UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PAMELLA ANGÉLICA LISBÔA RODRIGUES

**Análise da evolução de parâmetros bioquímicos do sangue e de
alterações dentárias em ratos diabéticos sob a ação terapêutica do
chá-verde**

BAURU
2010

PAMELLA ANGÉLICA LISBÔA RODRIGUES

Análise da evolução de parâmetros bioquímicos do sangue e de alterações dentárias em ratos diabéticos sob a ação terapêutica do chá-verde

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

BAURU
2010

R618 d Rodrigues, Pamella A. L.
Análise da evolução de parâmetros bioquímicos
do sangue e de alterações dentárias em ratos
diabéticos sob a ação terapêutica do chá-verde /
Pamella Angélica Lisbôa Rodrigues. – Bauru, 2010.
93 p.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de
Assis

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 009/2007
Data: 11 de junho de 2007

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por todo o Seu amor e dedicação.

Aos meus pais, pelo apoio e carinho.

À Angélica, pela amizade e auxílio.

À Universidade de São Paulo, na pessoa de sua reitora Profa. Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa de seu diretor Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

Aos professores do Departamento de Histologia, Dr. Rumio Taga, Dr. Gustavo Pompermaier Garlet, e, em especial, Dr. Gerson Francisco de Assis, meu orientador; e a todos os funcionários da universidade, os quais contribuíram para a elaboração desta dissertação.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

*“Então entenderás a justiça, o juízo, a equidade e todas as boas veredas.
Pois quando a sabedoria entrar no teu coração, e o conhecimento for
agradável à tua alma, o bom siso te guardará e a inteligência te conservará;
para te afastar do mau caminho, e do homem que fala coisas perversas; os
que deixam as veredas da retidão, para andarem pelos caminhos escusos.”*

Provérbios

Resumo

O diabetes é um problema de saúde que vem aumentando cada vez mais na população mundial. Suas principais causas estão relacionadas aos comportamentos da vida moderna, como a má alimentação e o sedentarismo. O tratamento extremo da doença é a aplicação de insulina exógena, mas atualmente, busca-se terapias alternativas, menos invasivas e dispendiosas, e mais práticas, como o uso do chá-verde, por seu possível efeito anti-hiperglicêmico. Neste estudo, o objetivo foi analisar os efeitos do chá em alguns parâmetros bioquímicos do sangue e histológicos dos tecidos dentários de ratos diabéticos. Foram utilizados 80 ratos *Wistar*, sendo que 40 constituíram o grupo experimental diabético e 40, o grupo controle. Estes grupos foram subdivididos em dois cada, os tratados com chá-verde e os que não receberam tratamento. Seguiu-se uma terceira subdivisão em grupos de 5 animais ($n=5$) de acordo com os períodos experimentais de 15 dias, 1, 2 e 3 meses. A indução do diabetes foi conseguida pela injeção de 50 mg/kg de estreptozotocina intra-peritoneal em animais com 2 meses de idade. Após 1 semana o diabetes foi diagnosticado por exames clínicos e glicemia maior do que 180 mg/dL. A partir daí, os animais tratados tiveram a ingestão hídrica substituída pela ingestão de chá-verde por 24 h ao dia. O chá-verde foi preparado com 7 g da folha desidratada / L água, em infusão por 10 min. Ao completarem-se os períodos experimentais, o sangue foi colhido, os animais foram mortos e suas mandíbulas extraídas e preparadas para a análise histológica. A avaliação histomorfométrica mostrou uma redução do volume de fibras entre os grupos de 3 meses em relação ao de 15 dias. As lesões cariosas foram verificadas e apresentaram-se nos períodos de 2 e 3 meses da doença, sendo que o chá-verde provavelmente inibiu em 50% as cáries nos animais diabéticos aos 2 meses experimentais. Os níveis glicêmicos sofreram um aumento significativo entre os períodos de 15 dias a 1 mês da doença e, então, mantiveram-se constantes, sendo que o chá-verde parece ter apresentado efeito anti-hiperglicêmicos neste período. Os níveis de uréia aumentaram gradualmente nos animais diabéticos, mas diminuíram aos 3 meses da doença nos animais tratados (diabéticos e controle). Os níveis de albumina mostraram-se menores somente nos diabéticos tratados aos 3 meses. Os níveis de proteínas totais foram menores desde os quinze dias de diabetes nos animais sem chá em relação aos tratados. Os níveis de colesterol acompanharam a curva de crescimento da glicemia através do tempo nos diabéticos sem tratamento. Um achado curioso foi a menor média de colesterol, aos quinze dias, do grupo diabético tratado com chá-verde. Os níveis de triglicérides só foram afetados pela doença ao terceiro mês, quando o maior nível de triglicérides foi o do grupo diabético tratado. No primeiro mês do experimento, os animais diabéticos apresentaram níveis maiores de creatinina

do que os do grupo controle, mas com o chá-verde este aumento foi significativamente menor. Com base nestes dados, podemos inferir que chá-verde, ingerido regularmente por via-oral, pode controlar inicialmente o avanço da cárie dentária, da glicemia e outros compostos sanguíneos, mas com o passar do tempo esse efeito parece diminuir sobre alguns produtos enquanto aumentar sobre outros.

Palavras-chave: Diabetes, Cárie, Chá-verde

Evaluation of blood biochemical substances and dental alterations in diabetic rats under the therapeutic action of the green tea

ABSTRACT

The diabetes is a increasing all around the world. The most probable causes are the problems related to the dietary and the lack of physical exercises. The best treatment known is the insulin, however, nowadays we have some efforts to discovery new types of treatment, chipper and more practical as the green tea. The green tea is wideness know like a anti-hyperglycemic agent. In our study, we aim to analyze the biochemical effects in the blood and the histology of the dental tissues in diabetic rats submitted to the therapy of green tea. For that we used 80 *Wistar* rats divided first in 2 groups, control and diabetic induced by streptozotocin. So on, the groups of 40 we divided again in 2 groups, each one recived water or green tea. Each 5 animals (n=5) of each group were killed according to the periods (15, 30, 60 and 90 days). The induction was achieved by the intraperitoneal injection of 50 mg/kg of weight body of streptozotocin. One week later the diabetes was diagnosed by clinical exams where the glycemic level reached 180 mg/dL. Then, the treatment started and the green tea groups had their liquid dietary of water substituted by green tea 24 h a day. The tea was prepared with 7 g/L of water in 10 min infusion. When the periods were completed the animals were killed and their maxillaries were removed and prepared for the histological analysis. The histomorphometrical evaluation showed a reduction in the fibers volume between the 15 and 90 days experimental periods. The caries injuries were presented in the periods of 60 and 90 days, but only in the diabetical group, and the green tea was able to prevent in 50% the number of caries in 60 days of treatment. The glycemic level was pretty higher in 30 days when compared to the 15 days, after that it didn't present any significant elevation. In this gap of time (15 to 30 days) the green tea showed anti-hyperglycemic and anti-cholesterol effects and also decreased the creatinina level in diabetics. The urea level increased through the time in the diabetic animals, but decreased after 90 days of green tea treatment. The albumin level responded in the same way. Based on this evaluations, we are able to infer that the green tea ingested via-oral is capable of control inicialmente the caries and some biochemical substances in the blood. However, these effects seem to decrease over some levels and increased in others while the time goes on presenting cumulative effects.

Key-words: Diabetes, Caries, Green tea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
3	PROPOSIÇÃO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	69
7	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A importância do diabetes mellitus cresce a cada dia no mundo contemporâneo, devido aos desregrados hábitos alimentares do homem moderno e aos hábitos de vida sedentários. Com isso, a Ciência e a Pesquisa se dedicam cada vez mais ao estudo desta doença buscando soluções que reflitam em prevenção e na melhor qualidade de vida dos portadores.

As causas do diabetes podem divergir, a insulina pode parar de ser secretada (tipo 1) ou as células podem não mais responder ao hormônio (tipo 2). Ambas acarretam o aumento do nível de glicose no sangue, e isto, por sua vez, provoca todos os sintomas e doenças decorrentes do diabetes. Algumas das disfunções conhecidas são: sangüínea, pancreática, renal, glandular, cerebral e bucal. É amplamente conhecida na literatura a relação entre o diabetes e o aumento dos casos de doenças bucais, principalmente a cárie e a doença periodontal (Claudino *et al.*, 2007). Embora não tenham conseqüências fatais para o indivíduo, estas desordens afetam desde os mais simples comportamentos sociais, como o sorrir, até os mais necessários comportamentos fisiológicos, como o mastigar (Atkinson *et al.*, 1994).

Para solucionar as disfunções conseqüentes do diabetes, a insulina tem sido eleita como o medicamento mais utilizado, contudo, rotas alternativas estão sendo pesquisadas para oferecer novos, menos invasivos e mais eficazes tratamentos, como, o chá-verde, extraído da planta *Camellia sinensis*, um agente hipoglicêmico natural (Augustyniak, 2005). O chá-verde entrou em foco, inicialmente, devido ao seu efeito emagrecedor. Posteriormente, estudos relacionaram-no aos efeitos antimicrobiano, hipoglicêmico, e ainda outros. Estes dois principais fatores associados, que seriam eficazes no combate às conseqüências bucais do diabetes e à própria doença, tornaram-se nosso alvo para um trabalho que os relacionasse ao tratamento de ratos diabéticos em curto prazo. Por isso, neste estudo analisamos os efeitos do chá-verde em alguns compostos bioquímicos do sangue e na evolução da cárie dentária sob o microscópio óptico.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

DIABETES

O diabetes mellitus é uma doença metabólica complexa com uma prevalência estimada de 171 milhões de casos dentro da população adulta mundial (Wild *et al.*, 2004) e a estimativa é de que este número alcance 366 milhões até o ano de 2030 (Sicree e Shaw, 2007). Ele está associado a altos índices de morbidade e de mortalidade. O aumento da incidência de diabéticos tipo 1 representa o maior problema de saúde pública em todo o mundo (Diamond, 2006). O diabetes do tipo 2 não é menos preocupante, alguns dos principais fatores, citados por Sicree e Shaw (2007), que contribuem para o seu desenvolvimento são a obesidade e o estilo de vida sedentário, que englobam a maioria da população global.

