda de inserção, quando comparados àqueles pacientes não-diabéticos e que apresentam higiene oral semelhante (Sastrowijoto, Van Der Velden *et al.*, 1990). No entanto, os diabéticos não apresentam diferenças na composição da microbiota oral, mas a resposta inflamatória frente à infecção não é a mesma. Pois, nesses pacientes, os níveis de mediadores pró-inflamatórios estão aumentados tanto sistemicamente quanto no ambiente periodontal, o que pode levar à maior destruição de um

periodonto cronicamente infectado (Liu, Bal *et al.*, 2006; Mealey, 2006). Isto é suportado por estudos nos quais o pobre controle glicêmico foi significativamente correlacionado com a maior produção sérica de citocinas e com níveis elevados dessas no fluido gengival (Lalla, Lamster *et al.*, 2000; Engebretson, Hey-Hadavi *et al.*, 2004). Também se observou que, camundongos diabéticos exibiram inflamação prolongada em resposta ao *P.gingivalis*, devido, em parte, à desregulação na quantidade de TNF- α (Naguib, Al-Mashat *et al.*, 2004).

Assim, a resposta imune, considerada uma peculiaridade do diabetes, inclui, além da produção sustentada de citocinas inflamatórias, anormalidades das funções neutrofílicas. Juntamente, essas alterações provêm um ambiente no qual a bactéria pode desenvolver-se, contribuindo para maior destruição periodontal (Graves, Naguib *et al.*, 2005; Mealey, 2006).

Tem sido mostrado também, que a hiperglicemia pode glicosilar proteínas corporais, formando produtos finais da glicosilação avançada (Fu, Zhen *et al.*, 2011); assim, o acúmulo dessas moléculas de AGE no periodonto estimula o recrutamento de monócitos para o local. Uma vez no tecido, AGEs interagem com seus receptores (RAGEs) presentes na superfície dos monócitos. A interação AGE-RAGE induz uma mudança no fenótipo do monócito, causando uma super-regulação da célula, aumentando significativamente a produção de citocinas inflamatórias, como Prostaglandina (PG) E₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Mealey, 2006). Interessantemente, modelos animais de Diabetes Mellitus demonstraram que, ao bloquear-se o receptor RAGE, os níveis de citocinas pró-inflamatórias diminuíram no tecido gengival, bem como a quantidade de metaloproteínases e o acúmulo de AGE, o que resultou em menor perda óssea alveolar frente à presença de *Porphyromonas gingivalis* (Lalla, Lamster *et al.*, 2000). Adicionalmente, sugere-se que a desregulação das citocinas inflamatórias associada com a expressão persistente no local, representam um mecanismo pelo qual a bactéria pode induzir maiores danos nos indivíduos diabéticos (Graves, Naguib *et al.*, 2005; Mealey, 2006). Resumidamente, isso tudo pode ser uma via que leva à perda tecidual, resultando em uma doença periodontal mais avançada (Rachon, Mysliwska *et al.*, 2003; Claudino, Ceolin *et al.*, 2007; Duarte, Neto *et al.*, 2007).

2.4. Chá Verde

Nas últimas décadas, houve um aumento do interesse em relação aos fitoquímicos presentes em bebidas e seus possíveis efeitos benéficos para a saúde. Isso adveio de numerosos estudos epidemiológicos que investigaram as propriedades protetoras dos flavonóides da dieta relacionadas às doenças cardiovasculares (Keli, Hertog *et al.*, 1996; Rimm, Katan *et al.*, 1996; Sesso, Gaziano *et al.*, 1999). Fato este evidenciado pela associação negativa entre a maior ingestão de flavonóides e a menor prevalência de doenças cardiovasculares, tendo o Japão como principal exemplo de um país que apresenta um elevado consumo de chá verde e ostenta os menores índices mundiais de doença cardiovascular (Duthie, Duthie *et al.*, 2000).

O chá verde contém diversos polifenóis que podem constituir mais de 30% do peso seco da folha. A maioria desses polifenóis é composta por flavonóides conhecidos como catequinas, em particular, a epicatequina gallate (EG), a epigallocatequina (EGC) e a epigallocatequina galate (EGCG) (Chacko, Thambi *et al.*, 2010; Crouvezier, Powell *et al.*, 2001). Entretanto, a epigallocatequina galate, o principal polifenol do chá verde, é considerado o mais potente antioxidante, entre uma gama de flavonóides e outros antioxidantes da dieta, incluindo as vitaminas C e D (Rice-Evans e Miller, 1996; Bremner, Blacklock *et al.*, 2000). No entanto, a atividade antioxidante do chá verde é considerada, em termos de quantidade e qualidade, maior que a das outras bebidas comumente consumidas (Rice-Evans e Miller, 1996; Riemersma, Rice-Evans *et al.*, 2001).

Alguns estudos mostram que os flavonóides em geral inibem a produção de óxido nítrico (NO) e a expressão de sintase de óxido nítrico induzível (iNOS) em macrófagos murinos (Chan, Fong *et al.*, 1997; Kim, Cheon *et al.*, 1999), sugerindo propriedades antiinflamatórias dependentes de suas atividades antioxidantes. Além disso, outras funções imunes parecem ser moduladas pelos flavonóides, incluindo produção de IL-2, proliferação de linfócitos, adesão de células mononucleares, produção de anticorpos e atividade de mieloperoxidase em neutrófilos (Sharma, Agrawal *et al.*, 1996; Middleton, 1998). Entretanto, poucos desses estudos examinaram os efeitos dos flavonóides derivados propriamente do chá verde.

Porém, quando se investigou as propriedades dos principais flavonóides (epicatequina gallate, epigallocatequina e a epigallocatequina galate) presentes no

chá verde, observou-se que todas as catequinas foram capazes de inibir leucócitos humanos de sintetizarem IL-1 β e, inversamente, estimularam a produção de IL-10, o que demonstrou uma tendência antiinflamatória dessas três principais catequinas (Crouvezier, Powell *et al.*, 2001). Além disso, camundongos que receberam doses intraperitoneais de lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) mostraram uma reduzida expressão de TNF- α quando se administrou oralmente os polifenóis extraídos do chá verde (Yang, De Villiers *et al.*, 1998).

Adicionalmente, demonstrou-se *in vitro*, que o EGCG inibiu a formação de osteoclastos e induziu a apoptose de células multinucleadas semelhantes a osteoclastos (Nakagawa, Wachi *et al.*, 2002; Yun, Pang *et al.*, 2004). Esses resultados puderam ser confirmados, visto que, *in vivo*, o EGCG foi capaz de diminuir a reabsorção óssea alveolar, frente à doença periodontal induzida por LPS, além de inibir, *in vitro*, a osteoclastogênese (Nakamura, Ukai *et al.*, 2010). O EGCG apresentou, ainda, efeito sobre os osteoblastos, pois quando aplicado sobre essas células infectadas com *Staphylococcus aureus*, houve uma menor expressão de RANKL e IL-6 (Ishida, Kohda *et al.*, 2007). Da mesma maneira, fibroblastos gengivais induzidos com TNFSF14, mostraram reduzida expressão de IL-6, após tratamento com epicatequinas extraídas do chá verde (Hosokawa, Hosokawa *et al.*, 2010). Em conjunto, esses achados sugerem um possível efeito antiinflamatório que as epicatequinas, presentes no chá verde, podem exercer sobre o periodonto, podendo funcionar como uma alternativa terapêutica futura para o tratamento da doença periodontal.

2.4.1 Efeitos do Chá Verde sobre o diabetes:

Estudos têm demonstrado que as catequinas podem interagir com o metabolismo da glicose, pois a administração do chá verde diminuiu os níveis séricos de glicose em ratos diabético-induzidos por aloxana (Sabu, Smitha *et al.*, 2002); além de reduzir os níveis de triglicerídeos e aumentar a tolerância à glicose em ratos normais (Sabu, Smitha *et al.*, 2002; Wu, Juan *et al.*, 2004). Tanto em camundongos geneticamente diabéticos (db+/db+), quanto naqueles induzidos por estreptozotocina, o chá verde também promoveu a redução nos níveis de glicose, 2 a 6 horas após a sua administração, sem afetar os níveis séricos de insulina;

reforçando as evidências de que o chá pode realmente melhorar o metabolismo da glicose (Tsuneki, Ishizuka *et al.*, 2004).

Diversos estudos baseados em modelos animais e humanos sugerem que o chá verde e seus flavonóides têm um efeito antidiabético, pois os flavonóides parecem exercer uma função semelhante à insulina, além de aumentarem a sua atividade (Anderson e Polansky, 2002; Iso, Date *et al.*, 2006; Wolfram, Raederstorff *et al.*, 2006). Essas evidências podem ser melhores explicadas por um estudo *in vitro* o qual verificou que a EGCG aumenta a fosforilação, via tirosina, dos receptores de insulina presentes na superfície celular (Waltner-Law, Wang *et al.*, 2002), o que leva a uma maior entrada do hormônio na célula, justificando esse aumento na atividade insulínica. Em adição, a EGCG parece atenuar os danos sofridos pelas células β induzidos por citocinas (Han, 2003) e prevenir a perda de massa nas ilhotas pancreáticas causada pela administração de estreptozotocina (Song, Hur *et al.*, 2003).

Portanto, esses resultados sugerem que as catequinas presentes no chá verde poderiam atuar benéficamente contra as desordens metabólicas que envolvem lipídeos e carboidratos. Por isso, o uso do chá deve ser investigado para se avaliar melhor os benefícios de sua administração frente ao quadro de diabetes e às implicações sistêmicas decorrente da doença, como a periodontite aqui estudada.

Justificativa

3 Justificativa

Visando facilitar o estudo da influência do diabetes sobre a patogênese da doença periodontal, modelos experimentais, como ratos e camundongos, têm sido utilizados com sucesso devido a diversas vantagens, como fácil manuseio, baixo custo, maior resistência a infecções e, principalmente, pela semelhança dos tecidos e respostas periodontais humanas (Ramamurthy, Zebrowski *et al.*, 1974; Golub, Nicoll *et al.*, 1982; He, Liu *et al.*, 2004). Além disso, a utilização de ratos em modelos experimentais permite a análise da progressão das alterações periodontais proveniente do diabetes em um menor intervalo de tempo, uma vez que o rato apresenta um ciclo de vida relativamente curto.

Tendo em vista a influência do diabetes sobre o sistema RANKL/OPG, bem como a expressão de mediadores inflamatórios envolvidos na patogênese da doença periodontal, torna-se importante o conhecimento dos mecanismos potencialmente envolvidos na regulação destes fatores no microambiente periodontal. Certamente, a análise dos fatores relacionados a estes mecanismos contribuirá para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas das doenças periodontais na presença do diabetes.

Resultados prévios obtidos pelo nosso grupo demonstraram o estabelecimento e a progressão de alterações histológicas compatíveis com o desenvolvimento de doença periodontal em ratos após a indução do diabetes. Salienta-se que não foi realizado nenhum tipo de indução de periodontite, tais como inoculação de bactérias ou utilização de ligaduras. Desta forma, demonstrou-se que somente o diabetes grave não compensado foi capaz de promover o estabelecimento e a progressão da doença periodontal em ratos (Claudino, Ceolin *et al.*, 2007). Baseado nestes resultados, este estudo buscou analisar as alterações na resposta inflamatória que possivelmente contribuíram para o estabelecimento e o desenvolvimento da doença periodontal associada ao diabetes em ratos. Ainda, nesse trabalho, com base em evidências literárias que atribuem às catequinas presentes no chá verde propriedades antiinflamatórias (Nakamura, Ukai *et al.* 2010;

Ishida, Kohda *et al.*, 2007) e antidiabéticas, investigou-se os possíveis benefícios para o periodonto de se administrar doses diárias do chá aos animais diabéticos.

Proposição

4 Proposição

Este estudo visa analisar os possíveis mecanismos biológicos envolvidos no estabelecimento da doença periodontal decorrente da indução do diabetes com estreptozotocina, bem como, avaliar os possíveis efeitos terapêuticos do chá verde sobre o periodonto dos ratos tratados com a bebida, após 15, 30, 60, 90 dias.

Detalhadamente, os objetivos deste estudo são:

- Analisar, por meio de histomorfometria, o desenvolvimento e a progressão espontânea da doença periodontal, decorrente da indução do diabetes em ratos, nos diferentes períodos de tempo e o possível efeito do chá verde na modulação da perda óssea alveolar.
- Analisar, por reações de imunohistoquímica, o número de células marcadas para TNF- α , RANKL, OPG, IL-10 e RUNX-2 no periodonto de ratos diabético-induzidos por estreptozotocina, tratados com chá verde ou água.

Material e Métodos

5 Material e métodos

5.1 Tratamento dos animais de experimentação

Foram utilizados 120 ratos machos (*Rattus norvegicus*, Wistar), com aproximadamente 250g de massa corporal e dois meses de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB-USP). Os ratos receberam alimentação líquida (água ou chá verde) e sólida (ração em grãos para ratos marca Purina) *ad libitum*, permanecendo à temperatura de 23°C e período claro-escuro de 12 horas. O Comissão de Ética no Ensino em Pesquisa com Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo emitiu o parecer favorável ao desenvolvimento do projeto de pesquisa referente ao doutorado, em 15 de outubro de 2008 (CEEPA-014/2008), conforme disposto nos Anexos.

Tratamento terapêutico com o chá verde

Os animais que receberam o chá verde como parte da dieta líquida tiveram o mesmo tratamento que os demais, exceto pela ingestão de água, a qual foi completamente substituída pela administração terapêutica do chá.

Para o preparo da infusão, foram obtidas folhas secas e particuladas de *Camelia sinensis* (Chá verde), acondicionadas em embalagens de 25g, importadas da China por Santosflora Comércio de Ervas Ltda, com registro no IBAMA 35867, autorização da ANVISA 04.604-1 e registro no Conselho Regional de Farmácia 2-02635-0101, possíveis de serem verificados nos Anexos. Conforme as recomendações do fabricante e teste piloto realizado anteriormente, para cada 1 litro de água foi recomendada a utilização de 7 gramas de folha do chá verde. A água foi aquecida até a temperatura de 70°C, antes do ponto de ebulição para que não se perdessem as propriedades terapêuticas contidas na folha, em seguida o fogo desligado e os 7 gramas de folha adicionados à água. As folhas permaneceram em infusão por 10 minutos e, depois de coadas, obteve-se o chá. Após a bebida ser resfriada, foi acondicionada nos mesmos frascos de água, porém envoltos por papel

alumínio para que ficassem ao abrigo da luz. O chá oferecido aos animais foi preparado e trocado diariamente, durante todo o período experimental, para evitar, juntamente com a medida de vedação da luz, a possível oxidação dos componentes fenólicos (Manfredini, Vertuani *et al.*, 2004).

5.2 Grupos experimentais e indução do diabetes

Os 120 ratos utilizados no experimento foram aleatoriamente divididos entre 40 animais pertencentes ao grupo controle, ou seja, animais não diabéticos e outros 80 que foram submetidos à indução do diabetes. Portanto, o maior número de animais que compõem o grupo diabético se justifica devido à expectativa de perda dos ratos, decorrente de morte causada pela toxicidade da estreptozotocina ou da não indução do diabetes, relacionada à resistência individual frente à dosagem administrada (Delfino, Mocelin *et al.*, 2002). Após 7 dias de indução do diabetes, realizaram-se testes clínicos e laboratoriais, que verificaram o estado glicêmico dos animais. Foram utilizados somente aqueles que responderam positivamente à indução do diabetes. Assim, os ratos novamente foram divididos em subgrupos, que receberam água ou chá verde, como parte da dieta líquida. Então, obtivemos os seguintes subgrupos: controle água (CA), controle chá (CC), diabético água (DA) e diabético chá (DC), analisados nos diferentes períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Determinou-se, dentro dos diferentes tempos, para cada grupo controle um n de 5 animais e para os grupos diabéticos um n=8. O delineamento experimental para utilização dos animais e indução do diabetes está ilustrado na Figura 1.

