UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

DANIELA SANTOS PEREIRA

Efeito do antioxidante epigallocatequina-3-galato na perda óssea durante a periodontite induzida por ligadura em ratos. Análise por tomografia microcomputadorizada 2D e 3D e histomorfométrica

BAURU
2015

DANIELA SANTOS PEREIRA

Efeito do antioxidante epigallocatequina-3-galato na perda óssea durante a periodontite induzida por ligadura em ratos. Análise por tomografia microcomputadorizada 2D e 3D e histomorfométrica

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração de Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Versão Corrigida

BAURU

2015

Pereira, Daniela Santos.

P414e Efeito do antioxidante epigallocatequina-3-galato na perda óssea durante a periodontite induzida por ligadura em ratos. Análise por tomografia microcomputadorizada 2D e 3D e histomorfométrica/ Daniela Santos Pereira - Bauru, 2015.
156p. : il.; 31 cm

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

Orientador: Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, em 20 de agosto de 2013.

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 032/2013
Data: 20/08/2013

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Daisy e Sebastião, meu irmão Guilherme e ao meu noivo D'Alessandro. Vocês são minha base.

Agradecimentos

A Deus por me conduzir em seu Amor e permitir que este sonho tenha se tornado realidade. Sou grata por ter colocado em minha vida oportunidades e pessoas maravilhosas. Dando a mim e a todos que estão à minha volta vida, saúde e bênçãos.

Aos meus amados pais Sebastião e Daisy que estão ao meu lado em todos os momentos, com amor e dedicação incondicionais. Agradeço por me educarem com sabedoria, apoiarem meus sonhos e sonhá-los comigo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gerson Francisco de Assis, por ter me acolhido à princípio para um estágio extra-curricular e com seu profissionalismo e carinho em ensinar, ter me envolvido e aceitado para uma iniciação científica que neste momento torna-se o final de um mestrado. Sua paciência, bom humor e disponibilidade são qualidades de um excelente orientador.

Ao meu querido irmão Guilherme que consegue me fazer rir independente da situação. Obrigada por ser tão amoroso, preocupado e dedicado. Eu te amo.

Ao meu amado noivo D'Alessandro, que me acompanha e me apoia desde o início da faculdade. Obrigada por ser tão especial, dedicado, paciente, amoroso e por me compreender nos momentos mais difíceis. Eu te amo.

Aos membros da Banca por aceitarem o convite, por se dedicarem para sugerir melhorias que certamente enriquecerão este trabalho.

À Dra. Tania Mary Cestari, por conscientemente ser mãe, amiga e co-orientadora. Você é muito especial Tania. Obrigada por tudo o que me ensina, todos os dias. E por sua paciência e compromisso com todos nós.

Agradecimento especial ao Prof. Dr. Renato Massaharu Hassunuma. Talvez o grande responsável por este momento em minha vida. Obrigada professor, por ter me apresentado ao Laboratório de Histologia da FOB. Por ter sido um dos melhores professores da minha graduação e ser até hoje presente em minha vida, me convidando para atividades na UNIP - BAURU. Aproveito ainda este espaço para agradecer por ter me indicado para dar aulas nos cursos técnicos da UNIP. Descobri que gosto de ser professora. A experiência tem sido enriquecedora.

Aos professores do laboratório Prof. Dr. Rumio Taga, pelo conhecimento transmitido de maneira humilde e sábia.

Ao Prof. Dr. Gustavo Garlet, pelo apoio e pelos ensinamentos que são passados com naturalidade até mesmo em conversas informais.

À Profa Dra. Camila Rodini, pela disposição em colaborar à qualquer momento.

Às técnicas Daniele Ceolin e Patrícia Germino pela colaboração nos processamentos histológicos. Obrigada também pela amizade, conversas e risadas desde que entrei no laboratório.

À secretária Maria Teresa A.F.M.S. (Tê) por ser tão dedicada e minimalista cuidando de nossos documentos como se fossem seus. Te agradeço por todas as conversas, choros, risadas e opiniões na escolha do meu vestido de noiva.

Aos técnicos do Biotério Central da FOB-USP pelo apoio técnico e amizade.

À Dona Divina que atrai a todos com o aroma inconfundível do seu café.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Histologia da FOB-USP. Ever Elias Mena Laura, amigo de todas as horas, obrigada por ser sábio, por todas as ajudas na parte experimental e nas disciplinas, seu companheirismo foi muito importante. À minha irmã de pesquisa Paula Sanches sempre dedicada e atenciosa, agradeço por todos os

momentos compartilhados e absolutamente todas as demonstrações de carinho e preocupação. Ao Ricardo Arantes, pela amizade, bom humor e por ter me ajudado muito na parte de escaneamento de peças em Araraquara. À Nathália Lopes, Rafael Ortiz pelas conversas, risadas, caminhadas e companheirismo. À Bruna Bighetti, Andreia Espíndola, Carol Rocha, Cláudia Bigueti, Franco Cavalla, Élcia Silveira pessoas especiais que sempre colocaram-se à disposição para ajudar, obrigada pela amizade e companheirismo. Ao Renato Martins, Carlos Eduardo Repeke, Carol Francisconi, Tamiris Vallim, Eliana Lipe, Ana Cláudia Araújo-Pires, Priscila Colavite, Gabi Gennaro, Adriane Togashi, Barbara Mansano e Suelen Paini pelo apoio, amizade e orientações. Ao Rodrigo de Almeida e Talita Ventura, pela amizade, conversas e lutas compartilhadas.

Aos meus primos, Sandra Pirani, Ana Carla Pirani e Leonardo Pirani e sua namorada Aline Martho por todo amor e amizade. E amigas Mayara Borim e Mayara Menezes por serem especiais desde nossas infâncias.

Aos demais amigos do laboratório e da faculdade.

Agradecimentos especiais aos pais do meu noivo Lídia Meister e Fábio Catanzaro e à minha cunhada Sammyra M. Catanzaro e seu namorado Gabriel Brísola por todo o apoio, amizade e companheirismo.

Em fim, meus sinceros agradecimentos, a todos que de alguma forma contribuíram na execução deste trabalho e a todos os amigos que me apoiaram no crescimento profissional.

Agradecimentos Institucionais

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB - USP).

Ao laboratório de Histologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À empresa Taiyo International - E.U.A. (Fabricante) e sua agente no Brasil, R & S Blumos - Brasil (Ingredientes para Alimentos, Bebidas e Suplementos), por fornecerem a Epigallocatequina-3-galato (EGCg).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de Mestrado.

Epígrafe

“Se vi mais longe foi por estar sobre os ombros de gigantes”

Isaac Newton

RESUMO

A doença periodontal é uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns que acometem a população. A grande destruição tecidual observada durante o seu desenvolvimento tem sido atribuída ao processo inflamatório exacerbado e ao desequilíbrio favorável à geração de espécies reativas de oxigênio em relação à capacidade de defesa dos antioxidantes. A epigallocatequina-3-galato (EGCG) obtida da *Camellia sinensis* é uma substância que apresenta potencial antioxidante e anti-inflamatório e, mais recentemente, testes *in vitro* têm mostrado que também possui atividade anti-osteoclastogênica, sendo apontada como uma possível droga para uso terapêutico nas patologias ósseas com excessiva atividade osteoclástica e destruição óssea. O objetivo do trabalho foi verificar morfometricamente em imagens obtidas pela tomografia microcomputadorizada (micro-CT) e cortes histológicos se a administração diária de EGCG reduz o processo inflamatório e a perda óssea alveolar na doença periodontal induzida por ligadura em ratos. O primeiro molar inferior direito de 60 ratos foi amarrado com fio de seda 3.0 e divididos em grupo sem tratamento (GST), grupo tratado com EGCG (GTEGCG) que recebeu diariamente por gavagem 100mg/Kg de EGCG e grupo Sham (GTsalina) que recebeu apenas solução salina. Nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias (n=5 animais/período/grupo) imagens digitais foram obtidas no microtomógrafo sendo submetidos à análise do nível ósseo periodontal (PBL) e da densidade óssea (BV/TV) inter-radicular. Nos cortes longitudinais do M1 corados pela HE foi avaliado o PBL e morfometricamente o percentual e volume de processo inflamatório e tecido ósseo, além do número osteoclastos/cm². Os dados foram submetidos à ANOVA a dois critérios e ao teste de Tukey (p<0,05). O PBL determinado nas imagens microtomográficas e histológicas mostraram que a perda óssea aumenta em todos os grupos durante a fase aguda da doença (0 a 14 dias) e estabiliza na fase crônica (14 dias-21 dias). Em geral, o PBL foi menor no GTEGCG (média de 0,839 mm) comparado aos GST e GTsalina (média de 0,953). Quanto à densidade óssea o BV/TV foi maior no GTEGCG (68%) comparados aos GST (62,06%). O percentual do processo inflamatório e o número de osteoclastos foram menores no GTEGCG, com pico aos 14 dias (3,4% de processo inflamatório e 32 osteoclastos/cm²),

comparados aos GST e GTsalina cujo o pico foi aos 7 dias (média de 8,6% de processo inflamatório e 68 osteoclastos/cm²).

Concluimos que, no modelo de periodontite induzida por ligadura, o tratamento com EGCG diminui o processo inflamatório e a osteoclastogênese e consequentemente a perda óssea e a severidade da doença.

Palavras-chave: Periodontite; *Camellia sinensis*; Catequina; Antioxidantes

ABSTRACT

Effects of epigallocatechin-3-gallate antioxidant in bone loss during ligature-induced periodontitis in rats. Analysis in 2D and 3D microcomputed tomography and histomorphometry

Periodontal disease is currently one of the most common chronic inflammatory diseases affecting the population. The large tissue destruction observed during its development, has been attributed to exacerbated inflammatory process and unbalance response between production of reactive oxygen species and antioxidant defense capacity. Recently, the substance epigallocatechin-3-gallate (EGCG) obtained from *Camellia sinensis* have been associated to antioxidant and anti-inflammatory actions. *In vitro* studies have shown that EGCG has also anti-osteoclastogenic activity suggesting to be a potencial drug for use in therapeutic treatment of bone diseases with excessive osteoclast formation and bone destruction. The aim of this study was to verify morphometrically in micro-ct and histological images whether daily administration of EGCG inhibits/decreases alveolar bone loss in periodontal disease induced in rats by ligature. The lower right first molar of 60 rats was tied with surgical suture thread 3.0. The animals were divided into untreated group (GST), EGCG treated group (GTEGCG) which received 100mg/kg of EGCG by gavage daily and Sham group (GT saline) which received saline solution only. In periods of 0, 7, 14 and 21 days (n=5 animals/period/group) digital images were obtained in microtomography (SkyScan1176) and subjected to analysis of PBL in the mesial, distal, buccal and lingual root and BV/TV bone volume percentage. In the sagittal slides PBL volumetric points and inflammatory process as well as the number of osteoclasts/cm² was analyzed. Data were submitted to two-way ANOVA and Tukey test (p <0.05). PBL determined in microtomographic and histological images showed that bone loss increased and stabilized, respectively, in the all groups acute phase (days 0 to 14) and chronic phase (14 days, 21 days) of the disease. In general, the PBL was lower in GTEGCG (average 0,839 mm) compared to GST and GTsaline (average 0,953). Regarding bone density BV/TV in GTEGCG was higher (68%) compared to GST (62.06%). The percentage of inflammation and the number of osteoclasts was more mild in GTEGCG, reaching peak at 14 days (3.4% inflammatory process and 32 osteoclasts / cm²) compared to

GST and GTsaline whose peak was at 7 days (average 8.6% inflammatory process and 68 osteoclasts / cm²). It was concluded that in the current model of periodontal disease induced by ligature, EGCG treatment decreases inflammatory process, osteoclastogenesis activity, bone loss, and consequently the severity of the disease.

Keywords: Periodontitis; *Camellia sinensis*; Catechin; Antioxidants

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Desenho experimental mostrando a distribuição dos 60 ratos nos 3 grupos (GST, GTEGCG e GTsalina) e a linha do tempo contendo o início do tratamento, inserção da ligadura e os períodos experimentais para avaliação do efeito da EGCG no desenvolvimento da doença periodontal em ratos..... 56
- Figura 2** - Sequência da colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior direito (M1). A) posicionamento do animal na mesa operatória; B) envolvimento do fio de seda entre o primeiro e segundo molar; C) nó sendo feito na região proximal; e D) aspecto final do fio de ligadura no M1..... 57
- Figura 3** - **Microtomógrafo (A)** utilizado para obtenção das imagens; **(B) programa NRecon** utilizado para a reconstrução das imagens..... 59
- Figura 4** - Software DataViewer utilizado para as análises bidimensionais do movimento linear do primeiro molar mostrando o alinhamento Transaxial (A), Coronal (B) e Sagital (C). 60
- Figura 5** - Ilustrações mostrando as mensurações lineares no Software DataViewer das raízes vestibular (Figura A), lingual (Figura B), mesial (Figura C) e distal (Figura D) do M1. 62
- Figura 6** - Software CTAn mostrando a padronização para as mensurações do percentual de volume ósseo na região interradicular do M1: A) seleção da área interradicular a ser analisada (vermelho); B) volume ósseo da região avaliada em 3D mostrando a profundidade (P) de 490 µm; e C). Todos os dados avaliados no programa salientando o percentual de volume ósseo (área circundado em vermelho)..... 63
- Figura 7** - Evolução da periodontite pós-ligadura mostrando o aspecto morfológico dos cortes longitudinais do primeiro molar referente aos escores adotados: A) Escore 0 mostrando tecidos periodontais saudáveis e pequena altura entre a JAC (linha tracejada azul) e COA (linhas tracejadas vermelhas); B) Escore 1 mostrando processo inflamatório limitada a região gengival (seta amarela); C) Escore 2 mostrando recessão gengival e perda óssea tipo horizontal com presença de lesão de furca grau 1 (seta azul); D) Escore 3 mostrando recessão gengival com presença de bolsa periodontal até 2/3 da raiz (seta vermelha) e pequenas áreas de reabsorção dentinária radicular (seta verde), e extensa perda óssea horizontal da crista óssea alveolar e do septo
-
-

	interdental até 2/3 da raiz com lesão de furca grau 2; E) Escore 4 mostrando extensa recessão gengival com perda do epitélio juncional e presença de bolsa periodontal profunda acima dos 2/3 da raiz, além de perda óssea vertical avançada da crista óssea alveolar e septo interdental até a região media da raiz com lesão de furca grau 3 e áreas de reabsorção dentinária radicular.....	66
Figura 8	- Representação dos campos avaliados ao longo de toda a raiz mesial e distal do primeiro molar na região do ligamento periodontal. A) Seta verde apontando para uma das 12 regiões escolhidas para contagem das células na região do ligamento periodontal e osso alveolar. Regiões representadas por quadrados. B) Representação de um dos campos avaliados com graticulo e objetiva de 20x. Seta azul apontando para um dos 100 pontos de intersecção entre as linhas dentro da área retangular (círculo vermelho).....	67
Figura 9	- Determinação do PBL no lado mesial e distal determinada pela distância (d) entre a junção amelo cementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) da raiz mesial do primeiro molar.....	68
Figura 10	- Reconhecimento dos osteoclastos presentes na superfície óssea contendo 2 ou mais núcleos e citoplasma abundante, contendo vacuolização nos cortes corados pelo HE.....	69
Figura 11	- Gráfico da massa corporal (g) antes da ligadura (MCInicial) e ao final de cada período experimental (MCFinal) dos animais dos grupos GST, GTsalina e GTEGCG. ANOVA a dois critérios mostrou não haver diferenças significantes dos pesos iniciais e finais dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais.	74
Figura 12	- Imagens microtomográficas no plano coronal mostrando o nível da junção amelo cementária (linha azul tracejada) e a distância até o nível ósseo periodontal (PBL) no lado vestibular (seta vermelha) e lingual (seta amarela). Notar no período de 0 dias, PBL similar tanto no lado vestibular como lingual em todos os grupos. Observar em todos os grupos o aumento do PBL ao longo dos períodos sendo mais acentuados nos grupos GST e GTsalina principalmente no lado vestibular. Notar também que no lado vestibular tanto a altura como a espessura da cortical óssea reduz até os 14 dias, porém aos 21 dias ocorre a aposição de um tecido ósseo mais radiopaco na face vestibular (seta azul).....	77

-
-
- Figura 13 -** Gráfico do PBL (mm) na região vestibular do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios aponta para o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios diferenças entre períodos ($p= 0,000000$) e grupos ($p= 0,000035$). Barras = DPM. 80
- Figura 14 -** Gráfico do PBL (mm) na região lingual do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios aponta para o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferença entre períodos ($p= 0,000000$). Barras = DPM. 81
- Figura 15 -** Imagens microtomográficas no plano transaxial mostrando o nível da junção amelo cementária (linha azul tracejada) e a distância até o nível ósseo periodontal (PBL) no lado mesial (seta vermelha) e distal (seta amarela). Notar no período de 0 dias, PBL similar tanto no lado mesial como distal em todos os grupos. Observar em todos os grupos o aumento do PBL ao longo dos períodos, sendo mais acentuados nos grupos GST e GTsalina principalmente no lado mesial. Notar também que no lado mesial, tanto a altura como a espessura da cortical óssea, reduzem até os 14 dias. 83
- Figura 16 -** Gráfico do PBL (mm) na região mesial do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios aponta para o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos ($p= 0,000000$) e grupos ($p= 0,001963$). Barras = DPM. 86
- Figura 17 -** Gráfico do PBL (mm) na região distal do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios aponta para o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos ($p= 0,000000$) e grupos ($p= 0,006076$). Barras = DPM. 87
- Figura 18 -** Imagens microtomográficas no plano transaxial mostrando em destaque a área óssea entre as raízes mesial e distal do M1 com ligadura. Notar no período de zero hora denso trabeculado ósseo ocupando quase que a totalidade da área entre as raízes. A partir do 7º dia de ligadura observar a redução da área óssea devido a grande perda óssea na região da furca. Notar maior perda óssea nos grupos GST e
-
-

GTsalina comparado ao GTEGCG em todos os períodos pós ligadura.	89
Figura 19 - Gráfico do percentual de tecido ósseo inter-radicular (%) do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico aponta para a diminuição acentuada do percentual de osso alveolar em todos os grupos até os 7 dias, sendo mais acentuada nos GST e GTsalina comparado ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos (p= 0,000000) e grupos (p= 0,048656). Barras = DPM.	92
Figura 20 - Fotomicrografia do primeiro molar no período de 0 dias (antes da ligadura) dos grupos GTEGCG (A-A ₁), GTsalina (B-B ₁) e GST (C-C ₁) mostrando estruturas dentárias e paradentárias saudáveis com presença do epitélio juncional (seta vermelha) aderido a junção amelocementária e sulcular e das gengivas inserida e marginal (características da região), além de, denso tecido ósseo alveolar envolvendo as raízes ao nível marginal (tracejado amarelo) e sem sinais de processo inflamatório ou reabsorção da crista óssea alveolar (seta preta). Objetivas de 4x e 10x. HE.....	93
Figura 21 - Fotomicrografia do primeiro molar após 7 dias de ligadura. A-A ₁) O M1 do GTEGCG mostra quadro de periodontite leve com recessão gengival (seta vermelha), áreas de reabsorção óssea alveolar (seta preta) e lesão de furca grau 1 ao nível cervical (tracejado amarelo); B-B ₁) M1 do GTsalina exibindo quadro de periodontite moderada com recessão gengival (seta vermelha) e intensa reabsorção óssea alveolar nas regiões mesial e distal (seta preta) podendo ser observada extensa necrose (N) das células e fibras do LP na região mesial até o terço apical da raiz, além de lesão de furca grau 1; C-C ₁) M1 do GST mostrando quadro de periodontite severa com recessão gengival (seta vermelha), formação da bolsa periodontal profunda (tracejado azul) contendo tecido necrosado e infiltrado inflamatório; intensa reabsorção óssea alveolar vertical e horizontal (seta preta) na região mesial e distal associado ao processo inflamatório (Pi) e perda óssea alveolar na região da furca até a altura do terço cervical (tracejado amarelo). Objetivas de 4x e 10x. HE.....	97
Figura 22 - Fotomicrografia do primeiro molar após 14 dias de ligadura. A-A ₁) O M1 do GTEGCG mostra quadro de periodontite leve com observado no período de 7 dias, porém com maior processo inflamatório gengival e perda óssea vertical (seta preta) e pequenas áreas de reabsorção cementária e dentinária na raiz mesial (círculo verde) ao nível cervical; B-B ₁) M1 do GTsalina exibindo periodontite	

moderada similar ao observado aos 7 dias, porém com perda da integridade epitelial (seta vermelha), formação de bolsa periodontal mais profunda (tracejado azul) e maior área de processo inflamatório (Pi) e reabsorção osteoclástica (seta preta), além de maior perda óssea na região de furca (tracejado amarelo); C-C₁) M1 do **GST** mostrando quadro de periodontite severa com formação da bolsa periodontal profunda (tracejado azul) contendo tecido necrosado (N); acentuada perda óssea alveolar na região da furca atingindo em alguns pontos mais de 2/3 da raiz (tracejado amarelo), reabsorção óssea alveolar vertical e horizontal (seta preta) na região mesial e distal associado ao processo inflamatório (Pi), reabsorção cementária e dentinária na raiz distal (círculo verde) e exposição da furca (seta branca); Objetivas de 4x e 10x. HE..... 101

Figura 23 - Fotomicrografia do primeiro molar após 21 dias de ligadura. A-A₁) O M1 do **GTEGCG** mostra quadro de periodontite leve com recessão gengival (seta vermelha), porém com redução do processo inflamatório (Pi) em relação ao período anterior e da reabsorção óssea associado ao reestabelecimento do maior nível ósseo alveolar, principalmente na região de furca (tracejado amarelo) e poucas áreas de reabsorção de cimento e dentina (círculo verde); B-B₁) M1 do **GTsalina** exibe periodontite moderada mas menos acentuada em relação ao período de 14 dias. A bolsa periodontal é profunda, porém a gengiva (seta vermelha) marginal está íntegra e a perda óssea na região de furca é menor em relação ao período anterior, com poucas áreas de reabsorção de cimento e dentina (círculo verde); C-C₁) O M1 do **GST** mostra quadro de periodontite severa com presença de processo inflamatório (Pi) associado a grande áreas de reabsorção da dentina e do cimento (círculo verde). Na região da furca observa-se uma melhora no quadro da doença, com perda óssea inferior aos 2/3 da raiz. Objetivas de 4x e 10x. HE..... 105

Figura 24 - Gráfico dos escores da doença periodontal do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando maior avanço da doença periodontal no GST em relação ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferença entre grupos (0,000) e períodos (p = 0,0065). Letras diferentes P<0,05 (teste Tukey). Barras = DPM..... 108