O diabetes tipo 1 é uma doença crônica mediada por células T, levando a uma desordem autoimune que provoca a destruição de células-beta pancreáticas, as quais, por sua vez, não conseguem mais produzir insulina. O tratamento é feito, comumente, a base de injeções de insulina associadas a rigoroso monitoramento da glicose sanguínea e acomete na maior parte das vezes crianças e adultos jovens (Balfe e Jackson, 2007).

Virally *et al.* (2007) descreve as causas do diabetes tipo 2, cujo desenvolvimento se daria a partir de desordens que concernem a secreção e a sensibilidade à insulina, além da progressiva disfunção e apoptose de células-beta pancreáticas, que agravam o quadro clínico da doença com o passar o tempo. Os motivos da morte destas células podem ser a lipotoxicidade ou a glucotoxicidade. Com isso, a secreção de insulina é reduzida ou ausente. Segundo os autores, estudos que buscam relacionar este tipo de diabetes aos genes ainda são bastante falhos, e o que parece ter real influência na doença são os fatores ambientais, como os já citados, obesidade, alimentação e sedentareidade. Portanto, os mais efetivos tratamentos estariam, além do controle glicêmico (insulina, metamorfina, inibidores de glicosidase-alfa, sulfonilurea, entre outros), em uma dieta equilibrada, atividades físicas e redução da massa corpórea.

CONSEQÜÊNCIAS DA DIABETES

O diabetes é caracterizado pela hiperglicemia e requer toda uma vida de tratamentos, trazendo inúmeras conseqüências aos doentes, as quais variam desde as psicológicas, como os distúrbios alimentares, por exemplo, a bulimia nervosa (8-30% de adolescentes), passando pelos transtornos nos relacionamentos familiares, até as conseqüências fisiológicas mais estudadas (Kakleas *et al.*, 2009). Algumas complicações relacionadas são: nefropatia, neuropatia, retinopatia, infarto agudo do miocárdio e outras doenças cardiovasculares, abortos, complicações fetais, nascimentos prematuros, morte da mãe, infecções e descontrole da doença, sendo que há uma relação bidirecional entre o diabetes e a infecção, tanto a diabetes favorece a ocorrência de infecções, como estas dificultam o controle glicêmico (Díaz-Romero *et al.*, 2005).

Segundo Ainamo *et al.* (1990) e Katz *et al.* (1991), a doença também predispõe a gengivite, doença periodontal, cárie, infecções bucais, entre outras; além de poder agravar estes casos em indivíduos já portadores. Isso acontece em decorrência da hiperglicemia, do aumento da secreção de glicose salivar, da xerostomia, da diminuição de quimiotaxia, aderência e atividade fagocítica dos neutrófilos em pacientes diabéticos (Bagdade *et al.*, 1978; Marhoffer *et al.*, 1992; Oliver *et al.*, 1994).

Díaz-Romero *et al.* (2005) explana a respeito da resposta à infecção, caracterizada pela secreção de glucagon, catecolamina (epinefrina e noraepinefrina), hormônios do crescimento e cortisol. Estes hormônios são antagonistas à atividade da insulina e, conseqüentemente, a produção de glucose pelo fígado, diminuição do uso periférico de glucose, atividade de quebra de lipídios, e degradação de proteínas. Estas ações dão origem à hiperglicemia, a qual torna tão difícil o controle de infecções.

A glucose pode reagir não-enzimaticamente com grupos de amino-proteínas livres e, através de uma série de reações, produzir uma classe de heterógenos, amino-açúcares chamados produtos finais da glicosilação avançada (AGE). Estas modificações e ligações destes produtos contribuem para numerosas complicações

associadas à diabetes, como as cardiovasculares (Asif *et al.*, 2000; Ulrich *et al.*, 2001).

As proteínas são as maiores contribuintes para a formação dos produtos finais da glicosilação avançada e os íons metálicos são responsáveis pelo seu acúmulo (Price *et al.*, 2001). Logo, os anti-oxidantes e os quelantes de metais, como as catequinas presentes no chá-verde, são ótimos candidatos na prevenção destes produtos (Asif *et al.*, 2000; Rahbar *et al.*, 2000; Vasan *et al.*, 2003).

Pessoas com diabetes tipo 1 sofrem, ao menos, dois episódios de hipoglicemia por semana (Pramming *et al.*, 1991; Pedersen-Bjergaard *et al.*, 2003). A definição internacional de hipoglicemia é dada pela habilidade do organismo se auto-recuperar em caso de exposição a baixos níveis de glicose. Por isso, utilizam-se os termos média e severa hipoglicemia. No primeiro, trata-se de episódios em que o organismo é capaz de se auto-recuperar. No segundo, são necessárias intervenção e assistência externa. A hipoglicemia pode ser causada por diversos fatores, entre eles, dose excessiva ou tipo errado de insulina, alimentação insuficiente, diminuição da produção de glicose endógena (após consumo de álcool), aumento na utilização de glicose endógena (durante atividades físicas), aumento de sensibilidade à insulina, diminuição da excreção de insulina por doença renal (Graveling e Frier, 2009).

A importância clínica da hipoglicemia está na possibilidade do desencadeamento de quadros graves, que vão da perda de consciência ao desenvolvimento do coma (Frier, 2009; Cryer, 2009). Na tentativa de evitar este inconveniente da doença, é importante a medição constante (todos os dias ou várias vezes ao dia, dependendo da severidade da doença e do nível glicêmico) (Caplin *et al.*, 2003). Contudo, a hipoglicemia provoca uma série de mudanças fisiológicas, muitas delas tentam proteger o cérebro, que é dependendo de glicose como combustível metabólico, por estímulo da mobilização e produção de glicose (principalmente pelo fígado). Quando o nível de glicose sanguínea cai, em não-diabéticos, acontece a supressão da secreção de insulina endógena e a regulação hormonal é feita principalmente pela liberação de glucagon e epinefrina (Cryer, 2008). As mudanças hemodinâmicas incluem aumento na frequência cardíaca, na

pressão sanguínea sistólica, na contratilidade do miocárdio, da viscosidade sanguínea, promovendo homeostase e coagulação (Wright *et al.*, 2008).

Os sintomas são igualmente importantes na hiperglicemia, conseqüente da ausência de insulina. O aumento do índice glicêmico no sangue está intimamente relacionado à injúria celular, as lesões podem ser por isquemias, diminuindo o fluxo sanguíneo cerebral; alterações hemorreológicas; microcirculatórias; complicações infecciosas; entre outros (Charles e Pereira, 1992).

TERAPIAS CONVENCIONAIS E ALTERNATIVAS

A insulina foi descoberta no Canadá, na década de 20, e marcou a história da medicina como um dos seus mais significantes momentos. A primeira pessoa que recebeu uma injeção de insulina foi Leonard Thompson, de 14 anos, que foi tratado em Toronto e, desde então, ela tem sido amplamente utilizada no tratamento do diabetes (Siminerio e Home, 2009).

A terapia com injeções de insulina, entretanto, é freqüentemente associada a severos episódios hipoglicêmicos, já que a insulina exógena não é capaz de mimetizar exatamente a fisiologia da secreção de insulina e isso tem feito com que cientistas busquem rotas alternativas a esse tipo de tratamento (Vija *et al.*, 2009).

Uma das alternativas é o transplante de ilhotas pancreáticas. Cerca de 6600 pessoas foram recipientes de ilhotas desde 1985 e têm demonstrado resultados parcialmente bem sucedidos na reversão de complicações neurais e renais a longo termo e controle e prevenção de hipoglicemia sem necessidade de administração de insulina exógena. Todavia, as desvantagens incluem complicações hemorrágicas ou trombóticas associadas ao procedimento de transplante, terapia de imunossupressão com seus efeitos colaterais e a dificuldade de se encontrar doadores (Shapiro *et al.*, 2000).

Também se descreve a capacidade de células-tronco embrionárias e secretoras de insulina para a normalização da glicemia em animais diabéticos (Shapiro *et al.*, 2000; Soria *et al.*, 2000). Para Vija *et al.* (2009), a maior perspectiva

para a terapia de diabetes do futuro é promover a regeneração celular, acompanhada pela autoreplicação celular ou diferenciação de células progenitoras com o uso de células tronco. Neste panorama, as células-tronco mesenquimais representam uma interessante opção terapêutica devido às suas propriedades imunomodulatórias e seu potencial de diferenciação em células secretoras de insulina *in vitro* (Vija *et al.*, 2009).

Por outro lado, muitas plantas medicinais têm comprovadamente tido sucesso no tratamento do diabetes (Rajasekharan e Tuli, 1976; Bhaskaran Nair e Santhakumari, 1985; Noy e Kuttan, 1999). Estudos, como o de Kattu *et al.* (2002), relatam sucesso no controle glicêmico de ratos diabéticos tratados com chá-verde. Outros estudos sugerem que o chá-verde seja utilizado como terapia opcional ao tratamento de doenças cardiovasculares advindas da diabetes (Babu *et al.*, 2007).

Em pesquisas realizadas no ano de 2002, pela Aliança de Educação em Dieta Suplementar, verificou-se que os suplementos alimentares e as ervas podem ter um alto impacto na saúde bucal e na nutrição. Aproximadamente, seis em dez adultos fazem uso de suplementos alimentares regularmente, e um em quatro, de ervas, por exemplo, o chá-verde, utilizado como anti-oxidante e pelas suas propriedades anticancerígenas para a cavidade bucal (Hamilton-Miller, 2001). O mesmo autor ainda explana sobre a atividade anti-estreptococal contra *S. mutans* e *S. sobrinus* (bactérias estritamente relacionadas aos casos de cárie) das catequinas deste chá. Para Kaufman *et al.* (2002), muitas ervas e suplementos alimentares podem inclusive apresentar interações adversas com medicamentos. Por outro lado, a Aliança diz haver poucas evidências científicas para o uso de ervas nas manifestações de doenças bucais. Estes são alguns dos motivos pelos quais a Ciência deve investir na busca de mais e maiores evidências neste campo de pesquisa (Hamilton-Miller, 2001).

