



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL



TADEU FRANCISCO PRADELA

**EFEITO DA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO, DERIVADA DO
CHÁ VERDE, EM METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 e 9
EM LESÕES PERIAPICAIS DE CÃES**

Ribeirão Preto

2020

TADEU FRANCISCO PRADELA

**EFEITO DA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO, DERIVADA DO
CHÁ VERDE, EM METALOPROTEINASES DE MATRIZ 2 e 9
EM LESÕES PERIAPICAIS DE CÃES**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Orientador: Prof^º. Dr^ª. Andiará De
Rossi

Ribeirão Preto

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pradela, Tadeu Francisco.

Efeito da Epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, em metaloproteinases de matriz 2 e 9 em lesões periapicais de cães.

82p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Odontopediatria

Orientador: De Rossi, Andiara

1. Metaloproteinase de Matiz; 2. EGCG; 3. Lesão Periapical; 4. Imunofluorescencia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Pradela, Tadeu Francisco. **Efeito da epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, em Metaloproteinases de Matriz 2 e 9 em lesões periapicais de cães.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____



Os experimentos com animais foram realizados no Biotério 2 da FORP-USP, sob supervisão de médico veterinário. O processamento histológico foi realizado no Laboratório Biologia Molecular e Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da FORP – USP.

O aluno recebeu a Bolsa CAPES Processo nº 88882.328545/2019-01

DADOS CURRICULARES

TADEU FRANCISCO PRADELA

Nascimento 08 de julho de 1993 – Ituiutaba – Minas Gerais

Filiação Geraldo Tadeu Pradela
Eleusa Dias Martins Pradela

2012-2017 Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Uberlândia - UFU.
Trabalho de conclusão de curso: "Effects of Ectodermal Displasia on children quality of life related to oral health."
Orientador: Prof^a. Dr^a. Danielly Cunha Araújo Ferreira de Oliveira.

2018-2020 Mestrado em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, Brasil.
Projeto: Efeito da Epigallocatequina-3-galato, derivada do Chá Verde, em Metaloproteinases de Matriz 2 e 9 em Dentes de Cães.
Orientador: Prof^a. Dr^a. Andiará De Rossi

RESUMO

PRADELA, T.F. Efeito da epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, em metaloproteinases de matriz 2 e 9 em lesões periapicais de cães. 2020 76 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

As metaloproteinases de matriz (MMP's) fazem parte de uma família de proteases relacionadas com a função e estrutura dos tecidos por agirem na degradação de componentes proteicos da matriz extracelular (ECM). Durante a progressão das doenças pulpares e periapicais as MMPs desempenham um papel importante na resposta imune e inflamatória do hospedeiro promovendo a degradação da matriz extracelular em processos patológicos pulpares e periapicais. A expressão das MMPs 2 e 9 podem se apresentar elevadas no exsudato intracanal de dentes com abscessos periapicais agudos, granulomas e cistos periapicais e no fluido gengival crevicular de dentes portadores de lesões periapicais crônicas. Assim, durante o tratamento endodôntico, o uso de medicações que promovam a inibição de MMPs deve ser considerado. A epigallocatequina-3-galato (EGCG), um extrato derivado do chá verde, vem sendo muito estudada na área da saúde devido às suas propriedades antiinflamatórias, antioxidantes e mineralizadoras, que incluem a capacidade de inibir a atividade proteolítica das metaloproteinases de matriz (MMPs) em diversas doenças sistêmicas e até mesmo na doença periodontal. No entanto, a ação da EGCG sobre a expressão e distribuição dessas MMPs no tratamento endodôntico ainda não foi avaliada. A hipótese desse trabalho é que a EGCG seja capaz de reduzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 quando utilizada como curativo de demora no tratamento endodôntico de dentes de cães portadores de lesões periapicais. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da aplicação de uma pasta à base de EGCG como curativo de demora na expressão das MMP-2 e MMP-9 na região apical e periapical de dentes de cães portadores de lesões periapicais induzidas experimentalmente. Um total de 70 raízes de pré-molares de cão com rizogênese completa foram aleatoriamente divididas em 5 grupos, submetidos à diferentes tratamentos: 1) Dente Hígido; 2) Dente portador de lesão periapical não tratada; 3) Dente tratado endodonticamente em sessão única; 4) Dente tratado endodonticamente em duas sessões com uso de pasta à base de EGCG e 5) Dente tratado endodonticamente em duas sessões com pasta à base de hidróxido de cálcio. Aos 120 dias após a obturação dos canais radiculares, os animais foram eutanasiados, os espécimes processados histotecnica e corados com HE e imunofluorescência para as MMPs 2 e 9. Além de análise descritiva, a desorganização tecidual, infiltrado inflamatório e expressão das MMPs foram