Figura 25 - Gráfico do PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios aponta para o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA

a dois critérios com diferença entre períodos ($p = 0,000000$). Barras = DPM.....	110
Figura 26 - Gráfico do PBL (mm) no lado distal do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando uma menor evolução da perda óssea em altura no GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($0,019095$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey). Barras = DPM.....	112
Figura 27 - Gráfico da densidade de volume (%) do processo inflamatório percentual do processo inflamatório (%) no M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando um efeito anti-inflamatório da EGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p =$ $0,0000$) e grupos ($0,0000$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.....	114
Figura 28 - Gráfico do percentual de osso alveolar (%) do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando um efeito protetor da EGCG durante a perda óssea alveolar induzida. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($0,011753$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.....	116
Figura 29 - Gráfico do número de osteoclastos por mm^2 do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando maior quantidade de osteoclastos nos períodos de 7 nos GST e GTsalina quando comparados ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p =$ $0,000000$) e grupos ($0,000004$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Escore histopatológico para avaliação da região periodontal	65
Tabela 2	- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da MCInicial e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).....	73
Tabela 3	- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da MCFinal e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).....	74
Tabela 4	- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL (mm) no lado VESTIBULAR do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	79
Tabela 5	- Comparação entre Períodos do PBL (mm) no lado VESTIBULAR do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	79
Tabela 6	- Comparação entre Períodos do PBL lado VESTIBULAR do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	79
Tabela 7	- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL (mm) no lado LINGUAL do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	80
Tabela 8	- Comparação entre Períodos do PBL (mm) no lado LINGUAL do M1 com ligadura pelo <i>post-hoc</i> teste de Tukey.(períodos) Letras diferentes $p < 0,05$. MESIAL do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).....	81
Tabela 9	- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL (mm) no lado	85
Tabela 10	- Comparação entre Períodos do PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura pelo <i>post-hoc</i> teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	85
Tabela 11	- Comparação entre Grupos de PBL (mm) lado mesial do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	85

Tabela 12 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL no lado DISTAL do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	86
Tabela 13 -	Comparação entre Períodos do PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	87
Tabela 14 -	Comparação entre Grupos de PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	87
Tabela 15 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região periodontal do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	91
Tabela 16 -	Comparação entre Períodos da densidade de volume ósseo (%) na região periodontal do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	91
Tabela 17 -	Comparação entre grupos da densidade de tecido ósseo (%) na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	91
Tabela 18 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância dos Escore da doença periodontal do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	107
Tabela 19 -	Comparação entre grupos dos Escore da doença periodontal do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	107
Tabela 20 -	Comparação entre Períodos dos Escore da doença periodontal do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	108
Tabela 21 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	109
Tabela 22 -	Comparação entre Períodos do PBL (µm) no lado MESIAL do M1 com ligadura pelo <i>post-hoc</i> teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$. DISTAL do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	110

Tabela 23 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do PBL (mm) no lado	111
Tabela 24 -	Comparação entre Períodos da distância PBL (mm) no lado DISTAL do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	112
Tabela 25 -	Comparação entre grupos do PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	112
Tabela 26 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) do processo inflamatório na região do periodonto do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	113
Tabela 27 -	Comparação entre Períodos da densidade de volume (%) do processo inflamatório do processo inflamatório na região do periodonto do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos*períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	114
Tabela 28 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região periodontal do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	115
Tabela 29 -	Comparação entre Períodos da densidade de tecido ósseo na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	115
Tabela 30 -	Comparação entre grupos da densidade de tecido ósseo (%) na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos). Letras diferentes $p < 0,05$	116
Tabela 31 -	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do número de osteoclastos por mm^2 do periodonto M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).	117
Tabela 32 -	Comparação entre Períodos e Grupos do número de osteoclastos por mm^2 do periodonto M1 com ligadura pelo teste de Tukey (grupos*períodos). Letras diferentes $p < 0,05$	118

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1	Doença periodontal	33
2.2	Doença periodontal e a reabsorção óssea	36
2.3	Doença periodontal e a saúde pública.....	38
2.4	A doença periodontal e o estresse oxidativo	39
2.5	Agentes antioxidantes – Polifenóis	42
2.6	Modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos	46
3	PROPOSIÇÃO	49
3.1	Geral.....	51
3.2	Específicas	51
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	Animais e delineamento dos grupos experimentais.....	55
4.2	Indução experimental da doença periodontal por ligadura	56
4.3	Dieta e tratamento terapêutico	57
4.3.1	Dieta	57
4.3.2	Tratamento terapêutico.....	58
4.4	Coleta das hemimandíbulas	58
4.5	Obtenção das imagens ao micro-CT	59
4.5.1	Padrões de escaneamento.....	59
4.5.2	Alinhamento das imagens para as análises 2D e 3D	60
4.6	Determinação do nível ósseo periodontal (PBL) e da densidade óssea entre as raízes do M1	61
4.6.1	Determinação do PBL entre as raízes do M1	61
4.6.2	Determinação da densidade óssea entre as raízes mesial e distal do M1 (%)	63
4.7	Processamento histológico.....	64

4.8	Avaliação por escore do processo inflamatório no ligamento periodontal e o quadro de evolução da periodontite induzida por ligadura	64
4.9	Determinação morfométrica da intensidade do processo inflamatório na região do periodonto	67
4.10	Determinação morfométrica do nível ósseo periodontal (PBL) no lado mesial e distal nos cortes histológicos	68
4.11	Determinação do número osteoclastos/mm ²	68
4.12	Análise estatística	69
5	RESULTADOS	71
5.1	Massa corporal (MC)	73
5.2	Avaliações microtomográficas	75
5.2.1	Determinação do nível ósseo periodontal (PBL) entre as raízes do M1	75
5.2.1.1	Lado vestibular e lingual	75
5.2.1.2	Lado mesial e distal	82
5.2.1.3	Densidade de volume de tecido ósseo (%) da região medular entre as raízes do M1	88
5.3	Análise histopatológica	92
5.3.1	M1 que recebeu ligadura no período de 7 dias	95
5.3.2	M1 que recebeu ligadura no período de 14 dias	99
5.3.3	M1 que recebeu ligadura no período de 21 dias	103
5.4	Análise da doença periodontal por escores	107
5.5	Avaliação do nível ósseo periodontal	109
5.5.1	Lado mesial	109
5.5.2	Lado distal	111
5.6	Densidade de volume (%) do processo inflamatório na região do periodonto do M1	113
5.7	Densidade de volume (%) do tecido ósseo na região periodontal do M1	115
5.8	Determinação do número de osteoclastos por mm ² do periodonto	117

6	DISCUSSÃO	119
7	CONCLUSÕES	129
	REFERÊNCIAS	133
	ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A periodontite é atualmente uma das doenças inflamatórias crônicas mais comuns que acometem a população. A incidência e progressão desta doença está relacionada à patógenos, bem como à vários fatores ambientais e ao hospedeiro. No início é assintomática, mas com o agravamento da doença, a inflamação se estende e resulta na destruição dos tecidos de proteção e suporte que compõe o periodonto, levando à reabsorção de osso alveolar, bem como a ocorrência de eritema, edema, sangramento e recessão gengival, mobilidade dentária, supuração de bolsas periodontais e perda dentária (VENKATESWARA, SIRISHA e CHAVA, 2011; CHATTERJEE *et al.*, 2012; NUGALA *et al.*, 2012; PRESHAW *et al.*, 2012).

O agente etiológico primário na periodontite é a presença da bactéria no biofilme subgengival (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994), porém grande parte da destruição dos tecidos periodontais é decorrente da resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro contra o microorganismo e seus produtos (Lamster e Novak, 1992; De Molon *et al.*, 2015).

Neste contexto, os fagócitos desempenham um papel crucial na defesa do hospedeiro contra a instalação da infecção da doença periodontal, através de vários mecanismos seletivos para controlar a invasão bacteriana. Os neutrófilos e macrófagos ativados produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) pela via NADPH-oxidase na presença de estímulos como bactérias, citocinas e outros estímulos inflamatórios (ALOK SHARMA, 2011; MUNIN e EDWARDS-LEVY, 2011; BHARDWAJ e BHARDWAJ, 2012). Os ROS armazenados no interior dos lisossomos dos neutrófilos e macrófagos atuam, destruindo microrganismos fagocitados e células necróticas. Quando os ROS são liberados das células em baixos níveis, podem aumentar a expressão das moléculas de adesão e citocinas, amplificando, deste modo, a cascata de mediadores químicos. Porém, em concentrações elevadas, esses mediadores podem levar ao estresse oxidativo e, assim, à destruição tecidual, sendo considerado por alguns pesquisadores como um dos fatores primários na etiologia de diversas doenças de caráter inflamatório (VALKO *et al.*, 2007).

Por outro lado, o organismo apresenta vários mecanismos antioxidantes, capazes de remover os oxidantes nocivos, logo que estes se formam, ou reparar os danos causados por ROS (ALOK SHARMA, 2011; MUNIN e EDWARDS-LEVY, 2011; BHARDWAJ e BHARDWAJ, 2012). O agravamento da periodontite tem sido atribuído ao desequilíbrio favorável à atividade das ROS em relação à capacidade de defesa antioxidativas (ALOK SHARMA, 2011).

Diante disso, existe um interesse crescente sobre o efeito terapêutico de substâncias naturais antioxidantes como os polifenóis, que são abundantes nos alimentos derivados de frutas, sementes e folhas de plantas, pois podem reforçar a defesa do organismo contra diversas doenças, bem como ajudar a manter um ambiente oral saudável (PETTI e SCULLY, 2009; VENKATESWARA, SIRISHA e CHAVA, 2011; LOLAYEKAR e SHANBHAG, 2012).

Alguns trabalhos tem sugerido que dietas ricas em antioxidantes podem inibir o desenvolvimento e a progressão da doença periodontal em indivíduos expostos ao estresse oxidativo (PETTI e SCULLY, 2009). Uma revisão realizada no Pubmed entre os anos de 1997 e 2013 por PALASKA *et al.*, (2013), confirmou o efeito antibacteriano e anti-inflamatório de polifenóis administrados oralmente, devido à sua característica de modulação da resposta inflamatória do hospedeiro.

Nesse sentido, o chá verde obtido a partir da infusão de folhas da planta *Camelia sinensis* é uma das bebidas mais consumidas do mundo e tem recebido considerável atenção por causa de seus efeitos benéficos sobre a saúde humana. Esta bebida chinesa tradicional tem sido proposta para tratamento e prevenção de dores de cabeça e no corpo, depressão, melhora na digestão, e também como energizante e prolongador da vida. (KUSHIYAMA *et al.*, 2009; VENKATESWARA, SIRISHA e CHAVA, 2011; CHATTERJEE *et al.*, 2012; NUGALA *et al.*, 2012).

Em um estudo publicado no Journal of Periodontology, KUSHIYAMA *et al.*, (2009) analisaram a saúde periodontal de 940 homens e descobriram que aqueles que bebiam chá verde regularmente tinham saúde periodontal superior à aqueles que consumiam menos desse chá. Os pesquisadores observaram também que, para cada xícara de chá verde consumida por dia, houve um decréscimo em todos os três indicadores de doença periodontal: profundidade da bolsa periodontal (PD), perda de inserção clínica do tecido gengival (CAL) e sangramento à sondagem (BOP), o

que significa uma menor predisposição a doença periodontal em indivíduos que bebem regularmente o chá verde. Segundo os autores a capacidade do chá verde em reduzir os sintomas da doença periodontal se deve à presença das catequinas, um potente antioxidante.

Das quatro catequinas encontradas no chá verde, a Epigallocatequina-3-galato (EGCG) é a mais abundante sendo responsável por cerca de 10% de toda a composição deste chá. Estudos apontam que um copo de chá verde (2,5 gramas de folhas de chá verde / 200 ml de água) contém 90 mg de EGCG. O consumo recomendado é de três a quatro xícaras de chá por dia, sendo que o copo médio de chá verde contém cerca de 50-150 mg de polifenóis. (VENKATESWARA, SIRISHA e CHAVA, 2011)

Recentemente, alguns mecanismos dos efeitos preventivos da EGCG na destruição de tecidos têm sido sugeridos. Dentre eles, a EGCG suprimiria produções de algumas citocinas tais como a interleucina (IL)-1-B, fator de necrose tumoral (TNF) e IL-6, os quais por sua vez aceleram a progressão da inflamação e da reabsorção óssea (17–19). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a EGCG é capaz de inibir a formação e diferenciação de osteoclastos (LEE, Y. S. *et al.*, 2010; OKA *et al.*, 2012).

Segundo Shen *et al.* 2013 as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias das catequinas do chá verde são capazes de promover a osteoblastogênese, suprimir a osteoclastogênese e estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos, em vez de adipócitos, modulando as vias de sinalização das quinases (ERK). Nos estudos de LEE *et al.*, (2010) a EGCG preveniu a diferenciação de osteoclastos em cocultura de células da medula óssea com osteoblastos primários após indução com IL1, TNF- α e Vitamina D3 + PGE2, sendo que as células multinucleadas positivas para TRAP diminuíram em uma relação dose dependente ao tratamento com EGCG. Para os autores a EGCG possui um efeito anti-osteoclastogênico, sendo sugerido como uma opção de tratamento para várias patologias ósseas com excessiva formação de osteoclasto e destruição óssea (YUN *et al.*, 2004).

Vale salientar que a maioria dos trabalhos avaliando o efeito da EGCG na osteoclastogênese é recente e foram realizados *in vitro*. Com relação à doença periodontal temos o trabalho de CHO *et al.*, (2013) que avaliaram em ratos o efeito terapêutico da EGCG administrada por via oral, após a instalação da doença

periodontal induzida durante 7 dias de ligadura. Verificaram que a administração sistêmica da EGCG teve um efeito terapêutico na doença periodontal, reduzindo o número de osteoclastos decorrente da diminuição da expressão de citocinas inflamatórias como a TNF e IL-6.

Dado a etiologia multifatorial da periodontite, nosso grupo de pesquisa GENNARO *et al.*, (2015) tem proposto a utilização do chá verde ou da EGCG, como coadjuvante no combate a doença periodontal tanto na sua prevenção como no seu tratamento. Para alcançar esse objetivo, o presente trabalho visa avaliar, por meio de análise microtomográfica e histomorfométrica se a administração diária via oral da EGCG possui efeito benéfico na prevenção ou no combate da perda óssea durante a doença periodontal induzida por ligadura em ratos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Doença Periodontal

O periodonto é um termo usado do grego (perio = “em volta” de e odonto = “dente”) para designar o conjunto de todos os tecidos que suportam e revestem o dente. É uma estrutura dinâmica composta por quatro tipos de tecidos, o cemento, o ligamento periodontal (PDL), o osso alveolar e a gengiva, cada um anatômica, bioquímica e histologicamente diferentes. Porém, eles funcionam como uma estrutura harmônica, sendo os componentes da matriz extracelular dentro de cada compartimento capazes de influenciar as funções celulares das estruturas adjacentes. Portanto, para que o periodonto exerça a função adequada de proteção e sustentação do dente, é necessário que apresente integridade estrutural e interação adequada entre os seus vários tecidos (NANCI, 2008).

Embora a gengiva seja uma área de selamento biológico, é também uma área onde a placa bacteriana/biofilme desafia o hospedeiro. O hospedeiro, contudo, possui mecanismos de defesa que envolvem enzimas, anticorpos e leucócitos polimorfonucleares da saliva e do fluido sulcular, que interagem contra a ação bacteriana, resultando em homeostase do hospedeiro no local. Se esse equilíbrio for levemente alterado, podem ocorrer danos à barreira gengival levando a inflamação. Essa inflamação pode se propagar e envolver áreas mais profundas do periodonto, ocorrendo a destruição do ligamento periodontal, osso alveolar e às vezes até do cemento, processo patológico conhecido como periodontite ou doença periodontal. Na doença periodontal, a reação inflamatória é visível microscópica e clinicamente e representa a reação do hospedeiro à microbiota e seus produtos (SIQUEIRA e TEIXEIRA, 2011; CARRANZA JR. e NEWMAN, 2012).

O termo biofilme é usado para denotar uma comunidade microbiana encapsulada em polímero, que se acumula no dente e protege contra colonização de patógenos exógenos (WILSON, 2001). O biofilme constitui-se de depósitos bacterianos e constituintes salivares, com um crescimento contínuo, sendo considerado a principal causa da instalação e progressão da doença periodontal (SLOTS, 1979; SOCRANSKY *et al.*, 1988; DAHLEN *et al.*, 1992; XIMENEZ-FYVIE, HAFFAJEE e SOCRANSKY, 2000).

A microbiota bacteriana na boca inclui mais de 700 filotipos diferentes, com cerca de 400 espécies encontradas na placa subgengival (AFRICA, PARKER e REDDY, 1985; AAS *et al.*, 2005). A microflora subgengival na periodontite pode abrigar centenas de espécies de bactérias, mas apenas uma pequena parte delas tem sido associada à progressão da doença e considerada etiologicamente importante. A placa subgengival de bolsas periodontais profundas é formada principalmente por bacilos e espiroquetas anaeróbias gram-negativas (HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994; MOORE e MOORE, 1994). Fortes evidências têm implicado *Porphyromonas gingivalis* (KOU *et al.*, 2008) e a *Aggregatibacter actinobacillus* (LOVEGROVE, 2004; DOGAN *et al.*, 2008) na patogênese da periodontite adulta e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* nas formas rapidamente destrutivas de doença periodontal em indivíduos mais jovens. Vale ressaltar que na análise periodontal em homens entre 60-70 anos de idade, foi utilizada para investigar a presença de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) e *Tannerella forsythia* (Tf). A presença de *Porphyromonas gingivalis* na placa subgengival foi significativamente associada com um maior nível de Proteína C-reativa. Além disso, estudos sugerem que a presença de Pg e alta colonização por Aa, Td, e Pi (*Prevotella intermedia*) desempenha um papel importante na periodontite severa (TORRUNGRUANG *et al.*, 2015; WINNING *et al.*, 2015). Além disso, *Bacteroides forsythus* (HUANG *et al.*, 2005), *Prevotella intermedia* (LOVEGROVE, 2004), *Peptostreptococcus micros* (TANABE, BODET e GRENIER, 2007), e *Fusobacterium nucleatum* (SAITO *et al.*, 2008) também tem sido fortemente relacionada à progressão da doença periodontal em adultos. Assim, a saúde do hospedeiro está diretamente ligada à natureza da microflora oral (BEREZOW e DARVEAU, 2011).

Por outro lado, a presença de espécies consideradas patógenos periodontais, em sítios sem evidências de destruição periodontal torna claro que, para a ocorrência da doença periodontal, os patógenos são necessários, mas não suficientes, dependendo também dos fatores genéticos e da resposta imunológica do hospedeiro. No biofilme, as espécies microbianas interagem e, embora algumas possam não ser patógenos periodontais, elas influenciam no processo da doença, favorecendo o seu crescimento ou aumentando o potencial de virulência de outros microrganismos (EZZO e CUTLER, 2003). Portanto, há uma relação simbiótica entre os microrganismos residentes do biofilme, interações entre as diferentes espécies

bacterianas e a resposta imune inflamatória dos hospedeiros (PIHLSTROM, MICHALOWICZ e JOHNSON, 2005; MEYLE e CHAPPLE, 2015).

As primeiras reações do periodonto, frente à presença da placa bacteriana são inflamatórias e imunológicas, com o intuito de proteger da invasão microbiana. É a natureza da resposta inflamatória que define a destruição característica da doença periodontal (GEMMELL *et al.*, 2002; CARDOSO *et al.*, 2008). Dependendo da lesão tecidual causada pelas reações de defesa do hospedeiro, podemos observar: inicialmente uma gengivite, reação inflamatória que fica restrita ao tecido gengival e sem perda de inserção do tecido conjuntivo. Sendo a primeira manifestação inflamatória ao biofilme, ela é reversível com a remoção do biofilme, mas se o biofilme persistir a gengivite se torna crônica. Em alguns indivíduos, a gengivite crônica progride para a periodontite, caracterizada pela migração apical do epitélio juncional, acompanhada por perda de tecido conjuntivo e osso alveolar, apresentando um menor controle da resposta imune, que surge em intervalos episódicos de destruição. Na periodontite a destruição dos tecidos não é reversível, resultando em perda progressiva da fixação da raiz do dente, eventualmente, conduzindo à perda do elemento dentário (ARMITAGE, 1995; KINANE e MARSHALL, 2001).

Embora a periodontite seja culturalmente relacionada à perda do dente ou a “falta de higiene”, outros fatores de risco também podem potencializar o desenvolvimento da doença periodontal como: predisposição genética, maus hábitos de saúde bucal (escovação excessiva ou a limpeza vigorosa com fio dental), fumo, doenças sistêmicas (diabetes), idade avançada, diminuição da imunidade, como ocorre na leucemia, HIV/AIDS e após sessões de quimioterapia, para tratamento de alguns tipos de câncer, má nutrição, medicamentos (fenitoína) e pílulas anticoncepcionais, além de metais pesados a exemplo do chumbo e do bismuto, alterações hormonais relacionadas à gravidez ou a menopausa, abuso de substâncias, como álcool e drogas, dentes desalinhados, pontas de obturação ásperas ou aparelhos mal encaixados ou mal limpas, como aparelhos e dentaduras, que podem irritar as gengivas e elevar o risco da inflamação (KINANE e MARSHALL, 2001).

Devido às várias condições patológicas, que acometem as estruturas do periodonto de proteção e/ou sustentação, foi criado e tem sido continuamente modificado, o sistema de classificação da doença periodontal, de maneira a

satisfazer necessidades clínicas, possibilitando um correto diagnóstico, plano de tratamento e previsão de prognóstico, quanto para uma ordenação dos estudos científicos, já que a falta de padronização dificulta, ou até mesmo impossibilita, a comparação dos resultados obtidos entre estudos. O sistema mais comumente aceito de classificação de doença periodontal é o elaborado pela Academia Americana de Periodontia (AAP). Durante grande parte do século passado, a Academia procurou identificar e classificar as várias formas de doença periodontal. A aceita atualmente é a AAP Classification (WIEBE e PUTNINS, 2000), na qual podemos resumir a classificação em:

I. Doença gengival

- A. induzido pela placa
- B. não induzida pela placa

II. Periodontite crônica

- A. localizada
- B. generalizada

III. Periodontite agressiva

- A. localizada
- B. generalizada

IV. A periodontite como uma manifestação de doença sistêmica

V. Doenças periodontais necrosante

VI. Abscessos do periodonto

VII. A periodontite associada a lesões endodônticas

VIII. Deformidades do desenvolvimento ou adquiridas

2.2 Doença periodontal e a reabsorção óssea

Além da presença dos microrganismos patogênicos, a amplificação e a progressão deste processo são altamente dependentes da resposta imune e inflamatória gerada pelo hospedeiro em resposta às bactérias ou seus produtos (KINANE e LAPPIN, 2001; TENG, 2003; COCHRAN, 2008; LEE *et al.*, 2009; TROMBONE *et al.*, 2009). Em geral, uma reação inflamatória pode desenvolver-se em duas direções, a de amplificação ou de atenuação dependendo da propriedade e

da carga de antígeno bacteriano. Se caminhar para a amplificação, a reação imune inata é seguida por uma resposta imune adaptativa ou específica, levando a perda/degradação tecidual, criando espaço para o processo imunológico. A atenuação da inflamação, por outro lado está associada com a regeneração destes componentes estruturais dos tecidos duros e moles (TERHEYDEN *et al.*, 2014).