PARÂMETROS CLÍNICOS

PROTEÍNAS TOTAIS: ALBUMINA, CREATININA E URÉIA

As proteínas são constituídas de aminoácidos, sendo componentes importantes de todas as células, como enzimas, hormônios, entre outros. A proteína total é uma medição aproximada da proteína sérica (albuminas e globulinas) que pode revelar o estado nutricional, doença renal, doença hepática e muitas outras condições. Se a proteína total estiver anormal, outros testes serão realizados para identificar a fração da proteína e, depois, qual proteína específica está anormal. A albumina é a proteína mais abundante do plasma e dos líquidos extracelulares, sendo uma das mais extensamente estudadas. Tem importância preponderante na determinação da pressão do plasma, exercendo função de proteína de transporte (Cálcio, ácidos graxos de cadeia longa, medicamentos, entre outros) (Acuña e Cruz, 2004).

A microalbuminúria definida, conforme consenso já estabelecido, tem sido considerada como um preditor do desenvolvimento da nefropatia diabética. A importância do nível da taxa de excreção de albumina não está apenas relacionada ao diagnóstico da nefropatia incipiente, mas também à possibilidade de intervenções terapêuticas precoces (Garber, 1994; Mogensen e Chistensen, 1984; Picirillo *et al.*, 2002).

Classicamente, a nefropatia diabética é vista como a transição da normoalbuminúria para a insuficiência renal crônica terminal, passando por dois estágios intermediários, marcados pela microalbuminúria e proteinúria clínica. Através da medida da creatinina (produto da degradação da fosfocreatinina) do sangue, é possível verificar-se a taxa de filtração glomerular, que é um parâmetro utilizado em exames médicos para avaliar a função renal, assim como a uréia (é o produto final do metabolismo protéico) (Lopes de Faria, 2006).

De acordo com o estudo de Ribaldo (2008), o uso do chá-verde, em ratos diabéticos, contribuiu para a diminuição do dano renal, evidenciando a importância do mesmo para a doença e suas consequências.

COLESTEROL E TRIGLICÉRIDES

Colesterol é uma lipoproteína, encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais. É um componente essencial das membranas celulares dos mamíferos. Existem vários tipos de lipoproteínas, e elas são classificadas de acordo com a sua densidade. As duas principais lipoproteínas usadas para diagnóstico dos níveis de colesterol são: (a) lipoproteínas de baixa densidade (LDL), acredita-se que são a classe maléfica ao ser humano, por serem capazes de transportar o colesterol do fígado até as células de vários outros tecidos e de ter ações danosas, por exemplo, a formação de placas arteroscleróticas nos vasos sanguíneos, que podem levar ao infarto; (b) lipoproteínas de alta densidade (HDL), são aquelas capazes de absorver os cristais de colesterol, que começam a ser depositados nas paredes arteriais/veias, retardando o processo arterosclerótico, apresentando ações benéficas. Outras gorduras, sintetizadas pela união de três ácidos graxos a um glicerol é o triglicérides, cuja função consiste na fonte e reserva de energia. Contudo, o excesso destas gorduras podem causar inúmeros estragos ao organismo, como o derrame cerebral e o infarto (Ockene *et al.*, 2004).

Segundo Gus *et al.* (2004), a doença cardiovascular é responsável por até 80% das mortes em indivíduos com diabetes. As razões para a manifestação de aterosclerose acelerada em pacientes diabéticos ainda não são completamente compreendidas. Foram sugeridos como mecanismos prováveis os efeitos tóxicos diretos da glicose sobre a vasculatura, a resistência à insulina e a associação da diabetes a outros fatores de risco (Haffner *et al.*, 1998), como cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial sistêmica, obesidade, resistência à insulina, microalbuminúria e anormalidades nos lipídios e lipoproteínas plasmáticas, caracteristicamente elevação de triglicérides e redução de colesterol contido na lipoproteína de alta densidade. A associação desses fatores de risco tem sido denominada síndrome metabólica ou síndrome X (Reaven, 1988).

Existem evidências de que a oxidação de colesterol de pouca densidade, relacionada ao risco de arteriosclerose e doenças cardíacas, seja inibida pelas catequinas presentes no chá-verde (Faria *et al.*, 2006).

CÁRIE E DOENÇA PERIODONTAL

A cárie é tida como uma pandemia, ou seja, um problema de saúde de distribuição global e conseqüências severas. Pesquisas do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, em 2001, afirmam que a cárie é a maior causa de perda dentária no país, sendo que cerca de 20% das crianças, quase 80% dos adultos e 95% dos idosos já experienciaram-na. A doença periodontal é caracterizada pela inflamação e perda óssea, também podendo causar a perda dentária e se dividindo entre quadros de periodontite e de gengivite. Sua evolução relacionada à bactéria causadora e à resposta do hospedeiro, enquanto a cárie é dieta e flúor dependente, sendo responsável por perdas das funções fisiológicas mais primárias, como comer, dormir, falar, além do desconforto causado pela sensação dolorosa experienciada pelos indivíduos portadores da doença. O tratamento da cárie envolve desde restauração dos tecidos lesionados até a extração do órgão por inteiro (Edelstein, 2006).

A partir destes dados, verificamos que um grande desafio aos profissionais de saúde é encontrar estratégias para preveni-la e solucioná-la (Henshaw *et al.*, 2004; Pérez-Olivares *et al.*, 2006). Evelyn *et al.* (2003) sugerem que pesquisa, educação, nutrição e cuidados odontológicos estão intrinsecamente relacionados à saúde bucal, bem como os fatores de risco, ambiente, genética e microorganismos. A alimentação tem sido apontada pela Associação Dietética Americana como um fator crítico tanto para a manifestação e o agravamento das doenças orais, como para a prevenção destas (Tan *et al.*, 2006).

Hertz-Mayfield (2005) e Claudino *et al.* (2007) também relacionam o diabetes à prevalência da doença periodontal. Moore *et al.* (1999) afirmam que quanto maior o tempo do diabetes, maior a severidade da doença periodontal. Por isso, a doença periodontal é considerada uma complicação tanto do diabetes tipo 1 quanto da do

tipo 2. Os produtos-finais da glicosilação avançada formados são responsáveis pela transformação de diversos componentes da matriz extracelular, os quais, por sua vez, afetam a estabilidade do colágeno e a integridade da parede vascular (Tan *et al.*, 2006). Para Tervonen *et al.* (1986), o controle glicêmico da doença implica em melhor saúde periodontal.

Taylor *et al.* (1996) publicou um estudo onde se verifica uma correlação, onde os indivíduos que apresentavam um quadro de doença periodontal tinham um menor controle glicêmico do que os diabéticos sem doença periodontal, indicando que esta também influencia no diabetes. De acordo com Tan *et al.* (2006), isso pode ocorrer devido aos mediadores da inflamação aguda alterarem o status metabólico-endocrinológico, tornando difícil o controle glicêmico e aumentando a resistência à insulina (33%). Portanto, manter o controle glicêmico é imprescindível na determinação de resistência e resposta às infecções.

CHÁ-VERDE (*Camellia sinensis*)

O chá é a bebida mais consumida em todo o mundo (Duffy *et al.*, 2003). Ryu (2006) relaciona positivamente o consumo do chá a diversas doenças, como cardíacas, inflamatórias, diabetes, câncer, entre outras.

O chá-verde, produzido a partir das folhas da planta *Camellia sinensis*, tem sido amplamente estudado devido aos seus benefícios na prevenção e no combate a diversas doenças (Liao *et al.*, 2001; McKay *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2006). Seu uso é tido como benéfico para inúmeras desordens, que vão desde câncer até a perda de peso. Na diabetes, os seus componentes podem agir: potencializando e/ou mimetizando a ação da insulina, interferindo na absorção da glicose no intestino, inibindo a produção de glucose pelo fígado e, conseqüentemente, diminuindo o nível glicêmico (Zaveri, 2006).

O método de secagem das folhas de *C. sinensis* para a produção do chá-verde faz com que as enzimas polifenol-oxidases sejam inativadas, e isso contribui para que os componentes naturais do chá, ou seja, os seus polifenóis sejam conservados (Babu *et al.*, 2007). Entre seus muitos componentes, estão a cafeína

(0,4% a 10%) e os polifenóis (45% a 90%). A maioria dos polifenóis existentes na *C. sinensis* são os flavonóides, também conhecidos como catequinas e, entre estas, as principais são a epicatequina, a epicatequina-3-galato, a epigallocatequina e a epigallocatequina-3-galato (Liao *et al.*, 2001).

As catequinas possuem alto poder anti-oxidante e é um ótimo quelador de metais, isso contribui no combate às desordens conseqüentes da diabetes, por exemplo, as decorrentes do aumento dos produtos finais da glicosilação avançada (Vinson *et al.*, 2005).

Segundo Larsson *et al.* (1981) e Hartz *et al.* (1983), a obesidade, além de ser um problema de saúde mundial, também está fortemente associada à resistência à insulina e, conseqüentemente, como fator de risco no desenvolvimento de diabetes tipo 2. Para Tokimitsu *et al.* (2002), o sobrepeso também pode ser combatido por meio do efeito das catequinas presentes no chá-verde, as quais diminuiriam o nível de lipídeo no plasma. Este resultado pode ser alcançado através da oxidação lipídica, no fígado, e da termogênese causadas pelo chá (Dulloo *et al.*, 2000).

Além disso, o chá-verde também tem mostrado efeitos: anti-diabéticos em modelos de animais por resistência à insulina (Wu *et al.*, 2004), anti-bacteriano (Stapleton *et al.*, 2004) e anti-inflamatório (Dona *et al.*, 2003); sendo, portanto, eleito alvo da nossa pesquisa no teste de tratamento de animais diabéticos e da cárie e doença periodontal.

Estudos *in vitro* têm demonstrado que o chá-verde é capaz de potencializar a atividade da insulina. Contudo, mais estudos *in vivo* são necessários para verificação das alterações na glucose sangüínea e nos níveis de insulina após consumo do chá (Wu *et al.*, 2004).

Fujiki (1999) recomenda o consumo de, ao menos, dez copos de chá-verde (2 g de extrato) todos os dias para uma vida mais longa e saudável.