classificadas em escores variando de 1 a 4 (ausente, suave, moderada e severa). Os resultados foram submetidos à análise estatística por meio do teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn (95% de confiança). Foi observado que o tratamento endodôntico em sessão única resultou em persistência de desorganização tecidual, resposta inflamatória, não proporcionou reparo do cimento, osso alveolar e ligamento periodontal que apresentaram expressão positiva e intensa das MMPs 2 e 9, tanto na região periapical como nas paredes do canal radicular. Por outro lado, o tratamento endodôntico realizado em duas sessões, tanto com pasta a base de EGCG como com pasta a base de hidróxido de cálcio, proporcionou reparação dos tecidos apicais e periapicais, com ausência de inflamação e presença de neoformação cementária, óssea e de fibras do ligamento periodontal. A expressão das MMPs 2 e 9 foi suave, sendo observada no citoplasma de células inflamatórias, fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, odontoblastos, cementócitos e endotélio vascular. Nos dentes hígidos, a expressão destas MMPs também foi verificada em odontoblastos. Nos grupos tratados em duas sessões a expressão das MMPs 2 e 9 foi suave, semelhante estatisticamente aos dentes hígidos e com expressão significativamente inferior aos dentes tratados em sessão única ($p < 0,001$). Pode-se concluir que a utilização da pasta à base de EGCG como curativo de demora promoveu redução na expressão das MMP-2 e MMP-9 e reparação das lesões periapicais, de maneira semelhante à pasta à base de hidróxido de cálcio e superior ao tratamento de realizado em sessão única.

Palavras-chave: 1. Metaloproteinases de Matiz; 2. EGCG; 3. Lesão Periapical; 4. Imunofluorescência.

ABSTRACT

PRADELA, T.F. **Effect of epigallocatechin-3-gallate, derived from green tea, in matrix metalloproteinases 2 and 9 in dog's periapical lesions.**

2020 76 f. Dissertation (Master) - Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Matrix metalloproteinases (MMP's) are a family of zinc- and calcium-dependent proteases, related to the function and structure of tissues because they act mainly on the degradation of protein components of the extracellular matrix (ECM), including dentinal and bone matrices. Studies show, in different animal and human models, a high and predominant expression of MMPs 2 and 9 both in periapical lesions and in intracanal exudates of teeth with acute periapical abscesses, in periapical granulomas and cysts and in crevicular gingival fluid of teeth with chronic periapical lesions, and also, during the progression of pulp and periapical diseases, they play an important role in the immune and inflammatory response of the host promoting the degradation of the extracellular matrix, degradation of the pulp tissue and periapical inflammation. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), an extract derived from green tea, has been extensively studied in the health field due to its beneficial properties, such as the ability to inhibit the proteolytic activity of matrix metalloproteinases (MMPs) in several systemic diseases and even in periodontal disease. However, the action of EGCG on the expression and distribution of these matrix metalloproteinases, when used as an intracanal dressing in endodontics, has not yet been evaluated. The hypothesis of this work is that EGCG is capable of reducing the expression of MMP-2 and MMP-9 when used as an intracanal dressing in the endodontic treatment of teeth of dogs with periapical lesions. The aim of this study is to evaluate the effect of applying an EGCG-based paste as an intracanal dressing in the expression of MMP-2 and MMP-9 in teeth of dogs with experimentally induced periapical lesions. A total of 70 roots of dog premolars with complete rhizogenesis and experimentally induced periapical lesions, were randomly divided into 5 groups submitted to different clinical conditions and treatments: 1) Healthy teeth; 2) Teeth with untreated periapical lesion; 3) Teeth treated endodontically in a single session; 4) Teeth treated endodontically in two sessions: paste based on EGCG (Composition: EGCG powder, zinc oxide and polyethylene glycol 400); 5) Teeth treated endodontically in two sessions: paste based on calcium hydroxide - Calen® (Composition: powdered calcium hydroxide, zinc oxide and polyethylene glycol 400). At 120 days after root canal filling, the animals were euthanized and the specimens were processed histotechnically and stained with HE and immunofluorescence so that it was possible to observe the expression of MMPs