Indução do Diabetes

Após jejum alimentar de 12 horas com fornecimento de água *ad libitum*, os ratos foram pesados, numerados e submetidos à sequente indução do diabetes. O procedimento constitui-se em uma aplicação intraperitoneal, dose única, de 50mg/kg de estreptozotocina (Noorafshan, 2006) diluída em soro fisiológico em uma concentração de 20mg/ml. Após 30 minutos, os animais voltaram a receber alimentação normalmente e permaneceram no biotério com acompanhamento diário da evolução do quadro clínico.

Foram selecionados para o grupo diabético somente os animais que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com o diabetes grave, após a determinação realizada no 7º dia seguido da indução. As alterações clínicas compreenderam perda de peso, aumento da ingestão hídrica e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 200mg/dl, glicosúria maior ou igual a 3000 mg/dl e positiva (+++) no teste de fitas reagentes (Pharmaceutical Corp. YEONDONG-Seoul Korea).

Figura 1 – Delineamento experimental para indução do diabetes e coleta das amostras

5.3 Avaliações clínica e laboratorial

Os dados clínicos de massa corporal e a dosagens de glicemia de todos os animais foram realizados com 7 dias de seguimento no grupo controle e no 7º dia após a indução do diabetes no grupo experimental. Posteriormente, as avaliações de massa corporal, ingestão hídrica, ingestão alimentar e diurese, bem como os dados laboratoriais referentes às dosagens de glicemia e de glicosúria foram executados após 15, 30, 60 e 90 dias de acompanhamento, com base na data de sacrifício de cada grupo.

Nos períodos previamente definidos, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais, 24 horas antes da coleta das maxilas. Durante as 12 horas noturnas, todos os ratos receberam volume conhecido de ração, sendo retirado nas 12 horas seguintes (jejum de 12 horas). Os volumes de água e chá verde também foram pré-determinados e fornecidos durante as 24 horas antes da coleta. Posteriormente, determinaram-se a massa corporal dos animais (em gramas), o volume de água ingerido em 24 horas (ingestão hídrica de 24 horas, em mililitros), a quantidade de alimento consumido em 12 horas (ingestão alimentar de 12 horas, em gramas) e o volume de diurese de 24 horas (em mililitros).

Após a avaliação do volume de diurese, coletou-se a urina para determinação da glicosúria por meio de fitas reagentes (Pharmaceutical Corp. YEONDONG-Seoul, Korea).

Para a dosagem imediata da glicemia (mg/dl), coletou-se, por meio de punção caudal, uma gota de sangue que foi aplicada diretamente sobre a fita específica para leitura glicêmica, a qual foi acoplada no aparelho próprio de diagnóstico (Accu-Check Advantage - Roche Diagnostic-2004-USA). Para a confirmação laboratorial do índice glicêmico, foram coletados 7mL de sangue, no momento do sacrifício, por punção cardíaca. Desse volume total, apenas 1,5mL foi destinado à dosagem glicêmica e os 5,5mL restantes foram utilizados para as demais dosagens bioquímicas. O plasma foi separado por centrifugação a 3000rpm e submetido à quantificação da glicose pelo método enzimático da glicose oxidase. A intensidade da cor formada foi proporcional à concentração de glicose na amostra, quantificada em leituras espectofotométricas a 510 nm.

5.4 Eutanásia dos animais, coleta e fixação das hemimaxilas

Ao término de cada período experimental, os animais foram anestesiados com dose excessiva dos anestésicos associados Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina (Agribrans do Brasil Ltda) administrados por via intraperitoneal, na dosagem de 4,0mg/Kg. Realizou-se a punção cardíaca, por meio da abertura do tórax, a coleta das amostras de sangue para exames, a exsanguinação e a morte dos animais. Em seguida, as maxilas foram removidas por dissecação e corte com tesoura, sendo posteriormente divididas em duas partes (hemimaxilas direita e esquerda). A hemimaxila direita foi imediatamente fixada em solução de formalina a 10% com tampão fosfato durante 7 dias em temperatura ambiente e posteriormente lavadas em água corrente “overnight”.

5.5 Procedimentos histotécnicos

Após a fixação, foi realizada a desmineralização em solução de EDTA pH 7,2 à temperatura de 2 a 8°C por sessenta dias, com trocas semanais da solução e monitoramento por análise radiográfica. As peças foram posteriormente submetidas à desidratação gradual em álcool, seguida de xilol e processamento em paraplast. Cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram obtidos em sentido longitudinal da raiz dos molares superiores, utilizando-se um micrótomo Leitz-Jung®, com intervalo de 20µm e corados por hematoxilina e eosina para a análise histomorfométrica. Todo o processamento histológico foi realizado no laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Determinação da perda óssea alveolar

A avaliação dos cortes histológicos, das áreas em que houve perda de osso alveolar, foi realizada em um sistema de análise de imagem digitalizada, composto por um microscópio Zeiss Axioskop II, com objetiva de 10 x, câmera AXIOCAM HRc - CARL ZEISS e *software* Kontron KS300/400 (KontronEletronic GMBH) com Axiovision (Carl Zeiss), instalado em um computador com processador INTEL CORE

I5 e um monitor LED 23" Philipis 234CL2. Os cortes semi-seriados do primeiro molar superior foram capturados, na região distal do dente, na área do osso alveolar compreendida entre o 1º e o 2º molar. Sequencialmente, foi traçada uma linha reta entre o 1º e 2º molar, na região da junção amelo-cementária (JAC) e uma outra linha perpendicular a essa, partindo da crista óssea alveolar - COA (Williams, Jeffcoat *et al.*). Assim, mediu-se a distância (d) entre a JAC do 1ºM e a crista óssea alveolar (Williams, Jeffcoat *et al.*), dentre as diferentes condições experimentais propostas (figura 2). Quanto maior essa distância obtida, mais significativa foi a perda óssea, o que caracterizou a ocorrência de doença periodontal.

Figura 2. Análise morfométrica da crista óssea alveolar. A metodologia adotada utilizou a avaliação da distância (d) compreendida entre a junção amelo-cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (Williams, Jeffcoat *et al.*) nos tecidos periodontais dos ratos. A mensuração foi realizada com o auxílio de um *software* Kontron KS300/400 com Axiovision associado ao microscópio Zeiss Axioskop II, com objetiva de 10 x.

5.6 Procedimentos imunohistoquímicos

Visando a realização das marcações de imunohistoquímica, foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura, sendo estes colocados sobre lâminas de vidro silanizadas (cola a base de poli-D-lisina) (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) e submetidas à imunomarcação pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. Foram utilizados dois cortes semisseriados por animal para cada uma das marcações de imunohistoquímica realizadas.

A imunohistoquímica é uma técnica que emprega anticorpos para detectar, quantificar e localizar proteínas específicas. Inicialmente, o sítio antigênico é exposto ao anticorpo primário e, posteriormente ao anticorpo secundário. O anticorpo secundário apresenta alta afinidade ao anticorpo primário, permitindo a ligação entre eles. Neste estudo, foram utilizados anticorpos secundários biotinilados, ou seja, anticorpos marcados com biotina. A presença da biotina confere alta afinidade na ligação com enzimas, atuando como ponte entre o complexo enzimático estreptavidina-peroxidase e o anticorpo secundário. O complexo enzimático estreptavidina-peroxidase-biotina tem como função a conversão de um cromógeno incolor em um produto final, que confere cores aos antígenos teciduais marcados (figura 3). Neste estudo, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina – DAB que confere aos antígenos uma coloração acastanhada.

Figura 3 – Esquema das etapas de imunomarcação pelo método da estreptavidina-biotina-peroxidase. 1) ligação do anticorpo primário com a proteína alvo (antígeno). 2) Ligação do anticorpo secundário biotilado ao anticorpo primário. 3) Ligação do complexo estreptavidina-peroxidase com a biotina presente no anticorpo secundário. 4) Conversão de um cromógeno diaminobenzidina – DAB pelo complexo estreptavidina-peroxidase, conferindo aos antígenos uma coloração acastanhada. Esquema retirado da Tese de Doutorado Claudino, M. 2010.

O protocolo básico para as imunomarcações foi:

Desparafinização, diafanização e re-hidratação:

Os cortes foram inicialmente colocados na estufa a 56°C para o início da desparafinização e adesão na lâmina. Procedeu-se a incubação em xilol (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany) com 2 banhos de 10 minutos para realização da desparafinização e diafanização. A re-hidratação foi realizada em banhos com concentrações decrescentes de etanol (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany), sendo etanol 100% por 10 minutos, etanol 95% por 10 minutos e etanol 70% por 5 minutos. Posteriormente, os cortes foram submetidos a

um banho de 10 minutos em água destilada seguido por um banho de 5 minutos em PBS.

Inativação da peroxidase endógena:

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada através da incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 30 minutos em câmara úmida. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Digestão enzimática para recuperação dos epítomos:

Para a recuperação dos epítomos, foram utilizados diferentes métodos de digestão enzimática, sendo eles:

- Incubação dos cortes com solução de pepsina 0,5% (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Este método foi utilizado para as marcações de IL-10, TNF- α e OPG.
- Incubação dos cortes com proteinase K (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) na concentração de 0,4mg/ml em PBS por 20 minutos em temperatura ambiente. Este método foi utilizado para as marcações de RUNX-2.
- Incubação dos cortes com solução tamponada de citrato de sódio (10mM, pH 6.0) em calor úmido a 95°C por 20 minutos. Este método foi utilizado para as marcações de RANK-L.

Após recuperação antigênica, os cortes foram resfriados em temperatura ambiente e lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos). Em seguida, foi realizada a secagem da lâmina com papel filtro ao redor dos cortes histológicos para demarcação Dako pen® (cod. S2002 - Dakocytomation Carpinteria, CA, USA).

Bloqueio das proteínas do soro:

Visando reduzir as ligações inespecíficas com o anticorpo, os cortes foram incubados em solução de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil Ltda, Araçatuba, São Paulo - Brasil) a 7% em PBS por 40 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Exposição aos anticorpos:

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS pH 7,4 contendo BSA a 1% e gotejados sobre as lâminas, permanecendo em câmara úmida por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3 banhos de 5 minutos) e expostos ao anticorpo secundário biotinilado em câmara úmida, durante 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS (3 banhos de 5 minutos).

Para controle negativo, um dos cortes foi incubado somente com o anticorpo secundário, sem exposição prévia ao anticorpo primário. Juntamente com o material a ser analisado, foi adicionado um corte de determinada estrutura com descrição prévia de expressão da proteína em questão, caracterizando o controle positivo.

Controle positivo:

RANKL, TNF- α e IL-10: estudos prévios demonstraram a expressão desses mediadores na presença de doença periodontal (GARLET et al, 2005; GARLET et al, 2006; SILVA et al, 2007). Sendo assim, foram utilizados cortes de tecido periodontal de ratos após indução de doença periodontal com ligadura (7 e 14 dias).

OPG e RUNX-2: sabe-se que a expressão desses mediadores está diretamente relacionada com o processo de remodelação e neoformação óssea (Khosla, 2001; Li e Xiao, 2007). Por isso, foram utilizadas como controle positivo lâminas referentes a um trabalho anteriormente desenvolvido no laboratório de Histologia da FOB-USP, em que esses fatores indutores de osteogênese foram implantados no tecido muscular.

Anticorpos utilizados:

- Anticorpo primário anti-RANKL (sc-7628- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:75 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
-

- Anticorpo primário anti- TNF- α (Abbiotec- 250844- Abbiotec, San Diego,USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário rabbit anti-goat IgG-B (sc-2774 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
- Anticorpo primário anti-IL-10 (Abbiotec- 250713- Abbiotec, San Diego,USA) na diluição de 1:50 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
- Anticorpo primário anti-OPG (ab73400 FR ABCAM Biochemicals, USA) na diluição de 1:150 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.
- Anticorpo primário anti-RUNX-2 (ab23981 ABCAM Biochemicals, USA) na diluição de 1:75 e anticorpo secundário goat anti-rabbit IgG-B (sc-2040 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) na diluição de 1:500.

Deteção do complexo anticorpo primário/anticorpo secundário:

Os cortes foram incubados na solução de streptavidina-peroxidase (Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por 20 minutos, sendo posteriormente lavados em PBS (3 banhos de 5 minutos).

Exposição ao substrato cromogênico DAB (Diaminobenzidina):

Após a exposição à solução de streptavidina-peroxidase, as lâminas foram lavadas com PBS (3 banhos de 5 minutos) e expostas à solução do DAB (solução líquida de 3,3'-diaminobenzidina, Dakocytomation Carpinteria, CA, USA) por 2 a 5 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS (1 banho de 5 minutos) e em água destilada (2 banhos de 10 minutos).

Contra-coloração e montagem:

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas por Hematoxilina de Harris a 5% por 1 minuto. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada (2 banhos de 5 minutos), desidratados em concentrações crescentes de etanol e diafanizados em xilol. A montagem das lâminas foi realizada utilizando resina sintética Entellan® (Merck KGaA, Frankfurter, Darmstadt - Germany).

5.7 Avaliação imunohistoquímica

A análise em microscopia de luz convencional consistiu da quantificação de células com imunomarcção positiva para cada anticorpo, utilizando análise de imagem digitalizada, composta por um microscópio Zeiss Axioskop II, com objetiva de 100x, câmera AXIOCAM HRc - CARL ZEISS e *software* Kontron KS300/400 (KontronEletronik GMBH) com Axiovision (Carl Zeiss), instalado em um computador com processador INTEL CORE I5 e um monitor LED 23" Philipis 234CL2. Foram avaliados 5 campos seqüenciais no tecido periodontal de cada animal, compreendidos entre a raiz distal do 1º molar superior e o osso alveolar adjacente. A delimitação dos campos envolveu o terço coronal do periodonto, região inicial de desenvolvimento da doença periodontal. A quantificação de células positivas para cada imunomarcção foi expressa como número de células marcadas por unidade de área de tecido. Em cada campo foi delimitada a região do periodonto, obtendo-se a área em μm^2 . Este valor foi transformado em mm^2 na magnitude de 100 vezes, após o cálculo da área delimitada. As lâminas foram avaliadas três vezes pelo mesmo examinador, em tempos diferentes, no microscópio óptico com aumento de 100 vezes. Foram consideradas positivas as células que apresentaram coloração acastanhada (figura 4).

Figura 4. Distribuição dos campos para a análise de imunohistoquímica nos tecidos periodontais. (A) Localização da área de interesse compreendida entre a raiz distal do 1º molar e o osso alveolar adjacente (aumento de 4X). (B) Representação dos 5 campos sequenciais localizados no terço coronal do periodonto (aumento de 10X). (C) Delimitação da área e contagem do número de células imunomarcadas no campo (aumento de 100X). A contagem foi realizada com auxílio de um microscópio Zeiss Axioskop II e objetiva de 100x, acoplado a uma câmera AXIOCAM HRc - CARL ZEISS, utilizando-se o programa de digitalização de imagem Kontron KS300/400 (KontronEletronic GMBH) com Axiovision (Carl Zeiss) . Observar as células imunomarcadas (seta), o Osso alveolar (#) e a dentina radicular (*).

5.8 Análise estatística dos dados

A análise entre os grupos controle e diabético, tratados com água ou chá verde, foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prism 5.0 Project (GraphPad Software Inc, EUA).

Resultados

6 Resultados

6.1 Indução do diabetes

Dos 80 ratos que receberam a administração de estreptozotocina, 64 preencheram os critérios de seleção adotados para o diabetes grave. Entretanto, 26 animais foram perdidos durante o seguimento, em decorrência de morte por anormalidades metabólicas ou porque não se tornaram diabéticos. Os demais permaneceram vivos até o momento do sacrifício. Todos os animais incluídos nos grupos diabéticos apresentaram alterações clínicas e laboratoriais compatíveis com a doença. As alterações clínicas observadas compreendem perda de peso, aumento da ingestão líquida, alimentar e do débito urinário. As alterações laboratoriais foram representadas por glicemia em jejum acima de 200mg/dl e glicosúria maior ou igual a 3000 mg/dl.