Na gengivite e periodontite esses estágios inflamatórios aparecem em diferentes graus de gravidade abrangendo um largo espectro de destruição tecidual (abscesso e ulceração) e cicatrização tecidual. A resposta inicial à infecção bacteriana é uma reação inflamatória local, que é ativada pela resposta imune inata ativa a inata local, resultando na liberação de uma variedade de citocinas e outros mediadores e a propagação da inflamação através dos tecidos gengivais. O fracasso para manutenção desta " fonte de inflamação" no tecido gengival acarreta na propagação da resposta inflamatória em direção ao LP e ao osso alveolar, que é o sinal cardinal da doença periodontal. Os mediadores inflamatórios também atuam sobre o processo de reabsorção óssea alveolar, interferindo na expressão de fatores de diferenciação e ativação de osteoclastos (GARLET *et al.*, 2003; TENG, 2003; GARLET *et al.*, 2005; GARLET *et al.*, 2007; COCHRAN, 2008; GARLET *et al.*, 2008).

A integridade do tecido ósseo depende da manutenção do equilíbrio entre a reabsorção óssea pelos osteoclastos e a formação óssea pelos osteoblastos. O desenvolvimento dos osteoclastos depende de uma molécula fundamental chamada RANKL (ligante do receptor de ativação do fator nuclear Kappa-B) que ao se ligar ao receptor RANK (receptor de ativação do fator nuclear kappa-B), presente em células hematopoiéticas precursoras de osteoclastos, desencadeia uma cascata de sinalização ativando diversos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação e ativação dos pré-osteoclastos (DUCY *et al.*, 1997; JIMI e GHOSH, 2005; TAKAYANAGI, 2005). O RANKL, o RANK e a osteoprotegerina (OPG), receptor "decoy" de RANKL, tem sido identificados como os principais componentes moleculares do sistema de remodelação óssea (TAKAYANAGI, 2005; COCHRAN, 2008; LEIBBRANDT e PENNINGER, 2008).

Nos tecidos periodontais saudáveis ocorre um equilíbrio harmônico entre as moléculas RANK/RANKL e OPG. Porém, durante uma resposta inflamatória, citocinas, quimiocinas e outros mediadores estimulam os osteoblastos periosteais e outros tipos celulares presentes no local, incluindo fibroblastos e linfócitos T e B a produzirem RANKL aumentando os níveis locais desta citocina. Estudos

demonstram que níveis elevados de RANKL são encontrados no fluido gengival e no tecido periodontal em condições de doença, quebrando assim o equilíbrio ósseo entre RANK/RANKL e OPG (BAKER, 2000; TENG *et al.*, 2000; TENG, 2003; MOGI e OTOGOTO, 2007). Como primeiro impacto, a inibição ou bloqueio das moléculas RANK e RANKL sugeriu ser uma solução imediata contra as doenças inflamatórias; porém, estudos têm demonstrado que camundongos geneticamente modificados, que não apresentam a moléculas RANKL ou RANK, desenvolvem uma série de outros problemas, incluindo osteoporose, deficiência na erupção dentária e no desenvolvimento dos órgãos linfóides, mostrando que a anulação completa e sistêmica destas moléculas é um procedimento terapêutico inviável (WONG *et al.*, 1999; RAUNER, SIPOS E PIETSCHMANN, 2007).

2.3 Doença periodontal e a saúde pública

A periodontite é uma doença que afeta mais de 50% da população adulta do mundo e aumenta ainda mais com a idade (PETERSEN e OGAWA, 2012). Periodontite severa é a sexta doença de maior prevalência no ser humano, com uma frequência de 11,2% (KASSEBAUM *et al.*, 2014) e é uma das principais causas de perda de dentes. Ela tem um impacto negativo sobre a saúde oral, que interfere na qualidade de vida das pessoas. Atinge principalmente a fala, nutrição, confiança e bem-estar geral e é independentemente associada com diversas doenças inflamatórias crônicas sistêmicas. Periodontite severa é um problema de saúde pública, uma vez que é altamente prevalente e causa deficiência e desigualdade social (PETERSEN *et al.*, 2005; BAEHNI e TONETTI, 2010). (BOILLOT *et al.*, 2015). Em um estudo com 11.869 homens e mulheres, com idade média de 50 anos de idade, observaram que a má higiene bucal está associada com níveis mais elevados de risco de doença cardiovascular e inflamação de baixo grau. Evidências epidemiológicas significativas suportam uma associação entre infecções bucais, particularmente periodontite e acidente vascular cerebral, especialmente entre homens e indivíduos mais jovens (DE OLIVEIRA, WATT e HAMER, 2010).

No contexto da prevenção, gengivite e periodontite são mais bem vistas como continuas entidades de doença inflamatória crônica por representarem uma perturbação da homeostase hospedeiro-microbiana em indivíduos suscetíveis, que

leva à destruição tecidual irreversível. Remoção regular e periódica do acúmulo de depósitos de bactérias abaixo da margem gengival é um componente chave da prevenção de doenças periodontais induzidos por placa (BAKER, 2000; TENG, 2003).

No artigo de revisão KHOLY, GENCO e VAN DYKE, (2015) apontam para a ligação entre infecções causadas pelas bactérias orais e as doenças cardíacas, e enfatizam o papel da inflamação sob ambas as condições. Por outro lado, os autores salientam que medicamentos utilizados como anti-inflamatórios podem produzir efeitos colaterais cardiovasculares significativos, concluindo que é crucial considerar terapias alternativas. As novas descobertas de vias naturais, que resolvem a inflamação, têm oferecido muitas oportunidades para revelar descobertas para tratamento por meio do desenvolvimento de novos alvos farmacológicos na terapêutica de infecções orais e doenças cardiovasculares.

2.4 A doença periodontal e o estresse oxidativo

O oxigênio é importante para todas as necessidades de energia de mamíferos, sendo utilizado para oxidar moléculas ricas em carbono e hidrogênio (isto é, nutrientes), produzindo diferentes formas de energia necessárias para a vida. A redução do oxigênio molecular na água é acompanhada por uma grande liberação de energia livre, que pode dar origem a radicais livres (FR) e/ou espécies reativas de Oxigênio (ROS). A reatividade e toxicidade associadas a eles contribuem para a patogênese de diversas doenças crônico-degenerativas. Embora a inflamação represente uma resposta do organismo a um estímulo nocivo, querem mecânicos, químicos ou infecciosos, essa resposta provoca lesões/danos de tecidos, no intuito de destruir e eliminar o agente agressor (SIES, 1997; HALLIWELL, 2012).

Como comentado anteriormente, a periodontite na sua fase destrutiva é iniciada e perpetuada por um pequeno grupo de bactérias predominantemente Gram-negativas, anaeróbias ou bactérias microaerofílicas, que colonizam a área subgengival. As bactérias causam a destruição tecidual diretamente por produzirem produtos tóxicos e indiretamente ativando sistemas de defesa do hospedeiro, ou seja, a inflamação. Assim, uma variedade de espécies moleculares aparece nos tecidos inflamados, entre eles FR e de ROS (KORNMAN, PAGE e TONETTI, 1997).

Uma vez que o biofilme está instalado na superfície do dente, inicia-se uma resposta do hospedeiro nos tecidos locais, compreendendo mecanismos inflamatórios agudos e crônicos. A resposta imunitária humoral do hospedeiro é, sem dúvida, um componente desta resposta e parece ser um importante iniciador associado aos sítios destrutivos da doença (EBERSOLE, 2003).

Estudos químicos do fluido gengival crevicular sugerem a importância de uma resposta excessiva de leucócitos polimorfonucleares (PMN), para a formação da placa subgengival nas fases ativas da destruição periodontal no hospedeiro. Além disso, o acumulado de PMN nos locais de infecção e inflamação sugere que a destruição de tecidos periodontais associada com a ação de PMN é o resultado de hiper-reatividade de PMN. Desta forma, os defeitos teciduais podem ser associados com algumas formas rapidamente progressivas de doença periodontal (LAMSTER e NOVAK, 1992).

A primeira fase da ação dos neutrófilos extracelulares envolve a geração de espécies reativas de oxigênio, pela ativação da NADPH-oxidase no complexo de membrana. A ativação NADPH-oxidase gera o ânion superóxido, que é o primeiro radical de oxigênio criado durante o “estresse oxidativo” (COOPER, PALMER e CHAPPLE, 2013).

Reforçando esta hipótese, após um trabalho de revisão de literatura realizado em 2013, DAHIYA *et al.*, (2013) afirmam que a placa dental abriga um número de bactérias patogênicas, que estimulam as células hospedeiras a liberar várias interleucinas e TNF- α . Essas citocinas pró-inflamatórias atraem PMNs, que se opõe a essas bactérias desafiadoras e, assim, são estimulados a produzir enzimas proteolíticas e O₂, levando ao estresse oxidativo. Ao longo dos últimos anos, uma forte evidência surgiu para correlacionar o estresse oxidativo com a patogênese da periodontite. Os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) são essenciais para muitos processos biológicos normais. Em baixas concentrações, estes radicais livres são moléculas de sinalização importantes na regulação de vários processos celulares (CHAPPLE, 1997), podendo estimular o crescimento de fibroblastos e células epiteliais em cultura, mas em concentrações mais elevadas pode resultar em dano ou morte celular (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004) através de uma variedade de mecanismos, tais como danos ao DNA, de lipídeos e de proteínas (BARTOLD, WIEBKIN e THONARD, 1984).

Organismos vivos possuem sistemas antioxidantes finamente regulados para manter os níveis de ROS muito baixos, ou seja, a sua produção e eliminação são bem equilibradas resultando em certo nível de estado estacionário de ROS. No que se refere à prevenção da formação de ROS, mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos têm sido estudados e descritos na literatura. Mecanismos enzimáticos são responsáveis pela neutralização direta de ROS, (BATTINO *et al.*, 1999; KAKLAMANOS e TSALIKIS, 2002; CHAPPLE e MATTHEWS, 2007) e estes mecanismos são constituídos por enzimas primárias responsáveis pela proteção do organismo humano numa tentativa de manter os níveis de ROS em um intervalo normal. Exemplos destas enzimas são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e da glutathione peroxidase (GPx). No entanto, em determinadas circunstâncias, este equilíbrio pode ser perturbado (LUSHCHAK, 2014).

Vale ressaltar que alguns estudos em pacientes com periodontite mostram que os níveis oxidativos são aumentados, quando comparados com indivíduos saudáveis periodontalmente (TAKANE *et al.*, 2002; SEZER, CICEK e CANAKCI, 2012). No entanto, os níveis de antioxidantes do próprio corpo são significativamente menores em pacientes com periodontite, quando comparados com os indivíduos adultos saudáveis (CHAPPLE *et al.*, 2002; BROCK *et al.*, 2004; ABOU SULAIMAN e SHEHADEH, 2010). Estudos têm demonstrado que pacientes com periodontite crônica ao serem tratados com sucesso pela remoção do biofilme supra e subgengival por raspagem e alisamento radicular combinado com a manutenção adequada de suporte periodontal apresentam diminuição do estado oxidante no fluido gengival e elevam os níveis de antioxidantes (ABOU SULAIMAN e SHEHADEH, 2010; BOSTANCI *et al.*, 2014). Portanto, nas doenças periodontais parece haver uma correlação entre a redução dos níveis de antioxidantes e o aumento dos danos oxidativos no ambiente bucal. Assim, com a remoção da placa bacteriana, que serve como tratamento de periodontite, tratamentos adjuvantes com quimioterápicos locais e sistêmicos, antioxidantes e micronutrientes são defendidos para melhorar os efeitos de terapia periodontal (BADER, 2010; VAN DER VELDEN, KUZMANOVA e CHAPPLE, 2011).

Além disso, o organismo também utiliza antioxidantes não enzimáticos, que são mecanismos secundários para neutralizar ROS (KAKLAMANOS e TSALIKIS, 2002; PRIOR, 2003; CHAPPLE e MATTHEWS, 2007; PLATEL e SRINIVASAN, 2015). Geralmente, estes tipos de antioxidantes são obtidos exogenamente,

principalmente por uma dieta equilibrada, que inclui uma variedade de frutas e legumes, como amoras, morangos, uvas (ZHAO *et al.*, 2015), abacate (KOPEC *et al.*, 2014), tomates (CHANDRA *et al.*, 2012), espinafre (BOHLOOLI *et al.*, 2015) e cenouras (PLATEL e SRINIVASAN, 2015). Os antioxidantes não enzimáticos são representados por vitaminas lipossolúveis (vitamina A, vitamina e-tocoferol e b-caroteno), vitaminas solúveis em água (vitamina C e complexos de vitamina B), oligoelementos (zinco e magnésio) e bioflavonóides (derivados de plantas) (MUNIZ *et al.*, 2015).

Existe ainda a ativação de vias da proteína-1 e fator nuclear-kB no fibroblasto gengival via CD14 e TLR-4 (toll like receptor) na presença de lipopolissacarídeos (LPS) e do DNA destas bactérias, provocando e participando da produção de citocinas inflamatórias. O que também leva ao recrutamento e ativação de PMN hiper-sensíveis e, assim, acelera a produção de ROS. Por outro lado, o aparecimento de NF-kB e AP-1 provoca a ativação dos osteoclastos e aumentos na concentração de MMP (metaloproteases de matriz), que resulta em dano tecidual. A destruição dos tecidos periodontais leva ao excesso de produção de peróxidos lipídicos, mediadores inflamatórios e proteínas oxidadas. Estes produtos ativam mais macrófagos, neutrófilos e fibroblastos gerando mais ROS. Em resumo, DAHIYA *et al.*, (2013) concluem que, na presença de patógenos periodontais, ROS e destruição do tecido formam um círculo vicioso.

2.5 Agentes antioxidantes – Polifenóis

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelos radicais livres nas células. O termo antioxidante pode ser definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES e STAHL, 1995).

Os antioxidantes são capazes de detectar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídeos, os aminoácidos, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos da dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e

carotenóides são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Os flavonóides consistem em vários grupos de compostos chamados antocianinas, flavonóides, flavonóis, flavonas e isoflavonas. Estes compostos são polifenóis, devido à presença de unidades múltiplas em fenólicos a sua estrutura química. Compostos de polifenóis são mais abundantes em frutas, legumes, cereais e bebidas. Frutas como maçãs, uvas, peras, cerejas, e bagas contêm cerca de 200-300 mg de polifenóis por 100 gramas (PANDEY e RIZVI, 2009). As epigalocatequinas, que é o foco deste estudo, pertencem ao grupo dos flavonoides e são comumente encontradas como um produto natural extraído do chá verde.

O chá verde é feito de folhas não fermentadas e não oxidadas de *Camelia sinensis*, contém grande quantidade de compostos polifenólicos, especialmente flavonoides os quais representam 30% do peso seco das folhas frescas. Os principais polifenóis do chá verde são as catequinas, sendo as principais: epigalocatequina-3-galato (EGCG), que constitui cerca de 59% das catequinas totais, epigalocatequina (EGC) cerca de 19%, epicatequina galato 3 (ECG) cerca de 13,6% e epicatequina (CE) cerca de 6,4% 0,6 (BATTINO *et al.*, 1999).

O teor de catequinas no vegetal depende de alguns fatores externos, tais como forma do processamento das folhas antes da secagem, localização geográfica do plantio e condições de cultivo (YANAGIMOTO *et al.*, 2003). A concentração de catequinas na bebida também varia de acordo com a preparação do chá. Em geral, o chá verde preparado em uma proporção de 1 grama de folhas para 100mL de água, por 3 minutos de fervura, contém cerca de 35-45mg/100mL de catequinas (BALENTINE, WISEMAN e BOUWENS, 1997). Segundo HASLER, (2002) uma xícara de 240 mL de chá verde contém aproximadamente 200mg de EGCG. Porém, a biodisponibilidade das catequinas no organismo depende da solubilidade, metabolismo e interação com outros componentes da dieta. Estudos mostram que após a administração oral do chá verde, cerca de 70 a 80% das catequinas, são absorvidas rapidamente no intestino delgado e processadas no fígado, sendo 90% metiladas, sulfatadas ou conjugadas com ácido glicurônico no fígado, permanecendo de 2 a 5% delas intactas na circulação. A absorção das catequinas é rápida com pico plasmático ocorrendo 2 a 4 horas após a ingestão e sua excreção ocorre principalmente através da bile.

Como a concentração das catequinas no chá verde podem variar quanto a forma e localização do plantio da *Camelia sinensis*, obtenção e processamento das folhas e na forma como o chá é preparado. Além disso, o consumo exagerado pode levar a hepatotoxicidade, por isso acreditamos que a melhor forma de consumo seria pela ingestão do principio ativo/EGCG via oral em concentração diária com potencial farmacológico viável sem risco de toxicidade.

Recentemente o *American College of Gastroenterology* divulgou novas recomendações sobre o consumo do extrato de chá verde, um ingrediente comum em pílulas de emagrecimento, dizendo que ele pode ser tóxico e causar insuficiência hepática, assim eles recomendam beber não mais de três xícaras (1 xícara = 240mL) de chá verde (cerca de 150 a 450 mg catequinas total) por dia, não ultrapassando mais do que 500 miligramas (mg) por dia catequinas (CHALASANI *et al.*, 2014).

Estudos recentes têm demonstrado que as catequinas do chá verde possuem atividade anticariogênica pelo direto efeito bactericida contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* e também, indiretamente, através da prevenção da aderência bacteriana para os dentes (HAMILTON-MILLER, 2001). A aplicação tópica de um creme dental contendo catequina de chá verde em um modelo de rato de periodontite induzida reduz a concentração de células inflamatórias nas lesões periodontais em maior extensão do que o dentífrico de controle. A expressão de marcadores gengivais de peroxidação lipídica hexanoil-lisina, nitrotirosina, um marcador de dano oxidativo proteína, e TNF- α foram reduzidos em resposta ao dentífrico com catequina de chá verde em comparação com o dentífrico de controle (MARUYAMA *et al.*, 2011). Portanto, a adição de catequina de chá verde para um dentífrico pode revelar-se útil para a melhoria da inflamação periodontal, reduzindo o estresse oxidativo e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (KURITA-OCHIAI *et al.*, 2015).

Além dos efeitos tópicos, tem-se observado uma a relação epidemiológica entre a ingestão de chá verde e a doença periodontal, levando a uma redução significativa na profundidade da bolsa, sondagem periodontal (KUSHIYAMA *et al.*, 2009) e a perda do dente (KOYAMA *et al.*, 2010), indicando que consumo de catequina reduz a profundidade das bolsas e a perda dentária. Estudos recentes com roedores revelaram que a administração oral ou intraperitoneal de EGCG melhora o quadro da artrite inflamatória (HAQQI *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2008),

reduzindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias no soro e articulações. A osteoclastogênese é regulamentada principalmente por duas citocinas: RANKL (ativador do receptor do fator nuclear kappa-B ligando) e o fator estimulador de colônias de macrófagos (UDAGAWA *et al.*, 1999). Embora o ROS possua citotoxicidade contra células por meio de dano oxidativo de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios ela funciona como sinalizadora de moléculas intracelulares para o RANKL durante a osteoclastogênese (ESTERBAUER, SCHAUR e ZOLLNER, 1991; HA *et al.*, 2004; WELLS *et al.*, 2009).

A geração de espécies reativas de oxigênio intracelulares (ROS) é aumentada quando RANKL se liga ao seu receptor na superfície celular dos precursores de osteoclastos. N-acetil-cisteína (NAC), sequestra o ROS intracelular induzida pelo RANKL interrompendo a diferenciação dos precursores de osteoclastos. Portanto, ROS é indispensável para estimular a diferenciação de osteoclastos via RANKL (LEE *et al.*, 2005). O papel de ROS no processo de reabsorção óssea não está definido, porém, tem sido sugerido que ROS desempenha apenas um papel indireto na ativação das vias pró-reabsorção, podendo ser um novo caminho para compreensão dos mecanismos que promovem a reabsorção óssea excessiva prevalente em diversas patologias ósseas e no desenvolvimento de fármacos capazes de bloquear a reabsorção via ROS (CALLAWAY e JIANG, 2015).

Um dos poucos trabalhos envolvendo o tratamento oral da doença periodontal com a EGCG é a de CHO *et al.*, (2013). Neste estudo a periodontite foi induzida por um fio de ligadura por 7 dias e após a remoção do fio os animais receberam diariamente por gavagem 200mg/Kg de EGCG (200 mg / kg). Após 4 semanas não ocorreu a recuperação da perda óssea, mesmo após a remoção do fio, enquanto que no grupo tratado ocorreu uma melhora significativa da altura óssea, das fibras colágenas do ligamento periodontal e da gengiva com diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e no número e atividade dos osteoclastos, sugerindo que a administração sistêmica da EGCG pode ter um efeito terapêutico no tecido periodontal destruído.

2.6 Modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos

Os molares dos roedores como ratos e camundongos apresentam algumas características que são comparáveis com a periodontite humana, tais como a incidência da doença periodontal e uma susceptibilidade a doença periodontal induzida experimentalmente (KLAUSEN, 1991). Ao mesmo tempo, esses roedores possuem um custo relativamente baixo, são fáceis de manusear, os processos inflamatórios e imunológicos são amplamente conhecidos, e as suas características genéticas podem ser facilmente manipuladas. Os métodos de indução da doença periodontal são fáceis de realizar e de serem reproduzidas, e destruição periodontal é detectável em algumas semanas nestes animais (DE MOLON, DE AVILA e CIRELLI, 2013). Além disso, patógenos periodontais humanos, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fuso nucleatum*, podem ser inoculados desempenhando um papel importante na patogenicidade em experimentos com camundongos livres de germes (WIEBE *et al.*, 2001).

É sabido que os modelos animais têm suas limitações. Porém, segundo (GRAVES *et al.*, 2008; GRAVES *et al.*, 2012) estas limitações são geralmente menores comparadas aos estudos *in vitro* ou aos estudos clínicos em humanos. Segundo os autores, uma característica fundamental de modelos animais é a capacidade de examinar complexas interações de bactérias-hospedeiras que não podem ser realizadas com uso de populações de célula única em condições artificiais, como é o caso dos estudos *in vitro*, por exemplo. Podemos citar o impacto de citocinas no recrutamento de células inflamatórias e na indução de reabsorção do osso. Isso levanta a questão de que o valor dos estudos animais deve ser considerado em termos da sua capacidade para testar hipóteses específicas em vez da sua capacidade para imitar todos os aspectos da doença periodontal humana.