MODELOS EXPERIMENTAIS ANIMAIS E ESTREPTOZOTOCINA

Modelos experimentais animais são freqüentemente utilizados na pesquisa envolvendo diabetes mellitus. A forma mais utilizada de indução da diabetes nestes animais é a química, pela administração de estreptozotocina ou aloxana. A estreptozotocina pode ser usada como indutora tanto por via endovenosa quanto por via intraperitoneal. A droga foi inicialmente caracterizada como um antimicrobiano de amplo espectro. Estudos posteriores verificaram a sua capacidade de promover diabetes em ratos e cães. Recentemente, o mecanismo de ação da estreptozotocina tem sido mais amplamente estudado e compreendido. Um dos seus componentes é o nitrito, o qual pode acarretar a produção de óxido nítrico, responsável pelo efeito citotóxico (destruição do ácido desoxirribonucléico (DNA)) da droga, principalmente, as células-beta, formadoras das ilhotas pancreáticas. A destruição destas células inibe a produção de insulina e implica na condição diabética do indivíduo (Delfino *et al.*, 2002).

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

Avaliação do efeito anti-hiperglicêmico do chá-verde (*Camellia sinensis*) em ratos diabéticos e a sua possível influência no controle da evolução da cárie, na morfologia do periodonto e sobre os índices de uréia, albumina, creatinina, triglicérides, colesterol e proteínas totais do sangue.

Para isso, foi realizado:

- ✓ Descrição histológica subjetiva da cárie nos dentes da mandíbula
- ✓ Avaliação histomorfométrica do ligamento periodontal do 1º molar
- ✓ Dosagens bioquímicas de compostos do sangue

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP), após parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da FOB (009/2007) quanto às condições experimentais, ao manuseio e à morte dos animais. Foram também mantidos no biotério pelo período experimental, em condições constantes de temperatura, umidade e iluminação, acondicionados em gaiolas de poliuretano (uma gaiola para cada cinco animais), e a ração (Purina), água ou chá foram oferecidos à vontade.

Foram utilizados cem ratos *Wistar* (*Rattus norvegicus*) machos adultos, de aproximadamente 250 g com 2 meses de idade, sendo que o delineamento experimental segue a figura:

Figura 1. Delineamento experimental.

Um número maior de animais foi induzido e separado de acordo com os períodos experimentais como medida preventiva do efeito letal da estreptozotocina, bem como do próprio quadro diabético em alguns animais. Contudo, somente 5 animais foram utilizados para as análises de cada grupo. A seleção destes 5 se deu pela semelhança na resposta entre eles na tentativa da homogeneização dos resultados.

INDUÇÃO DO DIABETES

O diabetes foi induzido quimicamente pela administração intraperitoneal de estreptozotocina, cujo efeito implica na destruição das células β -pancreáticas, responsáveis pela produção natural de insulina. A dose foi única, na concentração de 50 mg/kg do peso corporal.

Análises laboratoriais do diabetes foram realizadas no sétimo dia após a indução, por meio de teste com glicofita e aparelho medidor de glicemia sangüínea (Acu-Check). O grupo experimental compôs-se pelos animais que apresentaram valores da glicemia em jejum (12 horas) acima de 180 mL/dL.

TRATAMENTO DOS ANIMAIS

Para a verificação do efeito do chá-verde (*Camellia sinensis*) sobre os animais, eles foram divididos conforme demonstrado na figura 1. Os grupos que receberam o chá-verde tiveram acesso somente a este em lugar da água.

Conforme instruções do fabricante, o chá foi preparado a partir de 7 g da folha desidratada de *Camellia sinensis* (anexo 1) para cada litro de água fervente. Após a água alcançar a temperatura de ebulição, colocava-se a quantidade da folha em contato com a água e deixava-se em infusão por dez minutos e efetuava-se a separação das folhas e da água por decantação. Este chá era, então, oferecido aos animais e trocado a cada vinte e quatro horas para evitar oxidação (Augustyniak *et al.*, 2005).

A escolha da aquisição de folhas desidratadas de *C. sinensis* se deu com base no atestado do fabricante quanto à composição fitoquímica (anexo 1).

REALIZAÇÃO DOS TESTES E COLETA DAS AMOSTRAS

Para a realização dos testes, os animais foram mantidos em jejum de doze horas. Após este intervalo, dentro dos respectivos períodos experimentais de quinze dias, um mês, dois meses e três meses; os ratos foram mortos pela injeção de uma mistura de analgésico (cloridrato de dopamina) e relaxante muscular (cloridrato de xilazina), na dose de 1 mL (1:1), administrada por via intramuscular. Primeiramente, por punção cardíaca, foi colhido o sangue, a partir do qual foram realizados os testes laboratoriais para determinação da glicemia, uréia, albumina, creatinina, proteínas totais, colesterol e triglicérides. Estas determinações foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Reabilitação Crânio-Facial da Universidade de São Paulo, sob a responsabilidade do farmacêutico-bioquímico Luiz Henrique Marchesano, no aparelho automatizado LABMAX-240 da marca LABTEST utilizando-se Kits específicos para cada substância no plasma sanguíneo fluoretado do rato.

PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As hemimandíbulas dissecadas foram fixadas em formol 10% por sete dias; lavadas em água da torneira por 24 horas, desmineralizadas em EDTA (Titriplex, Merck) por dois a três meses (troca semanal da solução); incluídas em paraplast; cortadas em micrótomo (Leitz-Jung) em secções semi-seriadas (de seis a doze por indivíduo) de 5 µm de espessura; coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). O procedimento foi realizado no Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Para a realização da histomorfometria, adotamos somente a região adjacente à raiz mesial do primeiro molar. Estas regiões foram visualizadas em microscópio (Olympus CH2), no aumento de 40 X e descritas conforme seu aspecto histológico. Portanto, os resultados desta histomorfometria refletem somente as características desta região.

O procedimento foi realizado com o retículo de integração II (Zeiss) e objetiva Leitz 40 X que eram sobrepostos ao ligamento periodontal das regiões cervical, média e apical, da raiz mesial do primeiro molar. Duas secções de cada animal foram analisadas, totalizando cinco campos por corte e dez campos por animal.

A grade de integração II é composta por dez linhas paralelas, divididas igualmente por dez pontos, formando um sistema de cem pontos eqüidistantes que foram sobrepostos à imagem histológica, permitindo a contagem de pontos presentes no retículo que coincidem sobre as estruturas que foram analisadas. Com isso, foi possível obter a quantidade e calcular a porcentagem de cada tipo de estrutura que compunha o universo do ligamento periodontal, conforme a ilustração:

Figura 2. Ilustração da raiz mesial do primeiro molar, região-alvo da análise morfométrica, e imagem do retículo.

CRITÉRIOS PARA A QUANTIFICAÇÃO

1. Fibras colágenas: foram consideradas fibras colágenas todas as fibras presentes no ligamento periodontal, devido ao predomínio deste tipo de fibras e pela coloração (H&E) utilizada, que não permite a distinção dessa e outras fibrilas menores.
2. Fibroblasto: foram contados somente os núcleos, pois é quase impossível, através desta coloração (H&E), diferenciar citoplasma de fibroblastos de fibras colágenas.
3. Vasos sangüíneos.
4. Células inflamatórias
5. Osteoclastos
6. Osteoblastos
7. Matriz Óssea.
8. Outros: outras células presentes no tecido conjuntivo e substância intercelular amorfa do ligamento periodontal.

Embora outras células do tecido conjuntivo e substância intercelular amorfa tenham sido contadas, optamos por apresentar apenas as estruturas que tinham mais destaque e cujos resultados fossem representativos de fenômenos aplicados a esta pesquisa. A porção óssea foi contada apenas para completar a sobreposição do retículo. No final esses pontos não foram considerados para o universo do ligamento periodontal.

PROCEDIMENTO DE FOTOMICROGRAFIA

As fotos representativas das estruturas contadas e do periodonto histomorfometricamente analisado (demonstrados nas figuras 2 e 3) foram obtidas com o auxílio de uma câmera CCD-IRIS RGB (Sony) acoplada a um microscópio Axioskop 2.

RADIOGRAFIAS

As radiografias foram obtidas utilizando-se filmes radiográficos tamanho 2 (Kodak Insight), expostos segundo os parâmetros: 70 kVp, 7 mA, filtração total equivalente a 2,2 mm de Alumínio, distância foco-filme de 30 cm, com feixe de radiação perpendicular às peças cirúrgicas, e o tempo de exposição foi de 0,17 s. As radiografias convencionais foram reveladas, fixadas e lavadas pelo método temperatura-tempo, com soluções novas. As imagens foram observadas e analisadas a olho-nu para avaliação subjetiva da cárie antes da desmineralização e depois de 1 a 2 meses para verificar o grau de desmineralização, seguindo-se, então, o processo de inclusão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados numéricos foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA), para avaliação de possíveis diferenças entre os grupos e, posterior, teste de contraste entre médias (Tukey). O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os testes foram realizados no programa GraphPad Prism (GraphPad Software).

RESULTADOS

RESULTADOS

DESCRIÇÃO HISTOLÓGICA DO TECIDO PERIODONTAL

A região periodontal padronizada para o estudo foi a anterior ao primeiro molar de cada hemimandíbula, sendo analisada uma por animal (Figura 2). Não foi encontrada qualquer diferença histológica entre os animais, entre os períodos, os tratamentos ou a condição metabólica. Essas porções periodontais examinadas eram compostas por fibras, fibroblastos, substância intercelular, matriz óssea, osteoblastos, vasos sanguíneos e outras células de conjuntivo. Não foram encontradas células inflamatórias, osteoclasto ou restos epiteliais de Malassez em quantidades ou porcentagem consideradas diferentes entre os grupos. Embora, em outras regiões do periodonto verificou-se processo inflamatório em consequência da cárie dentária, a partir da coroa (Figura 3).

O tecido conjuntivo denso fibroso estava constituído por fibras colágenas, de coloração rosa clara, e fibroblastos com os núcleos corados em roxo, o qual constituía a maior parte da célula, sendo difícil a visualização do citoplasma, de coloração rosa clara, que se confundia com as fibras colágenas. Por isso, nas contagens histomorfométricas, consideramos como fibroblasto somente o seu núcleo. O espaço intercelular que é constituído por substância intercelular amorfa e líquido intersticial mostrava-se em branco no corte histológico.