O parâmetro clínico de ingestão líquida está apresentado na figura 5. Os animais diabéticos, tanto tratados com água quanto aqueles tratados com chá, ingeriram significativamente maior quantidade de líquido que os ratos não diabéticos, nos diferentes períodos de acompanhamento.

Figura 5- Ingestão líquida de água e chá dos animais do grupo controle e diabético. Observar a maior quantidade de líquido ingerido pelos animais diabéticos, independente do tratamento recebido. Letras diferentes indicam significância estatística ($p < 0,05$) entre os grupos, dentro dos períodos avaliados.

O seguinte parâmetro clínico representativo do estado diabético foi a avaliação da quantidade de massa corporal perdida. Conforme demonstrado na figura 6, os animais do grupo controle água e chá apresentaram um ganho de massa corporal compatível com o período de desenvolvimento do animal; por outro lado, os animais do grupo diabético perderam massa, durante o decorrer do experimento. Entretanto, quando comparamos os ratos diabéticos que receberam água com aqueles que ingeriram chá, houve uma perda acentuada de massa corporal no grupo tratado com água, correspondente ao estado observado de caquexia grave (figura 6c). Porém, ao analisar-se o grupo diabético tratado com chá, nota-se que houve uma perda de massa corpórea, mas sem que houvesse uma acentuação ao longo dos períodos experimentais.

Figura 6- Perda ou ganho de massa corporal (g), de acordo com o estado glicêmico, nos diferentes seguimentos do estudo. A) Grupo água. Perda de massa corporal nos diabéticos comparada com o ganho obtido pelos animais controle. O grupo controle água não apresentou variações entre os diferentes períodos analisados. B) Grupo chá. Comparativo do ganho de massa corporal dos ratos controle em relação aos diabéticos. C) Grupos diabéticos que receberam os diferentes tratamentos com água ou chá. Menor tendência dos animais tratados com chá a perder massa corporal, estatisticamente significativa aos 90 dias. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), nos diferentes períodos avaliados, dentro dos grupos experimentais. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

O índice glicêmico, o qual confirma o *status* diabético dos animais está representado na figura 7. Assim, foi possível observar que em todos os períodos, os ratos diabéticos pertencentes ao grupo chá e água apresentaram uma glicemia elevada, acima de 240mg/mL, enquanto os animais controle mantiveram o índice glicêmico abaixo de 120mg/mL. Portanto, os ratos diabéticos que receberam o chá verde tiveram uma leve tendência em diminuir a glicemia, após o período de 30 dias de tratamento, mas sem significância estatística (Figura 7b). Quando se compararam os grupos diabéticos tratados com água e chá, observou-se nos ratos que receberam o chá, um índice glicêmico médio (263 ± 95 ; 370 ± 71 ; 323 ± 94 ; 264 ± 91) levemente reduzido em relação àqueles que tomaram água (301 ± 85 ; 383 ± 50 ; 345 ± 55 ; 350 ± 75), nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias, respectivamente. Porém não houve significância estatística (Figura 7c).

Figura 7- Índice glicêmico médio. Cálculo realizado a partir da primeira medida tomada, no 7º dia após a indução, até o período final do seguimento correspondente (mg/dL). A) Grupo água. Níveis de glicemia elevados nos animais diabéticos. B) Grupo chá. Índice glicêmico também aumentado nos diabéticos. C) Grupos diabéticos que receberam os diferentes tratamentos com água ou chá. Menores valores glicêmicos nos ratos tratados com chá, porém sem significância estatística. Os grupos controle não apresentaram variações entre os diferentes períodos analisados. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), nos diferentes períodos avaliados, dentro dos grupos experimentais. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Considerando-se os parâmetros clínicos e laboratoriais obtidos, evidencia-se o estabelecimento do diabetes grave nos ratos após a administração de estreptozotocina.

6.2 Análise histomorfométrica

A análise histomorfométrica foi realizada em cortes histológicos provenientes das hemimaxilas de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água ou chá verde, acompanhados por 15, 30, 60 e 90 dias. Em seguida, avaliou-se a distância entre a JAC e a COA, na região da raiz distal do 1º M superior de cada animal, com o intuito de verificar a quantidade de perda óssea e o estabelecimento da doença periodontal. Quando comparados o grupo diabético água com o respectivo controle, observou-se que a distância JAC-COA foi significativamente maior nos animais diabéticos, em todos os diferentes segmentos. Houve também uma leve tendência nos diabéticos em aumentar essa distância, conforme o decorrer do tempo, sendo significativamente acentuada aos 90 dias (figura 8a). Entretanto, quando se comparou o grupo terapêutico chá, também foi encontrada uma distância JAC-COA maior nos ratos diabéticos que nos controles, porém, significativa apenas nos períodos mais longos de 60 e 90 dias. Nos animais controle, independente do tratamento, a distância JAC-COA permaneceu sem alterações significativas durante os períodos de análise. Ao se cruzarem os dados entre as condições diabéticas tratadas com água ou chá, foi possível notar que os animais que receberam chá apresentaram uma menor distância JAC-COA comparados àqueles tratados com água, com diferenças estatísticas nos segmentos de 30 e 90 dias (figura 8c). Portanto, esse aumento da JAC-COA encontrado nos animais diabéticos significa que houve uma perda óssea e é um provável indicativo de desenvolvimento espontâneo da doença periodontal em decorrência do diabetes.

O desenvolvimento da doença periodontal nos diferentes grupos está ilustrado na figura 9, representando o periodonto no início, após 15 dias da indução do diabetes e no final, após 90 dias de acompanhamento.

Figura 8- Cinética da distância entre Junção Amelo-Cementária (JAC) e a Crista Óssea Alveolar (COA). Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água ou chá foram analisados em relação à perda óssea alveolar por histomorfometria. A) Grupo água. Ocorrência de perda óssea nos diabéticos comparada aos animais controle, em todos os períodos. B) Grupo chá. Ocorrência de perda óssea nos diabéticos após 60 dias. C) Grupos diabéticos tratados com chá ou água. Maior perda óssea no grupo água em 30 e 90 dias. Os grupos controle não apresentaram variações entre os diferentes períodos analisados. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), nos diferentes períodos avaliados, dentro dos grupos experimentais. * Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados.

Figura 9- Fotomicrografias representativas da análise morfométrica, comparando o período inicial de indução do diabetes, 15 dias, com o final, após 90 dias. A) Grupo controle água. B) Grupo diabético água. Observar no período de 15 dias sinais de reabsorção óssea inicial e, aos 90 dias, a ocorrência de perda avançada do osso alveolar. C) Grupo controle chá. D) Grupo diabético chá. No período final de 90 dias é possível notar sinais de reabsorção seguida de uma neoformação na crista óssea. Osso alveolar (#) e Dentina radicular (*). Aumento de 10X e 100X.

6.3 Análise imunohistoquímica

A análise imunohistoquímica foi realizada em cortes histológicos provenientes das hemimaxilas de ratos diabéticos e não diabéticos tratados com água ou chá verde, acompanhados por 15, 30, 60 e 90 dias. Em seguida, foram realizados procedimentos de imunohistoquímica pelo método da estreptavidina-peroxidase, visando avaliar o número de células imunomarcadas para TNF- α , RANKL, OPG, IL-10 e RUNX-2, na região do ligamento periodontal da raiz distal do 1º molar superior.

6.3.1 Marcações para TNF- α

Analizando comparativamente os grupos controle e experimental, observou-se maior número de células marcadas nos grupos diabéticos, independente se tratados com chá ou água, em todos os diferentes períodos de acompanhamento (Figura 10a e 10b). O grupo diabético água apresentou tendência ao aumento de células imunomarcadas no decorrer do segmento. Porém, os diabéticos tratados com chá tiveram o número de células aumentado após 30 dias, que se estabilizou aos 60 e decresceu aos 90 dias de terapêutica. No grupo controle não foram observadas diferenças entre os períodos analisados. Quando foram comparados os diferentes tratamentos entre os ratos diabéticos, notou-se uma leve tendência dos animais tratados com chá a expressarem menor quantidade de células imunomarcadas para o TNF- α (Figura 10c). Entretanto, esta diferença tornou-se mais pronunciada nos períodos finais, sendo estatisticamente significativa aos 90 dias ($p < 0,001$).

O padrão de marcação e as diferenças observadas entre os variados grupos estão ilustradas na figura 11.

Figura 10 - Cinética da expressão de TNF- α nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle, tratados com água ou chá. Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células TNF- α^+ por reações de imunohistoquímica. Os resultados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados ($p < 0,05$). Os grupos controle água e chá não apresentaram variações entre os diversos segmentos do estudo. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados dentro do mesmo grupo experimental.

Figura 11 – – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TNF- α no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Cortes histológicos provenientes das hemimaxilas dos ratos foram submetidos à imunomarcação para TNF- α . (A) Grupo controle água. (B) Grupo diabético água. (C) Grupo controle chá. (D) Grupo diabético chá. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina radicular (*) e o osso alveolar (#). Aumento de 100X.

6.3.2 Marcações para RANKL

A marcação para RANKL nos grupos controle água e chá mostrou-se discreta em todos os períodos avaliados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles ($p>0,05$). Contudo, a presença do diabetes nos grupos experimentais resultou em aumento no número de células imunomarcadas em todos os períodos, quando comparados aos grupos controles (Figura 12a e 12b). Entretanto, o grupo diabético água apresentou um aumento acentuado da expressão de RANKL a partir de 30 dias, mantendo esse nível elevado até o período final de 90 dias (Figura 12a). Já os animais diabéticos tratados com chá verde mantiveram o mesmo padrão de expressão observado desde o início até o final do estudo (Figura 12b). Quando foi comparado o grupo diabético que recebeu água com aquele terapêutico chá, ficou evidente que os animais que receberam chá apresentaram significativamente ($p<0,001$) menores quantidades de células marcadas para RANKL que os ratos tratados com água, durante os períodos de 30, 60 e 90 dias (Figura 12c).

O padrão de marcação e as diferenças entre os grupos controle e diabético tratados com água ou chá verde estão ilustradas na figura 13.

Figura 12 - Cinética da expressão de RANKL nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde. Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células RANKL⁺ por reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). As letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados dentro do mesmo grupo experimental.

Figura 13 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RANKL no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Cortes histológicos provenientes das hemimaxilas dos ratos foram submetidos à imunomarcação para RANKL. (A) Grupo controle água. (B) Grupo diabético água. (C) Grupo controle chá. (D) Grupo diabético chá. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina radicular (*) e o osso alveolar (#). Aumento de 100X.

6.3.3 Marcações para OPG

A presença do diabetes no grupo água resultou em menor número de células marcadas para OPG nos períodos de 60 e 90 dias, quando comparados aos animais não diabéticos do mesmo grupo ($p>0,05$ e $p>0,01$; figura 14a). No grupo controle água, houve uma tendência em aumentar a quantidade de células que expressaram OPG no decorrer do tempo experimental (figura 14a). Os animais diabéticos tratados com chá apresentaram padrão semelhante ao correspondente grupo controle, não havendo diferenças estatísticas entre eles, nos diferentes períodos do segmento (figura 14b). Ao se comparar os animais diabéticos que receberam chá com aqueles que receberam água, foi detectada maior quantidade de células imunomarcadas no grupo terapêutico chá, durante o decorrer do experimento, com diferenças estatisticamente significantes aos 60 e 90 dias do tratamento ($p<0,05$ e $p<0,01$; figura 14c).

O padrão de marcação para os grupos controle e diabético tratados com água ou chá verde estão ilustrados na figura 15.

Figura 14 - Cinética da expressão de OPG nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde. Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células OPG⁺ por reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados dentro do mesmo grupo experimental. O grupo terapêutico chá controle e diabético não apresentou variações estatisticamente significativas entre os diversos segmentos do estudo.

Figura 15 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para OPG no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Cortes histológicos provenientes das hemimaxilas dos ratos foram submetidos à imunomarcação para OPG. (A) Grupo controle água. (B) Grupo diabético água. (C) Grupo controle chá. (D) Grupo diabético chá. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina radicular (*) e o osso alveolar (#). Aumento de 100X.

6.3.4 Marcações para RUNX-2

O grupo controle água apresentou um número maior de células marcadas para RUNX-2 que o correspondente grupo diabético, mantendo este padrão aos 30, 60 e 90 dias. Pois, no período inicial de 15 dias, ambos os grupos apresentaram quantidade semelhante de células RUNX-2⁺. Entretanto, o número de células tendeu a aumentar nos animais controle, enquanto que nos diabéticos diminuiu significativamente ($p < 0,05$), a partir dos 30 dias de indução do diabetes (figura 16a). Comparativamente ao grupo controle chá, o grupo experimental referido apresentou menor quantidade de células imunomarcadas, porém sem significância estatística. Além disso, houve uma tendência em diminuir a quantidade de células marcadas para o fator RUNX-2 no decorrer dos dias, sendo significativa aos 60 dias após a indução do diabetes ($p < 0,05$, figura 16b). Quando se compararam os grupos diabéticos tratados com chá e água, detectou-se o maior número de células marcadas naqueles animais que receberam o chá como tratamento, após 30 ($p < 0,01$), 60 ($p < 0,05$) e 90 dias ($p < 0,01$) da indução do diabetes (figura 16c).

O padrão de marcação e as diferenças observadas entre os grupos controle e diabético tratados com água ou chá verde estão ilustradas na figura 17.

Figura 16 - Cinética da expressão de RUNX-2 nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde. Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células RUNX-2⁺ por reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os períodos avaliados dentro do mesmo grupo experimental. O grupo controle chá não apresentou variações entre os diversos segmentos do estudo.

Figura 17 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para RUNX-2 no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Cortes histológicos provenientes das hemimaxilas dos ratos foram submetidos à imunomarcação para RUNX-2. (A) Grupo controle água. (B) Grupo diabético água. (C) Grupo controle chá. (D) Grupo diabético chá. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina radicular (*) e o osso alveolar (#). Aumento de 100X.

6.3.5 Marcações para IL-10

O grupo controle água apresentou um número maior de células imunomarcadas que o grupo diabético água, em todos os períodos analisados, com forte diferença estatística aos 30 ($p<0,001$) , 60 ($p<0,001$) e 90 ($p<0,001$) dias (Figura 18a). O grupo experimental chá apresentou padrão discretamente diminuído em relação ao correspondente grupo controle no período de 30 dias, seguido de uma tendência a redução nos 60 e 90 dias subseqüentes, porém, sem diferenças estatisticamente significativas (Figura 18b). A análise comparativa entre os grupos diabéticos água e chá demonstrou uma maior quantidade de células imunomarcadas para IL-10 no grupo diabético que recebeu chá como tratamento, com fortes diferenças estatisticamente significativas ($p<0,001$) em todos os períodos analisados (Figura 18c).

O padrão de marcação e as diferenças observadas entre os grupos controle e diabético tratados com água ou chá verde estão ilustradas na figura 19.

Figura 18 - Cinética da expressão de IL-10 nas células do ligamento periodontal nos grupos diabético e controle tratados com água ou chá verde. Cortes histológicos das hemimaxilas provenientes de ratos diabéticos e não diabéticos foram analisados em relação ao número de células IL10⁺ por reações de imunohistoquímica. Os resultados apresentados representam os valores da média e desvio-padrão em cada um dos períodos analisados. * Diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados ($p < 0,05$). Nenhum dos grupos analisados apresentou variações estatisticamente significativas entre os diversos segmentos do estudo.

Figura 19 – Fotomicrografias representativas das imunomarcações para IL-10 no periodonto dos ratos diabético e controle tratados com água ou chá verde, nos períodos de 15, 30, 60 e 90 dias. Cortes histológicos provenientes das hemimaxilas dos ratos foram submetidos à imunomarcação para IL-10. (A) Grupo controle água. (B) Grupo diabético água. (C) Grupo controle chá. (D) Grupo diabético chá. Observar a presença de células imunomarcadas (seta) no ligamento periodontal, a dentina radicular (*) e o osso alveolar (#). Aumento de 100X.