Segundo Graves *et al.*, (2012) um dilema a ser estudado na doença periodontal é a natureza inflamatória 'crônica' ou 'aguda', pois até a presente data não se sabe se ocorre destruição periodontal em explosões ou se é lenta e contínua. Em qualquer ponto no tempo da doença do periodonto humano, adjacente ao dente existem células inflamatórias recrutadas com características de inflamação tanto agudas como crônicas. É também evidente que a ruptura do tecido periodontal envolve tanto imunidade inata como adquirida (ASSUMA *et al.*, 1998; BAKER *et al.*,

1999; TENG *et al.*, 2000; DELIMA *et al.*, 2002). O papel da inflamação crônica e aguda ou inata contra imunidade adquirida pode ser estudado utilizando o modelo animal apropriado. Os modelos animais têm características úteis para a investigação de mecanismos moleculares envolvidos na patogênese de doenças periodontais e de testar a eficácia de fármacos e/ou formas de tratamento do processo inflamatório e redução das perdas teciduais (GRAVES *et al.*, 2012).

No atual trabalho utilizamos o modelo de doença periodontal induzida por ligadura em ratos. Este modelo foi descrito pela primeira vez em 1966 (ROVIN, COSTICH e GORDON, 1966) e é atualmente considerado como um dos modelos mais utilizados nas pesquisas envolvendo o periodonto (SOUZA *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2011; NOGUEIRA-FILHO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2015). A técnica envolve a colocação de um fio de algodão, seda ou nylon na área cervical do 1º ou 2º molar de ratos ou camundongos, que leva ao rápido acúmulo de grande quantidade de placa e ulceração epitelial. As alterações nos tecido periodontal são semelhantes às observadas durante a evolução da periodontite em humano, porém, ocorre em um período muito curto. Neste modelo em 7 dias podemos observar ruptura e migração apical do epitélio juncional, influxo de células inflamatórias, perda de fibra do ligamento periodontal e destruição do osso alveolar (ROVIN, COSTICH e GORDON, 1966; BEZERRA *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2010).

Embora alguns autores afirmem que a perda de massa óssea, nesse modelo seja decorrente do trauma mecânico (ROVIN, COSTICH e GORDON, 1966; SAMEJIMA, EBISU e OKADA, 1990), vários estudos têm demonstrado que tal como ocorre na doença periodontal humana, a penetração bacteriana no tecido hospedeiro, é o fator principal que afeta a perda de osso alveolar pós-ligadura, visto que, a ligadura por si só não inicia a inflamação gengival ou perda óssea significativa em ratos gnotobióticos (ROVIN, COSTICH e GORDON, 1966). No estudo de DUARTE *et al.*, (2010) os autores avaliaram a composição do biofilme que se acumulou em torno da ligadura em ratos, e depois de 42 dias, eles confirmaram a presença de diferentes espécies de bactérias que são normalmente observadas em seres humanos, incluindo *F. nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, e *A. actinomycetemcomitans*. Além disso, nos estudos envolvendo a aplicação sistêmica de antibióticos tem-se observado significativa redução da perda de inserção e da reabsorção óssea nos molares que foram amarrados, indicando a importância das

bactérias no quadro de periodontite induzida por ligadura (WEINER, DEMARCO e BISSADA, 1979; KENWORTHY e BAVEREL, 1981; LUAN *et al.*, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Geral

No atual trabalho avaliamos primeiramente os danos causados nas estruturas periodontais no quadro da evolução da doença periodontal induzida pela ligadura em ratos. Posteriormente, verificamos se o tratamento diário de 25 mg/Kg de EGCG protege dos possíveis efeitos deletérios observados durante a evolução periodontal. Os resultados aqui obtidos podem sugerir a utilização do EGCG como um possível adjuvante no tratamento convencional da doença periodontal.

3.2 Específicas

Para alcançarmos os objetivos verificamos nos molares que sofreram ligadura:

- a) o grau e a severidade da doença periodontal pós-ligadura dado por escores durante a análise histológica (ausente/saudável = grau 0 , gengivite = grau 1, periodontite leve = grau 2, periodontite moderada = grau 3 e periodontite severa = grau 4), no sentido de avaliar se o quadro da doença periodontal é atenuado com o tratamento do EGCG;
 - b) morfometricamente por volumetria de pontos nos cortes histológicos o percentual de células inflamatórias e de tecido ósseo na região periodontal, e do número de osteoclastos/mm² com a finalidade de avaliar se a EGCG apresenta efeito anti-inflamatórios e anti-osteoclastogênico, protegendo os tecidos periodontais contra a destruição frente a ação bacteriana;
 - c) as possíveis perdas ósseas verticais pela medida do nível ósseo periodontal (PBL) e no volume do tecido ósseo inter-radicular pela determinação do BV/TV nas imagens obtidas ao micro-CT com a finalidade de avaliar se a EGCG impede ou reduz a perda óssea decorrente do quadro evolutivo da doença periodontal.
-
-

- d) por fim se os resultados de modificações nas estruturas ósseas nas análises 2D e 3D das imagens microtomográficas se correlacionam positivamente com as análises histomorfométricas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento dos grupos experimentais

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados 60 ratos machos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, *Wistar*), com 60 dias de idade e massa corporal em torno de 250 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Odontologia de Bauru (USP) com protocolo de pesquisa número: 0032/2013 (Anexo 1).

Os animais foram aleatoriamente divididos em Grupo Sem Tratamento (GST, n=20), Grupo Sham intitulado como Grupo Tratado com Solução Salina (GTsalina, n=20) e Grupo Tratado com EGCG (GTEGCG, n=20). Os períodos experimentais de cada grupo eram de 0 dias (controle inicial) e de 7, 14 e 21 dias pós ligadura, sendo compostos por 5 animais/grupo. Ver a distribuição dos animais conforme desenho experimental apresentado na Figura 1.

Figura 1. Desenho experimental mostrando a distribuição dos 60 ratos nos 3 grupos (GST, GTEGCG e GTsalina) e a linha do tempo contendo o início do tratamento, inserção da ligadura e os períodos experimentais para avaliação do efeito da EGCG no desenvolvimento da doença periodontal em ratos.

4.2 Indução experimental da doença periodontal por ligadura

Para a indução da doença periodontal todos os animais foram sedados com administração intramuscular (IM) de cloridrato de ketamina: 0,5ml/Kg de massa corporal e cloridrato de xilazina: 0,1 mL/Kg de massa corporal (Ceva do Brasil). A ligadura constituída de fio de seda 3-0 estéril foi colocada na região cervical do

primeiro molar inferior direito, tomando-se o cuidado de penetrar o fio no sulco gengival, portanto, em íntima proximidade aos tecidos gengivais, ficando o nó na região mesial (LOHINAI *et al.*, 2001). Na Figura 2 ilustramos as etapas realizadas durante os procedimentos de ligadura.

Os dentes contralaterais foram utilizados como controle (tecidos sadios). Em seguida, os animais foram mantidos no biotério da FOB/USP.

Figura 2. Sequência da colocação da ligadura na região cervical do primeiro molar inferior direito (M1). A) posicionamento do animal na mesa operatória; B) envolvimento do fio de seda entre o primeiro e segundo molar; C) nó sendo feito na região mesial; D) aspecto final do fio de algodão para a técnica de ligadura no M1.

4.3 Dieta e tratamento terapêutico

4.3.1 Dieta: Todos os animais foram mantidos até o período de sacrifício em gaiolas de poliuretano padronizadas em grupos de cinco animais, com alimentação líquida (água potável) e sólida (ração granulada para ratos da marca Purina) *ad libitum*, em ambiente climatizado de 12 horas de claro e 12 de escuro.

4.3.2 Tratamento terapêutico: O tratamento teve início no dia anterior à colocação da ligadura. Os animais do GTEGCG (n=15) receberam diariamente doses de 100mg/Kg de extrato de chá-verde Epigallocatequina-3-galato (*Camellia sinensis* – cedida pela empresa Taiyo International, Inc. em concentração de 94% - Sunphenon®) (Anexo 2). A EGCG em pó foi diluída em solução fisiológica à 0,9%, resultando numa solução na concentração de 25mg/mL, a qual foi administrada diariamente via intragástrica (gavagem) na dosagem de 100mg/Kg de massa corporal por animal.

O volume de conteúdo gástrico suportado por roedores é de 1 mL de solução para cada 100g de massa corporal, no entanto, se a administração for de solução aquosa o volume pode ser de 2mL para cada 100g de massa corporal (PAIVA, MAFFILI e SANTOS, 2005). Assim, não ultrapassamos a concentração máxima suportada pelo estômago do rato. A quantidade da droga variou de acordo com a massa corporal do animal, mensurado a cada 7 dias, mas manteve-se sempre uma dosagem fixa de 100 mg/kg de massa corporal (SENTHIL e KUMARAN *et al.*, 2008; SACHDEVA, KUHAD e CHOPRA, 2011; BIASIBETTI *et al.*, 2013).

Os animais do GTsalina (n=15) passaram pelo mesmo nível de estresse, recebendo diariamente 0,1 mL/kg de solução salina por gavagem. Já os animais do GST (n=15) não receberam nenhuma forma de tratamento. Ver representação de tratamento ilustrado na Figura 1.

4.4 Coleta das hemimandíbulas

Ao término de cada período experimental (0h, 7, 14 e 21 dias) os animais foram sacrificados por dosagem excessiva de anestésico e as hemimandíbulas foram coletadas. Para esse procedimento foi administrado o dobro da dose de sedação no animal. Após a coleta, as hemimandíbulas foram imediatamente fixadas em solução de formalina de 10% com tampão fosfato à temperatura ambiente e lavadas em água corrente *over night*.

4.5 Obtenção das imagens ao MicroCT

Após a fixação, as hemimandíbulas foram escaneadas pelo sistema de microtomografia computadorizada de raios-X, utilizando o microtomógrafo modelo 1176 (Skyscan, Bélgica, Figura 3A) alocado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araraquara.

4.5.1 Padrões de escaneamento: As amostras foram submetidas a uma varredura de feixe de raios-X operada a 50kv e a 500 uA com resolução/pixel de 8,74 μ m. Foi utilizado um filtro de Cobre e Alumínio 0,5mm e a amostra rotacionada a 180°, com um “rotation step” de 0,5° e número de quadros/frames de 3 em cada passo de rotação. Em seguida, as imagens foram reconstruídas utilizando um software NRecon (SkyScan 1176 N. V. Belgium, Figura 3B) utilizando sempre o mesmo padrão para todas as amostras.

Figura 3. Microtomógrafo (A) utilizado para obtenção das imagens; (B) programa NRecon utilizado para a reconstrução das imagens.

4.5.2 Alinhamento das Imagens para as análises 2D e 3D:

Para as análises 2D e 3D realizamos o alinhamento das imagens nos 3 planos do espaço utilizando o software DataViewer (Figura 4) e adaptado de (Chang (A), Liang, *et al.*, 2013)

- 1) no plano transaxial, as coroas do primeiro molar (M1) para o terceiro molar (M3) foram central e verticalmente posicionadas;
- 2) no plano coronal, a JAC nos lados vestibular e lingual foram alinhadas horizontalmente.
- 3) no plano sagital, as JACs dos molares foram alinhadas horizontalmente ao mesmo nível; e

Figura 4: Software DataViewer utilizado para as análises bidimensionais do movimento linear do primeiro molar mostrando o alinhamento Transaxial (A), Coronal (B) e Sagital (C).

4.6 Determinação do nível ósseo periodontal (PBL) e da densidade óssea entre as raízes do M1

4.6.1 Determinação do PBL entre as raízes do M1

O nível ósseo periodontal (PBL - periodontal bone loss, sigla adotada por ser internacionalmente aceita) foi determinado pela distância a partir da junção amelo-cementária (JAC) até a crista óssea alveolar (COA) do M1, conforme sugerido por (CHANG (B), CHIEN, *et al.*, 2013). Primeiramente, no plano coronal avaliamos o PBL nas regiões vestibular (Figura 5A) e lingual (Figura 5B) do M1, e no plano sagital o PBL das regiões mesial (Figura 5C) e distal (Figura 5D). Os resultados foram obtidos das médias tomadas de medidas em cada plano por toda a extensão do M1. Nas raízes mesial e distal, a distância da região avaliada foi de 105 μm , enquanto que nas raízes lingual e vestibular, a distância foi de 490 μm .

Figura 5: Ilustrações mostrando as mensurações lineares no Software DataViewer das raízes vestibular (Figura A), lingual (Figura B), mesial (Figura C) e distal (Figura D) do M1.

4.6.2 Determinação da densidade óssea entre as raízes mesial e distal do M1 (%)

Nas imagens alinhadas no plano sagital determinou-se a densidade óssea (BV/TV) interradicular do M1, utilizando um software CTAn (SkyScan, Belgium), seguindo a seleção manual de uma área de interesse ROI poligonal, contornando a face distal da raiz mesial na furca, a face mesial da raiz distal, unindo os ápices das raízes, como mostra a Figura 6. Esse procedimento englobou todo o tecido ósseo que se encontrava entre as raízes mesial e distal a uma profundidade de 490 μ m. A densidade óssea entre as raízes de cada M1 foi determinada por porcentagem (%) de tecido avaliado.

Figura 6. Software CTAn mostrando a padronização para as mensurações do percentual de volume ósseo na região interradicular do M1: A) Seleção da área interradicular a ser analisada (vermelho); B) Volume ósseo da região avaliada em 3D mostrando a profundidade (P) de 490 μ m; e C) Todos os dados avaliados no programa salientando o percentual de volume ósseo (área circundado em vermelho). O valor de densidade óssea é dado no software pelo que é chamado de "Percent bone volume"

4.7 Processamento histológico

As peças passaram por processamento histológico de desmineralização em EDTA (solução contendo 4,13% de Tritriplex III Merck® e 0,44% de hidróxido de sódio) à temperatura de 2 a 8°C, por aproximadamente 30 dias, desidratação em álcool etílico, diafanização em xilol, e inclusão em *Histosec* (parafina + resina plástica). Cortes semi-seriados de 4µm de espessura foram obtidos no sentido longitudinal da raiz dos molares utilizando um micrótomo Leitz-Jung® e coletados em lâminas comuns para coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE).

4.8 Avaliação por escore do processo inflamatório no ligamento periodontal e o quadro de evolução da periodontite induzida por ligadura

Para a análise morfológica foram selecionados 5 cortes/hemimandíbula que apresentaram a porção central da câmara pulpar coronal e radicular do primeiro molar inferior. A identificação das lâminas foi vedada, para que o examinador não identificasse o grupo experimental analisado. A análise seguiu critérios de condições da periodontite, conforme apresentado na Tabela 1 e Figura 7. As análises foram realizadas em conjunto (ambos analisando os mesmos cortes) com o cirurgião dentista Ever Elias Mena Laura, aluno de Mestrado do nosso laboratório, utilizando o sistema de captura de imagem, composto pelo software Axio Vision Rel. 4.8.Ink (Carl Zeiss), câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss) acoplado ao Microscópio Axioscop 2 (Carl Zeiss) em objetivas de 2x, 4x, 10x e 40x.

Tabela 1: Escores histopatológicos para avaliação da região periodontal

ESCORES	PROCESSO INFLAMATÓRIO DO LP (PERIODONTITE)
0	Morfologia Normal
1	<p>Gengivite:</p> <p>Processo inflamatório focal limitado à região gengival sem recessão gengival;</p> <p>Ausência de perda do epitélio juncional com ou sem bolsa gengival (pseudobolsa) formada pelo aumento gengival associado a um edema do tecido conjuntivo sem destruição dos tecidos periodontais subjacentes.</p>
2	<p>Periodontite “leve”:</p> <p>Recessão gengival;</p> <p>Pequena perda da crista óssea alveolar e/ou do septo interdental;</p> <p>Perda óssea tipo horizontal com ou sem formação de bolsa periodontal pouco profunda (ao nível cervical);</p> <p>Presença lesão de furca grau 1 (pequena perda óssea com substituição por tecido conjuntivo sem focos de processo inflamatório).</p>
3	<p>Periodontite moderada:</p> <p>Recessão gengival com ou sem perda do epitélio juncional;</p> <p>Presença de bolsa periodontal até 2/3 da raiz (subregião medial);</p> <p>Extensa perda óssea horizontal e/ou vertical da crista óssea alveolar e do septo interdental até 2/3 da raiz, com lesão de furca grau 2 (extensa perda óssea com formação de tecido conjuntivo com processo inflamatório);</p> <p>Pequenas áreas de reabsorção dentinária radicular.</p>
4	<p>Periodontite avançada/severa:</p> <p>Extensa recessão gengival com perda do epitélio juncional;</p> <p>Presença de bolsa periodontal profunda acima dos 2/3 da raiz;</p> <p>Perda óssea vertical avançada da crista óssea alveolar ou septo interdental até a região média e/ou apical da raiz com lesão de furca grau 3 (extensa perda óssea, recessão gengival com exposição óssea e acúmulo de placa bacteriana com ou sem abscesso);</p> <p>Áreas de reabsorção dentinária radicular.</p>

Figura 7: Evolução da periodontite pós-ligadura mostrando o aspecto morfológico dos cortes longitudinais do primeiro molar referente aos escores adotados: A) Escore 0 mostrando tecidos periodontais saudáveis e pequena altura entre a JAC (linha tracejada azul) e COA (linhas tracejadas vermelhas); B) Escore 1 mostrando processo inflamatório limitada a região gengival (seta amarela); C) Escore 2 mostrando recessão gengival e perda óssea tipo horizontal com presença de lesão de furca grau 1 (seta azul); D) Escore 3 mostrando recessão gengival com presença de bolsa periodontal até 2/3 da raiz (seta vermelha) e pequenas áreas de reabsorção dentinária radicular (seta verde), e extensa perda óssea horizontal da crista óssea alveolar e do septo interdental até 2/3 da raiz com lesão de furca grau 2; E) Escore 4 mostrando extensa recessão gengival com perda do epitélio juncional e presença de bolsa periodontal profunda acima dos 2/3 da raiz, além de perda óssea vertical avançada da crista óssea alveolar e septo interdental até a região média da raiz com lesão de furca grau 3 e áreas de reabsorção dentinária radicular.

4.9 Determinação morfométrica da intensidade do processo inflamatório na região do periodonto

Os mesmos 5 cortes de hemimandíbulas selecionados para a análise morfológica foram utilizados para avaliar a intensidade do processo inflamatório na região do periodonto. De cada corte tecidual ao longo de toda a raiz mesial e distal do primeiro molar foram capturadas em objetiva de 20x 12 imagens abrangendo a região do ligamento periodontal e osso alveolar (Figura 8), escolhidas por amostragem sistemática (Weibel *et al.*, 1969), totalizando 60 campos avaliados por hemimandíbula. Utilizando um graticulo com área de 0,25mm² e 100 pontos equidistantes (intersecção entre as linhas dentro da área retangular) determinamos a densidade de volume ou o percentual de volume ocupado por cada estrutura pela volumetria de pontos anotando o número total de pontos que coincidiram sobre cada estrutura (i) e o número de pontos total (t). O percentual de cada estrutura avaliada (Pi) foi calculado pela relação $P_i = (i/t) \cdot 100$. Pequenas diferenças em função dos níveis dos cortes, como os aumentos pequenos, nessas áreas estão dentro de um erro mínimo esperado de até 5% (Weibel *et al.*, 1969).

Figura 8: Representação dos campos avaliados ao longo de toda a raiz mesial e distal do primeiro molar na região do ligamento periodontal. A) Seta verde apontando para uma das 12 regiões escolhidas para contagem das células na região do ligamento periodontal e osso alveolar. Regiões representadas por quadrados. B) Representação de um dos campos avaliados com graticulo em objetiva de 20x. Seta azul apontando para um dos 100 pontos de intersecção entre as linhas dentro da área retangular (círculo vermelho).

4.10 Determinação morfométrica do nível ósseo periodontal (PBL) no lado mesial e distal nos cortes histológicos

Utilizando um sistema composto pelo software Axio Vision Rel. 4.8.Ink (Carl Zeiss), câmera AxioCam HRc (Carl Zeiss) acoplado ao Microscópio Axioscop 2 (Carl Zeiss) e objetiva de 10x foram capturadas imagens de campos histológicos contendo a raiz mesial e distal do primeiro molar os quais foram alinhados a partir da junção amelo-cementária e medidas lineares do PBL foram obtidas da distância da junção amelocementária/crista óssea alveolar (d). (Ver Figura 9).

Figura 9. Determinação do PBL no lado mesial e distal determinada pela distância (d) entre a junção amelocementária (JAC) e a crista óssea alveolar (COA) da raiz mesial do primeiro molar.

4.11 Determinação do número de osteoclastos/mm²

Quantificamos o número de osteoclastos nos cortes teciduais corados por hematoxilina e eosina identificando-os como células multinucleadas com mais de 2 núcleos e citoplasma fracamente corado pela eosina (Figura 10).

Para tanto, foram analisados 4 cortes teciduais (com 150 µm de intervalo entre eles) de cada molar. De cada corte foram avaliadas 12 campos histológicos, selecionadas por amostragem sistemática (Weibel *et al.*, 1969), abrangendo a região

do osso alveolar do 1º Molar, totalizando 40 imagens para cada alvéolo. Para cada imagem obtida, foi determinado o número de células marcadas (Nm) e a área total analisada (A). Conhecendo-se a área total analisada e obtendo-se o número total (Nt) de cálculos, determinamos o índice de osteoclastos marcados por mm^2 , assim: $Nt = Nm \times A$.

Figura 10. Reconhecimento dos osteoclastos presentes na superfície óssea contendo 2 ou mais núcleos e citoplasma abundante, contendo vacuolização nos cortes corados pela coloração de HE.

4.12 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de homogeneidade das variâncias e depois comparados pela Análise de Variância (ANOVA) a dois critérios (período e grupos) e o teste de Tukey. Os dados qualitativos (escores) foram submetidos ao teste de Man-Whitney e Kruskal-Wallis. Todos os testes foram efetuados com o programa Statistica (Version 10.0; StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA), adotando-se um nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Massa corporal (MC)

A análise dos dados estatísticos (Tabelas 2 e 3) e do gráfico (Figura 11) mostraram que a MCInicial (antes da ligadura) e a MCFinal dos animais nos diferentes períodos experimentais foram similares entre os grupos/período, sendo em média de $295,4 \pm 36,87\text{g}$ e $314,2 \pm 37,3\text{g}$, respectivamente. Esses resultados indicam que o procedimento de ligadura não interferiu na alimentação dos animais.

Tabela 2 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da **MCInicial** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

MCInicial	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	6,260242	0,275823	5,429950	8	0,710788

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	0,785	2	0,463609
Grupos	1,767	2	0,185418
Períodos*Grupos	0,426	4	0,788696

Tabela 3 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da **MCFinal** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

MCFinal	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	6,344626	0,200649	6,808711	8	0,557405

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	1,575	2	0,220898
Grupos	0,467	2	0,630594
Períodos*Grupos	0,809	4	0,527513

Figura 11. Gráfico da massa corporal (g) antes da ligadura (MCInicial) e ao final de cada período experimental (MCFinal) dos animais dos grupos GST, GTsalina e GTEGCG. ANOVA a dois critérios mostrou não haver diferenças significantes dos pesos iniciais e finais dos animais nos diferentes grupos e períodos experimentais.