2 and 9. Tissue disorganization, inflammatory infiltrate and expression of MMPs 2 and 9 were classified into scores ranging from 1 to 4 (absent, mild, moderate and severe). The results were subjected to statistical analysis using the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test (95% confidence). It was observed that endodontic treatment in a single session resulted in persistent tissue disorganization, inflammatory response, did not provide repair of the cementum, alveolar bone and periodontal ligament that showed positive and intense expression of MMPs 2 and 9, both in the periapical region and in the walls of the root canal. On the other hand, the endodontic treatment carried out in two sessions, both with EGCG-based paste and calcium hydroxide-based paste, provided repair of the apical and periapical tissues, with no inflammation and cement, bone and fiber neof ormation periodontal ligament. The expression of MMPs 2 and 9 was smooth, being observed in the cytoplasm of inflammatory cells, fibroblasts, osteoblasts, cementoblasts, cementocytes and vascular endothelium. In healthy teeth, the expression of these MMPs was also verified in odontoblasts. In the groups treated in two sessions, the expression of MMPs 2 and 9 was mild, statistically similar to healthy teeth and with significantly lower expression than teeth treated in a single session ($p < 0.001$). It can be concluded that the use of EGCG-based paste as a intracanal dressing resulted in a reduction in the expression of MMP-2 and MMP-9 and repair of periapical lesions, similarly to calcium hydroxide-based paste and superior to treatment performed in a single session.

Keywords: 1. Matrix metalloproteinases; 2. EGCG; 3. Periapical injury; 4. Immunofluorescence.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. PROPOSIÇÃO.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4. RESULTADOS.....	34
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
ANEXO.....	79

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

As metaloproteinases de matriz (MMP's) fazem parte de uma família de mais de 25 proteases zinco- e cálcio-dependentes, relacionadas com a função e estrutura dos tecidos por atuarem principalmente na degradação de componentes proteicos da matriz extracelular (ECM), incluindo as matrizes dentinária e óssea (Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff, 2005; Kupai et al., 2010). Estas se dividem em vários subgrupos com base na estrutura e especificidade de substrato, incluindo collagenases, gelatinases, estromelinas e MMPs do tipo membrana (MT) (Seiki et al., 1999). A degradação das proteínas da matriz pelas MMPs, incluindo o colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanas, entre outras, ocorre tanto em processos fisiológicos, como a angiogênese, morfogênese e reparação tecidual, como em processos patológicos inflamatórios, tumorais ou autoimunes, tais como doenças cardiovasculares, artrite e diabetes (Ghajar et al., 2008; Gharagozlian et al., 2009).

A expressão das MMPs em tecidos saudáveis está presente em baixos níveis, porém em condições patológicas inflamatórias e infecciosas como na doença periodontal (Moura et al., 2017), doenças periapicais (Kupai et al., 2010; Martinho et al., 2016; Stape et al., 2018), bem como nas lesões de cárie dental (Mazzoni et al., 2015) os níveis de MMPs estão elevados. As MMPs podem ser produzidas por diferentes tipos celulares incluindo leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais que invadem os tecidos durante os eventos de remodelação e reparo tecidual (Martins et al., 2013). Elas possuem múltiplas formas, incluindo pró-formas latentes, formas ativas ou ativadas, espécies fragmentadas, espécies complexadas e formas ligadas à célula (Sorsa e Tervahartiala et al., 2011). As MMPs estão presentes no interior de células inflamatórias, porém, são mais frequentemente encontradas isoladas na superfície celular ou no interior da matriz extracelular (Sorsa et al., 2011). As MMPs são amplamente secretadas no espaço extracelular, e podem ser sintetizadas como zimogênios inativos nos quais a ativação pode ocorrer por

meio de mecanismos proteolíticos intracelulares, extracelulares ou mediados pela superfície celular (Seiki et al., 1999; Murphy., 2016).