Discussão

7 Discussão

O diabetes mellitus é a desordem endócrina mais comum, resultante do metabolismo anormal da glicose e de lipídeos. A hiperglicemia crônica decorrente da doença afeta diversos órgãos, resultando em alterações sistêmicas graves como retinopatia, nefropatia, neuropatia, doenças cardiovasculares e alterações na microcirculação periférica (Standards of medical care in diabetes--2012). Dentre essas alterações sistêmicas clássicas, em 1993, a doença periodontal foi reconhecida como a sexta complicação do diabetes (Loe, 1993).

Por mais de 50 anos, os pesquisadores têm explorado a relação entre o diabetes e a doença periodontal (Mealey, 2006), a qual resulta de uma resposta imune frente a uma infecção crônica, levando à destruição dos tecidos periodontais, incluindo a gengiva, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Perrino, 2007). Assim, têm-se demonstrado que, na presença do diabetes, a doença periodontal é mais freqüente e mais severa (Nelson, Shlossman *et al.*, 1990; Novaes, Pereira *et al.*, 1991; Novaes, Silva *et al.*, 1997; Taylor, 2001). Contudo, os mecanismos envolvidos no aumento da incidência e da severidade das doenças periodontais associadas ao diabetes permanecem pouco conhecidos. Além disso, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, fatores osteoclastogênicos e osteogênicos nos tecidos periodontais não é bem caracterizada na presença do diabetes.

Sabe-se que a reabsorção e a formação óssea são processos associados, mas que podem ocorrer de forma independente. A função de reabsorção exercida pelos osteoclastos é regulada pela interação com os fibroblastos presentes no ligamento periodontal (Lappin, Eapen *et al.*, 2009). Esses fibroblastos tanto podem estimular, quanto inibir o processo de reabsorção alveolar. O RANKL, presente na superfície dos fibroblastos, interage com seus receptores, na superfície dos osteoclastos, para estimular a osteoclastogênese. Por outro lado, a OPG, também produzida pelos fibroblastos do ligamento periodontal, bloqueia a atividade osteoclástica por se ligar ao receptor RANK (Kanzaki, Chiba *et al.*, 2002). Portanto, níveis maiores de RANKL em relação à OPG podem indicar reabsorção óssea local (Graves, Li *et al.*, 2011.; Garlet, Cardoso *et al.*, 2006). Por isso, o modelo

experimental utilizado nesse estudo preocupou-se em avaliar a quantidade de células, incluindo os fibroblastos, imunomarcadas positivamente para essas citocinas, presentes na região do ligamento periodontal de ratos diabéticos.

Além disso, grande parte dos modelos experimentais que buscam avaliar os efeitos da hiperglicemia crônica sobre a doença periodontal utiliza a indução do diabetes concomitantemente à indução da doença periodontal. Porém, o modelo utilizado em nossos experimentos é baseado somente na indução do diabetes sem qualquer interferência externa no periodonto, como ligaduras ou inoculação de bactérias. Pois, resultados anteriores obtidos com este modelo demonstraram que somente a indução do diabetes é suficiente para o estabelecimento e progressão da doença periodontal em ratos (Claudino, Ceolin *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que o chá verde pode proteger contra o desenvolvimento de doenças coronarianas e metabólicas, como o diabetes, por reduzir naturalmente os níveis de glicose sanguínea e o peso corporal (Tsuneki, Ishizuka *et al.*, 2004). Entretanto, todos esses estudos foram baseados em populações ou animais saudáveis, os quais não estão adversamente influenciados por fatores biológicos relacionados às desordens metabólicas (Meydani, 2001). Assim, em nosso estudo, não foi detectado uma redução significativa nos níveis de glicemia sanguínea naqueles animais que já apresentavam diabetes e que receberam o chá. Porém, outros estudos realizados em ratos diabético induzidos encontraram redução significativa nos níveis séricos de glicose, após a administração de doses variadas de 25, 50 ou 100 mg/Kg de epicatequinas extraídas do chá verde (Roghani e Baluchnejadmojarad, 2010; Sabu, Smitha *et al.*, 2002). Entretanto, em nosso estudo, os ratos tomaram chá *ad libitum* em substituição à água, por isso, não foi possível quantificar as doses de catequinas ingeridas pelos animais. Além disso, como o chá foi preparado a partir da infusão de folhas da *Camellia sinensis*, a quantidade de catequinas pode variar devido a diferenças na origem, variedade e condições de crescimento dessas folhas (Khokhar e Magnusdottir, 2002). Ainda, durante o preparo do chá verde fresco, não é possível extrair das folhas a quantidade total e precisa de catequinas (Fernandez, Martin *et al.*, 2000), por isso, a concentração encontrada no nosso trabalho, difere dos valores absolutos determinados nos outros experimentos referenciados.

Além disso, foi visto que o pré-tratamento com as epicatequinas extraídas do chá verde ajudou a proteger as ilhotas pancreáticas contra os danos oxidativos

induzidos pela estreptozotocina, porém não houve efeitos benéficos do extrato sobre o diabetes completamente estabelecido (Kim, Ryu *et al.*, 2003). Da mesma maneira, um estudo realizado durante 5 anos no Japão, demonstrou que o consumo do chá verde foi inversamente relacionado à incidência de diabetes na população normal, mas não exerceu nenhum efeito sobre aqueles já diabéticos (Iso, Date *et al.*, 2006). Assim, partindo dos resultados encontrados, juntamente com o nosso aqui descrito, o chá verde e suas catequinas podem ser considerados diabético-preventivos e não curativos.

Desde os tempos remotos, o chá verde tem sido considerado uma bebida promotora de saúde (Yun, Jialal *et al.*, 2010). Os efeitos benéficos do chá são principalmente atribuídos aos seus componentes polifenólicos, dentre os quais fazem parte as catequinas (Yang e Landau, 2000; Wolfram, 2007). Diversos estudos têm demonstrado que essas catequinas exercem efeitos benéficos sobre a saúde metabólica, além de possuírem propriedades antiinflamatórias (Calixto, Campos *et al.*, 2004; Kim, Jeong *et al.*, 2007; Wolfram, 2007). Partindo do princípio que os pacientes diabéticos apresentam níveis séricos aumentados de citocinas inflamatórias circulantes (Vozarova, Weyer *et al.*, 2002; Shoelson, Lee *et al.*, 2006), juntamente com essas informações encontradas na literatura que abordam os efeitos benéficos do chá, é possível inferir que, em nosso trabalho, os ratos diabéticos que ingeriram a bebida regularmente não demonstraram uma perda de peso tão significativa quanto aqueles animais diabéticos que receberam água, devido ao possível efeito metabólico favorável e antiinflamatório que o chá pôde proporcionar. Isso resultou em animais que, apesar dos altos níveis glicêmicos circulantes, não apresentaram as condições físicas de caquexia típica do diabetes não tratado. Ainda, a perda de peso acentuada, que normalmente acomete o diabético, pode ser justificada pela degeneração de adipócitos e de tecido muscular que ocorre para compensar o gasto de energia corpórea frente à diurese aumentada e à super-conversão de glicogênio em glicose (Ramadan, El-Beih *et al.*, 2009). Consequentemente, a manutenção do peso corporal requer um balanço entre o acúmulo e o gasto de energia celular, portanto, um ligeiro desequilíbrio pode levar a significativas mudanças no peso e resultar em emagrecimento (Lin e Lin-Shiau, 2006). Em concordância com nosso trabalho, o extrato de chá verde oferecido aos ratos diabéticos modulou a severa perda de peso típica da doença (Ramadan, El-Beih *et al.*, 2009), sugerindo que as epicatequinas podem ter um efeito positivo

anabólico por, possivelmente, diminuir a degeneração de adipócitos e de tecido muscular, devido à melhoria no metabolismo da glicose (Roghani e Baluchnejadmojarad, 2010; Ramadan, El-Beih *et al.*, 2009).

Após as constatações clínicas e laboratoriais do estado diabético, foi possível observar no periodonto desses animais, um maior aumento na distância JAC-COA, quando comparados aos ratos normoglicêmicos. Esses resultados, em concordância com aqueles obtidos em experimento realizado anteriormente em nosso laboratório (Claudino, Ceolin *et al.*, 2007), confirmam o desenvolvimento natural da doença periodontal, em decorrência da indução do diabetes. Interessantemente, quando comparamos os animais diabéticos que ingeriram água àqueles que tomaram o chá verde, observamos que no período inicial de 15 dias, ambos os grupos apresentavam a mesma distância JAC-COA, portanto, aos 30 dias, houve um aumento nessa distância no grupo água e uma redução no grupo chá, ao passo que, aos 60 dias, parece ter havido uma perda óssea ativa no grupo chá que permaneceu estável até os 90 dias. Inversamente, o grupo água apresentou uma aparente estagnação da perda óssea aos 60 dias, seguida de repentino aumento aos 90 dias. Esses períodos, em que se encontra um grande aumento na distância JAC-COA, combinados àqueles de estabilidade no avanço da reabsorção óssea, caracterizam bem o desenvolvimento da doença periodontal, marcado por episódios de exacerbada perda óssea alveolar, seguido por fase de quiescência (Schappi e Zappa, 1990; Zappa, Simona *et al.*, 1990). Contudo, pudemos observar que nos períodos de 30 e 90 dias aqueles animais diabéticos tratados com chá demonstraram menor perda óssea que os tratados com água e, nos períodos de 15 e 60 dias, ambos os grupos apresentaram valores muito semelhantes para a distância JAC-COA. Parece, assim, que o chá verde exerceu um efeito benéfico no periodonto dos animais diabéticos que o ingeriram, pois demonstraram menor atividade óssea reabsortiva, durante os 30 e 90 dias do segmento. De fato, extratos do chá verde, quando administrados oralmente, foram capazes de diminuir a reabsorção óssea alveolar induzida por inoculação de LPS no periodonto de camundongos (Ishida, Kohda *et al.*, 2007), além disso, inibiram *in vitro* a formação de osteoclastos e induziram a apoptose dessas células (Nakamura, Ukai *et al.*, 2010; Ishida, Kohda *et al.*, 2007; Morinobu, Biao *et al.*, 2008).

O processo de reabsorção óssea seguido por uma equivalente quantidade de osso neoformado é bem estabelecido e ocorre naturalmente nos indivíduos

saudáveis (Liu, Bal *et al.*, 2006). Entretanto, além dos ratos diabéticos terem apresentado uma maior reabsorção óssea, a quantidade observada de osso neoformado no periodonto foi menor que nos animais controle. Os resultados sugerem que o grupo diabético eventualmente produziu osso, mas de maneira insuficiente para preencher as lacunas de reabsorção, demonstrando uma capacidade reduzida de neoformação óssea. Isso pode ser devido ao diabetes diminuir a produção de matriz *per* célula ou ainda ao reduzido número de células capazes de sintetizarem a matriz óssea (Liu, Bal *et al.*, 2006). Portanto, a elevada apoptose no ligamento periodontal poderia afetar o processo de reparo, uma vez que o ligamento é conhecido por ser uma fonte rica de células mesenquimais capazes de se diferenciarem em osteoblastos (Isaka, Ohazama *et al.*, 2001). Assim, a ocorrência de apoptose poderia ser atribuída aos mediadores inflamatórios, como o TNF- α , marcados abundantemente nas células locais. Pois, sabe-se que algumas citocinas são capazes de ativar a via da caspase e induzir a morte celular (Wang, Du *et al.*, 2008; Barksby, Nile *et al.*, 2009; Mori, Brunetti *et al.*, 2009).

Consequentemente, o desenvolvimento da doença periodontal, como causa decorrente das complicações do diabetes, parece ser influenciado pelo tipo de resposta imune-inflamatória, assim, a expressão alterada de diferentes citocinas poderia influenciar o curso da doença (Graves, Li *et al.*, 2011). Nossos resultados revelaram que a presença de diabetes não compensado resultou em aumento no número de células marcadas para TNF- α , no ligamento periodontal dos ratos.

Corroborando com nossos resultados, o aumento na expressão de TNF- α também foi observado em camundongos diabéticos após a inoculação oral de *Porphyromonas gingivalis*. A expressão de TNF- α estimulada pelo patógeno foi mais acentuada nos animais diabéticos quando comparados aos camundongos não diabéticos (Naguib, Al-Mashat *et al.*, 2004).

Resultados similares demonstraram aumento na expressão de TNF- α nos tecidos periodontais de pacientes diabéticos sem controle glicêmico efetivo e portadores de periodontite crônica. Contudo, não houve diferenças entre os níveis detectados em pacientes diabéticos compensados e pacientes não diabéticos com periodontite crônica (Venza, Visalli *et al.*, 2010). Outro estudo também realizado em pacientes diabéticos revelou que, na presença de doença periodontal, os níveis séricos de TNF- α estavam mais elevados nos indivíduos não compensados, seguido

pelos pacientes compensados e, naqueles não diabéticos, foram detectados os menores níveis da citocina circulante (Dag, Firat *et al.*, 2009). Porém, resultados contraditórios descreveram que a presença concomitante do diabetes e da doença periodontal não interferiu na expressão de TNF- α nos tecidos periodontais. Pacientes não diabéticos sem doença periodontal apresentaram níveis similares aos pacientes diabéticos com doença periodontal. Os autores salientam que os experimentos de PCR utilizados na metodologia mensuram somente os níveis de RNA mensageiro, podendo interferir na interpretação dos dados. Além disso, o controle glicêmico observado no grupo diabético pode ter influenciado nos resultados (Duarte, Neto *et al.*, 2007).

Experimentos utilizando culturas de macrófagos provenientes de pacientes diabéticos e não diabéticos comprovaram as alterações na resposta inflamatória. Macrófagos provenientes de pacientes diabéticos apresentam maior capacidade de expressão de TNF- α quando comparados aos macrófagos oriundos de pacientes não diabéticos. Além disso, os macrófagos provenientes de pacientes diabéticos com doença periodontal mais severa produziram quantidades mais elevadas desse mediador em relação aos pacientes diabéticos com doença periodontal leve e moderada (Salvi, Beck *et al.*, 1998).

Entretanto, quando comparamos em nosso estudo os ratos diabéticos que receberam água com aqueles tratados com chá verde, observamos uma tendência do grupo chá em apresentar menores quantidades de células marcadas para o TNF- α . Assim, no período maior de acompanhamento, aos 90 dias, essa tendência tornou-se significativa, sugerindo um efeito antiinflamatório do chá verde dependente do tempo de tratamento ou da dose ingerida. Pois, estudos de bioviabilidade têm demonstrado que o freqüente consumo da bebida, ao longo dos dias, aumenta a concentração plasmática das catequinas (Van Het Hof, Kivits *et al.*, 1998; Van Het Hof, Wiseman *et al.*, 1999).

Em concordância com nossos resultados, o chá verde, quando administrado via gavagem oral em camundongos, foi capaz de reduzir, de maneira dose-dependente, a produção sérica de TNF- α induzida por injeção intraperitoneal de LPS. Ou seja, a administração de 0,5g de polifenóis/Kg diminuiu 80% os níveis séricos da citocina e inibiu completamente a morte dos camundongos causada pelo LPS (Yang, De Villiers *et al.*, 1998). Além disso, foi visto *in vitro* que a EGCG

bloqueou a ativação do fator de transcrição NF- κ B em macrófagos estimulados com o mesmo LPS, conseqüentemente, diminuiu a expressão de TNF- α mRNA e a produção da correspondente citocina (Yang, De Villiers *et al.*, 1998).

Inversamente, não foi observado nenhum efeito dos polifenóis derivados do chá verde na produção de TNF- α , a partir de leucócitos humanos estimulados com LPS. Portanto, a principal explicação dada pelos autores foi a reduzida dosagem utilizada de polifenóis, comparada ao trabalho anteriormente citado (Crouvezier, Powell *et al.*, 2001).