O tecido ósseo alveolar mostrou-se corado em rosa claro, estando separado do cemento pelo ligamento periodontal. Os osteoblastos presentes estavam corados em roxo no núcleo e em rosa no citoplasma, sendo este abundante em relação ao núcleo. Tendo em vista o desenho da matriz e a quase ausência de osteoclastos, pode-se dizer que não houve reabsorção evidente do tecido na região morfometricamente examinada.

Os vasos sanguíneos estavam presentes em grande quantidade em todos os tecidos periodontais, no tecido conjuntivo fibroso bem como na matriz óssea.

A estrutura e a organização tecidual do ligamento periodontal da face mesial do primeiro molar e o seu periodonto, não apresentaram diferença entre os períodos ou os tratamentos experimentais, de forma que foi possível a visualização, na região

periapical, das fibras do ligamento periodontal dispostas ao redor da raiz unindo o cimento ao osso alveolar, enquanto que este apresentou superfície lisa e arredondada. As regiões mesial e média da raiz também apresentaram aspectos de normalidade.

Figuras 2: Região periodontal do 1º molar analisado de um rato normal. Observa-se dentina e cimento; fibras e fibroblastos, matriz óssea e vaso sanguíneo. Objetiva de 10X.

Figuras 3: Região coronal e radicular do 2º molar de rato diabético de 2 meses experimentais acometido por cárie. Pode-se verificar na região coronal a colonização por bactérias e destruição do tecido dentinário. Abaixo da coroa, há destruição da região radicular e quadro inflamatório do tecido periodontal. Objetiva de 40X.

CÁRIE

As lesões cariosas foram encontradas apenas em animais diabéticos, estando restrita aos períodos mais longos da doença, a partir de dois meses. Estas lesões estavam presentes tanto nos animais tratados como nos não-tratados:

- ✓ Período Experimental de 2 meses
 - Animais tratados com chá-verde

Dois animais deste grupo (n=5) apresentaram cárie.

- Animais não-tratados

Quatro animais deste grupo (n=5) apresentaram cárie.

- ✓ Período Experimental de 3 meses
 - Animais tratados com chá-verde

Quatro animais deste grupo (n=5) apresentaram cárie.

- Animais não-tratados

Três animais deste grupo (n=5) apresentaram cárie.

A lesão cariiosa atingiu, na maioria das vezes, a coroa do segundo molar, levando à total perda desta região dentária. Em apenas dois casos a cárie atingiu a raiz.

Nas figuras 3 e 4, pode-se verificar a coroa dentária mostrando-se quase totalmente destruída pelo processo carioso que culminou na perda de esmalte (não mostrada), atingindo os tecidos dentinário e pulpar. Este espaço foi então preenchido por restos alimentares, fragmentos de dentina e presença de células inflamatórias. Em casos mais graves, o processo de degradação tecidual atingiu a região radicular, levando também à destruição de cimento, dentina e polpa.

Também pode-se confirmar estes resultados analisando a radiografias das lesões demonstradas nas fotos (Figura 5) obtidas imediatamente antes do processamento histológico, segundo seu período experimental. Pelas radiografias é possível notar a evolução da cárie e um crescimento menor das mandíbulas e dos dentes incisivos dos animais diabéticos.

Figura 4: Lesão cariosa atingindo o 2º molar, causando destruição do esmalte (não mostrado), da dentina (D) e da polpa (P) (onde se encontra restos alimentares (circulados)) e levando à reabsorção periodontal na região interna da raiz (setas). Objetiva de 4X.

Figura 5: Radiografia das hemimandíbulas imediatamente antes do processamento histológico, com destaque para as lesões cariosas (seta branca). As duas superiores correspondem a animais controle e as de baixo aos diabéticos. Observe o menor desenvolvimento da mandíbula e dos incisivos em ratos diabéticos no período experimental de 2 meses.

DADOS ESTATÍSTICOS

Os resultados estatísticos são compostos de duas partes: apresentação dos dados, por meio de gráficos, e descrição das verificações a partir dos testes estatísticos.

Figura 6. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de glicemia (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Glicemia**

○ 15 dias

A média de glicemia (188 mg/dL) nos animais tratados com 15 dias foi 35% menor quando comparados ao grupo experimental sem tratamento (média de 292 mg/dL). Essa diferença foi similar no grupo controle.

○ 1 mês

A média de glicemia dos animais diabéticos com ou sem tratamento é de 465 mg/dL, 43% maior em relação ao grupo de 15 dias, e 67% maior em relação ao grupo controle (média de 152 mg/dL).

○ 2 e 3 meses

Em dois meses, os ratos diabéticos que faziam uso do chá-verde apresentaram o pico de 515 mg/dL, em média, de glicemia, média que não foi diferente dos outros grupos experimentais nestes dois períodos. Já os animais do grupo controle apresentaram média de 168 mg/dL, também similares nos dois períodos.

○ Grupo Controle

Não houve qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos em quaisquer dos períodos de tempo testados.

○ Grupo Experimental

O diabetes provocou a elevação (62%) da glicemia de forma progressiva entre os grupos quinze dias e um mês, contudo, após este período houve estabilização.

Figura 7. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de uréia (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Uréia**

○ 15 dias a 2 meses

O índice de uréia nos animais experimentais com (média de 72,2 mg/dL; 62% maior) e sem tratamento (média de 53,4 mg/dL; 50% maior), era maior em relação aos grupos controle com (média de 24,4 mg/dL) e sem tratamento (média de 26,4 mg/dL). Os resultados seguem este padrão progressivo no período de um e dois meses. Os níveis de uréia, em um mês, são maiores do que os de quinze dias: nos grupos experimentais com tratamento, a média é de 96,8 mg/dL e, sem tratamento, a média é de 98,6 mg/dL. Os grupos controle com tratamento apresentaram média de 38,4 mg/dL e, sem tratamento, média de 32,8 mg/dL. Aos dois meses, os respectivos índices subiram para: 113 mg/dL, 105 mg/dL, 41,2 mg/dL e 35 mg/dL.

○ 3 meses

Aos três meses apresentaram o nível maior de uréia, os animais sem tratamento tinham em média 115 mg/dL, ao contrário, os tratados, de 58,2 mg/dL. Os animais controle com e sem tratamento tiveram os níveis médios de 34,4 mg/dL e 30,8 mg/dL, respectivamente.

○ Grupo Controle

O estudo estatístico do grupo controle mostrou uma relação entre o aumento do nível de uréia no intervalo entre os períodos de quinze dias e um mês, seguido de uma queda, no intervalo de dois a 3 meses.

○ Grupo Experimental

O estudo estatístico do grupo experimental foi semelhante ao do grupo controle, exceto pela redução (48%) dos níveis de uréia entre os grupos tratados de dois (média de 113 mg/dL) e três meses (média de 58,2 mg/dL).

Figura 8. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de albumina (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ Albumina

○ 15 dias

Os níveis de albumina diferiram tão somente entre os grupos diabético sem tratamento (água) (média de 2,96 mg/dL) e controle sem tratamento (água) (média de 3,21 mg/dL), demonstrando que a diabetes fez com que estes níveis fossem menores (10,9%) mesmo em períodos curtos da doença.

○ 1 mês

Houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos diabético com tratamento (média de 2,72 mg/dL) e controle com tratamento (média de 3,00 mg/dL), e também entre diabético com tratamento (chá) e controle sem tratamento (água) (média de 3,05 mg/dL).

○ 2 e 3 meses

Foram encontradas diferenças entre os grupos diabético com (média de 2,65 mg/dL em dois meses e de 2,70 mg/dL em três meses) e sem tratamento (média de 2,47 mg/dL em dois meses e de 2,51 mg/dL em três meses) e controle com tratamento (média de 3,08 mg/dL em dois meses e de 2,96 mg/dL em três meses); entre os diabéticos com e sem tratamento e o controle sem tratamento (média de 2,97 mg/dL em dois meses e 3,09 mg/dL em três meses).

○ Grupo Controle

Os níveis da proteína apresentaram seu pico no período de quinze dias (média de 3,21 mg/dL) e, a partir daí, começaram a decrescer (média de 2,96 mg/dL em três meses), indicando uma redução normal através do tempo (7,8%).

○ Grupo Experimental

Verificamos o mesmo desenho neste gráfico, porém, as médias são diferentes. O pico de albumina em quinze dias é de média 2,96 mg/dL (equivalente ao grupo controle de 3 meses) e o ponto mais baixo está em dois meses (média de 2,47 mg/dL), indiferente estatisticamente aos três meses.

Figura 9. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de proteínas totais (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Proteínas Totais**

○ 15 dias

Aos quinze dias de tratamento, os animais experimentais (média de 7 mg/dL, similar ao grupo controle) mantiveram o nível de proteínas totais, diferentemente dos não tratados (média de 6,4 mg/dL), os quais apresentaram-se 8,5% menores.

○ 1 a 3 meses

Os índices protéicos dos grupos experimentais tratados e não-tratados foram, respectivamente, de 5,78 mg/dL e 6,05 mg/dL; enquanto os dos grupos controle, com e sem tratamento, atingiram igualmente 6,85 mg/dL, cerca de 13% maior. Este padrão se repetiu no período de dois meses, quando os índices dos animais experimentais, com e sem tratamento, foram de: 6,24 mg/dL e 6,43 mg/dL; dos animais controle, com e sem tratamento: 6,93 mg/dL e 7,08 mg/dL. Aos três meses, estes índices foram, respectivamente: 6,27 mg/dL, 6,8 mg/dL, 6,63 mg/dL e 7 mg/dL.

○ Grupo Controle

Não foi encontrada qualquer relação entre os grupos controle com e sem tratamento.

○ Grupo Experimental

Com o passar do tempo, inicialmente os níveis de proteínas totais decresceram, e ao final do estudo, voltaram a subir.