A atividade das MMPS é regulada por fatores genéticos e epigenéticos, incluindo hormônios, fatores de crescimento, inibidores fisiológicos endógenos, citocinas e interações célula-célula e célula-matriz. Atualmente, são conhecidos quatro tipos de inibidores teciduais endógenos das metaloproteinases (TIMPs), nomeados de 1 a 4 (Geurts et al., 2012). Enquanto o sistema RANK-RANKL-OPG, principal responsável pela regulação da osteoclastogênese, é um determinante da atividade das lesões periapicais, o equilíbrio entre MMPs e TIMPs determina o resultado da ação catabólica mediada pela resposta proteolítica que contribui para a degradação de tecidos moles e mineralizados (Vernal et al., 2006; Graves et al., 2011; Menezes-Silva et al., 2012; Hadziabdic et al., 2016). A ocorrência de aumento na expressão e/ou ativação de MMPs sem o aumento simultâneo dos TIMPs, para neutralizar esse catabolismo proteolítico, pode resultar no desenvolvimento de processos patológicos, incluindo a lesão periapical e doença periodontal (Carneiro et al., 2009; Letra et al., 2013; Sousa et al., 2014).

A elevada expressão e atividade de diferentes MMPs vem sendo encontrada nas diferentes manifestações clínicas das doenças periapicais, incluindo a ação combinada de múltiplas MMPs, como MMP-1, MMP-2, MMP-8 e MMP-9 (Andonovska et al., 2008; Paula-Silva et al., 2009., Trombone et al., 2016). Entretanto, estudos revelam em diferentes modelos animais e humanos expressão elevada e predominante das MMPs-2 e -9 tanto na lesão periapical (Corotti et al., 2009, Sousa et al., 2013), como no exsudato intracanal de dentes com abscessos periapicais agudos (Buzoglu et al., 2009), em granulomas e cistos periapicais (Paula-Silva et al., 2009) e no fluido gengival crevicular de dentes portadores de lesões periapicais crônicas (Belmar et al., 2008). As MMP-2 e MMP-9 também podem ser detectadas em níveis elevados na periodontite, perimplantite e pericoronarite (Beklen, et al., 2005). Na doença periodontal causam a destruição do tecido conjuntivo e promovem um desequilíbrio entre a produção e a degradação do colágeno, ocasionando perda

de inserção dentária (Chang et al., 2002; Sorsa et al., 2006; Liu et al., 2017; Guru et al., 2017).

Durante a progressão das doenças pulpares e periapicais as MMPs 2 e 9 desempenham um papel importante na resposta imune e inflamatória do hospedeiro promovendo a degradação da matriz extra-celular, degradação do tecido pulpar e inflamação periapical (Corotti et al., 2009; Carneiro et al., 2009; Sorsa et al., 2011; Li et al., 2012; Wan et al., 2014; Carneiro et al., 2017; Takahama et al., 2018). A MMP-2, também chamada de gelatinase A, é importante para o *turnover* da ECM, clivando os colágenos tipos IV, V, VII e XI. Já a MMP-9 (gelatinase B) é também, essencial para iniciar o processo de reabsorção óssea (Chang et al., 2002), removendo a camada de colágeno da superfície óssea que é composta principalmente pelo colágeno fibrilar tipo I mineralizado.