Sabe-se que o TNF- α é um mediador inflamatório, o qual regula positivamente a osteoclastogênese e está envolvido com a quebra da homeostasia nos tecidos conjuntivo e ósseo (Katagiri e Takahashi, 2002; Graves e Cochran, 2003). Assim, na doença periodontal, o balanço entre a expressão de mediadores pró e antiinflamatórios é um fator relevante para o desenvolvimento da doença periodontal, influenciando, de tal maneira, o sistema RANKL/OPG (Garlet, Cardoso *et al.*, 2006). Portanto, o aumento na expressão de TNF- α , no periodonto dos ratos diabéticos, possivelmente, influenciou a elevada produção de RANKL pelas células do ligamento periodontal, em todos os períodos observados.

Da mesma maneira, camundongos diabéticos infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentaram doença periodontal mais severa em relação aos camundongos não diabéticos. Concomitantemente, houve aumento na expressão de RANKL, sugerindo que o eixo RANK/RANKL/OPG está envolvido nas bases moleculares relacionadas ao aumento na severidade da doença periodontal, em presença do diabetes (Mahamed, Marleau *et al.*, 2005). Além disso, a indução de diabetes em camundongos resultou em redução na densidade óssea acompanhada por aumento na expressão de RANKL, IL-1 β e IL-6 (Motyl e McCabe, 2009).

Novamente, pudemos confirmar o efeito benéfico antiinflamatório do chá-verde, ao analisarmos as células imunomarcadas para RANKL. Pois, os ratos diabéticos que ingeriram a bebida apresentaram uma quantidade significativamente menor da citocina expressa que aqueles tratados com água. Além disso, os animais que receberam água demonstraram um significativo aumento na expressão de RANKL após os 30 dias, mantendo os níveis elevados até o período final de 90 dias. Entretanto, os ratos tratados com chá mantiveram quantidade semelhante de células marcadas para a citocina ao longo de todos os períodos, ou seja, o chá foi capaz de

inibir o aumento da expressão de RANKL, o que normalmente ocorreria concomitantemente ao avanço do diabetes e da doença periodontal.

Confirmando as propriedades antiinflamatórias das catequinas derivadas do chá verde, os efeitos inibitórios na produção de RANKL puderam ser vistos quando se adicionou EGC sobre osteoblastos infectados com *S. aureus* (Ishida, Kohda *et al.*, 2007). Contrariamente, não foi detectado nenhum efeito das epicatequinas sobre a produção de RANKL no periodonto de camundongos infectados com LPS (Nakamura, Ukai *et al.*, 2010).

Conforme estabelecido, o principal papel do RANKL na fisiologia óssea é estimular a diferenciação dos osteoclastos. Portanto, a associação desta citocina com o Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos (M-CSF) é necessário e suficiente para a completa diferenciação de precursores de osteoclastos em células maduras (Khosla, 2001). Entretanto, quando macrófagos foram cultivados com RANKL e M-CSF, o número de células multinucleadas TRAP-positivas (osteoclastos) diminuiu após se adicionar epicatequinas extraídas do chá verde ao meio de cultura (Nakamura, Ukai *et al.* 2010).

Em contraste ao RANKL, a OPG atua inibindo a osteoclastogênese, pois funciona como um falso receptor que se liga ao RANKL, impedindo a associação deste ao RANK. Portanto, a remodelação óssea parece ser principalmente controlada pelo balanço RANKL/OPG e qualquer modificação que leve ao desequilíbrio pode induzir uma excessiva reabsorção óssea, ou ao contrário, uma formação óssea exacerbada (Hakeda, Kobayashi *et al.*, 1998).

A osteoprotegerina também pode ser produzida por fibroblastos do ligamento periodontal (Kanzaki, Chiba *et al.*, 2002) e se encontra reduzida nos tecidos periodontais em situações de periodontite moderada e severa, enquanto que a expressão de RANKL mRNA está aumentada nos estágios mais avançados da doença (Liu, Xu *et al.*, 2003). Por isso, admite-se que o balanço entre RANKL e OPG pode determinar a severidade da doença periodontal, ou seja, uma proporção maior de RANKL para OPG indicaria reabsorção óssea local. (Liu, Xu *et al.*, 2003; Garlet, Martins *et al.*, 2004; Garlet, Cardoso *et al.*, 2006).

De fato, em nosso trabalho, encontramos uma menor quantidade de células do ligamento periodontal marcadas para OPG nos ratos diabéticos, durante os períodos de 60 e 90 dias, correspondentes às fases mais avançadas da doença. Interessantemente, nos períodos iniciais de 15 e 30 dias, esses animais diabéticos,

independente do tratamento recebido, apresentaram uma quantidade elevada de OPG. Em concordância com nosso trabalho, nos pacientes diabéticos, foram encontrados níveis mais elevados da citocina circulante comparados aos indivíduos saudáveis (Kim, Lee *et al.*, 2005; Lappin, Eapen *et al.*, 2009).

É intrigante que os ratos diabéticos, especialmente aqueles tratados com água, tenham apresentado níveis elevados de OPG nos períodos iniciais de acompanhamento, pois demonstraram, desde o começo, maior quantidade de perda óssea, revelando o desenvolvimento da doença periodontal. Sendo a OPG considerada uma proteína de proteção óssea, era esperado que sua produção, desde o início, estivesse reduzida frente ao quadro de periodontite decorrente da indução do diabetes. Entretanto, a estreptozotocina utilizada para induzir a doença, juntamente com a ativação do sistema imune, causa danos às células β do pâncreas (Mosci, Vecchiarelli *et al.*, 1993; Lukic, Stosic-Grujicic *et al.*, 1998) e, sabe-se que, além dos fibroblastos e osteoblastos, essas células pancreáticas também secretam OPG (Schrader, Rennekamp *et al.*, 2007). Portanto, a produção elevada da proteína, no início do estabelecimento do diabetes, funciona como uma tentativa de proteger as células β dos danos causados (Schrader, Rennekamp *et al.*, 2007). Assim, podemos supor que todos os tipos celulares capazes de expressar OPG, inclusive os fibroblastos do ligamento periodontal, estariam trabalhando em conjunto na tentativa de atenuar, inicialmente, as injúrias sobre as células β do pâncreas. No entanto, conforme passado o tempo, houve uma ligeira redução na quantidade de OPG nos animais diabéticos, enquanto que nos ratos controle ocorreu um aumento da citocina presente. Provavelmente, nesses períodos mais avançados, as células β dos diabéticos já teriam sido destruídas e a secreção de OPG não teria mais função protetora, por isso sua redução. Já nos ratos saudáveis, a imunomarcagem para OPG estaria aumentada por participar do processo fisiológico de remodelação óssea, que ocorre com o desenvolvimento e crescimento dos animais.

No momento em que comparamos a condição diabética com o tratamento recebido, observamos que os diabéticos tratados com chá verde apresentaram maior número de células marcadas para OPG que aqueles que ingeriram água, principalmente nos períodos de 60 e 90 dias de acompanhamento. Portanto, analisando os efeitos osteogênicos das catequinas sobre células pluripotentes, identificou-se uma maior expressão de OPG após a adição EGCG ao meio (Ko, Lau *et al.*, 2009). Em conjunto com o encontrado na literatura, nossos resultados

sugerem que o chá verde seria capaz de atenuar a perda óssea periodontal decorrente do diabetes, promovendo a osteogênese e suprimindo a função osteoclástica, por sustentar a expressão de OPG.

Citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e RANKL podem induzir a perda óssea, quando presentes no processo de remodelação, impedindo a osteogênese adequada. Para esclarecer os mecanismos pelos quais as citocinas podem afetar a formação óssea, diversos aspectos têm sido estudados. Estes podem incluir o impacto dos mediadores inflamatórios nos precursores de osteoblastos, no número de células diferenciadas ou na produção da matriz. Assim, o TNF- α , por meio do seu receptor p55, parece desencadear um processo de sinalização, o qual inibe a expressão do fator de transcrição RUNX-2, impedindo a diferenciação dos osteoblastos (Gilbert, He *et al.*, 2002; Gilbert, Rubin *et al.*, 2005). Portanto, um dos mecanismos que podem diminuir a quantidade de osteoblastos é a supressão do Cbfa1/Runx-2, principal responsável pela diferenciação dos precursores em células ósseas ativas (Graves, Li *et al.*, 2011).

Dada a importância do fator de transcrição Cbfa1/Runx-2 na diferenciação dos osteoblastos e, conseqüentemente, no processo de neoformação óssea, investigamos os efeitos do diabetes sobre a produção de Runx-2 pelas células do ligamento periodontal dos ratos. Como esperado, os animais diabéticos tratados com água apresentaram uma quantidade significativamente menor de células imunomarcadas para o fator de transcrição em relação ao grupo controle correspondente, a partir dos 30 dias e, assim seguindo, até o período final de 90 dias. Resultados semelhantes foram vistos em camundongos diabético-induzidos por estreptozotocina que falharam em produzir osteóide suficiente devido à reduzida expressão de Runx-2 (Lu, Kraut *et al.*, 2003). Outro estudo também realizado em camundongos diabético-induzidos demonstrou que, quando esses animais foram submetidos à movimentação ortodôntica, houve maior número de células TRAP-positivas, aumento na expressão da citocina inflamatória TNF- α e maiores níveis dos marcadores de atividade osteoclástica RANKL e CSF-1. Inversamente, o diabetes levou a uma menor expressão dos marcadores de atividade osteoblástica, como o RUNX2, a osteoclastina (OCN) e a fosfatase alcalina, causando uma maior movimentação ortodôntica como resultado da acentuada reabsorção óssea (Braga, Taddei *et al.*, 2011). Ainda, a deficiência de insulina e a hiperglicemia estão diretamente associadas com a reduzida expressão de RUNX-2, pois, uma vez

revertido o status diabético pela administração de insulina, os níveis de RUNX-2 normalizaram-se, refletindo no aumento do número de osteoblastos (Fowlkes, Bunn *et al.*, 2008). Juntos, os resultados sugerem que a falha na diferenciação celular pode levar ao desequilíbrio no processo de reabsorção/neoformação, resultando em perda óssea alveolar nos animais diabéticos.

Após detectarmos que o diabetes diminuiu a presença do RUNX-2 nas células do ligamento periodontal, verificamos os possíveis efeitos do chá verde sobre a expressão do fator de transcrição. Como esperado, os animais diabéticos que ingeriram o chá demonstraram uma quantidade significativamente maior de células imunomarcadas para RUNX-2 que aqueles correspondentes do grupo água, nos períodos de 30, 60 e 90 dias. Corroborando com os nossos resultados, a EGCG foi capaz de estimular a expressão de RUNX-2 por células mesenquimais da linhagem óssea, aumentando a osteogênese (Chen, Ho *et al.*, 2005). A catequina também elevou a expressão de RUNX-2, induzindo a diferenciação dos osteoblastos e a formação de nódulos ósseos mineralizados (Vali, Rao *et al.*, 2007). Em suma, nossos resultados sugerem que o chá verde exerce um efeito benéfico sobre as células do ligamento periodontal de ratos diabéticos, mantendo em níveis mais elevados a expressão de RUNX-2. Isso pode prevenir a acentuada perda óssea que ocorre na doença periodontal decorrente do diabetes, por manter o estímulo de diferenciação dos osteoblastos.

Conforme comentado, algumas das citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, permanecem elevadas nos pacientes diabéticos e podem promover a atividade osteoclástica e a reabsorção óssea por modificarem a via RANK/RANKL/OPG. Assim, parece existir uma relação próxima entre periodontite, reabsorção óssea e diabetes, ao se considerar a inflamação crônica um denominador comum entre elas (Garcia-Hernandez, Arzate *et al.*, 2012). Portanto, são os mediadores inflamatórios que regulam a quebra da homeostasia, desencadeando a osteoclastogênese e o desenvolvimento da doença periodontal. Por outro lado, as citocinas produzidas por células do tipo Th2, como a IL-10, exercem um efeito reverso, inibindo o início da reabsorção (Claudino, Garlet *et al.*, 2010). Dessa maneira, a IL-10 controla a perda óssea por regular negativamente a sinalização e a atividade das citocinas pró-inflamatórias (Puliti, Von Hunolstein *et al.*, 2002). Assim, o balanço entre os mediadores da inflamação e os seus moduladores é um fator relevante para a progressão da doença periodontal, pois determinam,

respectivamente, a expressão de RANKL e OPG (Garlet, Cardoso *et al.*, 2006). Isto é, a presença prolongada de citocinas inflamatórias estimula os osteoblastos a super expressarem RANKL, enquanto que os mediadores antiinflamatórios, como a IL-10, induzem as células a sintetizarem OPG, que impede a ligação RANK-RANKL, evitando a perda óssea (Katagiri e Takahashi, 2002).

Quando foram analisadas células ósseas de ratos diabéticos, mostrou-se que a expressão gênica para IL-10 foi significativamente reduzida em relação aos normais (Kloting, Follak *et al.*, 2005). De maneira semelhante, em nosso trabalho, quando analisamos os animais diabéticos do grupo água, detectamos uma quantidade significativamente menor de IL-10 nas células do ligamento periodontal, nos períodos de 30,60 e 90 dias. Em concordância com nossos resultados, células B extraídas de pacientes diabéticos também secretaram constitutivamente menor quantidade de IL-10 e níveis mais elevados de IL-8, confirmando que o diabetes é capaz de suprimir a expressão da citocina antiinflamatória e de aumentar a síntese de mediadores inflamatórios (Jagannathan, McDonnell *et al.*, 2010). Além disso, foi encontrada associação entre a baixa capacidade celular em produzir IL-10 e a presença de altos índices glicêmicos e dislipidemia, sugerindo que a expressão da citocina está modulada na presença do diabetes e na síndrome metabólica (Van Exel, Gussekloo *et al.*, 2002).

Porém, ao compararmos a condição diabética com o tratamento recebido, observamos que os ratos que ingeriram chá apresentaram uma quantidade significativamente maior de células imunomarcadas para IL-10 que aqueles animais que receberam água, desde o período inicial até o término do acompanhamento. Corroborando com os nossos resultados, a adição de ECG, EGC ou EGCG induziu monócitos a sintetizarem IL-10, demonstrando uma tendência antiinflamatória das três principais catequinas do chá (Crouvezier, Powell *et al.*, 2001). Além disso, a EGCG aumentou a produção de IL-10 em camundongos diabéticos não obesos e preservou as células β pancreáticas contra os efeitos deletérios do diabetes, atrasando a progressão da doença (Fu, Zhen *et al.*, 2011).

Recentemente, estudos demonstraram que a EGCG induziu a síntese de IL-10 e o aumento do número de células T reguladoras (Tregs) (Wong, Nguyen *et al.*, 2011; Yun, Jialal *et al.*, 2010). Notoriamente, a resposta imune é controlada por um delicado balanço entre as células T efectoras e as células T reguladoras, as quais exercem a função principal de modular a inflamação, por meio da expressão de IL-

10 e TGF- β (O'garra e Vieira, 2004). No entanto, a diferenciação das Tregs é regulada pelo Foxp3, um fator de transcrição responsável por controlar o desenvolvimento e a função dessas células (Wong, Nguyen *et al.* 2011; Yun, Jialal *et al.* 2010). Entretanto, tem-se discutido quais são as possíveis vias de atuação do chá verde que levam ao aumento da expressão de IL-10, como também à redução na síntese de citocinas pró-inflamatórias.

Assim, o chá verde poderia elevar a produção de IL-10 por inibir a DNA metiltransferase (DNMT). Pois, já se sabe que a desmetilação da região promotora do gene *foxp3*, usando inibidores de DNA metiltransferase (DNMT), resulta na expressão do fator de transcrição e na subsequente diferenciação de células T em Tregs (Lal, Zhang *et al.*, 2009). Portanto, alguns estudos indicam que a EGCG pode alterar a expressão do gene, por justamente inibir a atividade da DNMT, causando a desmetilação da região promotora e a consequente reativação do gene silenciado (Wong, Nguyen *et al.*, 2011; Fang, Wang *et al.*, 2003). Uma vez o gene ativado, o fator de transcrição Foxp3 é expresso e induz a diferenciação das células T reguladoras, as quais sintetizam maior quantidade de IL-10 (Figura 20).