Figura 10. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de colesterol (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Colesterol**

- 15 dias, 2 e 3 meses

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

- 1 mês

O grupo experimental tratado apresentou a menor média entre os grupos, de 61,2 mg/dL, 23,5% menor do que a maior média, 80 mg/dL, do grupo controle sem tratamento. Contudo, não estatisticamente diferente dos outros dois grupos, controle tratado e experimental sem tratamento.

- Grupo Controle

O menor índice de colesterol encontrado foi o de 63,4 mg/dL, no grupo de quinze dias tratado. O maior foi o de 104,4 mg/dL, no grupo de três meses sem tratamento. De acordo com a análise estatística, também percebe-se um aumento gradativo no nível de colesterol.

- Grupo Experimental

A única diferença significativa encontrada neste grupo está entre os subgrupos tratado de um mês e não-tratado de três meses.

Figura 11. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de triglicérides (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Triglicérides**

- 15 dias aos 2 meses

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

- 3 meses

Foi encontrado um maior nível (53%) no grupo experimental tratado (média de 133 mg/dL) em relação aos grupos controle tratado e não-tratado (médias, respectivas, 64 mg/dL e 60 mg/dL).

- Grupos Controle e Experimental

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 12. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão de creatinina (mg/dL) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Creatinina**

- 15 dias

O nível de creatinina foi 21,8% menor nos grupos experimentais com (média de 0,55 mg/dL) do que sem tratamento (média de 0,43 mg/dL), e também de 14,5% entre os grupos controle sem tratamento (média de 0,51 mg/dL) e experimental sem tratamento.

- 1 mês

Neste intervalo de tempo o índice de creatinina é maior nos grupos experimentais (médias de 0,62 mg/dL (tratados) e 0,71 mg/dL (não-tratados)) em relação aos controle (médias de 0,44 mg/dL (tratados) e 0,45 mg/dL (não-tratados)). E 12,6% maior no grupo experimental não-tratado em relação ao tratado.

- 2 e 3 meses

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

- Grupo Controle

A única diferença encontrada neste grupo foi entre os subgrupos não-tratados de quinze dias e o três meses, implicando em redução de 15,7% no nível protéico.

- Grupo Experimental

As médias entre animais tratados e não-tratados de um mesmo período não diferiram entre os animais experimentais. Contudo, verificou-se que o nível de creatinina era 25% maior nos períodos entre quinze dias e um mês, e 24,2% menor entre um mês e dois a três meses.

Figura 13. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão da densidade de volume de fibra (%) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Fibra colágena**

- Grupo Controle

O volume de fibras foi 55,6% menores no tecido periodontal dos animais não-tratados de 3 meses em relação aos não-tratados de 15 dias; e 42,9% menores, nos animais tratados de 3 meses em relação aos não-tratados de 15 dias.

Não houve diferença estatisticamente significante entre os demais grupos.

Figura 14. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão da densidade de volume de fibroblasto (%) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Fibroblasto**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Figura 15. Gráficos a-f, valores referentes à média e ao desvio padrão da densidade de volume de vasos sanguíneos (%) dos ratos diabéticos e controle durante os períodos experimentais de 15 dias a 3 meses. Letras iguais representam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

✓ **Vasos Sanguíneos**

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

DISCUSSÃO

Para facilitar a leitura dividimos a discussão em tópicos conforme a proposição deste trabalho.

HISTOLOGIA DO PERIODONTO E CÁRIE

A histologia do periodonto era normal em todas as hemimandíbulas analisadas, não se encontrando qualquer diferença visual entre os tecidos periodontais na região estabelecida para análise, tais como cemento, tecidos conjuntivo fibroso, ósseo e sanguíneo, ou entre as características das células neles encontradas. Contudo, na região do segundo molar e nas divisas entre este e os dentes vizinhos, foi possível detectar diferentes graus de inflamação juntamente com a presença de cárie.

A análise histomorfométrica apresentou diferença na densidade no volume de fibras, que se mostrou reduzido com o passar do tempo no grupo controle, aproximadamente 50% menor no grupo de 3 meses em relação ao de 15 dias. Esta redução não foi detectada dentre os animais diabéticos até os 3 meses, ao contrário de Claudino *et al.* (2007), quando os ratos diabéticos apresentaram significativa redução no volume das fibras colágenas em relação aos animais não-diabéticos nos períodos longos da doença (6 a 12 meses).

Moore *et al.* (2010) relataram as complicações bucais relacionada ao diabetes, estas podem variar desde xerostomia, gengivite, periodontite, abscessos até lesões graves da língua e mucosa e perda dentária. Para eles, problemas de cárie têm se mostrado aumentados em indivíduos portadores de diabetes, devido ao descontrole glicêmico, disfunções salivares, hábitos alimentares e idade.

Nos animais estudados, até 3 meses experimentais verificou-se que num período de três meses de avaliação somente os ratos diabéticos apresentaram lesões cariosas, e estas também estavam limitadas aos períodos mais longos da doença, de dois e três meses.

No período de dois meses, apenas dois, entre cinco animais tratados com chá-verde, apresentaram lesões cariosas, enquanto que, dentro os animais não tratados, quatro entre cinco apresentaram cárie, evidenciando um possível efeito anti-cárie do chá neste período da doença. Estes dados corroboram com o estudo de Ferrazzano *et al.* (2009), que informam acerca da ação anti-cárie, provinda dos efeitos anti-microbianos do chá.

No intervalo de três meses do diabetes, quatro entre cinco animais diabéticos tratados com chá-verde apresentaram lesões por cárie, e três entre cinco animais não-tratados tinham cárie.

Claudino *et al.* (2007), evidenciaram a presença de cárie desde o primeiro mês da doença e o desenvolvimento de doença periodontal no terceiro mês em ratos diabéticos induzidos pela aloxana. Percebe-se que, em nosso estudo, a cárie foi mais tardia e reduzida em número, e a doença periodontal não estava presente na região alvo do estudo, mas no 2º molar. Isso pode se dar pelo efeito do chá-verde no grupo tratado que apresentou menor índice de cárie aos dois meses e ausência até os 30 dias.

Claudino *et al.* (2007) também demonstrou a relação positiva entre o diabetes e a cárie, sendo que, em períodos maiores do diabetes (6, 9 e 12 meses), todos os animais apresentaram intensa atividade cariogênica em todos os molares, enquanto os animais sadios não tinham evidência de cárie em quaisquer dos períodos.

No presente estudo, a lesão cariosa era evidente no 2º molar, inclusive com presença de restos alimentares, colônias de bactérias, comprometimento das dentinas coronária e radicular, polpa e periodonto periapical em alguns dentes. Mas o 1º molar, até os 3 meses da doença, resistiu ao aparecimento da cárie. Isso se deve provavelmente pela posição mais distal do 2º molar, exercendo um papel mais forte na mastigação e estando também mais susceptível ao acúmulo de alimento e bactérias. Além disso, o diabetes provoca hipossalivação, dificultando a retirada dos restos alimentares e favorecendo o crescimento bacteriano.

GLICEMIA

De acordo com Roghani e Baluchnejadmojarad (2010), as catequinas presentes no chá-verde têm propriedades hipoglicêmicas, o que é confirmado no estudo de Thielecke e Boschmann (2009) sobre controle glicêmico (90-100 mg/dL). No presente estudo, foi possível verificar, aos 15 dias da doença, os efeitos anti-hiperglicêmicos do chá-verde, de forma que no grupo tratado houve uma redução do nível de glicemia em 35%. Com 1 mês de diabetes, os animais de ambos os grupos apresentaram um aumento do índice glicêmico em 43%, sendo a glicemia do grupo diabético 67% maior do que a do grupo controle neste período.

Aos dois meses, os animais diabéticos apresentaram o índice glicêmico mais alto dentre os períodos experimentais (515 mg/dL). Este índice foi três vezes maior do que o dos animais controle do mesmo período, evidenciando que em períodos prolongados da doença, o chá-verde sozinho não foi capaz de normalizar a glicemia ou de qualquer efeito anti-hiperglicêmico.

Entre os animais do grupo controle, em todos os períodos, não foi constatado qualquer diferença significativa no nível de glicemia. Por outro lado, o diabetes elevou em 62% a glicemia, de forma progressiva, entre os grupos 15 dias e 1 mês; de 2 meses em diante, o índice tornou-se constante.

ALBUMINA

Os valores de referência para a albumina são 3,5 a 5 mg/dL, para Pontremoli *et al.* (1998) a microalbuminúria (redução da excreção da albumina) pode estar relacionada a uma série de complicações, entre as quais estão os problemas relacionados a sensibilidade à insulina, além de ser considerada um fator de risco para a nefropatia em diabéticos ou mesmo um marcador de danos renais.

Neste estudo, considerando-se somente os animais do grupo controle, o índice de albumina apresentou-se maior no período de 15 dias, verificando-se uma

redução natural com o passar do tempo (7,8% até três meses). Os desenhos dos gráficos não foram diferentes nos animais diabéticos, contudo, as médias diferiram, partindo-se de um pico (2,96 mg/dL), aos 15 dias, já reduzido, quando comparado ao grupo controle (3,21 mg/dL).

A albumina foi reduzida em 10% nos animais diabéticos, aos 15 dias da doença. Contudo, neste período, não foi verificado qualquer efeito do chá sobre os índices da proteína. Este resultado se estendeu aos grupos de 1 mês da doença. Nos períodos mais longos da doença (2 e 3 meses) o chá pareceu exercer algum efeito sobre a albumina, de tal forma que os índices não foram tão reduzidos nos animais tratados quanto nos não-tratados.

CREATININA

Os valores de referência de creatinina é de 0,6 a 1,3 mg/dL. Já nos 15 primeiros dias de tratamento, observou-se que o nível de creatinina foi reduzido em 21,8% no grupo diabéticos não-tratado em relação ao que recebia chá-verde, e também uma redução de 14,5% no grupo controle sem tratamento, demonstrando um possível efeito do chá no aumento da creatinina tanto na presença quanto na ausência da diabetes. Estes resultados foram inversos aos de Takako *et al.* (2005), que demonstraram conseguir um efeito diminutivo nos níveis de creatinina em ratos diabéticos tratados com polifenóis do chá-verde.