A elevada expressão das MMPs durante a lesão periapical pode ser reduzida por meio do tratamento endodôntico (Paula-Silva et al., 2010; Shin et al., 2011). Estudos de nosso grupo de pesquisa mostraram que os níveis de MMPs 1, 2, 8 e 9 nos dentes portadores de lesão periapical tratados em duas sessões, por meio de utilização de pasta à base de hidróxido de cálcio, é reduzido significativamente quando comparados aos dentes não tratados ou tratados em sessão única (Paula-Silva et al., 2010).

É importante destacar que o tratamento endodôntico de dentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical ainda apresenta sucesso inferior aos dentes sem lesão periapical (Leonardo, 2002) devido à persistência de infecção intra e extra radicular, onde está presente o biofilme periapical (Leonardo et al., 1994; Siqueira et al., 2011; Oliveira et al., 2016; Gutmann e Manjarrés, 2018). A infecção endodôntica é polimicrobiana, com predomínio de micro-organismos anaeróbios Gram-negativos, que possuem endotoxina ou lipopolissacarídeos (LPS) em sua parede celular, e Gram-positivos que possuem o ácido lipoteicóico (LTA), que também devem ser inativadas durante o tratamento dos canais radiculares (Assed et al., 1996; Leonardo et al., 2000; Nelson-Filho, 2002; Silva et al., 2008; Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Dessa maneira, para elevar o sucesso no tratamento é indispensável à aplicação de

substâncias antimicrobianas, anti-inflamatórias, mineralizadoras e inativadoras de LPS e LTA, dentre as quais as pastas à base de hidróxido de cálcio têm apresentado melhores resultados e vem sendo preconizada por nosso grupo de pesquisa (Siqueira et al., 2002; Tanomaru et al., 2008; Paula-Silva et al., 2010; Silva et al., 2012; Hidalgo et al., 2016; Prada et al., 2019).

Recentemente, visando reduzir toxicidade e resistência microbiana causada por drogas sintéticas (Prabhakar et al., 2010), os extratos de plantas constituem uma opção para a prevenção e tratamento de doenças autoimunes, infecciosas e inflamatórias (Yousaf et al., 2014; Lee e Tan, 2015; Guo et al., 2018; Dudics et al., 2018; Reygaert, 2018; Prasanth et al., 2019). O chá verde, derivado da *Camellia sinensis*, apresenta muitos efeitos benéficos sobre a saúde (Suzuki e Isemura, 2013; Lagha et al., 2018; Reygaert, 2018; Prasanth et al., 2019). Os componentes químicos principais do chá verde são os flavonóides e as catequinas, dentre essas a epigallocatequina-3-galato (EGCG) é a mais ativa biologicamente (Wang et al., 2014), que constitui mais de 50% dos polifenóis presentes (Yousaf et al., 2014; Reygaert, 2018; Prasanth et al., 2019). A EGCG apresenta ação antioxidante (Guo et al., 2018; Arafa et al., 2019; Bulboaca et al., 2020), anti-inflamatória (Dudics et al., 2018; Chu et al., 2019) e anti-carcinogênica (Suzuki e Isemura, 2013; Wang et al., 2014; Yousaf et al., 2014; Ho et al., 2019; Naujokat et al., 2020). Estudos sobre seu papel anti-carcinogênico *in vivo* e *in vitro* que a EGCG pode inibir o crescimento de células tumorais via redução da produção de RANK e, inclusive de MMP-9 (Luo et al., 2017). Em cultura de fibroblastos gengivais estimulados com LPS, o tratamento com EGCG é capaz de reduzir a produção das MMPs 2, 8 e, principalmente, da MMP-9 (Morin e Granier, 2017).

Em condições de erosão e abrasão dentinária, a aplicação de EGCG pode prevenir o desgaste dentinário (Kato et al., 2010; Passos et al., 2018) por sua ação na inibição das MMPs, o que evita a degradação da matriz orgânica desmineralizada (Buzalaf et al., 2012). Sua ação na superfície dentinária, antes da aplicação de sistemas adesivos, também melhora a resistência de união das restaurações (Singh et al., 2017; Kalaiselvam et al., 2018), não promove

alteração de cor da interface dentina-resina (Lopes et al., 2019), tem efeito inibitório em proteases originadas de dentina (Yu et al., 2017) e reduz a sensibilidade dentinária proporcionando obliteração dos túbulos dentinários e aumentando à resistência contra abrasão (Yu et al., 2017).