Figura 20- Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre o gene *foxp3*. As epicatequinas inibem a DNA metiltransferase (DNMT), permitindo a desmetilação da região promotora do gene *foxp3*. O sítio promotor é ativado, o que resulta na expressão do fator de transcrição Foxp3, na subsequente diferenciação de células T em Tregs e, finalmente, na produção de IL-10.

Adicionalmente, nossos resultados mostraram que as células do ligamento periodontal, na presença dos altos índices glicêmicos, aumentaram a expressão de TNF- α . No entanto, uma das principais conseqüências da glicemia elevada é a formação dos AGEs que se ligam ao seus receptores RAGEs nas células e ativa a fosfolipase C (PLC), a qual atua sobre a via do PKC. Por sua vez, nessa via ocorre a fosforilação da proteína kinase MAPK e de ERK1/2, levando à seguinte ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual é translocado para o núcleo e se liga ao sítio promotor de genes que codificam as citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α . Isto sugere que os altos níveis de glicose podem regular positivamente a expressão dos

mediadores inflamatórios, por ativar o NF- κ B, após a interação AGE-RAGE (Zhu, Ren *et al.*, 2012; Newsholme, Haber *et al.*, 2007). A partir dessas informações, é possível imaginar que o NF- κ B e sua via de ativação também seriam alvos desejáveis de atuação do chá verde para prevenir ou reduzir a resposta inflamatória no diabético.

Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que os polifenóis extraídos do chá bloqueiam a expressão de TNF- α , IL-1 β e iNOS por, de fato, inibirem a ativação do NF- κ B, impedindo sua translocação do citoplasma para o núcleo (Lin e Lin, 1997; Yang, De Villiers *et al.*, 1998; Crouvezier, Powell *et al.*, 2001) (Figura 21).

Figura 21- Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre o fator de transcrição NF- κ B. A ligação das moléculas de AGE ao receptor RAGE ativa a cascata intracelular do PKC que resultará na translocação do NF- κ B para o núcleo. A ligação do fator de transcrição com o sítio promotor de um gene específico para determinada citocina inflamatória, resultará na transcrição e expressão de um mediador, como o TNF- α . Portanto, as epicatequinas atuam no final da via, impedindo diretamente a translocação do NF- κ B para o interior do núcleo.

Outra possível atuação epigenética do chá verde seria via desacetilação de histonas. Ou seja, a acetilação por Histona Acetiltransferase de uma proteína específica gera um desdobramento da molécula de DNA e aumenta a acessibilidade para o fator de transcrição se ligar. Em contraste, a desacetilação por Histona Desacetilase (HDAC) impede o desdobramento do DNA, limitando o acesso do fator de transcrição e, conseqüentemente, reprimindo a transcrição do gene (Yun, Jialal *et al.*, 2010; Rahman, Gilmour *et al.*, 2002). Entretanto, o bloqueio de HDAC resultaria em acetilação, facilitando a ligação de um fator de transcrição, como o NF- κ B, o que culminaria com a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Rahman, Gilmour *et al.*, 2002). Portanto, relatou-se que a EGCG também teve uma atuação nessa via, pois aumentou a atividade da HDAC e, conseqüentemente, limitou a ligação do NF- κ B ao gene promotor (Yun, Jialal *et al.*, 2010) (Figura 22).

Figura 22- Desenho ilustrativo da possível via de atuação do chá verde sobre a enzima Histona Desacetilase (HDAC). A acetilação por histona acetiltransferase de uma proteína específica gera um desdobramento da molécula de DNA e aumenta a acessibilidade para um fator de transcrição se ligar ao gene. Em contraste, a desacetilação por Histona Desacetilase (HDAC) impede o desdobramento do DNA, limitando o acesso do fator de transcrição e, conseqüentemente, reprimindo a transcrição do gene. Portanto, as epicatequinas atuam sobre a HDAC, potencializando seu efeito, impedindo acetilação e o desdobramento do DNA. Assim, a ligação do fator de transcrição, como o NF- κ B, ao sítio promotor do gene ficaria impossibilitada e não haveria a expressão de citocinas pró-inflamatórias.

Em nosso trabalho, os ratos diabéticos que receberam água demonstraram um aumento na marcação celular para TNF- α que culminou com maior expressão de RANKL. Por outro lado, houve menor quantidade de células marcadas para IL-10, consequentemente, menos marcações para RUNX-2 e discreta modulação da OPG. Entretanto, todas essas alterações imunológicas resultaram em maior quantidade de perda óssea alveolar, típica do estabelecimento da doença periodontal nos diabéticos. Corroborando com nossos resultados, camundongos diabéticos infectados com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* apresentaram doença periodontal mais severa em relação aos camundongos não diabéticos. Concomitantemente, houve aumento na expressão de RANKL sugerindo que o eixo RANK/RANKL/OPG está envolvido nas bases moleculares relacionadas ao aumento na severidade da doença periodontal na presença do diabetes (Mahamed, Marleau *et al.*, 2005). Além disso, a indução do diabetes em camundongos resultou em aumento na expressão de TNF- α e RANKL e em menor expressão de RUNX2, causando reabsorção óssea acentuada (Braga, Taddei *et al.*, 2011).

Analisando os resultados em conjunto, é possível observar que a presença do diabetes interferiu de forma relevante na expressão de diversos mediadores relacionados ao estabelecimento das doenças periodontais. Pois, o estímulo constante do sistema imunológico por bactérias ou por alterações sistêmicas, como o diabetes, gera uma resposta inflamatória exacerbada que resulta, não somente, em formação de osteoclastos e na conseguinte reabsorção óssea, mas também, na diminuída osteogênese. Por isso, a localização da inflamação e sua duração são fatores críticos para o desenvolvimento da doença periodontal. Assim, se a inflamação cessa e não se estende até a fase de neoformação, o impacto sobre a perda óssea periodontal pode ser relativamente pequeno, desde que haja uma mesma quantidade de osso neoformado para aquele reabsorvido. Inversamente, se a inflamação se estender até o período de neoformação, como ocorre nos diabéticos que estão constantemente produzindo elevados níveis de citocinas inflamatórias, a capacidade de reparo do osso reabsorvido será comprometida (Graves, Li *et al.* 2011; Vozarova, Weyer *et al.*, 2002; Shoelson, Lee *et al.*, 2006). Como discutido, parece haver diversos mecanismos envolvidos nesse processo em que a resposta inflamatória interfere na neoformação óssea. Sendo assim, as citocinas inflamatórias podem inibir a expressão de RUNX-2 e a seguinte diferenciação dos osteoblastos e, então, limitar a formação óssea (Liu, Bal *et al.*, 2006). Ou ainda, os mediadores

inflamatórios, como o TNF- α e RANKL, podem atuar diretamente sobre os próprios osteoblastos, diminuindo a atividade celular e a síntese de matriz óssea (Graves, Li *et al.*, 2011). Por isso, existem evidências de que esses mecanismos possam realmente interferir em várias patologias ósseas caracterizadas pelo desequilíbrio entre a reabsorção e a neoformação. Assim, as interferências da resposta inflamatória exacerbada aumentam o processo de reabsorção e, simultaneamente, reduzem o número de osteoblastos viáveis, dificultando a formação proporcional de osso para balancear a quantidade reabsorvida (Al-Mashat, Kandru *et al.*, 2006; Liu, Bal *et al.*, 2006; Behl, Siqueira *et al.*, 2008).

Então, diversas doenças que envolvem inflamação e metabolismo ósseo, exibem desequilíbrio entre os processos de reabsorção e neoformação do osso. Portanto, pesquisar os fatores imunológicos que estão afetando a biologia, fornece conhecimentos para melhor entendermos o processo das doenças bem como as possíveis formas de tratamento. Porém, aqui demonstramos a associação de duas patologias relacionadas à osteoimunologia e os possíveis benefícios do chá verde como terapêutica sistêmica.

De fato, o chá verde parece ter uma atuação antiinflamatória nos ratos diabéticos que o ingeriram. Pois, modulou a expressão de TNF- α frente ao diabetes, especialmente no período final de 90 dias. Consequentemente, o RANKL mostrou-se diminuído de maneira significativa em 30, 60 e 90 dias de acompanhamento. Por outro lado, a marcação para IL-10 apresentou-se elevada, durante todo o tempo em que os animais diabéticos ingeriram o chá verde, o que resultou em maior expressão de RUNX-2 a partir dos 30 dias e de OPG a partir dos 60 dias, seguindo assim até o final do acompanhamento. Em conjunto, a expressão diminuída das citocinas pró-inflamatórias combinada com aumento daquelas antiinflamatórias e do marcador de atividade osteoblástica, resultou em menor quantidade de perda óssea nos períodos de 30 e 90 dias. Curiosamente, não houve diferenças no intermédio de 60 dias, provavelmente porque houve quiescência no desenvolvimento da periodontite no grupo água enquanto que no grupo chá a doença estaria na fase ativa. Então, nesse momento de convergência, não foi possível detectar visualmente os efeitos positivos do chá verde, apesar de sua ação benéfica em níveis moleculares. Concisamente, podemos dizer que o chá verde modulou a inflamação e, com isso, atenuou a progressão avançada da doença periodontal decorrente do diabetes.

Conforme discutido, existem até o momento três possíveis vias de atuação do chá verde. Uma delas pode estar relacionada com a ação direta das catequinas sobre o NF- κ B, impedindo a ativação do fator de transcrição e sua translocação para o núcleo, evitando, assim, a transcrição das citocinas inflamatórias (Lin e Lin, 1997; Yang, De Villiers *et al.*, 1998; Crouvezier, Powell *et al.*, 2001). Outra forma de atuação, ainda relacionada com a transcrição de proteínas, seria por potencializar a atividade da HDAC, impedindo o desdobramento do DNA, limitando o acesso do fator de transcrição e, conseqüentemente, reprimindo a transcrição do gene relacionado ao mediador inflamatório (Yun, Jialal *et al.*, 2010). Ainda, o chá verde poderia modular a inflamação por elevar a produção de IL-10, via inibição da DNMT. Ou seja, uma vez inativada a DNMT, o fator de transcrição Foxp3 é expresso e induz a diferenciação das células T reguladoras, as quais sintetizam maior quantidade de IL-10 (Wong, Nguyen *et al.*, 2011; Fang, Wang *et al.*, 2003).

Em conjunto, as pesquisas sugerem mecanismos de ação que podem, ao menos em parte, explicar as propriedades antiinflamatórias atribuídas ao consumo do chá verde. No entanto, outros estudos são necessários para a efetiva caracterização dos mecanismos moleculares de atuação do chá sobre as patologias relacionadas ao diabetes. A elucidação destes mecanismos contribuirá para o desenvolvimento de estratégias preventivas e terapêuticas voltadas para o controle da prevalência e da severidade das doenças periodontais associadas ao diabetes.

Conclusões

8 Conclusões

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões:

1. A indução e a progressão do diabetes resultaram em perda óssea alveolar como característica do desenvolvimento natural da doença periodontal em decorrência da desordem metabólica.
 2. O estado diabético levou ao aumento no número de células imunomarcadas para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e RANKL nos tecidos periodontais de ratos.
 3. Inversamente, os ratos diabéticos demonstraram menor quantidade de células imunomarcadas para as citocinas antiinflamatórias, IL-10 e OPG, no periodonto.
 4. O fator de transcrição RUNX-2 também se apresentou em menor quantidade nas células periodontais dos ratos diabéticos.
 5. Os ratos diabéticos tratados com chá verde demonstraram menor perda óssea alveolar, nos períodos de 30 e 90 dias, quando comparados aos tratados com água.
 6. O chá verde diminui o número de células imunomarcadas para TNF- α no periodonto dos ratos diabéticos, aos 90 dias, como também, reduziu a marcação para RANKL a partir dos 30 dias até o período final de acompanhamento.
-

7. Os animais diabéticos também foram beneficiados pelo chá por apresentarem maior número de células imunomarcadas para OPG, aos 60 e 90 dias e maior quantidade para IL-10 em todos os períodos.
8. Os ratos diabéticos tratados com chá demonstraram maior quantidade de células imonomarcadas para RUNX-2 que os animais do grupo correspondente tratados com água, nos períodos de 30, 60 e 90 dias.

Portanto, o estabelecimento e a progressão do diabetes em ratos favoreceram uma desregulação na expressão dos mediadores inflamatórios e dos antiinflamatórios, interferindo na homeostasia do periodonto. Por outro lado, o chá verde apresentou efeitos benéficos sobre o diabetes, pois modulou a inflamação, atenuando a progressão da doença periodontal.

*"É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos
ficado, para sempre, à margem de nós mesmos."*

Fernando Teixeira de Andrade

Referências

Referências

- AL-MASHAT, H. A. et al. Diabetes enhances mRNA levels of proapoptotic genes and caspase activity, which contribute to impaired healing. *Diabetes*, v. 55, n. 2, p. 487-95, Feb 2006. ISSN 0012-1797 (Print)
- ALIKHANI, M.; ALIKHANI, Z.; GRAVES, D. T. Apoptotic effects of LPS on fibroblasts are indirectly mediated through TNFR1. *J Dent Res*, v. 83, n. 9, p. 671-6, Sep 2004. ISSN 0022-0345 (Print)
- ALIKHANI, Z. et al. Advanced glycation end products enhance expression of pro-apoptotic genes and stimulate fibroblast apoptosis through cytoplasmic and mitochondrial pathways. *J Biol Chem*, v. 280, n. 13, p. 12087-95, Apr 1 2005. ISSN 0021-9258 (Print)
- ANDERSON, R. A.; POLANSKY, M. M. Tea enhances insulin activity. *J Agric Food Chem*, v. 50, n. 24, p. 7182-6, Nov 20 2002. ISSN 0021-8561 (Print)
- ASSUMA, R. et al. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol*, v. 160, n. 1, p. 403-9, Jan 1 1998. ISSN 0022-1767 (Print)
- BAKER, P. J. The role of immune responses in bone loss during periodontal disease. *Microbes Infect*, v. 2, n. 10, p. 1181-92, Aug 2000. ISSN 1286-4579 (Print)
- BARKSBY, H. E. et al. Differential expression of immunoregulatory genes in monocytes in response to *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Clin Exp Immunol*, v. 156, n. 3, p. 479-87, Jun 2009. ISSN 1365-2249 (Electronic)
- BEHL, Y. et al. Activation of the acquired immune response reduces coupled bone formation in response to a periodontal pathogen. *J Immunol*, v. 181, n. 12, p. 8711-8, Dec 15 2008. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- BRAGA, S. M. et al. Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci*, v. 119, n. 1, p. 7-14, Feb 2011. ISSN 1600-0722 (Electronic)
- BREMNER, P. D. et al. Comparison of the phenolic composition of fruit juices by single step gradient HPLC analysis of multiple components versus multiple chromatographic runs optimised for individual families. *Free Radic Res*, v. 32, n. 6, p. 549-59, Jun 2000. ISSN 1071-5762 (Print)
- CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med*, v. 70, n. 2, p. 93-103, Feb 2004. ISSN 0032-0943 (Print)
-

CHACKO, S. M. et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. *Chin Med*, v. 5, p. 13, Apr 2010. ISSN 1749-8546 (Electronic)

CHAN, M. M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. *Biochem Pharmacol*, v. 54, n. 12, p. 1281-6, Dec 15 1997. ISSN 0006-2952 (Print)

CHEN, C. H. et al. Green tea catechin enhances osteogenesis in a bone marrow mesenchymal stem cell line. *Osteoporos Int*, v. 16, n. 12, p. 2039-45, Dec 2005. ISSN 0937-941X (Print)

CLAUDINO, M. et al. Alloxan-induced diabetes triggers the development of periodontal disease in rats. *PLoS One*, v. 2, n. 12, p. e1320, 2007. ISSN 1932-6203 (Electronic)

CLAUDINO, M. et al. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. *Eur J Oral Sci*, v. 118, n. 1, p. 19-28, Feb 2010. ISSN 1600-0722 (Electronic)

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1569-76, Aug 2008. ISSN 0022-3492 (Print)

CROUVEZIER, S. et al. The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine*, v. 13, n. 5, p. 280-6, Mar 7 2001. ISSN 1043-4666 (Print)