No primeiro mês da doença, o índice de creatinina foi maior nos grupos experimentais, e entre eles, maior no grupo não-tratado (12,6%). Sendo assim, o chá-verde pareceu contribuir na tentativa de normalizar o índice de creatinina nestes animais. Efeito este, que não se repetiu nos demais intervalos de tratamento. Também se pôde verificar que, entre os grupos experimentais, houve uma diminuição de 24,2% no nível de creatinina no intervalo de 1 a 3 meses.

PROTEÍNAS TOTAIS

No primeiro período experimental, não foi constatada qualquer diferença estatística entre os animais experimentais, tratados ou não (referência 6 a 8,5 mg/dL). Enquanto os animais não-diabéticos submetidos ao tratamento com chá-verde apresentaram uma redução no nível de proteínas totais de 8,5%.

Nos períodos de 1 a 3 meses, o chá-verde pareceu não influenciar o índice protéico dos animais do grupo controle. No grupo diabético, verifica-se uma primeira elevação dos níveis, seguida por uma redução e posterior nova elevação.

URÉIA

Embora os taninos, presentes no chá-verde, possam apresentar atividade tóxica, possui também atividades desejáveis, como adstringentes, anti-diarréico, anti-séptico, anti-microbiano, anti-fúngico, hemostáticos, antídotos em caso de intoxicações e propriedades protetoras em casos de injúrias (Monteiro *et al.*, 2005). Estes indícios podem ajudar a explicar o fato do nível de uréia decrescer com o uso prolongado do chá em animais diabéticos, idéia baseada nos estudos de Balaraman e Leena (2005), os quais verificaram que o extrato de chá-verde restaurou o nível de uréia em animais tratados (10 a 40 mg/dL). Takako (2005) também relatou a diminuição do índice de uréia em animais diabéticos tratados com polifenóis do chá-verde.

Comparando-se os grupos de animais controle, verificou-se que dos 15 dias a 1 mês, o índice de uréia aumentou, enquanto daí adiante, diminuiu. Por outro lado, o índice de uréia foi elevado em quase 3 vezes nos animais diabéticos, em relação aos controle, de 15 dias a 2 meses da doença, indiferente ao tratamento com chá-verde. Mas, aos 3 meses da doença, os animais sem tratamento apresentaram um índice de uréia médio de 115 mg/dL e, os tratados, de 58,2 mg/dL, demonstrando

assim o seu efeito na diminuição dos níveis de uréia em animais diabéticos a longo prazo, auxiliando assim na desintoxicação do organismo (Takako, 2005).

COLESTEROL E TRIGLICÉRIDES

Dados científicos já comprovaram que a hipertensão arterial é um dos maiores fatores de risco para muitas doenças cérebro-cardiovasculares e que a ingestão regular de chá-verde é capaz de diminuir a pressão arterial (Yasujima *et al.*, 2003). Em um estudo realizado com 13.916 indivíduos japoneses, com idades entre 40 e 69 anos, o consumo de chá-verde foi associado com a redução dos níveis séricos de colesterol (< 200 mg/dL), quando este consumo perfazia mais de 10 xícaras por dia (Tokunaga *et al.*, 2002). Existem evidências (Wisburger *et al.*, 2002) de que a oxidação de LDL-colesterol, relacionada ao risco de arteriosclerose e doenças cardíacas, seja inibida pelas catequinas presentes no chá-verde.

No estudo de Chanadiri *et al.* (2005), sobre investigação do efeito das catequinas do chá-verde no metabolismo lipídico em ratos que receberam alimentação hiperenergética por 7 semanas, verificou-se que houve diminuição na concentração de colesterol total, triglicerídeos, LDL e de gordura visceral nos animais que receberam as catequinas na quarta semana experimental. Para Renno (2008), o chá-verde auxilia na regulação do metabolismo lipídico, auxiliando no seu controle.

Neste estudo, a única diferença estatística, entre os testes para colesterol, ocorreu entre os grupos dentro de intervalo de 1 mês de tratamento, quando os animais diabéticos tratados com chá apresentaram a menor média entre os grupos, 61,2 mg/dL, 23,5% menor do que a maior média do grupo controle sem tratamento. Além disso, percebe-se que o colesterol aumenta gradativamente em função do tempo, sendo o maior índice encontrado o de 104,4 mg/dL, no grupo de 3 meses sem tratamento. Estes fatos evidenciam a correlação entre o agravamento da

doença e o aumento do colesterol, e também o efeito anti-colesterol do chá no período de 1 mês da doença.

Não houve qualquer diferença estatisticamente significativa, neste estudo, que indicasse alguma correlação entre diabetes ou chá-verde e triglicérides (referência: até 150 mg/dL). Embora, num período prolongado de diabetes, aos 3 meses, foi encontrado um aumento de 53% no nível de triglicérides no grupo experimental tratado em relação aos grupos controle, e não houve diferença estatística entre os grupos diabéticos, tratados ou não, sugerindo que o chá-verde não teve qualquer influência sobre o índice de triglicérides analisados nestes animais durante este período da doença. Estes resultados corroboram com os achados de Batista (2006), que estudou os efeitos do chá-verde sobre os níveis lipídeo-sangüíneos em pacientes portadores de dislipidemias, verificando que a ingestão de chá-verde não influenciou significativamente os níveis de triglicérides.

Também salientamos a dificuldade em encontrarmos trabalhos comparando os índices destes produtos sangüíneos em ratos diabéticos sob estas condições.

Finalmente, o chá que utilizamos é um dos produtos mais vendido nas lojas especializadas estando à disposição da população para o consumo. Como queríamos mimetizar uma situação parecida com o uso rotineiro da população, ele nos atendeu neste aspecto. Além disso, para esse chá o comerciante apresentou um laudo técnico (anexo 1) com as características do produto, com 10% de polifenóis, com as aprovações da ANVISA, IBAMA e com certificação farmacêutica.

Por isso, um primeiro passo foi dado para verificar o potencial do chá tópico e sistêmico. Mais trabalhos com controle mais efetivos de mais variáveis deverão ser realizados para verificar os potenciais benefícios sistêmicos do chá e na cavidade bucal de pacientes diabéticos.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos verificar que:

- O periodonto de sustentação da região analisada apresentou poucas alterações histológicas até o terceiro mês experimental.
- As lesões cariosas foram encontradas em animais diabéticos, sendo que aos dois meses, o dobro dos animais não-tratados apresentaram cárie em relação aos tratados; contudo o número se igualou entre os grupos no terceiro mês experimental.
- O chá-verde teve efeito anti-hiperglicêmico apenas em animais diabéticos no intervalo de 15 dias de tratamento.
- Os níveis de uréia aumentaram gradualmente nos animais diabéticos, sendo que o chá-verde foi capaz de diminuí-lo somente a longo prazo, aos 3 meses da doença.
- A ação verificada no chá-verde sobre os níveis de albumina ocorreu aos três meses de tratamento, onde o índice estava menor nos diabéticos tratados em relação aos que não receberam tratamento.
- Os níveis de proteínas totais foram menores nos períodos iniciais dos animais diabéticos não-tratados em relação aos tratados e aos do grupo controle, mas voltaram a subir no período de três meses.
- Os níveis de colesterol acompanharam a curva de crescimento da glicemia através do tempo. Contudo, um achado curioso foi a menor média de colesterol, aos quinze dias, do grupo diabético tratado com chá-verde.
- Os níveis de triglicérides não foram afetados pela doença ou pelo tratamento durante os dois primeiros meses da doença, mas somente ao terceiro mês, quando foi significativamente maior nos animais doentes.

- Os níveis de creatinina foram reduzidos nos animais diabéticos desde os quinze primeiros dias de experimento. Entretanto, este fato foi revertido, sendo que ao primeiro mês do experimento, os animais diabéticos apresentaram níveis maiores de creatinina do que os do grupo controle; mas com o chá-verde este aumento foi significativamente menor (21%).

A partir destas verificações, pode-se concluir que o chá-verde, ingerido regularmente por via-oral, pode controlar inicialmente o avanço da cárie, da glicemia, da creatinina e do colesterol; enquanto, a longo prazo, tem efeito cumulativo, diminuindo os índices de uréia e de albumina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUÑA, K.; CRUZ, T. Avaliação do Estado Nutricional de Adultos e Idosos e Situação Nutricional da População Brasileira. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 48, n. 3, 2004.

AINAMO, J. *et al.* Rapid periodontal destruction in adult humans with poorly controlled diabetes: a report of two cases. **J Clin Periodontol**, v. 17, p. 22-28, 1990.

ASIF, M. *et al.* An advanced glycation endproduct crosslink breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. **Proc Natl Acad Sci**, v. 97, n. 6, p. 2809-13, 2000.

ATKINSON, J.C. *et al.* salivary gland dysfunction: causes, symptoms, treatment. **J Am Dent Assoc.**, v. 125, p. 409-16, 1994.

AUGUSTYNIAK, A. *et al.* Preventive action of green tea from changes in the liver antioxidant abilities of different aged rats intoxicated with ethanol. **Nutrition**, v. 21, p. 925-32, 2005.

BABU, P. V. A. *et al.* Green tea attenuates diabetes induced Maillard-type fluorescence and collagen cross-linking in the heart of streptozotocin diabetic rats. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 433–440, 2007.

BAGDADE, J. D. *et al.* Impaired granulocyte adherence: a reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. **Diabetes**, v. 27, p. 677-681, 1978.

BHASKARAN NAIR, R. *et al.* Antidiabetic activity of the seed kernal of *Syzygium cumini* Linn. **Ancient Science of Life**, v. 6, p. 80-84, 1985.

BALFE, M.; JACKSON, P. Technologies, diabetes and the student body. **Health & Place**, v. 14, n. 13, p. 775–787, 2007.

CAPLIN N.J *et al.* Subcutaneous glucose sensor values closely parallel blood glucose during insulin-induced hypoglycaemia, **Diabet. Med.**, v. 20, p. 238–241, 2003.

CHARLES, A.; NOVIS, S. A. P. Adverse prognostic influence of diabetes mellitus and hyperglycemia on the evolution of cerebral infarction: a review of its causes with special reference to the genesis of hyperglycemia in the acute phase of encephalic vascular accident. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 50, n. 2, p. 151-155, 1992.