5.2 Avaliações microtomográficas

5.2.1. Determinação do nível ósseo periodontal (PBL) entre as raízes do M1

O nível ósseo periodontal foi obtido nas imagens microtomográficas em 4 lados distintos: vestibular, lingual, mesial e distal.

5.2.1.1 Lado vestibular e lingual

O PBL no lado vestibular e lingual foi avaliado nas imagens das mandíbulas posicionadas no plano coronal como ilustra a Figura 12. Assim discutiremos os dados obtidos para os dois lados concomitantemente. Durante a análise estatística dos dados e dos gráficos obtidos para a PBL do lado vestibular (Tabela 4, 5 e 6 e Figura 13) e lingual (Tabela 7 e 8 e Figura 14) podemos observar que ao 0 dias o PBL foi similar entre os grupos, sendo em média de $0,444 \pm 0,05$ mm para a vestibular e $0,846 \pm 0,08$ mm para a lingual, como pode ser observado na Figura 12. Com relação ao período experimental (Tabela 5 e 8), o PBL aumentou significativamente 141% no lado vestibular ($1,070 \pm 0,16$ mm) e 45% no lado lingual (seta vermelha) ($1,227 \pm 0,13$ mm) entre 0 e 14 dias, indicando maior perda óssea no lado vestibular comparado a lingual (seta amarela). Notar na Figura 12 um aumento acentuado da seta vermelha com o decorrer dos períodos comparado com a seta amarela. Com relação aos grupos não foi observado diferenças no PBL no lado lingual (Tabela 7), porém na vestibular (Tabela 6) o PBL foi 15,07% menor no GTEGCG ($0,738 \pm 0,23$ mm) comparado ao GST ($0,904 \pm 0,30$ mm) e GTsalina ($0,834 \pm 0,26$ mm) como pode ser observado na Figura 12 ao compararmos as setas vermelhas do GTEGCG com os demais grupos a cada período. Estes dados seguem uma menor perda óssea no lado vestibular nos animais tratados com EGCG em relação aos demais.

Curiosamente nas imagens coronais do M1 (Figura 12) podemos observar que a cortical óssea no lado vestibular reduz drasticamente tanto em altura como em espessura entre 0 e 14 dias, porém aos 21 dias ocorre um aumento em espessura devido a aposição de novo tecido ósseo na cortical óssea, remanescente caracterizado por uma faixa mais radiopaca.

Figura 12: Imagens microtomográficas no plano coronal mostrando o nível da junção amelo cementária (linha azul tracejada) e a distância até o nível ósseo periodontal (PBL) no lado vestibular (seta vermelha) e lingual (seta amarela). Notar no período de 0 dias similar PBL tanto no lado vestibular como lingual em todos os grupo. Observar em todos os grupos o aumento do PBL ao longo dos períodos sendo mais acentuados nos grupos GST e GTsalina principalmente no lado vestibular. Notar também que no lado vestibular tanto a altura como a espessura da cortical óssea reduz até os 14 dias, porém aos 21 dias ocorre a aposição de um tecido ósseo mais radiopaco na face vestibular (seta azul).

Tabela 4 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL (mm)** no lado **VESTIBULAR do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Vestibular	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	1,675643	0,422933	1,232757	2	0,539896

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	105,886	3	0,000000
Grupos	12,821	2	0,000035
Períodos*Grupos	1,759	6	0,127770

Tabela 5 - Comparação entre períodos do **PBL (mm)** no lado **VESTIBULAR do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

PBL (mm) no lado VESTIBULAR do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,444±0,05 ^A	0,805±0,14 ^B	1,070±0,16 ^C	0,983±0,11 ^C

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Tabela 6- Comparação entre Períodos do **PBL lado VESTIBULAR do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

PBL (mm) lado VESTIBULAR do M1 com ligadura (média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
0,904±0,30 ^A	0,834±0,26 ^A	0,738±0,23 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Nota: Letras diferentes $p < 0,05$

Figura 13: Gráfico do PBL (mm) na região vestibular do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios indica o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($p = 0,000035$). Barras = DPM.

Tabela 7 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL (mm) no lado LINGUAL do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Lingual	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	17,78971	0,309174	14,62446	11	0,200343

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	30,648	3	0,000000
Grupos	2,083	2	0,135728
Períodos*Grupos	0,465	6	0,830936

Tabela 8 - Comparação entre períodos do PBL (mm) no lado LINGUAL do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

PBL (mm) no lado LINGUAL do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,846±0,08 ^A	1,012±0,09 ^B	1,227±0,13 ^C	1,235±0,18 ^C

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Figura 14: Gráfico do PBL (mm) na região lingual do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios indica o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferença entre períodos ($p = 0,000000$). Barras = DPM.

5.2.1.2 Lado mesial e distal

O PBL no lado mesial e distal foi avaliado nas imagens das mandíbulas posicionadas no plano sagital como ilustra a Figura 15. Assim, discutiremos os dados obtidos para os dois lados concomitantemente. Durante a análise estatística dos dados e dos gráficos obtidos para o PBL do lado mesial (Tabelas 9, 10 e 11 e Figura 16) e distal (Tabela 12, 13 e 14 e Figura 17) podemos observar que ao 0 dias o PBL foi similar entre os grupos, sendo em média de $0,603 \pm 0,09$ mm para a mesial e $0,407 \pm 0,06$ mm para a lingual, como pode ser observado na Figura 13. Com relação ao período experimental (Tabela 10 e 13) o PBL aumenta significativamente 149,5% no lado mesial ($1,505 \pm 0,17$ mm) e 92,6 % no lado distal ($0,784 \pm 0,20$ mm) entre 0 e 14 dias, indicando uma maior perda óssea no lado mesial (compare na fig. 15, o tamanho da seta vermelha do período de 0 dias com os demais períodos experimentais). Com relação aos grupos (Tabela 11 e 14), o PBL do lado mesial e distal foi, respectivamente, 15,6% e 19,8% menor no GTEGCG comparado com o GST e 11,22%, e menor apenas no lado mesial quando comparado com o GTsalina (Tabela 7), sugerindo novamente uma menor perda óssea nos lados mesial e distal nos animais tratados com EGCG em relação aos demais (compare na Fig. 15 a menor comprimento das setas vermelhas e amarelas no GTEGCG comparado com o GST e GTsalina).

Figura 15: Imagens microtomográficas no plano transaxial mostrando o nível da junção amelo cementária (linha azul tracejada) e a distância até o nível ósseo periodontal (PBL) no lado mesial (seta vermelha) e distal (seta amarela). Notar no período de 0 dias similar PBL tanto no lado mesial como distal em todos os grupos. Observar em todos os grupos o aumento do PBL ao longo dos períodos, sendo mais acentuados nos grupos GST e GTsalina principalmente no lado mesial. Notar também que no lado mesial, tanto a altura como a espessura da cortical óssea, reduzem até os 14 dias.

Tabela 9 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Mesial	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	15,90488	0,209673	16,26275	11	0,131653

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	96,134	3	0,000000
Grupos	7,118	2	0,001963
Períodos*Grupos	1,513	6	0,194290

Tabela 10- Comparação entre Períodos do **PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

PBL (mm) no lado mesial do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,603±0,09 ^A	0,994±0,18 ^B	1,505±0,17 ^C	1,36±0,24 ^C

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Tabela 11- Comparação entre Grupos de **PBL (mm) lado mesial do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

PBL (mm) lado MESIAL do M1 com ligadura (média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
1,199±0,37 ^A	1,140±0,43 ^A	1,012±0,37 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Figura 16: Gráfico do PBL (mm) na região mesial do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios indica o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($p = 0,001963$). Barras = DPM.

Tabela 12 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL no lado DISTAL do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Distal	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	15,90488	0,209673	16,26275	11	0,131653

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	23,983	3	0,000000
Grupos	5,687	2	0,006076
Períodos*Grupos	0,471	6	0,826566

Tabela 13- Comparação entre Períodos do PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

PBL (mm) no lado distal do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,407±0,06 ^A	0,614±0,15 ^B	0,784±0,20 ^C	0,751±0,10 ^C

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Tabela 14- Comparação entre Grupos de PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura (média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
0,717±0,22 ^A	0,624±0,19 ^{A,B}	0,575±0,16 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Figura 17: Gráfico do PBL (mm) na região distal do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios indica o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($p = 0,006076$). Barras = DPM.

5.2.1.3 Densidade de volume de tecido ósseo (%) da região medular entre as raízes do M1

A densidade de volume de tecido ósseo na região medular avaliado entre as raízes mesial e distal do M1 com ligadura e está ilustrada na Figura 18. A análise dos dados estatísticos (Tabelas 15, 16 e 17) e do gráfico (Figura 19) mostrou que a densidade de volume tecido ósseo entre as raízes antes da ligadura foi em média de $76,22 \pm 7,49\%$. Com relação ao período experimental observamos uma acentuada redução na densidade óssea de 25,19% entre 0 e 7 dias (quando comparado à perda óssea da região da furca aos 7 dias com o padrão de normalidade de 0 dias na Figura 18) que se estabiliza aos 14 dias e sofre um discreto aumento aos 21 dias, sugerindo o fim da fase aguda caracterizada pelo intenso processo inflamatório e grande perda óssea e início da fase de reparo com restauração parcial do volume ósseo. Com relação aos grupos experimentais novamente os dados estatísticos apontam para um efeito benéfico da EGCG na evolução da doença periodontal em relação ao GST (BV/TV do GST 62,06% contra BV/TV de 67,75% no GTEGCG), quando comparado à perda óssea no GST com os do GTEGCG na Figura 18.

Figura 18: Imagens microtomográficas no plano transaxial mostrando em destaque a área óssea entre as raízes mesial e distal do M1 com ligadura. Notar no período de zero hora denso trabeculado ósseo ocupando quase que a totalidade da área entre as raízes. A partir do 7º dia de ligadura observar a redução da área óssea devido à grande perda óssea na região da furca. Notar maior perda óssea nos grupos GST e GTsalina comparado ao GTEGCG em todos os períodos pós ligadura.

Tabela 15 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região periodontal do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

Tecido Ósseo (%)	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	P
	10,54601	0,183695	13,40837	11	0,267474

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	20,201	3	0,000000
Grupos	3,222	2	0,048656
Períodos*Grupos	0,853	6	0,535838

Tabela 16- Comparação entre Períodos da densidade de volume ósseo (%) na região periodontal do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

Média da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região do periodontal do M1 com ligadura dos períodos avaliados (Média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
76,22±7,49 ^A	57,02±9,08 ^B	60,92±8,30 ^{B,C}	66,56±3,44 ^C

Nota: Letras diferentes representam p<0,05

Tabela 17- Comparação entre grupos da densidade de tecido ósseo (%) na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

Média da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região do Periodonto do M1 com ligadura dos grupos avaliados (Média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
62,06±12,12 ^A	65,73±9,18 ^{A,B}	67,75±8,80 ^B

Nota: Letras diferentes representam p<0,05

Figura 19: Gráfico do percentual de tecido ósseo inter-radicular (%) do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico indica a diminuição acentuada do percentual de osso alveolar em todos os grupos até os 7 dias, sendo mais acentuada nos GST e GTsalina comparado ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios com diferenças entre períodos ($p=0,000000$) e grupos ($p=0,048656$). Barras = DPM.

5.3 Análise histopatológica

Na avaliação do quadro histopatológico das estruturas periodontais do M1 contra-lateral (sem ligadura) das mandíbulas de todos os grupos e períodos experimentais foi observado que todas as estruturas apresentavam-se íntegras (Figura 20). Por outro lado, o M1 que recebeu ligadura apresentou diferentes estágios da doença periodontal. A análise do quadro histopatológico aponta para um efeito benéfico da EGCG durante a doença periodontal induzida por ligadura.

Figura 20: Fotomicrografia do primeiro molar no período de 0 dias (antes da ligadura) dos grupos **GTEGCG** (A-A₁), **GTSalina** (B-B₁) e **GST** (C-C₁) mostrando estruturas dentárias e paradentárias saudáveis com presença do epitélio juncional (seta vermelha) aderido a junção amelocementária e sulcular e das gengivas inserida e marginal (características da região), além de, denso tecido ósseo alveolar envolvendo as raízes ao nível marginal (tracejado amarelo) e sem sinais de processo inflamatório ou reabsorção da crista óssea alveolar (seta preta). Objetivas de 4x e 10x. HE.

5.3.1 M1 com ligadura após o período de 7 dias

GTEGCG: uma amostra (20%) apresentou o quadro compatível de gengivite exibindo apenas processo inflamatório focal, limitado a região gengival. As demais 4 amostras (80%) apresentavam quadro de periodontite leve (Figura 21, A-A1) exibindo recessão gengival, pequena perda óssea alveolar vertical com formação de uma bolsa periodontal pouco profunda (ao nível cervical), além de, lesão de furca grau 1 com pequena perda óssea e substituição por tecido conjuntivo sem focos de processo inflamatório.

GTsalina: três amostras (60%) apresentaram o quadro de periodontite leve, similar ao observado nas 4 amostras do EGCG (Figura 21, A-A1) e duas amostras (40%) exibiram periodontite moderada (Figura 21, B-B1) com recessão gengival, perda do epitélio juncional, presença de bolsa periodontal até 2/3 da raiz, extensa perda óssea vertical e horizontal da crista óssea alveolar e do septo interdental, além de lesão de Furca grau 2 caracterizada pela perda óssea alveolar e substituição por tecido conjuntivo com processo inflamatório.

GST: apenas 1 amostra (20%) apresentou quadro de periodontite leve, 2 amostras (40%) periodontite moderada similar ao observado no grupo GTSalina (Figura 20, B-B1) e 2 amostras (40%) exibiram periodontite severa (Figura 21, C-C1) com extensa recessão gengival, presença de bolsa periodontal profunda atingindo mais de 2/3 da raiz, perda óssea vertical avançada da crista óssea alveolar e do septo interdental até a região media da raiz associado a processo inflamatório, além de, lesão de Furca grau 3 com extensa perda óssea, recessão gengival com exposição óssea.

Figura 21: Fotomicrografia do primeiro molar após 7 dias de ligadura. A-A₁) O M1 do GTEGCG mostra quadro de periodontite leve com recessão gengival (seta vermelha), áreas de reabsorção óssea alveolar (seta preta) e lesão de furca grau 1 ao nível cervical (tracejado amarelo); B-B₁) M1 do GTsalina exibindo quadro de periodontite moderada com recessão gengival (seta vermelha) e intensa reabsorção óssea alveolar nas regiões mesial e distal (seta preta) podendo ser observada extensa necrose (N) das células e fibras do LP na região mesial até o terço apical da raiz, além de lesão de furca grau 1; C-C₁) M1 do GST mostrando quadro de periodontite severa com recessão gengival (seta vermelha), formação da bolsa periodontal profunda (tracejado azul) contendo tecido necrosado e infiltrado inflamatório; intensa reabsorção óssea alveolar vertical e horizontal (seta preta) na região mesial e distal associado ao processo inflamatório (Pi) e perda óssea alveolar na região da furca até a altura do terço cervical (tracejado amarelo). Objetivas de 4x e 10x. HE.

5.3.2 M1 com ligadura após o período de 14 dias

GEGCG: observou-se um avanço da doença periodontal em relação ao período anterior com maior perda óssea alveolar porém redução no número de osteoclastos. Apenas duas amostras (40%) apresentaram o quadro periodontite leve (Figura 22, A-A1), das demais duas amostras (40%) exibiram periodontite moderada e uma amostra (20%) periodontite severa.

GTsalina: como observado no GEGCG, o GTsalina também apresentou um avanço da doença periodontal em relação ao período anterior anterior, com maior perda óssea alveolar, porém com redução no número de osteoclastos. Neste grupo apenas uma amostra (20%) apresentou quadro de periodontite leve, 3 amostras (60%) periodontite moderada (Figura 22, B-B1) e uma amostra (20%) periodontite severa.

GST: este grupo apresentou quadro mais agravado da doença periodontal mostrando maior trabeculamento do osso alveolar, mas com redução no número de osteoclastos. Apenas uma amostra (20%) apresentou quadro de periodontite leve, 2 amostras (40%) de periodontite moderada e 2 amostras (40%) de periodontite severa (Figura 22, C-C1) com sinais de reabsorção dentária.

Figura 22: Fotomicrografia do primeiro molar após 14 dias de ligadura. A-A₁) O M1 do **GTEGCG** mostra quadro de periodontite leve com observado no período de 7 dias, porém com maior processo inflamatório gengival e perda óssea vertical (seta preta) e pequenas áreas de reabsorção cementária e dentinária na raiz mesial (círculo verde) ao nível cervical; B-B₁) M1 do **GTsalina** exibindo periodontite moderada similar ao observado aos 7 dias, porém com perda da integridade epitelial (seta vermelha), formação de bolsa periodontal mais profunda (tracejado azul) e maior área de processo inflamatório (Pi) e reabsorção osteoclástica (seta preta), além de maior perda óssea na região de furca (tracejado amarelo); C-C₁) M1 do **GST** mostrando quadro de periodontite severa com formação da bolsa periodontal profunda (tracejado azul) contendo tecido necrosado (N); acentuada perda óssea alveolar na região da furca atingindo em alguns pontos mais de 2/3 da raiz (tracejado amarelo), reabsorção óssea alveolar vertical e horizontal (seta preta) na região mesial e distal associado ao processo inflamatório (Pi), reabsorção cementária e dentinária na raiz distal (círculo verde) e exposição da furca (seta branca); Objetivas de 4x e 10x. HE.

5.3.3 M1 com ligadura após o período de 21 dias

GEGCG: observou-se uma redução do processo inflamatório e da reabsorção óssea associada a um reestabelecimento das estruturas periodontais perdidas durante a fase aguda da doença e redução do processo inflamatório. Assim 3 amostras (60%) apresentavam quadro de periodontite leve (Figura 23,. A-A1) e duas amostras (40%) de periodontite moderada.

GTSalina: também observou-se uma pequena melhora no quadro da doença periodontal, porém de menor intensidade comparado ao grupo EGCG, tendo duas amostras (40%) apresentando periodontite leve e 3 amostras (60%) com periodontite moderada (Figura 23, 3B-B1).

GST: como observado nos períodos anteriores este grupo apresentou quadro mais avançado da doença periodontal em relação aos demais grupos, porém, com sinais de melhora em relação ao período anterior, tanto com relação ao processo inflamatório, quanto a perda óssea. Assim, como observado no período de 14 dias apenas uma amostra (20%) apresentou quadro de periodontite leve, 2 amostras (40%) de periodontite moderada e 2 amostras (40%) de periodontite severa (Figura 23, C-C1), nestes casos, com extensa perda de cemento e da dentina radicular principalmente na região mesial.

Figura 23: Fotomicrografia do primeiro molar após 21 dias de ligadura. A-A₁) O M1 do **GTEGCG** mostra quadro de periodontite leve com recessão gengival (seta vermelha), porém com redução do processo inflamatório (Pi) em relação ao período anterior e da reabsorção óssea associado ao reestabelecimento do maior nível ósseo alveolar, principalmente na região de furca (tracejado amarelo) e poucas áreas de reabsorção de cimento e dentina (círculo verde); B-B₁) M1 do **GTsalina** exibe periodontite moderada mas menos acentuada em relação ao período de 14 dias. A bolsa periodontal é profunda, porém a gengiva (seta vermelha) marginal está íntegra e a perda óssea na região de furca é menor em relação ao período anterior, com poucas áreas de reabsorção de cimento e dentina (círculo verde); C-C₁) O M1 do **GST** mostra quadro de periodontite severa com presença de processo inflamatório (Pi) associado a grande áreas de reabsorção da dentina e do cimento (círculo verde). Na região da furca observa-se uma melhora no quadro da doença, com perda óssea inferior aos 2/3 da raiz. Objetivas de 4x e 10x. HE.

5.4 Análise da doença periodontal por escores

Durante as avaliações histopatológicas as estruturas periodontais do lado contra-lateral que não recebeu ligadura apresentaram-se saudáveis e receberam o escore Zero. A análise dos dados estatísticos (Tabelas 18, 19 e 20) e do gráfico (Figura 24) dos escores referente ao grau da doença periodontal mostrou diferença entre os períodos de 0 hora (escore 0) e os demais períodos (média dos escores 2,7) independentemente do grupo. Também se observou diferenças entre grupos apontando para um menor escore/grau da doença periodontal no GTEGCG em relação ao ST, sugerindo um efeito benéfico da EGCG na evolução da doença.

Tabela 18 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância dos **Escore da doença periodontal do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

Escore da doença periodontal	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
		0,175000	-6,22010	8	1,000000

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	86,2667	3	0,000000
Grupos	5,6000	2	0,006517
Períodos*Grupos	0,8667	6	0,526194

Tabela 19- Comparação entre grupos dos **Escore da doença periodontal do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

Escore da doença periodontal do M1 com ligadura (média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
2,4±1,57 ^A	2,0±1,29 ^{A,B}	1,8±1,15 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$

Tabela 20- Comparação entre Períodos dos **Escore**s da doença periodontal do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

Escore da doença periodontal do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0±0 ^A	2,60± 0,73 ^B	2,93±0,70 ^B	2,73±0,70 ^B

Nota: Letras diferentes representam p<0,05

Figura 24: Gráfico dos escores da doença periodontal do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando maior avanço da doença periodontal no GST em relação ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferença entre grupos (0,000) e períodos (p = 0,0065). Letras diferentes P<0,05 (teste Tukey). Barras = DPM.

5.5 Avaliação do nível ósseo periodontal

O nível ósseo periodontal (PBL) foi determinado pela distância a partir da junção amelo-cementária (JAC) até a crista óssea alveolar (COA) do M1 conforme sugerido por (CHANG *et al.*, 2013 (B)).

5.5.1 Lado mesial

A análise estatística dos dados (Tabela 21 e 22) e do gráfico (Figura 25) mostrou o PBL (mm) no lado mesial não apresentou diferenças significantes entre os grupos apenas em períodos. Vale salientar que, o aumento do PBL é proporcional a perda óssea vertical/altura do osso alveolar. Assim, o PBL foi em média de 0,445 mm no período de 0 hora, sendo considerada como a distância padrão de um periodonto saudável no lado mesial. Aos 14 dias essa distância aumenta significativamente passando para 0,129 mm, com perda óssea vertical de 0,850 mm. Aos 21 dias esse valor praticamente manteve-se constante 0,123 mm e perda óssea de 0,788 mm. Estes resultados aliados à análise morfológica mostram maior agravamento da perda óssea vertical no lado mesial até o período de 14 dias de ligadura.