No tratamento das reabsorções inflamatórias de tecidos mineralizados, como observado na lesão periapical, a EGCG também vem sendo foco de atenção por sua eficaz ação contra micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (Reygaert, 2018; Betts et al., 2019), incluindo responsáveis por lesões periapicais, como o *E. faecalis* (Horiba et al., 1991; Prabhakar et al., 2010; Lee e Tan, 2015), periodontais, como a *P. gingivalis* (Jung et al., 2012; Asahi et al., 2014; Lagha et al., 2018) e cariogênicos como os *S. mutans*, *S. sobrinus* e *L. casei* (Vilela, 2015; Yu et al., 2017; Melok et al., 2018; Vilela et al., 2020). Além de apresentar ação antimicrobiana, a EGCG apresenta compatibilidade tecidual (Hwang et al., 2011; Jung et al., 2011; Ghasempour et al., 2015; Ferreira, 2015; Kwon et al., 2017; Kook et al., 2018), sendo já proposta como meio de conservação de dentes avulsionados após traumatismos (Hwang et al., 2011; Jung et al., 2011; Ghasempour et al., 2015) e agente regenerador ósseo na doença periodontal e nas doenças pulpares e periapicais (Jung et al., 2012; Asahi et al., 2014; Kwon et al., 2017; Lagha et al., 2017, Lagha et al., 2018; Chen et al., 2019).

Na endodontia, a EGCG foi sugerida como medicação entre sessões ou na irrigação dos canais radiculares (Prabhakar et al., 2010; Lee e Tan, 2015; Ferreira, 2015; Pheenithicharoenkul e Panichuttra 2016). Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa mostraram que a aplicação de uma pasta à base de EGCG patenteada para uso como curativo de demora endodôntico (De Rossi et al., 2014) proporcionou reparo semelhante ao da pasta à base de hidróxido cálcio, quando utilizada em dentes portadores de lesão periapical (Liévana, 2018). Quando utilizada como solução irrigadora, além de apresentar ação antimicrobiana (Prabhakar et al., 2010; Lee e Tan, 2015), a EGCG aumenta a adesão do cimento obturador às paredes da dentina radicular (Pheenithicharoenkul e Panichuttra 2016; Yu et al., 2017) por apresentar ação anti-oxidante, capaz de neutralizar o hipoclorito de sódio (NaOCl) residual e

oxigênio, e por inibir a atividade proteolítica das MMPs (Yu et al., 2017). Recentemente um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa também mostrou que o tratamento de dentes pós-radioterapia com EGCG inativa a atividade enzimática de MMPs ativadas pelo tratamento radioterápico (Queiroz et al., 2019). No entanto, nenhum estudo avaliou o efeito da EGCG sobre as MMPs associadas às lesões periapicais.

Diante do exposto, verifica-se que além de desempenhar papel anti-inflamatório, antioxidante, antimicrobiano, regenerador tecidual e mineralizador, a utilização de uma pasta a base EGCG como curativo de demora na terapia endodôntica poderia atuar na redução das MMPs presentes no sistema de canais radiculares e na lesão periapical, contribuindo para o processo de reparo.

2. Proposição

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da aplicação de uma pasta à base de EGCG como curativo de demora na expressão das MMP-2 e MMP-9 em dentes de cães portadores de lesões periapicais induzidas experimentalmente.

HIPÓTESE

A Epigallocatequina-3-Galato é capaz de reduzir a expressão de MMP-2 e MMP-9 e proporcionar reparação tecidual quando utilizada como curativo de demora no tratamento endodôntico de dentes de cães portadores de lesões periapicais.