CHENG, T. O. All teas are not equal. The Chinese green tea and cardiovascular health (review). **Int J Cardiol**, v. 108, p. 301–8. 2006.

CLAUDINO, M. *et al.* Alloxan-Induced Diabetes Triggers the Development of Periodontal Disease in Rats. **Plus One**, v. 12, p. 1-6, 2007.

COTE, S. *et al.* Dental caries of refugee children compared with US children. **Pediatrics**, v. 114, p. 733-40, 2004.

CRYER, P.E. The barrier of hypoglycemia in diabetes, **Diabetes**, v. 57, p. 3169–3176, 2008.

CRYER, P.E. Preventing hypoglycaemia: what is the appropriate glucose alert value? **Diabetologia**, v. 52, p. 35–37, 2009.

DELFINO, V. D. A. *et al.* Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração Streptozotocin-induced diabetes mellitus: long-term comparison of two drug administration routes. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

Diabetes Care, v. 28, n. 1, p. 164-176, 2005.

Diagnosis and Management of Dental Caries Throughout Life. **National Institute of Health**, NIH Consensus Statement, v. 18, p. 1-30, 2001.

DÍAZ-ROMERO, R. M. *et al.* Oral Infections and Glycemic Control in Pregnant Type 2 Diabetics. **Archives of Medical Research**, v. 36, p. 42-48, 2005.

DIAMOND, P. G. Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990–1999. **Diabet Med**, v. 23, p. 857–66, 2006

DONA, M. *et al.* Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4335–4341, 2003.

DUFFY, S.J. *et al.* Effects of phenolics on vascular endothelial function. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 14, p. 21–27, 2003.

DULLOO, A. G. *et al.* Green tea and thermogenesis: interactions between catechinpolyphenols, caffeine and sympathetic activity. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 24, p. 252– 258, 2000.

EDLSTEIN, B. L. The Dental Caries Pandemic and Disparities Problem. **Oral Health**, v. 6, n. 2, 2006.

ENRIONE, E. *et al.* Position of the American Dietetic Association: Oral health and nutrition. **The American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, p. 615-625, 2003.

FARIA, F. *et al.* Consumo de *Camellia sinensis* em população de origem oriental e incidência de doenças crônicas. **Rev Nutr**, v.19, n. 2, 2006.

FRIER, B.M. Defining hypoglycaemia: what level has clinical relevance? **Diabetologia**, v. 52, p. 31–34, 2009.

FUJIKI, H. Two stages of cancer prevention with green tea. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 125, p. 589–597, 1999.

GARBER, A. J. Consensus development conference on the diagnosis and management of nephropathy in patients with diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 17, n.1, p. 1357-61, 1994.

GRAVELING, A. J. Hypoglycaemia: An overview. **Primary care diabetes**, v. 3, p. 131–139, 2009.

HAFFNER, S. M. *et al.* Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 339, p. 229-34, 1998.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. Anti-cariogenic properties of tea. **J Med Microbiol.**, v. 50, p. 299-302, 2001.

HARTZ, A. J. *et al.* Relationship of obesity to diabetes: influence of obesity level and body fat distribution. **Prev Med**, v. 12, p. 351-357, 1983.

HERTZ-MAYFIELD, L. J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, n. 6, p. 196–209, 2005.

JOY, K. L. *et al.* Anti-diabetic activity of *Picorrhiza kurroa* extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 167, p. 143-148, 1999.

KAKLEAS, K. *et al.* Psychosocial problems in adolescents with type 1 diabetes mellitus. **Diabetes Metab**, 2009.

KATZ, P. P. *et al.* Epidemiology and prevention of periodontal disease in individuals with diabetes. **Diabetes Care**, v. 14; p. 375–385, 1991.

Referências citadas de acordo com as normas da ABNT

KAUFMAN, D. *et al.* Recent patterns of medication use in the ambulatory adult population of the United States. **JAMA.**, v. 287, p. 337-344, 2002.

LARSSON, B. *et al.* The health consequences of moderate obesity. **Int J Obes**, v. 5, p. 97– 116, 1981.

LIAO, S. *et al.* Green tea: biochemical and biological basis for health benefits. **Vitam Horm**, v. 62, p. 1-94, 2001.

MARHOFFER, W. Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. **Diabetes Care**, v. 15, p. 256-260, 1992.

MCKAY, D. L. *et al.* The role of tea in human health: an update. **J Am Coll Nutr**, v. 21, p. 1-13, 2002.

MENNEN, L. I. *et al.* Tea consumption and cardiovascular risk in the SU.VI.MAX Study: Are life-style factors important? **Nutr Res**, v. 23, p. 879-890, 2003.

MOGENSEN, C. E.; CHISTENSEN, C. K. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. **N Engl J Med**, v. 311, n. 2, p. 89-93, 1984.

MOORE, P. A. *et al.* Type 1 diabetes mellitus and oral health: assessment of periodontal disease. **J Periodontol**, v. 70, p. 409-17, 1999.

MURASE, T. *et al.* Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. **International Journal of Obesity**, v. 26, p. 1459–1464, 2002.

OCKENE, I. S. *et al.* Seasonal variation in serum cholesterol levels: treatment implications and possible mechanisms. **Arch Intern Med**, v. 164, p. 863 – 70, 2004.

OLIVER, R. C. *et al.* Diabetes—a risk factor for periodontitis in adults. **J Periodontol**, v. 65, p. 530-538, 1994.

PEDERSEN-BJERGAARD, U. *et al.* Prediction of severe hypoglycaemia by angiotensin-converting enzyme activity and genotype in type 1 diabetes. **Diabetologia**, v. 46, p. 89–96, 2003.

PICCIRILLO, L. J. *et al.* Microalbuminúria em pacientes diabéticos tipo 1: prevalência e fatores associados. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 6, 2002.

PRAMMING, S., *et al.* Symptomatic hypoglycaemia in 411 type 1 diabetic patients, **Diabet. Med.**, v. 8, p. 217–222, 1991.

PRICE, D. L. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. **J Biol Chem**, v. 276, p. 48967–72, 2001.

PSOTER, W. J. Malnutrition and Dental Caries: A Review of the Literature. **Caries Research**, v. 39, p. 441–447, 2005.

RAHBAR, S. *et al.* Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (part II). **Mol Cell Biol Res Commun**, v. 3, p. 360-6, 2000.

RAJASEKHARAN, S. *et al.* Vijaysar' (*Pterocarpus marsupium*) in the treatment of 'Madhumeha' (*diabetes mellitus*)* a clinical trial. **Journal of Research in Indian Medicine and Yoga Homeopathy**, v. 9, p. 76-78. 1976.

REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595-607, 1988.

RIBALDO, P. D. B. O chá verde (*Camellia sinensis*) atenua a nefropatia através da redução da expressão da subunidade NOX-4 da ND(P)H oxidase no diabetes mellitus experimental. Dissertação de mestrado apresentada a pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a

obtenção de título de Mestre em Clínica Médica, na área de Ciências Básicas, Campinas, 2008.

RYU, O. H. Effects of green tea consumption on inflammation, insulin resistance and pulse wave velocity in type 2 diabetes patients. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 71, p. 356-358, 2006.

SABU, M. C. *et al.* Anti-diabetic activity of green tea polyphenols and their role in reducing oxidative stress in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 109-116, 2002.

SCHAAN, B. D. *et al.* Perfil de risco cardíaco no diabetes mellitus e na glicemia de jejum alterada. **Rev Saúde Pública**, v. 38, n. 4, 2004.

SHAPIRO, A. M. *et al.* Islet transplantation in seven patients with type I diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. **N Engl J Med**, v. 343, p. 230–8, 2000.

SICREE, R.; SHAW, J. Type 2 diabetes: An epidemic or not, and why it is happening? **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 1, p. 75—81, 2007.

SIMINERIO, L. *et al.* Innovation, inspiration, and an integrated approach. **Primary Care Diabetes**, v. 3, p. 63–64, 2009.

SORIA, B. *et al.* Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cell normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. **Diabetes**, v. 49, p. 157-162, 2000.

STAPLETON, P.D. *et al.* Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 5, p. 462–467, 2004.

TAN, W. C. *et al.* Diabetes as a Risk Factor for Periodontal Disease: Current Status and Future Considerations. **Ann Acad Med Singapore**, v. 35, p. 571-81, 2006.

TAYLOR, G. W. *et al.* Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J Periodontol**, v. 67, p. 1085-93, 1996.

TERVONEN, T.; KNUUTTILA, M. Relation of diabetes control to periodontal pocketing and alveolar bone level. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 61, p. 346-9, 1986.

ULRICH, P. *et al.* Protein glycation, diabetes, and aging. **Recent Prog Horm Res**, v. 56, p. 1–21, 2001.

VALLEJOS-SÁNCHEZ, A. A. *et al.* Dental fluorosis in cohorts born before, during and after the national salt fluoridation program in a community in Mexico. **Acta Odontol Scand.**, v. 64, p. 209-13, 2006.

VASAN, S. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein cross links. **Arch Biochem Biophys**, v. 419, p. 89-96, 2003.

VIJA, L. *et al.* Mesenchymal stem cells: Stem cell therapy perspectives for type 1 diabetes. **Diabetes & Metabolism**, v. 35, p. 85, 2009.

VIRALLY, M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. **Diabetes & Metabolism**, 2007.

VINSON, J. A. *et al.* Black and green teas equally inhibit diabetic cataracts in a streptozotocin-induced rat model of diabetes. **J Agric Food Chem**, v. 53, 3710–3, 2005.

ZAVERI, N. T. Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications. **Life Sciences**, v. 78, p. 2073–2080, 2006.

WRIGHT, R. J. *et al.* Vascular disease and diabetes: is hypoglycemia an aggravating factor? **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 24, p. 353–363, 2008.

WILD, S *et al.* Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. **Diabetes Care**, v.27, p. 1047–53, 2004.

WU, L. Y. *et al.* Effect of Green Tea Supplementation on Insulin Sensitivity in Sprague Dawley Rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p. 634-648, 2004.

WU, L. Y. *et al.* Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. **European Journal of Nutrition**, v. 43, n. 2, p. 116–124, 2004.