Tabela 21 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Mesial	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	1,459249	0,383177	0,712700	2	0,700227

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	37,9285	3	0,000000
Grupos	1,9950	2	0,147132
Períodos*Grupos	0,3709	6	0,893862

Tabela 22- Comparação entre Períodos do PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

PBL (mm) no lado Mesial do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,445±0,109 ^A	0,821±0,166 ^B	0,129±0,376 ^C	0,1233±0,244 ^C

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Figura 25: Gráfico do PBL (mm) no lado MESIAL do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais. O padrão gráfico a dois critérios indica o aumento da PBL até o período de 14 dias em todos os grupos e com menores valores no GTEGCG em relação os demais grupos. ANOVA a dois critérios com diferença entre períodos ($p = 0,000000$). Barras = DPM.

5.5.2 Lado distal

A análise estatística dos dados (Tabelas 23, 24 e 25) e do gráfico (Figura 26) mostrou o PBL (mm) no lado distal apresentou diferenças significantes entre os grupos e entre períodos. No período de 0 hora, o PBL (mm) foi em média de 0,334 mm (distância padrão do periodonto saudável lado distal) e aumentaram gradualmente até os 14 dias (média de 0,625 mm e perda óssea de 0,291 mm), mantendo-se constante aos 21 dias (média de 0,706 mm e perda óssea de 0,372 mm), mostrando que a perda óssea nesta região foi menor em relação ao lado mesial. Com relação aos grupos, os valores do PBL foram significantemente menores no GTEGCG (0,502 mm, perda óssea de 0,168 mm) em relação ao ST (0,612 mm, perda óssea de 0,278 mm) apontando para um efeito benéfico do EGCG com relação à perda óssea vertical/altura na região distal.

Tabela 23 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **PBL (mm) no lado DISTAL do M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

PBL - Lado Distal	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	32,46504	0,207133	11,38238	11	0,411807

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	18,818	3	0,000000
Grupos	4,303	2	0,019095
Períodos*Grupos	1,780	6	0,123184

Tabela 24- Comparação entre Períodos da **distância PBL (mm) no lado DISTAL do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos). Letras diferentes $p < 0,05$.

PBL (mm) no lado Distal do M1 com ligadura (média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
0,374±0,104 ^A	0,572±0,165 ^B	0,625±0,119 ^{B,C}	0,706±0,156 ^C

Tabela 25 - Comparação entre grupos do **PBL (mm) lado DISTAL do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

PBL (mm) no lado Distal do M1 com ligadura (média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
0,612±0,187 ^A	0,593±0,194 ^{A,B}	0,502±0,154 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Figura 26: Gráfico do **PBL (mm) no lado distal do M1 com ligadura** nos diferentes períodos experimentais, mostrando uma menor evolução da perda óssea em altura no GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($0,019095$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey). Barras = DPM.

5.6 Densidade de volume (%) do processo inflamatório na região do Periodonto do M1

A análise dos dados estatísticos (Tabelas 26 e 27) do gráfico (Figura 27) mostrou interação entre grupos e períodos. No período de 0 dias o processo inflamatório ocorreu em pequenas áreas próximas à gengiva sendo ocupando em média de 0,6% da área avaliada. Aos 7 dias pós-ligadura ocorreu um pico do processo inflamatório no GST (9,7%) e GTsalina (7,5%), valores significativamente maiores em relação GTEGCG (2,1%). Aos 14 dias embora tenha ocorrido um decaimento dos percentuais referente ao processo inflamatório no GST (7,3%) e GTsalina (5,2%) e um aumento no GTEGCG (3,4%) os valores foram significativamente menores no grupo EGCG em relação ao GST. Já, aos 21 dias, ocorreu redução do processo inflamatório em todos os grupos, porém o GTEGCG (1,2%) apresentou percentuais menores em relação ao GST (3,2%). Estes resultados apontam que a EGCG possa ter um efeito anti-inflamatório durante a evolução da doença periodontal pós-ligadura.

Tabela 26 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) do processo inflamatório na região do periodonto do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

Processo Inflamatório (%)	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	13,56086	0,234713	11,09883	11	0,435021

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	137,766	3	0,000000
Grupos	73,574	2	0,000000
Períodos*Grupos	17,664	6	0,000000

Tabela 27- Comparação entre períodos da **densidade de volume (%)** do **processo inflamatório do processo inflamatório na região do periodonto do M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos*períodos).

Período	Densidade de volume (%) do processo inflamatório na região do Periodonto do M1 com ligadura		
	GST	GTsalina	GTEGCG
0 dias	0,633±0,40 ^A	0,609±0,48 ^A	0,560±0,71 ^A
7 dias	9,68±1,01 ^B	7,49±0,97 ^C	2,10±1,25 ^{A,E}
14 dias	7,30±0,66 ^B	5,16±1,49 ^{C,D}	3,42±0,76 ^{D,E}
21 dias	3,16±0,64 ^E	2,29±0,94 ^{D,E}	1,17±0,66 ^D

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Figura 27: Gráfico da densidade de volume (%) do processo inflamatório percentual do processo inflamatório (%) no M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando um efeito anti-inflamatório da EGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,0000$) e grupos ($0,0000$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.

5.7 Densidade de volume (%) do tecido ósseo na região periodontal do M1

A análise dos dados estatísticos (Tabelas 28, 29 e 30) do gráfico (Figura 28) mostrou que o osso alveolar na região periodontal do M1 com ligadura apresentou diferença estatisticamente significativa entre períodos e entre grupos, não havendo interação entre eles. Ao 0 dias, os valores percentuais de tecido ósseo foram em média de 51,2%, reduzindo drasticamente até os 7 dias (33,1%) e mantendo constante até os 21 dias, indicando que, a maior perda óssea ocorre aos primeiros 7 dias de ligadura. A redução nos percentuais de tecido ósseo foi maior no GST (35,5%), seguido pelo GTsalina (38,5%) e GTEGCG (40%), indicando um efeito protetor do EGCG durante a perda óssea alveolar induzido pela ligadura.

Tabela 28 - Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região periodontal do M1 com ligadura e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

Tecido Ósseo (%)	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	11,28821	0,186719	11,16329	11	0,429687

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	53,654	3	0,000000
Grupos	4,882	2	0,011753
Períodos*Grupos	1,964	6	0,089567

Tabela 29- Comparação entre Períodos da densidade de tecido ósseo na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (períodos).

Média da densidade de volume (%) tecido ósseo na região do Periodonto do M1 com ligadura dos períodos avaliados (Média±DPM)			
0 dias	7 dias	14 dias	21 dias
51,20±2,62 ^A	33,06±7,36 ^B	31,62±5,46 ^B	36,24±4,60 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Tabela 30- Comparação entre grupos da densidade de tecido ósseo (%) na região do Periodonto do M1 com ligadura pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos).

Média da densidade de volume (%) de tecido ósseo na região do Periodonto do M1 com ligadura dos grupos avaliados (Média±DPM)		
GST	GTsalina	GTEGCG
35,46±10,17 ^A	38,56±8,47 ^{AB}	40,07±9,34 ^B

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Figura 28: Gráfico do percentual de osso alveolar (%) do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando um efeito protetor da EGCG durante a perda óssea alveolar induzida. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($0,011753$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.

5.8 Determinação do número de osteoclastos por mm² do periodonto

As análises dos dados estatísticos (Tabelas 32 e 32) do gráfico (Figura 29) mostraram interação entre grupos e períodos. No período de 0 dias o número de osteoclastos foi em média de 7,0 osteoclastos/mm² da área avaliada. Aos 7 dias pós-ligadura ocorreu um pico no número de osteoclastos no GST (8,7 osteoclastos/mm²) e GTsalina (2,3 osteoclastos/mm²), valores maiores em relação GTEGCG (2,3 osteoclastos/mm²). Aos 14 dias embora ocorra um decaimento dos percentuais referente ao processo inflamatório no GST (3,8 osteoclastos/mm²) e GTsalina (2,8 osteoclastos/mm²) e um aumento no GTEGCG (3,2 osteoclastos/mm²) não apresentando diferença entre grupos. Aos 21 dias, embora ocorra uma redução no número de osteoclastos, esta redução não foi significativa em relação ao período anterior. Estes resultados sugerem que durante o desenvolvimento da doença periodontal por ligadura, a EGCG colabora para a redução da osteoclastogênese nos períodos iniciais da doença.

Tabela 31- Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância do **número de osteoclastos por mm² do periodonto M1 com ligadura** e comparação dos diferentes grupos experimentais pela ANOVA a dois critérios (grupos e períodos).

Osteoclastos por mm ²	Teste de homogeneidade das variâncias ou covariância				
	Hartley	Cochran	Bartlett	df	p
	34,60741	0,226854	19,54375	11	0,052005

Variáveis	ANOVA (grupos*períodos)		
	F	Df	P
Períodos	31,7702	3	0,000000
Grupos	16,3499	2	0,000004
Períodos*Grupos	6,3460	6	0,000058

Tabela 32- Comparação entre Períodos e Grupos do **número de osteoclastos por mm² do periodonto M1 com ligadura** pelo *post-hoc* teste de Tukey (grupos*períodos).

Período	Número de osteoclastos por cm ² do periodonto M1 com ligadura (média±DPM)		
	GST	GTsalina	GTEGCG
0 dias	6,60±9,37 ^A	9,00±3,67 ^A	6,60±9,61 ^A
7 dias	87,40±20,08 ^B	48,20±21,61 ^{B,C,D}	22,90±6,97 ^{A,C}
14 dias	38,36±16,22 ^{C,D}	28,40±6,20 ^{C,D}	32,24±8,46 ^{C,D}
21 dias	35,31±18,09 ^{C,D}	19,80±12,87 ^D	12,94±8,99 ^{A,D}

Nota: Letras diferentes representam $p < 0,05$. DPM: Desvio padrão médio

Figura 29: Gráfico do número de osteoclastos por mm² do M1 com ligadura nos diferentes períodos experimentais, mostrando maior quantidade de osteoclastos nos períodos de 7 nos GST e GTsalina quando comparados ao GTEGCG. ANOVA a dois critérios aponta para diferenças entre períodos ($p = 0,000000$) e grupos ($0,000004$). Letras diferentes $P < 0,05$ (teste Tukey), Barras = DPM.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Em indivíduos que apresentam as estruturas periodontais saudáveis, existe no local equilíbrio entre a geração de radicais livres de oxigênio e sua inativação por antioxidantes. Este equilíbrio é perturbado no quadro da periodontite quando localmente o organismo passa a produzir maior quantidade de ROS nessa região. A liberação de enzimas bacterianas, bem como mediadores inflamatórios e ROS gerados localmente em resposta ao insulto bacteriano leva à perda da inserção gengival, ruptura do tecido conjuntivo e progressão da doença periodontal, que se não tratada adequadamente pode levar à perda das estruturas de suporte dos dentes, incluindo a reabsorção do osso alveolar. Melhorar os efeitos de terapia periodontal por meio da epigallocatequina-3-galato do chá verde foi o foco do nosso trabalho, pois apresenta vários estudos toxicológicos na literatura, além de, outros estudos que já atribuem algumas propriedades farmacológicas ao EGCG, incluindo a de antioxidante, anti-cárie, antibacteriano, antiviral, antidiabético, antimutagênica e antitumorais. Em trabalho anterior (GENNARO *et al.*, 2015) foi verificado que o consumo *ad libitum* de chá verde em ratos diabéticos retardou a evolução do quadro da diabetes e da doença periodontal desenvolvida naturalmente pelos animais. Estes efeitos foram atribuídos aos polifenóis contidos no chá verde, que levaram a redução de citocinas pró-inflamatórias e osteoclastogênica. Devido à dificuldade de se controlar a quantidade e a qualidade do fármaco a ser ingerido na forma de chá, na atual pesquisa propomos a ingestão de quantidades controladas do maior princípio ativo do chá verde, a EGCG, na terapia da doença periodontal.

Como observado no trabalho de GENNARO *et al.*, (2015) no presente trabalho, o consumo diário de 25mg/Kg de EGCG não impediu o aparecimento da doença periodontal induzida pela ligadura em ratos, porém, o grau e a severidade da doença foram significativamente menores em relação aos animais não tratados. Sugerimos que os resultados benéficos do chá verde observados em ratos diabéticos também se deve a presença do EGCG no chá.

No modelo experimental de ligadura todas as características da evolução da doença periodontal foram observados histologicamente tais como: acúmulo de alimento e formação da placa ou biofilme dentário; intenso processo inflamatório com presença de grande quantidade de polimorfonucleares, macrófagos, além de

linfócitos e plasmócitos, destruição/descontinuidade epitelial e formação da bolsa periodontal. Aliado a este quadro inflamatório agudo, foi observado grande perda óssea alveolar com pico no número de osteoclastos aos 7 dias. Como na periodontite humana, a fase destrutiva da periodontite experimental induzida pela ligadura está associada com uma resposta do hospedeiro, como mostrado pela formação de um infiltrado inflamatório na gengiva antes de reabsorção óssea (GYORFI *et al.*, 1994). Devido à rápida instalação e evolução da doença, ela se assemelha ao da periodontite agressiva (AGP) em humanos, caracterizada pela gravidade e rapidez da progressão da doença, envolvendo molares e incisivos com rápida destruição óssea. Segundo, SHADDOX *et al.*, (2011) os níveis elevados de bactérias Gram-negativas podem levar ao aumento de 4 a 5 vezes nos níveis de LPS em circulação, o que, por sua vez, ativa a produção de mediadores inflamatórios como TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, IL12p40, GM-CSF, e MIP1 α , no fluido crevicular gengival (GCF), perpetuando um ciclo inflamatório de destruição periodontal. Do mesmo modo, estudos adicionais forneceram uma correlação entre a disseminação sistêmica do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e doença periodontal (PUSSINEN *et al.*, 2004; PUSSINEN *et al.*, 2007). Assim, no contexto da periodontite, os níveis elevados de bactérias Gram-negativas podem levar ao aumento dos níveis de LPS em circulação, o que, por sua vez, ativam a produção de mediadores inflamatórios, perpetuando um ciclo inflamatório de destruição periodontal.

O maior potencial terapêutico da EGCG na doença periodontal foi observado na fase aguda da inflamação (período de 7 dias). Neste período, ocorreu um pico do processo inflamatório e do número de osteoclastos nos grupos GST de 9,7% e 8,7 osteoclastos/mm², respectivamente, e GTsalina de 7,5% e 2,3 osteoclastos/mm², respectivamente, enquanto que no GTEGCG foi de apenas 2,1% e 2,3 osteoclastos/mm², respectivamente. Ao mesmo tempo, o percentual ósseo alveolar foi inversamente proporcional, reduzindo 40% nos grupos GTsalina e GST e reduzindo apenas 22% no GTEGCG. A EGCG também reduziu a formação e o tamanho das bolsas periodontais. Estes resultados apontam para a importância do processo inflamatório na formação e ativação dos osteoclastos durante a perda da integridade das estruturas periodontais e da perda óssea alveolar. Assim, os possíveis alvos farmacológicos da EGCG seriam em modular a resposta inflamatória e a ativação dos osteoclastos.

Neste sentido um estudo recente *in vitro* mostrou que as catequinas são capazes de modular os parâmetros funcionais dos neutrófilos reduzindo o quadro inflamatório (suprimindo a expressão de TLR4, NFκB e iNOS, diminuição de TNF-α, IL-1β and IL-6 e suprimindo a liberação de ROS e NO), (MARINOVIC, MORANDI e OTTON, 2015), sugerindo que a EGCG pode ter atenuado a destruição inicial pela modulação funcional dos neutrófilos frente ao desafio bacteriano.

Em camundongos BALB/c, a administração via gavagem de polifenol do chá verde 2 horas antes da injeção intraperitoneal de 40mg/Kg de LPS foi capaz de reduzir de maneira dose-dependente, os níveis séricos de TNF-α induzido por LPS. Na dosagem de 0,5g de polifenóis/Kg o nível sérico da citocina diminuiu 80% além de inibir a letalidade induzida pelo LPS, nos camundongos. Na avaliação *in vitro*, a EGCG bloqueou a ativação do fator de transcrição NF-κB em macrófagos RAW264 estimulado com LPS, diminuindo a expressão genica e a produção de TNF-α (YANG *et al.*, 1998). Recentemente, outros estudos *in vitro* tem demonstrado os efeitos positivos da EGCG no processo inflamatório desencadeado pelo TNF-α inibindo as vias do NF-κB e MAPK, isso tem sido observado em hepatócitos estimulados por LPS (LIUET *et al.*, 2014) e em células epiteliais alveolares pulmonares via inibição ICAM-1 dependente de ROS (LEE *et al.*, 2013). A EGCG também tem demonstrado um efeito anti-aterosclerótico através da regulação das vias anti-inflamatórias e metabólicas (PENG *et al.*, 2010; ZHENG *et al.*, 2012) pela coibição de citocinas inflamatórias, tais como TNF-α e IL-1β, por meio do bloqueio da via do NF-κB, e fator nuclear relacionado com E2 (Nrf2) (YUAN, LI e YANG, 2007; SRIRAM, KALAYARASAN e SUDHANDIRAN, 2009; TSAI *et al.*, 2011).

Nas células periodontais humanas estudos *in vitro* (JUNG *et al.*, 2012) mostram que tanto fibroblastos como as células-tronco do LP humanas são afetadas pela adição de 20μg/mL LPS extraído de *Porphyromonas gingivalis* levando a um aumento exacerbado da expressão de citocinas pró-inflamatórias e osteoclastogênica como IL-1β, IL-6, TNF-α, RANKL e que a suplementação/tratamento com 20 μM EGCG reduzem significativamente a expressão destas citocinas. Recentemente também se tem sugerido que a redução dos osteoclastos associada ao EGCG, deve-se a produção de enzimas antioxidativas como a N-acetilcisteína via regulação transcricional do fator relacionado ao fator nuclear E2 (Nrf2) que encapsula o ROS interrompendo a diferenciação dos precursores de osteoclastos via RANKL (CALLAWAY e JIANG, 2015).

Outros trabalhos *in vitro* também observaram que o tratamento com EGCG promove uma *down-regulation* da secreção de IL-6 por células pulpares de humanos estimulados por LPS de *Escherichia coli* (NAKANISHI *et al.*, 2010) e fibroblastos gengivais humanos estimulados por TNF-14 (HOSOKAWA *et al.*, 2010). Num estudo clínico, HIRASAWA *et al.*, (2002) verificaram que a aplicação de EGCG de liberação lenta ao longo de um período de 8 semanas em pacientes com avançada periodontite (profundidade da bolsa de 4,7 mm) levaram a reduções significativas na profundidade da bolsa (3,3 mm) e no número de colônias e bactérias (bacilos anaeróbicos Gram-negativos) cultivadas do fluido crevicular. Todos esses e os nossos resultados confirmam o efeito anti-inflamatório e bactericida da EGCG.

Um dos poucos trabalhos envolvendo o tratamento oral da doença periodontal com a EGCG é o de CHO *et al.*, (2013). Neste estudo a periodontite foi induzida por um fio de ligadura por 7 dias, após a remoção do fio os animais receberam diariamente por gavagem 200mg/Kg de EGCG (200 mg/kg). Após 4 semanas a perda óssea não se recuperaram mesmo após a remoção do fio enquanto que no grupo tratado ocorreu uma melhora significativa da altura óssea, das fibras colágenas do ligamento periodontal e da gengiva com diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF e no número e atividade dos osteoclastos, sugerindo que a administração sistêmica da EGCG pode ter um efeito terapêutico no tecido periodontal destruído.

Aos 14 dias embora ocorra uma diminuição nos percentuais referentes ao processo inflamatório e no número de osteoclastos no GST (7,3% e 3,8 osteoclastos/mm²), e GTsalina (5,2% e 2,8 osteoclastos/mm²), e um aumento no GTEGCG (3,4% e 3,2 osteoclastos/mm²) em relação aos períodos anteriores, os valores foram menores no grupo EGCG ou não apresentaram diferenças significativas entre eles. Estes resultados apontam para a mobilização do pico inflamatório e de reabsorção óssea de 7 dias para 14 dias no grupo tratado com EGCG. Estes resultados mostram que a doença periodontal evoluiu, porém, a uma velocidade bem menor em relação aos animais não tratados.

Aos 21 dias, embora os percentuais de processo inflamatório, número de osteoclastos e osso alveolar não tenham apresentado diferenças significativas com os obtidos aos 14 dias, o padrão gráfico e histológico mostra uma inversão do quadro patológico, similar ao quadro de cronificação da doença, com reduções no processo inflamatório e no número de osteoclastos associado ao pequeno ganho

ósseo. Neste período é nítida a recessão gengival, com reinserção epitelial ao nível cervical ou medial da raiz, com algumas áreas exibindo exposição da região da furca, sendo menos acentuada nos animais que receberam EGCG. Provavelmente, neste modelo experimental seria o período em que a resposta do hospedeiro foi diminuída por meio da indução de tolerância à endotoxina, diminuindo a perda óssea (SUN *et al.*, 2014).

Osso alveolar uma das estruturas de suporte do dente, é caracterizado por alta porosidade e heterogeneidade. Além disso, a complexidade das estruturas anatômicas adjacentes (raiz do dente, cimento e ligamento periodontal) pode causar dificuldade durante a quantificação. Embora a análise histomorfométrica traga informações qualitativas valiosas do processo biológico envolvido com a inflamação e alterações teciduais das estruturas periodontais e a histomorfometria do osso seja um dos métodos padronizados que pode ser utilizado para quantificar a microestrutura do osso trabecular, porém ela é limitada a análise bidimensional (2D) sendo representada por alguns cortes e em planos específicos (GALLEGO *et al.*, 2010).

A microtomografia computadorizada é uma técnica não destrutiva que reconstrói e modela interiores de amostras que contêm tecidos duros em escala micrométrica e obtêm informações sobre sua geometria tridimensional. O conceito básico desse processo de imagem provou que um objeto tridimensional pode ser reconstruído por meio de suas projeções bidimensionais (AMABILI e ALIJANI, 2014).

Na microtomografia computadorizada, os raios X são concentrados num feixe estreito que passa por uma pequena parte do corpo, sendo detectado do outro lado da amostra. A intensidade dos raios X que chega ao detector de diferentes ângulos é convertida em um sinal digital, posteriormente processado por um computador e convertido em uma imagem espacial de alta resolução. Ao processar essas informações, o computador, reconstrói uma imagem bidimensional ou tridimensional da amostra a partir de informações obtidas para uma única fatia (2D) ou múltiplas fatias (3D) da amostra .

A resolução espacial de uma imagem em tomografia computadorizada depende da capacidade de um sistema de imagem em distinguir dois pontos na imagem com diferentes atenuações e separados por pequenas distâncias em uma amostra. Assim, quanto menor e mais próximos os pontos na amostra que o sistema

consiga distinguir, melhor a resolução espacial. Uma estrutura não será discriminada na imagem se for menor que o valor da resolução espacial do equipamento. Este parâmetro depende do feixe de raios X transmitido e detectado, do processo de reconstrução da imagem e do processo de aquisição (rotação da amostra) (BANKMAN, 2008).

Neste trabalho utilizamos o microtomógrafo modelo SkyScan 1176 com resolução/pixel de aproximadamente 9 μ m aumentando o tempo de aquisição das imagens (43 min), visto que, a região óssea a ser avaliada era do osso alveolar ao redor do M1 e as dimensões a serem avaliadas em muitos eram inferiores a 1mm.