DAG, A. et al. The effect of periodontal therapy on serum TNF-alpha and HbA1c levels in type 2 diabetic patients. *Aust Dent J*, v. 54, n. 1, p. 17-22, Mar 2009. ISSN 0045-0421 (Print)

DELFINO, V. D. et al. Effect of the inclusion of ruthenium red in three preservation solutions on the viability of freshly isolated and cold-stored rat pancreatic islets. *Transplant Proc*, v. 34, n. 2, p. 527-30, Mar 2002. ISSN 0041-1345 (Print)

DELIMA, A. J. et al. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. *J Infect Dis*, v. 186, n. 4, p. 511-6, Aug 15 2002. ISSN 0022-1899 (Print)

DELIMA, A. J. et al. Soluble antagonists to interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor (TNF) inhibits loss of tissue attachment in experimental periodontitis. *J Clin Periodontol*, v. 28, n. 3, p. 233-40, Mar 2001. ISSN 0303-6979 (Print)

DUARTE, P. M. et al. Diabetes modulates gene expression in the gingival tissues of patients with chronic periodontitis. *Oral Dis*, v. 13, n. 6, p. 594-9, Nov 2007. ISSN 1354-523X (Print)

DUTHIE, G. G.; DUTHIE, S. J.; KYLE, J. A. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev*, v. 13, n. 1, p. 79-106, Jun 2000. ISSN 1475-2700 (Electronic)

ENGBRETSON, S. P. et al. Gingival crevicular fluid levels of interleukin-1beta and glycemic control in patients with chronic periodontitis and type 2 diabetes. *J Periodontol*, v. 75, n. 9, p. 1203-8, Sep 2004. ISSN 0022-3492 (Print)

FANG, M. Z. et al. Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*, v. 63, n. 22, p. 7563-70, Nov 15 2003. ISSN 0008-5472 (Print)

FERNANDEZ, P. L. et al. HPLC determination of catechins and caffeine in tea. Differentiation of green, black and instant teas. *Analyst*, v. 125, n. 3, p. 421-5, Mar 2000. ISSN 0003-2654 (Print)

FOWLKES, J. L. et al. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. *Endocrinology*, v. 149, n. 4, p. 1697-704, Apr 2008. ISSN 0013-7227 (Print)

FREIRE-DE-LIMA, C. G. et al. Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages. *J Biol Chem*, v. 281, n. 50, p. 38376-84, Dec 15 2006. ISSN 0021-9258 (Print)

FROST, A. et al. Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand*, v. 68, n. 2, p. 91-6, Apr 1997. ISSN 0001-6470 (Print)

FU, Z. et al. Epigallocatechin gallate delays the onset of type 1 diabetes in spontaneous non-obese diabetic mice. *Br J Nutr*, v. 105, n. 8, p. 1218-25, Apr 2011. ISSN 1475-2662 (Electronic)

FUNK, J. R. et al. Biomechanical evaluation of early fracture healing in normal and diabetic rats. *J Orthop Res*, v. 18, n. 1, p. 126-32, Jan 2000. ISSN 0736-0266 (Print)

GARCIA-HERNANDEZ, A. et al. High glucose concentrations alter the biomineralization process in human osteoblastic cells. *Bone*, v. 50, n. 1, p. 276-88, Jan 2012. ISSN 1873-2763 (Electronic)

GARLET, G. P. et al. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiol Immunol*, v. 21, n. 1, p. 12-20, Feb 2006. ISSN 0902-0055 (Print)

GARLET, G. P. et al. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 8, p. 671-9, Aug 2004. ISSN 0303-6979 (Print)

GILBERT, L. et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*, v. 141, n. 11, p. 3956-64, Nov 2000. ISSN 0013-7227 (Print)

GILBERT, L. et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, v. 277, n. 4, p. 2695-701, Jan 25 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

GILBERT, L. C.; RUBIN, J.; NANES, M. S. The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, v. 288, n. 5, p. E1011-8, May 2005. ISSN 0193-1849 (Print)

GOLUB, L. M. et al. In vivo crevicular leukocyte response to a chemotactic challenge: inhibition by experimental diabetes. *Infect Immun*, v. 37, n. 3, p. 1013-20, Sep 1982. ISSN 0019-9567 (Print)

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1585-91, Aug 2008. ISSN 0022-3492 (Print)

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, v. 74, n. 3, p. 391-401, Mar 2003. ISSN 0022-3492 (Print)

GRAVES, D. T. et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*, v. 35, n. 2, p. 89-105, Feb 2008. ISSN 1600-051X (Electronic)

GRAVES, D. T.; LI, J.; COCHRAN, D. L. Inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*, v. 90, n. 2, p. 143-53, Feb 2011. ISSN 1544-0591 (Electronic)

GRAVES, D. T. et al. Inflammation is more persistent in type 1 diabetic mice. *J Dent Res*, v. 84, n. 4, p. 324-8, Apr 2005. ISSN 0022-0345 (Print)

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*, v. 3, Jan 2011. ISSN 2000-2297 (Electronic)

HAKEDA, Y. et al. Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 251, n. 3, p. 796-801, Oct 29 1998. ISSN 0006-291X (Print)

HAN, M. K. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, suppresses cytokine-induced pancreatic beta-cell damage. *Exp Mol Med*, v. 35, n. 2, p. 136-9, Apr 30 2003. ISSN 1226-3613 (Print)

HAN, X. et al. Bacterial-responsive B lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol*, v. 176, n. 1, p. 625-31, Jan 1 2006. ISSN 0022-1767 (Print)

HE, H. et al. Diabetes causes decreased osteoclastogenesis, reduced bone formation, and enhanced apoptosis of osteoblastic cells in bacteria stimulated bone loss. *Endocrinology*, v. 145, n. 1, p. 447-52, Jan 2004. ISSN 0013-7227 (Print)

HERSKIND, A. M. et al. Diabetes mellitus and healing of closed fractures. *Diabete Metab*, v. 18, n. 1, p. 63-4, Jan-Feb 1992. ISSN 0338-1684 (Print)

HOSOKAWA, Y. et al. Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*, v. 54 Suppl 2, p. S151-8, Jul 2010. ISSN 1613-4133 (Electronic)

HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 860-7, Dec 14 2006. ISSN 1476-4687 (Electronic)

ISAKA, J. et al. Participation of periodontal ligament cells with regeneration of alveolar bone. *J Periodontol*, v. 72, n. 3, p. 314-23, Mar 2001. ISSN 0022-3492 (Print)

ISHIDA, I. et al. Epigallocatechin gallate suppresses expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) in *Staphylococcus aureus* infection in osteoblast-like NRG cells. *J Med Microbiol*, v. 56, n. Pt 8, p. 1042-6, Aug 2007. ISSN 0022-2615 (Print)

ISO, H. et al. The relationship between green tea and total caffeine intake and risk for self-reported type 2 diabetes among Japanese adults. *Ann Intern Med*, v. 144, n. 8, p. 554-62, Apr 18 2006. ISSN 1539-3704 (Electronic)

JAGANNATHAN, M. et al. Toll-like receptors regulate B cell cytokine production in patients with diabetes. *Diabetologia*, v. 53, n. 7, p. 1461-71, Jul 2010. ISSN 1432-0428 (Electronic)

JIN, Q. et al. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. *J Periodontol*, v. 78, n. 7, p. 1300-8, Jul 2007. ISSN 0022-3492 (Print)

KANZAKI, H. et al. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*, v. 17, n. 2, p. 210-20, Feb 2002. ISSN 0884-0431 (Print)

KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, v. 8, n. 3, p. 147-59, May 2002. ISSN 1354-523X (Print)

KAWAGUCHI, H. et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*, v. 135, n. 2, p. 774-81, Aug 1994. ISSN 0013-7227 (Print)

KAWAI, T. et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, v. 169, n. 3, p. 987-98, Sep 2006. ISSN 0002-9440 (Print)

KELI, S. O. et al. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*, v. 156, n. 6, p. 637-42, Mar 25 1996. ISSN 0003-9926 (Print)

- KHOKHAR, S.; MAGNUSDOTTIR, S. G. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United kingdom. *J Agric Food Chem*, v. 50, n. 3, p. 565-70, Jan 30 2002. ISSN 0021-8561 (Print)
- KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, v. 142, n. 12, p. 5050-5, Dec 2001. ISSN 0013-7227 (Print)
- KIM, H. K. et al. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol*, v. 58, n. 5, p. 759-65, Sep 1 1999. ISSN 0006-2952 (Print)
- KIM, M. J. et al. Protective effects of epicatechin against the toxic effects of streptozotocin on rat pancreatic islets: in vivo and in vitro. *Pancreas*, v. 26, n. 3, p. 292-9, Apr 2003. ISSN 1536-4828 (Electronic)
- KIM, S. J. et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *J Nutr Biochem*, v. 18, n. 9, p. 587-96, Sep 2007. ISSN 0955-2863 (Print)
- KIM, S. M. et al. Serum osteoprotegerin levels are associated with inflammation and pulse wave velocity. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 63, n. 5, p. 594-8, Nov 2005. ISSN 0300-0664 (Print)
- KING, G. L. The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol*, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1527-34, Aug 2008. ISSN 0022-3492 (Print)
- KLOTING, N.; FOLLAK, N.; KLOTING, I. Diabetes per se and metabolic state influence gene expression in tissue-dependent manner of BB/OK rats. *Diabetes Metab Res Rev*, v. 21, n. 3, p. 281-7, May-Jun 2005. ISSN 1520-7552 (Print)
- KO, C. H. et al. Effects of tea catechins, epigallocatechin, gallic acid, and gallic acid gallate, on bone metabolism. *J Agric Food Chem*, v. 57, n. 16, p. 7293-7, Aug 26 2009. ISSN 1520-5118 (Electronic)
- KRAKAUER, J. C. et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, v. 44, n. 7, p. 775-82, Jul 1995. ISSN 0012-1797 (Print)
- KUZUSHIMA, M.; MOGI, M.; TOGARI, A. Cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis in mouse osteoblastic cells: involvement of p38MAP kinase. *Arch Oral Biol*, v. 51, n. 11, p. 1048-53, Nov 2006. ISSN 0003-9969 (Print)
- LAL, G. et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol*, v. 182, n. 1, p. 259-73, Jan 1 2009. ISSN 1550-6606 (Electronic)
- LALLA, E. et al. Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest*, v. 105, n. 8, p. 1117-24, Apr 2000. ISSN 0021-9738 (Print)
-

- LAPPIN, D. F. et al. Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol*, v. 36, n. 8, p. 634-41, Aug 2009. ISSN 1600-051X (Electronic)
- LEE, S. F. et al. Immune response and alveolar bone resorption in a mouse model of *Treponema denticola* infection. *Infect Immun*, v. 77, n. 2, p. 694-8, Feb 2009. ISSN 1098-5522 (Electronic)
- LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1143, p. 123-50, Nov 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic)
- LI, Y. L.; XIAO, Z. S. Advances in Runx2 regulation and its isoforms. *Med Hypotheses*, v. 68, n. 1, p. 169-75, Jan 2007. ISSN 0306-9877 (Print)
- LIN, J. K.; LIN-SHIAU, S. Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. *Mol Nutr Food Res*, v. 50, n. 2, p. 211-7, Feb 2006. ISSN 1613-4125 (Print)
- LIN, W. L.; MCCULLOCH, C. A.; CHO, M. I. Differentiation of periodontal ligament fibroblasts into osteoblasts during socket healing after tooth extraction in the rat. *Anat Rec*, v. 240, n. 4, p. 492-506, Dec 1994. ISSN 0003-276X (Print)
- LIN, Y. L.; LIN, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. *Mol Pharmacol*, v. 52, n. 3, p. 465-72, Sep 1997. ISSN 0026-895X (Print)
- LIU, D. et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med*, v. 11, n. 1, p. 17-21, Jan 2003. ISSN 1107-3756 (Print)
- LIU, R. et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res*, v. 85, n. 6, p. 510-4, Jun 2006. ISSN 0022-0345 (Print)
- LOE, H. Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, v. 16, n. 1, p. 329-34, Jan 1993. ISSN 0149-5992 (Print)
- LU, H. et al. Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation. *Endocrinology*, v. 144, n. 1, p. 346-52, Jan 2003. ISSN 0013-7227 (Print)
- LUKIC, M. L.; STOSIC-GRUJICIC, S.; SHAHIN, A. Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol*, v. 6, n. 1-2, p. 119-28, 1998. ISSN 1044-6672 (Print)
- MAHAMED, D. A. et al. G(-) anaerobes-reactive CD4+ T-cells trigger RANKL-mediated enhanced alveolar bone loss in diabetic NOD mice. *Diabetes*, v. 54, n. 5, p. 1477-86, May 2005. ISSN 0012-1797 (Print)
-

- MANFREDINI, S. et al. Design, synthesis and in vitro evaluation on HRPE cells of ascorbic and 6-bromoascorbic acid conjugates with neuroactive molecules. *Bioorg Med Chem*, v. 12, n. 20, p. 5453-63, Oct 15 2004. ISSN 0968-0896 (Print)
- MEALEY, B. L. Periodontal disease and diabetes. A two-way street. *J Am Dent Assoc*, v. 137 Suppl, p. 26S-31S, Oct 2006. ISSN 0002-8177 (Print)
- MEYDANI, M. Nutrition interventions in aging and age-associated disease. *Ann N Y Acad Sci*, v. 928, p. 226-35, Apr 2001. ISSN 0077-8923 (Print)
- MIDDLETON, E., JR. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol*, v. 439, p. 175-82, 1998. ISSN 0065-2598 (Print)
- MOGI, M. et al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*, v. 83, n. 2, p. 166-9, Feb 2004. ISSN 0022-0345 (Print)
- MORI, G. et al. Osteoblast apoptosis in periodontal disease: role of TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Int J Immunopathol Pharmacol*, v. 22, n. 1, p. 95-103, Jan-Mar 2009. ISSN
- MORINOBU, A. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, v. 58, n. 7, p. 2012-8, Jul 2008. ISSN 0004-3591 (Print)
- MOSCI, P. et al. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. I. Course of *Candida albicans* infection. *Cell Immunol*, v. 150, n. 1, p. 27-35, Aug 1993. ISSN 0008-8749 (Print)
- MOTYL, K.; MCCABE, L. R. Streptozotocin, type I diabetes severity and bone. *Biol Proced Online*, v. 11, p. 296-315, 2009. ISSN 1480-9222 (Electronic)
- MUNOZ-TORRES, M. et al. Bone mineral density measured by dual X-ray absorptiometry in Spanish patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int*, v. 58, n. 5, p. 316-9, May 1996. ISSN 0171-967X (Print)
- NAGUIB, G. et al. Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol*, v. 123, n. 1, p. 87-92, Jul 2004. ISSN 0022-202X (Print)
- NAKAGAWA, H. et al. Fenton reaction is primarily involved in a mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate to induce osteoclastic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 292, n. 1, p. 94-101, Mar 22 2002. ISSN 0006-291X (Print)
- NAKAMURA, H. et al. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. *J Periodontal Res*, v. 45, n. 1, p. 23-30, Feb 2010 ISSN 1600-0765 (Electronic)
-

NELSON, R. G. et al. Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care*, v. 13, n. 8, p. 836-40, Aug 1990. ISSN 0149-5992 (Print)

NEWSHOLME, P. et al. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *J Physiol*, v. 583, n. Pt 1, p. 9-24, Aug 15 2007. ISSN 0022-3751 (Print)

NOVAES, A. B., JR. et al. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. *J Periodontol*, v. 62, n. 2, p. 116-22, Feb 1991. ISSN 0022-3492 (Print)

NOVAES, A. B., JR. et al. Manifestations of insulin-dependent diabetes mellitus in the periodontium of young Brazilian patients. A 10-year follow-up study. *J Periodontol*, v. 68, n. 4, p. 328-34, Apr 1997. ISSN 0022-3492 (Print)

O'GARRA, A.; VIEIRA, P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med*, v. 10, n. 8, p. 801-5, Aug 2004. ISSN 1078-8956 (Print)