2.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Caracterizar a presença e localização das MMPs 2 e 9 em dentes de cães hípidos e portadores de lesões periapicais não tratadas;
- Verificar se a aplicação de uma pasta à base de EGCG como curativo de demora durante o tratamento endodôntico de dentes de cães portadores de lesões periapicais, promove alteração na expressão das MMPs 2 e 9;
- Comparar os efeitos do tratamento endodôntico em duas sessões, realizado com a pasta à base de EGCG aos efeitos do tratamento realizado com uma pasta à base de hidróxido de cálcio e ao tratamento realizado em única sessão, na expressão das MMPs 2 e 9 na região apical e periapical.

3. Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

Procedimentos Éticos

O presente estudo foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEUA/FORPUSP), sendo aprovado (Processo nº 11.1.1405.53.8 - Anexo A). Os cuidados com o bem-estar dos animais de experimentação seguiram as Normas e Princípios Éticos Adotados pela CEUA/FORP-USP e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentados pela Constituição Federal Brasileira na Lei no 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Animais

Foram utilizados 3 cães da raça Beagle, de ambos os gêneros com 12 meses de idade, pesando em média 15 quilos. Para o experimento, foram selecionados os 2^{os} e 3^{os} pré-molares superiores e os 2^{os}, 3^{os} e 4^{os} pré-molares inferiores, totalizando 30 dentes (60 raízes). Previamente ao início dos experimentos os animais receberam vermífugos (Drontal® Puppy – Bayer – São Paulo – Brasil), na dosagem de 1 comprimido a cada 10 Kg de peso, vitaminas (Glicopan® Pet – Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda – Louveira – Brasil) e vacinas anti-rábica (Rai-Vac I® – Fort Dodge – Campinas – Brasil) e Duramune (Fort Dodge – Campinas – Brasil) em 3 doses, com 3 semanas de intervalo entre cada aplicação.

Durante o período de experimento os animais foram mantidos no biotério da FORP-USP, acomodados em baias individuais em temperatura ambiente, com livre acesso à água e dieta padrão da Unidade. O bem-estar dos animais foi avaliado diariamente pelo pesquisador e pelo médico veterinário da unidade. Em casos de gengivite e/ou cálculo gengival, os animais receberam profilaxia, raspagem, alisamento e polimento dentário, seguidas da aplicação de digluconato de clorexidina a 0,12% (Periogard - Colgate – Palmolive - Indústria Ltda. - Brasil).

Grupos experimentais

Inicialmente, a expressão das MMPs 2 e 9 foi avaliada em dentes de cães hígidos e portadores de lesões periapicais não tratadas, visando caracterizar sua expressão (lâminas de arquivo pessoal, De Rossi et al., 2005). A seguir, a expressão das MMPs 2 e 9 foi avaliada em dentes portadores de lesões periapicais submetidos à tratamento endodôntico utilizando como curativo de demora uma pasta à base de EGCG patenteada para uso endodôntico (De Rossi et al., 2014). Nesta pasta, a EGCG (Figura 1) na concentração de 1 mg/mL (Sigma Aldrich Co.- St. Louis – MO - USA), na forma de partículas sólidas (pó), é veiculada em polietilenoglicol 400 (800 µL) (PEG 400 - Galena Química e Farmacêutica Ltda., Campinas, SP, Brasil) e óxido de zinco (2g) (OZ – S.S White Artigos Dentários Ltda., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) como agente radiopacificador (Ferreira, 2013; Ferreira 2015; Liévana, 2018). O tratamento com pasta à base de EGCG foi comparado com uma pasta à base de hidróxido de cálcio, que também apresenta óxido de zinco como radiopacificador e PEG 400 como veículo (Calen® – S.S. White Artigos Dentários Ltda. – Rio de Janeiro – RJ – Brasil) e ao tratamento endodôntico realizado em única sessão, sem aplicação de medicação. Os grupos experimentais e número de dentes utilizados estão listados na Tabela 1.