Assim, avaliamos nas imagens bidimensionais indiretamente a perda óssea em altura nos lados vestibular, lingual, mesial e distal pela determinação do nível ósseo periodontal (PBL) e em 3D a perda óssea trabecular inter-radicular pela determinação da densidade do osso. Este conjunto de informação permitiu definir um padrão espacial das alterações ósseas estruturais durante a doença periodontal induzida por ligadura ao longo do tempo e verificar com mais detalhes o efeito protetor da EGCG na perda óssea periodontal.

Com relação às medidas do PBL ao micro-CT, o mesmo foi realizado nos cortes histológicos longitudinais, porém neste tipo de ângulo de corte não foi possível quantificar as perdas do lado lingual e vestibular. Quando comparamos os resultados obtidos nas análises microtomográficas e histológicas para o PBL nos lados mesial e lingual observamos que os valores obtidos foram similares. Assim, no período de 0 dias, os valores obtidos nas imagens ao micro-CT e histomorfométrica no lado mesial foram em média, respectivamente $0,603 \pm 0,09$ mm e $0,445 \pm 0,109$ mm para o lado mesial e $0,407 \pm 0,06$ e $0,374 \pm 0,104$ mm para a lingual, evidenciando sempre maior PBL para o lado mesial comparado ao distal. Tanto para o lado mesial como distal o perfil gráfico do PBL foi similar nos dois tipos de avaliações. Ao submetemos os dados a ANOVA a dois critérios em ambos os lados e metodologias utilizadas mostraram diferenças significativas quanto ao período de tratamento observou-se um acentuado aumento linear no período de inflamação aguda, entre 0 e 14 dias, tanto no lado mesial (aumento médio de 149,5% na análise ao micro-CT vs. 191% para histomorfométrica) e distal (92% na análise ao micro-CT vs. 77,3% para a histomorfométrica), indicando em ambas metodologias maior perda óssea no lado mesial comparado a distal. No período relacionado à fase crônica podemos observar que o PBL praticamente se manteve nos grupos GTsalina e GST (média de

0,680 mm aos 14 dias e de 0,786 mm aos 21 dias) e decaiu no GTEGCG (média de 0,634 mm aos 14 dias e 0,546 mm aos 21 dias) indicando que, nestas regiões o tratamento com a EGCG promoveu uma melhora no quadro da doença estabilizando o nível ósseo perdido.

A avaliação quanto ao PBL nos lados vestibular e lingual só foi feita nas imagens obtidas ao Micro-CT, pois as imagens histológicas foram obtidas apenas no plano transaxial. Ao micro-CT, o PBL no período de 0 hora para a vestibular foi em média de $0,444 \pm 0,05$ mm e para a lingual de $0,846 \pm 0,08$ mm. Como observado para os lados mesial e distal, na fase aguda da doença o PBL no lado vestibular e lingual aumentam, respectivamente 141% e 45%, indicando maior perda óssea no lado vestibular comparado a lingual. Neste período, em ambos os lados os valores do PBL foram menores no grupo que recebeu EGCG comparado aos demais grupos sem tratamento, porém só foi estatisticamente significativa no lado vestibular. Na fase crônica da doença, período de 14 a 21 dias, ocorre a manutenção do PBL em todos os grupos, com tendência de equiparação dos valores entre os grupos, reforçando novamente que o efeito principal da EGCG ocorre na fase aguda da doença. Outro fator relevante que não pode ser observado nos cortes histológicos foi que na fase aguda da doença a cortical óssea vestibular apresentou uma redução acentuada também em espessura, indicando a ocorrência de perda óssea horizontal. Na fase crônica observou-se um aumento em espessura nessa região devido à aposição de novo tecido ósseo na cortical óssea, remanescente caracterizado por uma faixa mais radiopaca, mostrando a importância da análise em 3D na avaliação da perda óssea e da remodelação alveolar durante as diferentes fases da doença periodontal.

Com relação ao volume ósseo cortical, fica claro nas imagens ao micro-CT que este não pode ser determinado, pois os limites são perdidos com a evolução da doença. A perda óssea em altura/vertical, é representado com maior confiabilidade pelo aumento das medidas lineares bidimensionais do PBL, como já visto. Volumetricamente a perda do tecido ósseo na região medular localizado entre as raízes no plano transaxial, utilizando como limite as raízes mesial e disto-vestibular onde determinamos o percentual de osso remanescente (BV/TV). Assim a perda óssea foi determinada indiretamente pela redução do BV/TV. O BV/TV entre as raízes antes da ligadura foi em média de $76,22 \pm 7,49\%$. Nos primeiros 7 dias de ligadura, o BV/TV reduziu acentuadamente 35% no GST, 25% no GTsalina e 19%

no GTEGCG nos primeiros 7 dias em todos os grupos, devido à presença do processo inflamatório localizado na região da furca que se expandiu ao longo do tecido ósseo inter-radicular promovendo a reabsorção óssea, sendo menos acentuada nos animais que foram tratados com EGCG. Entre 7 e 21 dias a BV/TV aumenta em todos os grupo, sendo em média de $66,56 \pm 3,44\%$ sugerindo uma fase de reparo com restauração parcial do volume ósseo. Com relação aos grupos experimentais novamente os dados estatísticos apontam para um efeito benéfico da EGCG na evolução da doença periodontal quanto à perda óssea inter-radicular.

Dependendo da extensão das alterações estruturais acometidas no tecido ósseo as medidas lineares e volumétricas obtidas no presente estudo com o micro-ct correlacionaram bem com os obtidos histomorfométricos, sugerindo que a microtomografia pode ser uma excelente ferramenta na quantificação de alterações estruturais ósseas decorrentes de processos patológicos. Nesse sentido, alguns autores afirmam que a avaliação morfométrica pelo micro-CT é capaz de detectar perda óssea alveolar; não sendo necessária uma avaliação histológica complementar para confirmação dos dados (CHERN *et al.*, 2007). Segundo CHACKARTCHI *et al.* (2011), a maioria das análises histomorfométricas é baseada num cálculo quantitativo de uma imagem 2D, feita a partir da porção central da amostra, contrastando com a análise de micro-CT, que é feita a partir do volume total da amostra, e, portanto, mais completa neste aspecto. Porém, a análise histomorfométrica mesmo sendo mais invasiva e trabalhosa do que a análise ao micro-CT, se usada corretamente, dentro de padrões já validados, remete à dados confiáveis que servem para a validação de quantificações morfométricas em imagens obtidas ao micro-CT. Além disso, a análise histológica pode nos remeter a informações que permitem avaliar celularmente e molecularmente os eventos que levam a destruição tecidual e/ou reparo. No caso da doença periodontal, a extensão do processo inflamatório, os tipos de infiltrado inflamatório, a presença de necrose tecidual, a organização do tecido mole são mais facilmente acessados pela análise histológica.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada e os resultados obtidos, verificamos que:

- a) a ligadura do M1 promove rapidamente o acúmulo do biofilme e o desenvolvimento da doença periodontal similarmente ao observado em humanos (gengivite, seguida pelas periodontites leve, moderada e severa);
 - b) a doença periodontal induzida pela ligadura apresenta duas fases: uma fase inicial aguda, onde ocorre intenso processo inflamatório, com presença de neutrófilos, macrófagos e linfócitos, ativação exacerbada de osteoclastos, perda da integridade epitelial, formação de extensas bolsas e grande destruição dos tecidos periodontais. Por fim uma fase crônica, onde podem ser observados os eventos inflamatórios e reabsortivos diminuem e áreas de reparo/reestruturação;
 - c) o tratamento dos animais com 25mg/Kg de EGCG via gavagem não impediu a instalação e a progressão da doença periodontal nos M1 que sofreram ligadura, porém o processo inflamatório e a presença de osteoclastos foram menores e lentos na fase aguda quando comparado aos animais não tratados, salientado a atividade anti-inflamatória e anti-osteoclastogênica da EGCG;
 - d) nos animais tratados com EGCG a perda óssea avaliada pelo aumento da PBL nas regiões mesial, distal e vestibular e, do percentual de tecido ósseo na região inter-dental (BV/TV) foram significativamente menores comparado ao GST e ao GTsalina, indicando que o tratamento com a EGCG reduz a perda óssea durante a doença periodontal; e
 - e) por fim, os dados de PBL e do percentual de tecido ósseo obtidos pela análise microtomográfica e histomorfométrica apresentaram o mesmo padrão gráfico e similaridade numérica, indicando que ambas as metodologias são confiáveis para a quantificação da perda óssea.
-
-

Portanto, no modelo de periodontite induzida por ligadura, o tratamento com EGCG diminui o processo inflamatório e a osteoclastogênese e consequentemente a perda óssea e a severidade da doença, sugerindo a utilização do EGCG como um adjuvante no tratamento da doença periodontal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

AAS, J. A. et al. **Defining the normal bacterial flora of the oral cavity.** J Clin Microbiol, v. 43, n. 11, p. 5721-32, Nov 2005. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137.

ABOU SULAIMAN, A. E.; SHEHADEH, R. M. **Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the treatment of non-smokers with chronic periodontitis.** J Periodontol, v. 81, n. 11, p. 1547-54, Nov 2010. ISSN 0022-3492.

AFRICA, C. W.; PARKER, J. R.; REDDY, J. **Bacteriological studies of subgingival plaque in a periodontitis-resistant population. I. Darkfield microscopic studies.** J Periodontal Res, v. 20, n. 1, p. 1-7, Jan 1985. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

ALOK SHARMA, S. S. **Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Periodontics: A Review.** International Journal of Dental Clinics, v. 3, n. 2, 2011. Disponível em: <<http://intjdc.org/index.php/intjdc/article/view/12.3.2.11>>.

AMABILI, M.; ALIJANI, F. **International Journal of Non-Linear Mechanics - 4th Canadian Conference on Non-linear Solid Mechanics.** 2014.

ARMITAGE, G. C. **Clinical evaluation of periodontal diseases.** Periodontol 2000, v. 7, p. 39-53, Feb 1995. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

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) 0022-1767.

BADER, H. I. **Adjunctive periodontal therapy: a review of current techniques.** Dent Today, v. 29, n. 7, p. 94-6, 98; quiz 98, 103, Jul 2010. ISSN 8750-2186 (Print) 8750-2186.

BAEHNI, P.; TONETTI, M. S. **Conclusions and consensus statements on periodontal health, policy and education in Europe: a call for action--consensus view 1. Consensus report of the 1st European Workshop on Periodontal Education.** Eur J Dent Educ, v. 14 Suppl 1, p. 2-3, May 2010. ISSN 1396-5883.

BAKER, P. J. et al. **CD4(+) T cells and the proinflammatory cytokines gamma interferon and interleukin-6 contribute to alveolar bone loss in mice.** Infect Immun, v. 67, n. 6, p. 2804-9, Jun 1999. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567.

* As referências estão nos padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)

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) 1286-4579.

BALENTINE, D. A.; WISEMAN, S. A.; BOUWENS, L. C. **The chemistry of tea flavonoids.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, v. 37, n. 8, p. 693-704, Dec 1997. ISSN 1040-8398 (Print) 1040-8398.

BANKMAN, I. **Handbook of medical image processing and analysis.** 2008.

BARTOLD, P. M.; WIEBKIN, O. W.; THONARD, J. C. **The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid.** *J Periodontal Res*, v. 19, n. 4, p. 390-400, Jul 1984. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

BATTINO, M. et al. **Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species.** *Crit Rev Oral Biol Med*, v. 10, n. 4, p. 458-76, 1999. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411.

BEREZOW, A. B.; DARVEAU, R. P. **Microbial shift and periodontitis.** *Periodontol* 2000, v. 55, n. 1, p. 36-47, Feb 2011. ISSN 0906-6713.

BEZERRA, M. M. et al. **Low-dose doxycycline prevents inflammatory bone resorption in rats.** *Braz J Med Biol Res*, v. 35, n. 5, p. 613-6, May 2002. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879x.

BHARDWAJ, A.; BHARDWAJ, S. V. **Role of Antioxidants in Periodontal Disease and Its Therapy.** *Asian Journal of Medical Research*, v. 1, n. 2, p. 62-67, 2012.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta / Free radicals and the main dietary antioxidants.** *Rev. nutr.* 2: 123-130 p. 1999.

BIASIBETTI, R. et al. **Green tea (-)epigallocatechin-3-gallate reverses oxidative stress and reduces acetylcholinesterase activity in a streptozotocin-induced model of dementia.** *Behav Brain Res*, v. 236, n. 1, p. 186-93, Jan 1 2013. ISSN 0166-4328.

BOHLOOLI, S. et al. **The effect of spinach supplementation on exercise-induced oxidative stress.** *J Sports Med Phys Fitness*, v. 55, n. 6, p. 609-14, Jun 2015. ISSN 0022-4707 (Print) 0022-4707.

BOILLOT, A. et al. **Periodontal microbiota and phospholipases: The Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST)**. *Atherosclerosis*, v. 242, n. 2, p. 418-423, Jul 22 2015. ISSN 0021-9150.

BOSTANCI, V. et al. **Effect of chronic periodontitis on serum and gingival crevicular fluid oxidant and antioxidant status in patients with familial Mediterranean fever before and after periodontal treatment**. *J Periodontol*, v. 85, n. 5, p. 706-12, May 2014. ISSN 0022-3492.

BROCK, G. R. et al. **Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health**. *J Clin Periodontol*, v. 31, n. 7, p. 515-21, Jul 2004. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

CALLAWAY, D. A.; JIANG, J. X. **Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases**. *J Bone Miner Metab*, v. 33, n. 4, p. 359-70, Jul 2015. ISSN 0914-8779.

CALLAWAY, D. A.; JIANG, J. X. **Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases**. *J Bone Miner Metab*, v. 33, n. 4, p. 359-70, Jul 2015. ISSN 0914-8779.

CARDOSO, C. R. et al. **Characterization of CD4+CD25+ natural regulatory T cells in the inflammatory infiltrate of human chronic periodontitis**. *J Leukoc Biol*, v. 84, n. 1, p. 311-8, Jul 2008. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400.

CARRANZA JR, F. A.; NEWMAN, M. G. **Carranza - Periodontia Clínica**. 11. 2012. 1208 ISBN 8535245405.

CHACKARTCHI, T. et al. **Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study**. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, n. 5, p. 473-80, May 2011. ISSN 0905-7161.

CHACKARTCHI, T. et al. **Sinus floor augmentation using large (1-2 mm) or small (0.25-1 mm) bovine bone mineral particles: a prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study**. *Clin Oral Implants Res*, v. 22, n. 5, p. 473-80, May 2011. ISSN 0905-7161.

CHALASANI, N. P. et al. **ACG Clinical Guideline: The Diagnosis and Management of Idiosyncratic Drug-Induced Liver Injury**. 950-966 p. 2014.

CHANDRA, H. M. et al. **Influence of genotypic variations on antioxidant properties in different fractions of tomato.** J Food Sci, v. 77, n. 11, p. C1174-8, Nov 2012. ISSN 0022-1147.

CHANG, P. C. et al. **A comparison of the thresholding strategies of micro-CT for periodontal bone loss: a pilot study.** Dentomaxillofac Radiol, v. 42, n. 2, p. 66925194, 2013. ISSN 0250-832X (Print) 0250-832x. (A)

CHANG, P. C. et al. **Progression of periodontal destruction and the roles of advanced glycation end products in experimental diabetes.** J Periodontol, v. 84, n. 3, p. 379-88, Mar 2013. ISSN 0022-3492. (B)

CHAPPLE, I. L. et al. **Glutathione in gingival crevicular fluid and its relation to local antioxidant capacity in periodontal health and disease.** Mol Pathol, v. 55, n. 6, p. 367-73, Dec 2002. ISSN 1366-8714 (Print) 1366-8714.

CHAPPLE, I. L. **Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases.** J Clin Periodontol, v. 24, n. 5, p. 287-96, May 1997. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

CHAPPLE, I. L.; MATTHEWS, J. B. **The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction.** Periodontol 2000, v. 43, p. 160-232, 2007. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

CHATTERJEE, A. et al. **Green tea: A boon for periodontal and general health.** J Indian Soc Periodontol, v. 16, n. 2, p. 161-7, Apr 2012. ISSN 0972-124x.

CHERN, G. D. et al. **High-Q-preserving coupling between a spiral and a semicircle micro-cavity.** Opt Lett, v. 32, n. 9, p. 1093-5, May 1 2007. ISSN 0146-9592 (Print) 0146-9592.

CHERN, G. D. et al. **High-Q-preserving coupling between a spiral and a semicircle micro-cavity.** Opt Lett, v. 32, n. 9, p. 1093-5, May 1 2007. ISSN 0146-9592 (Print) 0146-9592.

CHO, A. R. et al. **The effect of orally administered epigallocatechin-3-gallate on ligature-induced periodontitis in rats.** J Periodontal Res, v. 48, n. 6, p. 781-9, Dec 2013. ISSN 0022-3484.

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) 0022-3492.

COOPER, P. R.; PALMER, L. J.; CHAPPLE, I. L. **Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe?** Periodontol 2000, v. 63, n. 1, p. 165-97, Oct 2013. ISSN 0906-6713.

DAHIYA, P. et al. **Reactive oxygen species in periodontitis.** J Indian Soc Periodontol, v. 17, n. 4, p. 411-6, Jul 2013. ISSN 0972-124X (Print) 0972-124x.

DAHLEN, G. et al. **The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease.** J Clin Periodontol, v. 19, n. 10, p. 802-9, Nov 1992. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

DE MOLON, R. S. et al. **Long-term evaluation of oral gavage with periodontopathogens or ligature induction of experimental periodontal disease in mice.** Clin Oral Investig, Sep 28 2015. ISSN 1432-6981.

DE MOLON, R. S.; DE AVILA, E. D.; CIRELLI, J. A. **Host responses induced by different animal models of periodontal disease: a literature review.** J Investig Clin Dent, v. 4, n. 4, p. 211-8, Nov 2013. ISSN 2041-1618.

DE OLIVEIRA, C.; WATT, R.; HAMER, M. **Toothbrushing, inflammation, and risk of cardiovascular disease: results from Scottish Health Survey.** Bmj, v. 340, p. c2451, 2010. ISSN 0959-535x.

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)

DOGAN, B. et al. **Consistent intrafamilial transmission of Actinobacillus actinomycetemcomitans despite clonal diversity.** J Periodontol, v. 79, n. 2, p. 307-15, Feb 2008. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

DUARTE, P. M. et al. **Microbial profile of ligature-induced periodontitis in rats.** Arch Oral Biol, v. 55, n. 2, p. 142-7, Feb 2010. ISSN 0003-9969.

DUCY, P. et al. **Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation.** Cell, v. 89, n. 5, p. 747-54, May 30 1997. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

EBERSOLE, J. L. **Humoral immune responses in gingival crevice fluid: local and systemic implications.** Periodontol 2000, v. 31, p. 135-66, 2003. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. **Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.** Free Radic Biol Med, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849.

EZZO, P. J.; CUTLER, C. W. **Microorganisms as risk indicators for periodontal disease.** Periodontol 2000, v. 32, p. 24-35, 2003. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

GALLEGO, L. et al. **Three-dimensional culture of mandibular human osteoblasts on a novel albumin scaffold: growth, proliferation, and differentiation potential in vitro.** Int J Oral Maxillofac Implants, v. 25, n. 4, p. 699-705, Jul-Aug 2010. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786.

GALLEGO, L. et al. **Three-dimensional culture of mandibular human osteoblasts on a novel albumin scaffold: growth, proliferation, and differentiation potential in vitro.** Int J Oral Maxillofac Implants, v. 25, n. 4, p. 699-705, Jul-Aug 2010. ISSN 0882-2786 (Print) 0882-2786.

GARCIA, V. G. et al. **Treatment of experimental periodontal disease with antimicrobial photodynamic therapy in nicotine-modified rats.** J Clin Periodontol, v. 38, n. 12, p. 1106-14, Dec 2011. ISSN 0303-6979.

GARLET, G. P. et al. **Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced periodontal disease in mice: patterns of cytokine, chemokine, and chemokine receptor expression and leukocyte migration.** Microbes Infect, v. 7, n. 4, p. 738-47, Apr 2005. ISSN 1286-4579 (Print) 1286-4579.

GARLET, G. P. et al. **Animal models to study host-bacteria interactions involved in periodontitis.** Front Oral Biol, v. 15, p. 117-32, 2012. ISSN 1420-2433 (Print) 0301-536x.

GARLET, G. P. et al. **Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease.** J Periodontal Res, v. 38, n. 2, p. 210-7, Apr 2003. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

GARLET, G. P. et al. **The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in Actinobacillus actinomycetemcomitans-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction.** Clin Exp Immunol, v. 147, n. 1, p. 128-38, Jan 2007. ISSN 0009-9104 (Print) 0009-9104.

GARLET, T. P. et al. **Differential expression of osteoblast and osteoclast chemmoatractants in compression and tension sides during orthodontic movement.** Cytokine, v. 42, n. 3, p. 330-5, Jun 2008. ISSN 1043-4666.

GEMMELL, E. et al. **Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues.** Oral Microbiol Immunol, v. 17, n. 6, p. 388-93, Dec 2002. ISSN 0902-0055 (Print) 0902-0055.

GENNARO, G. et al. **Green Tea Modulates Cytokine Expression in the Periodontium and Attenuates Alveolar Bone Resorption in Type 1 Diabetic Rats.** PLoS One, v. 10, n. 8, p. e0134784, 2015. ISSN 1932-6203.

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 0303-6979.

GYORFI, A. et al. **Neurogenic component in ligature-induced periodontitis in the rat.** J Clin Periodontol, v. 21, n. 9, p. 601-5, Oct 1994. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

HA, H. et al. **Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts.** Exp Cell Res, v. 301, n. 2, p. 119-27, Dec 10 2004. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. **Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases.** Periodontol 2000, v. 5, p. 78-111, Jun 1994. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

HALLIWELL, B. **Free radicals and antioxidants: updating a personal view.** Nutr Rev, v. 70, n. 5, p. 257-65, May 2012. ISSN 0029-6643.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. **Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?** Br J Pharmacol, v. 142, n. 2, p. 231-55, May 2004. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188.

HAMILTON-MILLER, J. M. **Anti-cariogenic properties of tea (Camellia sinensis).** J Med Microbiol, v. 50, n. 4, p. 299-302, Apr 2001. ISSN 0022-2615 (Print) 0022-2615.

HAQQI, T. M. et al. **Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 96, n. 8, p. 4524-9, Apr 13 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424.

HASLER, C. M. **Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health.** J Nutr, v. 132, n. 12, p. 3772-81, Dec 2002. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

HIRASAWA, M. et al. **Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study.** J Periodontal Res, v. 37, n. 6, p. 433-8, Dec 2002. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

HIRASAWA, M. et al. **Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study.** J Periodontal Res, v. 37, n. 6, p. 433-8, Dec 2002. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

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 1613-4125.