OFFENBACHER, S.; BARROS, S. P.; BECK, J. D. Rethinking periodontal inflammation. *J Periodontol*, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1577-84, Aug 2008. ISSN 0022-3492 (Print)

PERRINO, M. A. Diabetes and periodontal disease: an example of an oral/systemic relationship. *N Y State Dent J*, v. 73, n. 5, p. 38-41, Aug-Sep 2007. ISSN 0028-7571 (Print)

PUCHER, J. J.; OTOMO-CORGEL, J. Periodontal disease and systemic health--diabetes. *J Calif Dent Assoc*, v. 30, n. 4, p. 312-6, Apr 2002. ISSN 1043-2256 (Print)

PULITI, M. et al. Regulatory role of interleukin-10 in experimental group B streptococcal arthritis. *Infect Immun*, v. 70, n. 6, p. 2862-8, Jun 2002. ISSN 0019-9567 (Print)

RACHON, D. et al. Serum interleukin-6 levels and bone mineral density at the femoral neck in post-menopausal women with Type 1 diabetes. *Diabet Med*, v. 20, n. 6, p. 475-80, Jun 2003. ISSN 0742-3071 (Print)

RAHMAN, I. et al. Oxidative stress and TNF-alpha induce histone acetylation and NF-kappaB/AP-1 activation in alveolar epithelial cells: potential mechanism in gene transcription in lung inflammation. *Mol Cell Biochem*, v. 234-235, n. 1-2, p. 239-48, May-Jun 2002. ISSN 0300-8177 (Print)

RAMADAN, G.; EL-BEIH, N. M.; ABD EL-GHFFAR, E. A. Modulatory effects of black v. green tea aqueous extract on hyperglycaemia, hyperlipidaemia and liver dysfunction in diabetic and obese rat models. *Br J Nutr*, v. 102, n. 11, p. 1611-9, Dec 2009. ISSN 1475-2662 (Electronic)

RAMAMURTHY, N. S.; ZEBROWSKI, E. J.; GOLUB, L. M. Insulin reversal of alloxan-diabetes induced changes in gingival collagen metabolism of the rat. *J Periodontal Res*, v. 9, n. 3, p. 199-206, 1974. ISSN 0022-3484 (Print)

REYNOLDS, J. J. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*, v. 2, n. 1, p. 70-6, Mar 1996. ISSN 1354-523X (Print)

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J. Antioxidant activities of flavonoids as bioactive components of food. *Biochem Soc Trans*, v. 24, n. 3, p. 790-5, Aug 1996. ISSN 0300-5127 (Print)

RIEMERSMA, R. A. et al. Tea flavonoids and cardiovascular health. *QJM*, v. 94, n. 5, p. 277-82, May 2001. ISSN 1460-2725 (Print)

RIMM, E. B. et al. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. *Ann Intern Med*, v. 125, n. 5, p. 384-9, Sep 1 1996. ISSN 0003-4819 (Print)

ROGHANI, M.; BALUCHNEJADMOJARAD, T. Hypoglycemic and hypolipidemic effect and antioxidant activity of chronic epigallocatechin-gallate in streptozotocin-diabetic rats. *Pathophysiology*, v. 17, n. 1, p. 55-9, Feb 2010. ISSN 0928-4680 (Print)

SABU, M. C.; SMITHA, K.; KUTTAN, R. Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol*, v. 83, n. 1-2, p. 109-16, Nov 2002. ISSN 0378-8741 (Print)

SALVI, G. E.; BECK, J. D.; OFFENBACHER, S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*, v. 3, n. 1, p. 40-50, Jul 1998. ISSN 1553-0841 (Print)

SASTROWIJOTO, S. H. et al. Improved metabolic control, clinical periodontal status and subgingival microbiology in insulin-dependent diabetes mellitus. A prospective study. *J Clin Periodontol*, v. 17, n. 4, p. 233-42, Apr 1990. ISSN 0303-6979 (Print)

SCHAPPI, P.; ZAPPA, U. [The episodic progression of untreated adult periodontitis]. *Parodontol*, v. 1, n. 4, p. 351-62, Nov 1990. ISSN 0937-1532 (Print)

SCHRADER, J. et al. Cytokine-induced osteoprotegerin expression protects pancreatic beta cells through p38 mitogen-activated protein kinase signalling against cell death. *Diabetologia*, v. 50, n. 6, p. 1243-7, Jun 2007. ISSN 0012-186X (Print)

SESSO, H. D. et al. Coffee and tea intake and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol*, v. 149, n. 2, p. 162-7, Jan 15 1999. ISSN 0002-9262 (Print)

SHARMA, U. et al. Nestroft screening tool for beta-thalassemia trait. *Indian Pediatr*, v. 33, n. 9, p. 788-9, Sep 1996. ISSN 0019-6061 (Print)

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*, v. 116, n. 7, p. 1793-801, Jul 2006. ISSN 0021-9738 (Print)

SINGH, R.; SHAW, J.; ZIMMET, P. Epidemiology of childhood type 2 diabetes in the developing world. *Pediatr Diabetes*, v. 5, n. 3, p. 154-68, Sep 2004. ISSN 1399-543X (Print)

SOEJIMA, K.; LANDING, B. H. Osteoporosis in juvenile-onset diabetes mellitus: morphometric and comparative studies. *Pediatr Pathol*, v. 6, n. 2-3, p. 289-99, 1986. ISSN 0277-0938 (Print)

SONG, E. K.; HUR, H.; HAN, M. K. Epigallocatechin gallate prevents autoimmune diabetes induced by multiple low doses of streptozotocin in mice. *Arch Pharm Res*, v. 26, n. 7, p. 559-63, Jul 2003. ISSN 0253-6269 (Print)

Standards of medical care in diabetes--2010. *Diabetes Care*, v. 33 Suppl 1, p. S11-61, Jan ISSN 1935-5548 (Electronic)

Standards of medical care in diabetes--2012. *Diabetes Care*, v. 35 Suppl 1, p. S11-63, Jan ISSN 1935-5548 (Electronic)

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodontal Res*, v. 40, n. 4, p. 287-93, Aug 2005. ISSN 0022-3484 (Print)

TAUBMAN, M. A.; KAWAI, T. Involvement of T-lymphocytes in periodontal disease and in direct and indirect induction of bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 12, n. 2, p. 125-35, 2001. ISSN 1045-4411 (Print)

TAYLOR, G. W. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Ann Periodontol*, v. 6, n. 1, p. 99-112, Dec 2001. ISSN 1553-0841 (Print)

TENG, Y. T. et al. Functional human T-cell immunity and osteoprotegerin ligand control alveolar bone destruction in periodontal infection. *J Clin Invest*, v. 106, n. 6, p. R59-67, Sep 2000. ISSN 0021-9738 (Print)

THAMMASITBOON, K.; GOLDRING, S. R.; BOCH, J. A. Role of macrophages in LPS-induced osteoblast and PDL cell apoptosis. *Bone*, v. 38, n. 6, p. 845-52, Jun 2006. ISSN 8756-3282 (Print)

TSAL, C.; HAYES, C.; TAYLOR, G. W. Glycemic control of type 2 diabetes and severe periodontal disease in the US adult population. *Community Dent Oral Epidemiol*, v. 30, n. 3, p. 182-92, Jun 2002. ISSN 0301-5661 (Print)

TSUBOI, M. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta increase the Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. *J Lab Clin Med*, v. 134, n. 3, p. 222-31, Sep 1999. ISSN 0022-2143 (Print)

TSUNEKI, H. et al. Effect of green tea on blood glucose levels and serum proteomic patterns in diabetic (db/db) mice and on glucose metabolism in healthy humans. *BMC Pharmacol*, v. 4, p. 18, Aug 26 2004. ISSN 1471-2210 (Electronic)

VALI, B.; RAO, L. G.; EL-SOHEMY, A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem*, v. 18, n. 5, p. 341-7, May 2007. ISSN 0955-2863 (Print)

VAN DYKE, T. E.; KORNMAN, K. S. Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *J Periodontol*, v. 79, n. 8 Suppl, p. 1503-7, Aug 2008. ISSN 0022-3492 (Print)

VAN EXEL, E. et al. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes*, v. 51, n. 4, p. 1088-92, Apr 2002. ISSN 0012-1797 (Print)

VAN HET HOF, K. H. et al. Bioavailability of catechins from tea: the effect of milk. *Eur J Clin Nutr*, v. 52, n. 5, p. 356-9, May 1998. ISSN 0954-3007 (Print)

VAN HET HOF, K. H. et al. Plasma and lipoprotein levels of tea catechins following repeated tea consumption. *Proc Soc Exp Biol Med*, v. 220, n. 4, p. 203-9, Apr 1999. ISSN 0037-9727 (Print)

VENZA, I. et al. Proinflammatory gene expression at chronic periodontitis and peri-implantitis sites in patients with or without type 2 diabetes. *J Periodontol*, v. 81, n. 1, p. 99-108, Jan 2010. ISSN 1943-3670 (Electronic)

VERHAEGHE, J. et al. The effects of systemic insulin, insulin-like growth factor-I and growth hormone on bone growth and turnover in spontaneously diabetic BB rats. *J Endocrinol*, v. 134, n. 3, p. 485-92, Sep 1992. ISSN 0022-0795 (Print)

VERSTAPPEN, J.; VON DEN HOFF, J. W. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*, v. 85, n. 12, p. 1074-84, Dec 2006. ISSN 0022-0345 (Print)

VOZAROVA, B. et al. High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes*, v. 51, n. 2, p. 455-61, Feb 2002. ISSN 0012-1797 (Print)

WALTNER-LAW, M. E. et al. Epigallocatechin gallate, a constituent of green tea, represses hepatic glucose production. *J Biol Chem*, v. 277, n. 38, p. 34933-40, Sep 20 2002. ISSN 0021-9258 (Print)

WANG, L.; DU, F.; WANG, X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, v. 133, n. 4, p. 693-703, May 16 2008. ISSN 1097-4172 (Electronic)

WEI, S. et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, v. 115, n. 2, p. 282-90, Feb 2005. ISSN 0021-9738 (Print)

WILD, S. et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, v. 27, n. 5, p. 1047-53, May 2004. ISSN 0149-5992 (Print)

- WILLIAMS, R. C. et al. Flurbiprofen: a potent inhibitor of alveolar bone resorption in beagles. *Science*, v. 227, n. 4687, p. 640-2, Feb 8 1985. ISSN 0036-8075 (Print)
- WOLFRAM, S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr*, v. 26, n. 4, p. 373S-388S, Aug 2007. ISSN 0731-5724 (Print)
- WOLFRAM, S. et al. Epigallocatechin gallate supplementation alleviates diabetes in rodents. *J Nutr*, v. 136, n. 10, p. 2512-8, Oct 2006. ISSN 0022-3166 (Print)
- WONG, C. P. et al. Induction of regulatory T cells by green tea polyphenol EGCG. *Immunol Lett*, v. 139, n. 1-2, p. 7-13, Sep 30 2011. ISSN 1879-0542 (Electronic)
- WU, L. Y. et al. Effect of green tea supplementation on insulin sensitivity in Sprague-Dawley rats. *J Agric Food Chem*, v. 52, n. 3, p. 643-8, Feb 11 2004. ISSN 0021-8561 (Print)
- YANG, C. S.; LANDAU, J. M. Effects of tea consumption on nutrition and health. *J Nutr*, v. 130, n. 10, p. 2409-12, Oct 2000. ISSN 0022-3166 (Print)
- YANG, F. et al. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr*, v. 128, n. 12, p. 2334-40, Dec 1998. ISSN 0022-3166 (Print)
- YUN, J. H. et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res*, v. 39, n. 5, p. 300-7, Oct 2004. ISSN 0022-3484 (Print)
- YUN, J. M.; JIALAL, I.; DEVARAJ, S. Effects of epigallocatechin gallate on regulatory T cell number and function in obese v. lean volunteers. *Br J Nutr*, v. 103, n. 12, p. 1771-7, Jun 2010. ISSN 1475-2662 (Electronic)
- ZAPPA, U. et al. Episodic probing attachment loss in humans: histologic associations. *J Periodontol*, v. 61, n. 7, p. 420-6, Jul 1990. ISSN 0022-3492 (Print)
- ZHU, P. et al. Involvement of RAGE, MAPK and NF-kappaB pathways in AGEs induced MMP-9 activation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*, v. 21, n. 2, p.123-9, Feb 2012. ISSN 1600-0625 (Electronic)
-

Anexos

Anexo 1- Laudo técnico e controle de qualidade da Camelia Sinesis (Chá Verde)

Santosflora
ERVAS, ESPECIARIAS E
EXTRATOS SECOS

Santosflora Comércio de Ervas Ltda.
R Tuiuti, 718/720 - CEP 03081-000
São Paulo - SP - Brasil - Fone: +55 11 6191-8787 - Fax: +55 11 6191-6387

Controle de qualidade Laudo Técnico e Identificativo

E-mail: santosflora@santosflora.com.br
WebSite: www.santosflora.com.br

Ref N/ Pedido: 2007004950

Registro IBAMA: 35867
Licença de Funcionamento:-----
Autorização ANVISA: 1.04.604-1
Registro CRF: 2-02635-0101
Data: 17/7/2007

NOMENCLATURA: CHA VERDE IMPORTADO

Nome científico(gênero/espécie): *Camelia sinensis*
Identificação botânica: *Camelia sinensis*
Parte utilizada: Folha
Manufatura/Val(mês/ano): 05/2006 - 05/2009
Método de secagem: Ao forno

Esterilização: Não Houve
Família: Ternstroemiaceae
Origem: China
Lote: CHVI06/02
Granulometria:

Características organolépticas e identificação macroscópica e microscópica:

Folhas alternas, ovado-agudas, quase lanceoladas, levemente denteadas, glabras, pouco coriáceas, curo-pecioladas, de coloração verde ao verde escuro. Característica do pó: fino e higroscópico de coloração verde ao verde escuro, sabor e odor característicos.

Teste de pureza e integridade:

Umidade: 6,5% (*esp. máx. 12%); Cinzas Totais: 5,9% (*esp. máx. 8%); Cinzas insol ácido: 1,2% (*esp. máx. 5%).

Análise de princípios ativos e/ou marcadores:

Teor para Taninos: 11,0% (*esp. mín. 5%); Teor de polifenóis: 10,0% (especificação: informativo).
Teor de Cafeína: 3,52% (*esp. mín. 2%)

PESQUISA DE CONTAMINANTES MICROBIOLÓGICOS

ANÁLISE	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADOS
Contagem padrão em placas	Máx. 10.000 ufc/g	N.R.
Bolores e leveduras	Máx. 100 ufc/g ou ml	N.R.
Contagem de enterobactérias	Máx. 100 ufc/g ou ml	N.R.
<i>E. coli</i>	Ausência	N.R.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	N.R.
<i>Pseudomonas sp</i>	Ausência	N.R.
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	N.R.

* LIMITES ESTABELECIDOS PELA ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS (WHO/PHARM/98, BHP 1996).
* ARMazenar em local seco e arejado, longe de umidade e calor.
* N.R. REFERE-SE A TESTE NÃO REALIZADO
* ALTERAÇÃO DE COR PODERÁ OCORRER DEVIDO SE TRATAR DE PRODUTO NATURAL
* A VALIDADE SERÁ DESCONSIDERADA CASO O PRODUTO SEJA MANIPULADO OU ARMazenado em locais inadequados

*Especificação experimental interna.

Susana Salvador Cabral Gasparri

Susana Salvador Cabral Gasparri
Farmacêutica Responsável:
CRF/SP: 35.739

Anexo 2- Carta de aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. N° 014/2008

Bauru, 15 de outubro de 2008.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **“dos tipos de patógenos periodontais e da expressão de citocinas no periodonto de ratos diabéticos submetidos ao tratamento com chá-verde”**, de autoria de Gabriela Gennaro, foi enviado ao relator para avaliação.

O parecer do Relator **aprovando** o projeto foi aceito *“ad referendum”* desta Comissão, considerando que não existem infrações éticas.

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis
Docente do Departamento de Ciências Biológicas