HUANG, D. M. et al. **[Colonization relationship between Porphyromonas gingivalis and Bacteroides forsythus in the infected root canals with chronic apical periodontitis].** Shanghai Kou Qiang Yi Xue, v. 14, n. 5, p. 531-5, Oct 2005. ISSN 1006-7248 (Print) 1006-7248.

JIMI, E.; GHOSH, S. **Role of nuclear factor-kappaB in the immune system and bone.** Immunol Rev, v. 208, p. 80-7, Dec 2005. ISSN 0105-2896 (Print) 0105-2896.

JUNG, I. H. et al. **Anti-inflammatory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated fibroblasts and stem cells derived from human periodontal ligament.** J Periodontal Implant Sci, v. 42, n. 6, p. 185-95, Dec 2012. ISSN 2093-2278 (Print) 2093-2278.

KAKLAMANOS, E. G.; TSALIKIS, L. **A review on peri-implant crevicular fluid assays potential in monitoring and predicting peri-implant tissue responses.** J Int Acad Periodontol, v. 4, n. 2, p. 49-59, Apr 2002. ISSN 1466-2094 (Print) 1466-2094.

KASSEBAUM, N. J. et al. **Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression.** J Dent Res, v. 93, n. 11, p. 1045-53, Nov 2014. ISSN 0022-0345.

KENWORTHY, R.; BAVEREL, M. **Studies of a periodontal tissue lesion in the rat, untreated or treated with chlorhexidine digluconate.** J Clin Periodontol, v. 8, n. 4, p. 349-58, Aug 1981. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

KHOLY, K. E.; GENCO, R. J.; VAN DYKE, T. E. **Oral infections and cardiovascular disease.** Trends in Endocrinology & Metabolism, v. 26, n. 6, p. 315-321, 6// 2015. ISSN 1043-2760. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276015000454> >.

KIM, H. R. et al. **Green tea protects rats against autoimmune arthritis by modulating disease-related immune events.** J Nutr, v. 138, n. 11, p. 2111-6, Nov 2008. ISSN 0022-3166.

KINANE, D. F.; LAPPIN, D. F. **Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease.** Acta Odontol Scand, v. 59, n. 3, p. 154-60, Jun 2001. ISSN 0001-6357 (Print) 0001-6357.

KINANE, D. F.; MARSHALL, G. J. **Periodontal manifestations of systemic disease.** Aust Dent J, v. 46, n. 1, p. 2-12, Mar 2001. ISSN 0045-0421 (Print) 0045-0421.

KLAUSEN, B. **Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article.** J Periodontol, v. 62, n. 1, p. 59-73, Jan 1991. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

KOPEC, R. E. et al. **Avocado consumption enhances human postprandial provitamin A absorption and conversion from a novel high-beta-carotene tomato sauce and from carrots.** J Nutr, v. 144, n. 8, p. 1158-66, Aug 2014. ISSN 0022-3166.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. **The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players.** Periodontol 2000, v. 14, p. 33-53, Jun 1997. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

KOU, Y. et al. **Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with Porphyromonas gingivalis vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols.** J Periodontol, v. 79, n. 1, p. 174-80, Jan 2008. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

KURITA-OCHIAI, T. et al. **Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress.** Antioxidants. 4: 577-590 p. 2015.

KUSHIYAMA, M. et al. **Relationship between intake of green tea and periodontal disease.** J Periodontol, v. 80, n. 3, p. 372-7, Mar 2009. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

LAMSTER, I. B.; NOVAK, M. J. **Host mediators in gingival crevicular fluid: implications for the pathogenesis of periodontal disease.** Crit Rev Oral Biol Med, v. 3, n. 1-2, p. 31-60, 1992. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411.

LEE, I. T. et al. **Protective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against TNF-alpha-induced lung inflammation via ROS-dependent ICAM-1 inhibition.** J Nutr Biochem, v. 24, n. 1, p. 124-36, Jan 2013. ISSN 0955-2863.

LEE, J. H. et al. **Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppressing the nuclear factor-kappaB signal.** Mol Pharmacol, v. 77, n. 1, p. 17-25, Jan 2010. ISSN 0026-895x.

LEE, N. K. et al. **A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation.** Blood, v. 106, n. 3, p. 852-9, Aug 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

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 0019-9567.

LEE, Y. S. et al. **AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts.** Bone, v. 47, n. 5, p. 926-37, Nov 2010. ISSN 1873-2763.

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 0077-8923.

LI, C. L. et al. **Impact of Actinomyces naeslundii on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in ovariectomized rats with periodontitis.** J Craniomaxillofac Surg, Jul 14 2015. ISSN 1010-5182.

LOHINAI, Z. et al. **Evidence for the expression of cyclooxygenase-2 enzyme in periodontitis.** Life Sci, v. 70, n. 3, p. 279-90, Dec 7 2001. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205.

LOLAYEKAR, N.; SHANBHAG, C. **Polyphenols and oral health.** RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia, v. 9, n. 1, 2012. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=153023690011> >.

LOVEGROVE, J. M. **Dental plaque revisited: bacteria associated with periodontal disease.** J N Z Soc Periodontol, n. 87, p. 7-21, 2004. ISSN 0111-1485 (Print) 0111-1485.

LUAN, Q. et al. **Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial.** J Dent Res, v. 87, n. 2, p. 148-52, Feb 2008. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345.

LUSHCHAK, V. I. **Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification.** Chem Biol Interact, v. 224c, p. 164-175, Oct 28 2014. ISSN 0009-2797.

MARINOVIC, M. P.; MORANDI, A. C.; OTTON, R. **Green tea catechins alone or in combination alter functional parameters of human neutrophils via suppressing the activation of TLR-4/NFkappaB p65 signal pathway.** Toxicol In Vitro, v. 29, n. 7, p. 1766-78, Oct 2015. ISSN 0887-2333.

MARUYAMA, T. et al. **Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation.** Arch Oral Biol, v. 56, n. 1, p. 48-53, Jan 2011. ISSN 0003-9969.

MEYLE, J.; CHAPPLE, I. **Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis.** Periodontol 2000, v. 69, n. 1, p. 7-17, Oct 2015. ISSN 0906-6713.

MOGI, M.; OTOGOTO, J. **Expression of cathepsin-K in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis.** Arch Oral Biol, v. 52, n. 9, p. 894-8, Sep 2007. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969.

MOORE, W. E.; MOORE, L. V. **The bacteria of periodontal diseases.** Periodontol 2000, v. 5, p. 66-77, Jun 1994. ISSN 0906-6713 (Print) 0906-6713.

MORAES, R. M. et al. **Exenatide and Sitagliptin Decrease the Expression of Il1b, Mmp9 and Nos2, but Does not Reduce Alveolar Bone Loss in Rats With Periodontitis.** J Periodontol, p. 1-15, Jul 24 2015. ISSN 0022-3492.

MUNIN, A.; EDWARDS-LEVY, F. **Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review.** Pharmaceutics, v. 3, n. 4, p. 793-829, 2011. ISSN 1999-4923.

MUNIZ, F. W. et al. **The impact of antioxidant agents complimentary to periodontal therapy on oxidative stress and periodontal outcomes: A systematic review.** Arch Oral Biol, v. 60, n. 9, p. 1203-14, Sep 2015. ISSN 0003-9969.

NAKANISHI, T. et al. **Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors.** Eur J Oral Sci, v. 118, n. 2, p. 145-50, Apr 2010. ISSN 0909-8836.

NANCI, A. **Ten Cate - Histologia Oral. Desenvolvimento, estrutura e função.** 7ª Edição. 2008. ISBN 978-85-3522982-0.

NOGUEIRA-FILHO, G. R. et al. **Impact of cannabis sativa (marijuana) smoke on alveolar bone loss: a histometric study in rats.** J Periodontol, v. 82, n. 11, p. 1602-7, Nov 2011. ISSN 0022-3492.

NUGALA, B. et al. **Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease: The Asian paradox.** J Indian Soc Periodontol, v. 16, n. 3, p. 313-6, Jul 2012. ISSN 0972-124x.

OKA, Y. et al. **Tea polyphenols inhibit rat osteoclast formation and differentiation.** J Pharmacol Sci, v. 118, n. 1, p. 55-64, 2012. ISSN 1347-8613.

PAIVA, F. P. D.; MAFFILI, V. V.; SANTOS, A. C. S. **Curso de Manipulação de Animais de Laboratório.** MONIZ., M. D. 2005.

PALASKA, I.; PAPATHANASIOU, E.; THEOHARIDES, T. C. **Use of polyphenols in periodontal inflammation.** Eur J Pharmacol, v. 720, n. 1-3, p. 77-83, Nov 15 2013. ISSN 0014-2999.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. **Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease.** Oxid Med Cell Longev, v. 2, n. 5, p. 270-8, Nov-Dec 2009.

PENG, N. et al. **Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-6- and angiotensin II-induced production of C-reactive protein in vascular smooth muscle cells.** Life Sci, v. 86, n. 11-12, p. 410-5, Mar 13 2010. ISSN 0024-3205.

PETERSEN, P. E. et al. **The global burden of oral diseases and risks to oral health.** Bull World Health Organ, v. 83, n. 9, p. 661-9, Sep 2005. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686.

PETERSEN, P. E.; OGAWA, H. **The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control.** Periodontol 2000, v. 60, n. 1, p. 15-39, Oct 2012. ISSN 0906-6713.

PETTI, S.; SCULLY, C. **Polyphenols, oral health and disease: A review.** J Dent, v. 37, n. 6, p. 413-23, Jun 2009. ISSN 0300-5712.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. **Periodontal diseases.** Lancet, v. 366, n. 9499, p. 1809-20, Nov 19 2005. ISSN 0140-6736.

PLATEL, K.; SRINIVASAN, K. **Bioavailability of Micronutrients from Plant Foods: An Update.** Crit Rev Food Sci Nutr, p. 0, Mar 6 2015. ISSN 1040-8398.

PRESHAW, P. M. et al. **Periodontitis and diabetes: a two-way relationship.** Diabetologia, v. 55, n. 1, p. 21-31, Jan 2012. ISSN 0012-186x.

PRIOR, R. L. **Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage.** Am J Clin Nutr, v. 78, n. 3 Suppl, p. 570s-578s, Sep 2003. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165.

PUSSINEN, P. J. et al. **Serum microbial- and host-derived markers of periodontal diseases: a review.** Curr Med Chem, v. 14, n. 22, p. 2402-12, 2007. ISSN 0929-8673 (Print) 0929-8673.

PUSSINEN, P. J. et al. **Severe periodontitis enhances macrophage activation via increased serum lipopolysaccharide.** Arterioscler Thromb Vasc Biol, v. 24, n. 11, p. 2174-80, Nov 2004. ISSN 1079-5642.

RAUNER, M.; SIPOS, W.; PIETSCHMANN, P. **Osteoimmunology.** Int Arch Allergy Immunol, v. 143, n. 1, p. 31-48, 2007. ISSN 1018-2438 (Print) 1018-2438.

ROVIN, S.; COSTICH, E. R.; GORDON, H. A. **The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats.** J Periodontal Res, v. 1, n. 3, p. 193-204, 1966. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

SACHDEVA, A. K.; KUHAD, A.; CHOPRA, K. **Epigallocatechin gallate ameliorates behavioral and biochemical deficits in rat model of load-induced chronic fatigue syndrome.** Brain Res Bull, v. 86, n. 3-4, p. 165-72, Oct 10 2011. ISSN 0361-9230.

SAITO, Y. et al. **Stimulation of Fusobacterium nucleatum biofilm formation by Porphyromonas gingivalis.** Oral Microbiol Immunol, v. 23, n. 1, p. 1-6, Feb 2008. ISSN 0902-0055 (Print) 0902-0055.

SAMEJIMA, Y.; EBISU, S.; OKADA, H. **Effect of infection with Eikenella corrodens on the progression of ligature-induced periodontitis in rats.** J Periodontal Res, v. 25, n. 5, p. 308-15, Sep 1990. ISSN 0022-3484 (Print) 0022-3484.

SENTHIL KUMARAN, V. et al. **Repletion of antioxidant status by EGCG and retardation of oxidative damage induced macromolecular anomalies in aged rats.** Exp Gerontol, v. 43, n. 3, p. 176-83, Mar 2008. ISSN 0531-5565 (Print) 0531-5565.

SEZER, U.; CICEK, Y.; CANAKCI, C. F. **Increased salivary levels of 8-hydroxydeoxyguanosine may be a marker for disease activity for periodontitis.** Dis Markers, v. 32, n. 3, p. 165-72, 2012. ISSN 0278-0240.

SHADDOX, L. M. et al. **Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis.** J Dent Res, v. 90, n. 9, p. 1140-4, Sep 2011. ISSN 0022-0345.

SHEN, C. L. et al. **Functions and mechanisms of green tea catechins in regulating bone remodeling.** Curr Drug Targets, v. 14, n. 13, p. 1619-30, Dec 2013. ISSN 1389-4501.

SIES, H. **Oxidative stress: oxidants and antioxidants.** Exp Physiol, v. 82, n. 2, p. 291-5, Mar 1997. ISSN 0958-0670 (Print)

SIES, H.; STAHL, W. **Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants.** Am J Clin Nutr, v. 62, n. 6 Suppl, p. 1315s-1321s, Dec 1995. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165.

SIQUEIRA, J. T. T. D.; TEIXEIRA, M. J. **Dores Orofaciais - Diagnóstico e Tratamento.** 2011. ISBN 8536701595.

SLOTS, J. **Subgingival microflora and periodontal disease.** J Clin Periodontol, v. 6, n. 5, p. 351-82, Oct 1979. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

SOCRANSKY, S. S. et al. **Associations between microbial species in subgingival plaque samples.** Oral Microbiol Immunol, v. 3, n. 1, p. 1-7, Mar 1988. ISSN 0902-0055 (Print) 0902-0055.

SOUZA, D. M. et al. **Evaluation of two morphometric methods of bone loss percentages caused by periodontitis in rats in different locations.** J Appl Oral Sci, v. 18, n. 5, p. 493-7, Sep-Oct 2010. ISSN 1678-7757.

SRIRAM, N.; KALAYARASAN, S.; SUDHANDIRAN, G. **Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2-Keap1 signaling.** Pulm Pharmacol Ther, v. 22, n. 3, p. 221-36, Jun 2009. ISSN 1094-5539.

SUN, Y. et al. **Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli: alternations in Toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway.** Inflammation, v. 37, n. 1, p. 268-76, Feb 2014. ISSN 0360-3997.

TAKANE, M. et al. **New biomarker evidence of oxidative DNA damage in whole saliva from clinically healthy and periodontally diseased individuals.** J Periodontol, v. 73, n. 5, p. 551-4, May 2002. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

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

TANABE, S.; BODET, C.; GRENIER, D. **Peptostreptococcus micros cell wall elicits a pro-inflammatory response in human macrophages.** J Endotoxin Res, v. 13, n. 4, p. 219-26, 2007. ISSN 0968-0519 (Print) 0968-0519.

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) 0021-9738.

TENG, Y. T. **The role of acquired immunity and periodontal disease progression.** Crit Rev Oral Biol Med, v. 14, n. 4, p. 237-52, 2003. ISSN 1045-4411.

TERHEYDEN, H. et al. **Inflammatory reaction - communication of cells.** Clin Oral Implants Res, v. 25, n. 4, p. 399-407, Apr 2014. ISSN 0905-7161.

TORRUNGRUANG, K. et al. **Porphyromonas gingivalis, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, and Treponema denticola / Prevotella intermedia Co-Infection Are Associated with Severe Periodontitis in a Thai Population.** PLoS One, v. 10, n. 8, p. e0136646, 2015. ISSN 1932-6203.

TROMBONE, A. P. et al. **Experimental periodontitis in mice selected for maximal or minimal inflammatory reactions: increased inflammatory immune responsiveness drives increased alveolar bone loss without enhancing the control of periodontal infection.** J Periodontal Res, v. 44, n. 4, p. 443-51, Aug 2009. ISSN 0022-3484.

UDAGAWA, N. et al. **Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: receptor activator of NF-kappa B ligand.** Bone, v. 25, n. 5, p. 517-23, Nov 1999. ISSN 8756-3282 (Print) 1873-2763.

VALKO, M. et al. **Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease.** Int J Biochem Cell Biol, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725.

VAN DER VELDEN, U.; KUZMANOVA, D.; CHAPPLE, I. L. **Micronutritional approaches to periodontal therapy.** J Clin Periodontol, v. 38 Suppl 11, p. 142-58, Mar 2011. ISSN 0303-6979.

VENKATESWARA, B.; SIRISHA, K.; CHAVA, V. K. **Green tea extract for periodontal health.** J Indian Soc Periodontol, v. 15, n. 1, p. 18-22, Jan 2011. ISSN 0972-124x.

WEINER, G. S.; DEMARCO, T. J.; BISSADA, N. F. **Long term effect of systemic tetracycline administration on the severity of induced periodontitis in the rat.** J Periodontol, v. 50, n. 12, p. 619-23, Dec 1979. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

WELLS, P. G. et al. **Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer.** Toxicol Sci, v. 108, n. 1, p. 4-18, Mar 2009. ISSN 1096-0929.

WIEBE, C. B. et al. **Naturally occurring periodontal bone loss in the wild deer mouse, genus *Peromyscus*.** J Periodontol, v. 72, n. 5, p. 620-5, May 2001. ISSN 0022-3492 (Print) 0022-3492.

WIEBE, C. B.; PUTNINS, E. E. **The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology--an update.** J Can Dent Assoc, v. 66, n. 11, p. 594-7, Dec 2000. ISSN 0709-8936 (Print) 0709-8936.

WILSON, M. **Bacterial biofilms and human disease.** Sci Prog, v. 84, n. Pt 3, p. 235-54, 2001. ISSN 0036-8504 (Print) 0036-8504.

WINNING, L. et al. **The association between subgingival periodontal pathogens and systemic inflammation.** J Clin Periodontol, Aug 26 2015. ISSN 0303-6979.

WONG, B. R. et al. **TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src.** Mol Cell, v. 4, n. 6, p. 1041-9, Dec 1999. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765.

XIMENEZ-FYVIE, L. A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. **Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis.** J Clin Periodontol, v. 27, n. 10, p. 722-32, Oct 2000. ISSN 0303-6979 (Print) 0303-6979.

YANAGIMOTO, K. et al. **Antioxidative activities of volatile extracts from green tea, oolong tea, and black tea.** J Agric Food Chem, v. 51, n. 25, p. 7396-401, Dec 3 2003. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561.

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) 0022-3166.

YUAN, J. H.; LI, Y. Q.; YANG, X. Y. **Inhibition of epigallocatechin gallate on orthotopic colon cancer by upregulating the Nrf2-UGT1A signal pathway in nude mice.** Pharmacology, v. 80, n. 4, p. 269-78, 2007. ISSN 0031-7012.

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) 0022-3484.

ZHAO, M. et al. **Evaluation of protective effect of freeze-dried strawberry, grape, and blueberry powder on acrylamide toxicity in mice.** J Food Sci, v. 80, n. 4, p. H869-74, Apr 2015. ISSN 0022-1147.

ZHENG, Y. et al. **Epigallocatechin-gallate stimulates NF-E2-related factor and heme oxygenase-1 via caveolin-1 displacement.** J Nutr Biochem, v. 23, n. 2, p. 163-8, Feb 2012. ISSN 0955-2863.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1 – Carta de aprovação do comitê de ética

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 032/2013

Bauru, 20 de agosto de 2013.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Efeito da administração oral da epigalocatequina-3-galato durante a periodontite induzida por ligadura em ratos diabéticos**, de autoria de Daniela Santos Pereira, com colaboração de Tania Mary Cestari e Ever Elias Mena Laura, sob sua orientação, foi enviado a um relator para avaliação e considerado APROVADO em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de agosto de 2013**.

Solicitamos que qualquer alteração na pesquisa seja comunicada a esta Comissão, e que, ao final seja enviado um Relatório com os resultados obtidos, para análise ética e emissão de parecer final; o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

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

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferrari@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>

Anexo 2 – Especificações da EGCG **Specialized Green Tea Extract Powder**

Date: March 1, 2011

Page 1 of 1

Sunphenon® EGCg is a decaffeinated extract of green tea leaves (*Camellia sinensis*), made of highly purified natural green tea catechins, rich in epigallocatechin gallate (EGCg). Sunphenon® EGCg has minimal coloring with little to no taste, ideal for use in antioxidant rich supplements, beverages, dairy products, confections and foods.

Sunphenon® EGCg is Food Grade, non GMO and certified Kosher.

Sunphenon® EGCg complies with U.S. FDA pesticide regulations for tea as outlined in 40CFR180.

Specifications

Item	Specification Value	Method / Condition
Appearance	Off-white to pale-pink powder	Visual Observation
EGCg content	Not less than 94%	HPLC, Dry Matter*
Caffeine	Less than 0.1%	HPLC
Loss on Drying	Less than 5.0%	105°C, 3 hours
Residue on Ignition	Less than 0.5%	550°C, 3 hours
Bulk Density	0.42 ~ 0.62 g/ml	LBD
Heavy Metals (as Pb)	Less than 10.0 µg/g	Colorimetry
Arsenic (as As ₂ O ₃)	Less than 1.0 µg/g	Atomic-photospectrometry
Arsenic (as As)	Less than 1.0 µg/g	Atomic-photospectrometry
Lead (Pb)	Less than 1.0 µg/g	Atomic-photospectrometry
Cadmium (Cd)	Less than 0.5 µg/g	Atomic-photospectrometry
Mercury (Hg)	Less than 0.1 µg/g	Atomic-photospectrometry
Standard plate count	Less than 1,000 cfu/g	Standard Plate Agar
Coliforms	Negative / 0.1g	BGLB method
<i>E. coli</i>	Negative / 0.1g	BGLB method
Mold / Yeast	Less than 100 cfu/g	Potato dextrose agar plate / Chloramphenicol
<i>Salmonella</i>	Negative / 25g	SMAFSRB**
<i>Staphylococcus aureus</i>	Negative / g	SMAFSRB**

* Dry Matter

** SMAFSRB: Standard Methods of Analysis in Food Safety Regulation Biology, Japan.

Packaging and Storage

10 kg net weight, aluminum foil bag, carton drum. In its original packaging, may be stored at room temperature at least 36 months from date of production. Store in a cool, dry place away from heat and direct light.

TAIYO INTERNATIONAL, INC.

5960 Golden Hills Drive, Minneapolis, MN 55416 USA

763-398-3003

Fax: 763-398-3007

The information contained herein is, to the best of our knowledge, correct. It should not be construed as permission for violation of patent rights. The data outlined and the statements made are intended only as a source of information for your consideration and verification and not as a condition of sale. No warranties, expressed or implied are made. On the basis of this information, it is suggested that you evaluate the product on a laboratory scale prior to use in a finished product. Sunphenon® is a registered trademark of Taiyo Kagaku Co., Ltd. U.S. and International Patents Pending. © 2011 Taiyo International, Inc., Taiyo Kagaku Co., Ltd.