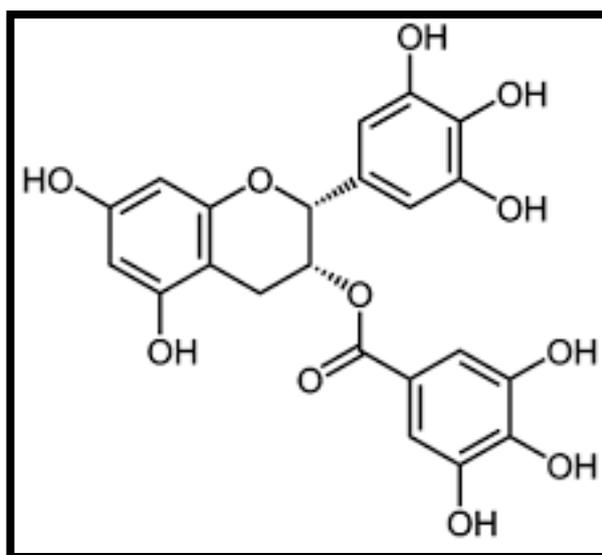


Figura 1. Estrutura química da EGCG (C₂₂H₁₈O₁₁), massa molecular 458,37 g/mol.

Fonte: Página da Sociedade Brasileira de Química¹. ¹Disponível em

<http://qnint.sbg.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=zSWyvIMTmjYy0Er35Dc0YElyZ28ul2LA5Rgl5pUzkpXUy91BtQw8z9HXIU_OgTUppom_3nTYKClRK-RnfOmpg==> Acesso em: 24 ago. 2018.

Tabela 1- Grupos avaliados no presente estudo e distribuição do número de dentes

Grupo	Condição Clínica/Tratamento	Número de dentes (raízes)
I	Dente hígido	5 dentes (10 raízes)
II	Dente portador de lesão periapical induzida experimentalmente e não tratada	5 dentes (10 raízes)
III	Dente tratado endodonticamente em sessão única	5 dentes (10 raízes)
IV	Dente tratado endodonticamente em duas sessões: pasta à base de EGCG (Composição: EGCG em pó, óxido de zinco e polietilenoglicol 400)	10 dentes (20 raízes)
V	Dente tratado endodonticamente em duas sessões: pasta à base de hidróxido de cálcio - Calen [®] (Composição: hidróxido de cálcio em pó, óxido de zinco e polietilenoglicol 400)	10 dentes (20 raízes)

EGCG: Epigallocatequina-3-galato

Indução da Lesão Periapical e Tratamento Endodôntico

Os procedimentos operatórios foram realizados sob a anestesia geral (inalatória), sob os cuidados de um médico veterinário. Na fase de tranquilização, os animais foram pré-anestesiados, por meio de injeção por via endovenosa de acepromazina (Acepran 0,2% - Vetnil Indústria e Comércio de Produtos Veterinários Ltda - Louveira - SP - Brasil), na dosagem de 0,11 mg/kg de peso, 15 minutos antes do ato operatório. Na fase de indução foi aplicado zolazepam (Zoletil 50 Virbac do Brasil - São Paulo - SP - Brasil), na dosagem de 3mg/kg de peso, por via endovenosa, para posterior passagem da sonda endotraqueal, necessária para a realização da anestesia inalatória. Após a intubação com sonda endotraqueal, a fase de manutenção da anestesia foi realizada com isoflurano (Abbott Laborat. do Brasil Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil), na concentração de 1,5 a 2,5% juntamente com oxigênio, utilizando o aparelho para anestesia inalatória (Takaoka KT-20 - Biocom Tecnologia - São Paulo - SP - Brasil), até indução do efeito. Durante todo ato operatório, os animais foram mantidos com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Glicolabor Indústria Farmacêutica Ltda. - Ribeirão Preto – SP - Brasil), sob monitoramento cardiorrespiratório realizado com auxílio de oxímetro de pulso

veterinário (Edan ZEH100B -Sistem Biomédica - Yucatan - México). Após a realização dos procedimentos operatórios os animais receberam analgésico (Cloridrato de Tramadol, Medelly S/A – Campinas –Brasil), na dosagem de 3 mg/kg de peso, por via endovenosa, a cada 12 horas, durante 2 dias.

O exame radiográfico periapical dos dentes foi realizado com filmes periapicais nº 2, ultra-rápidos (Eastman Kodak Company - Rochester - NY - EUA), pela técnica da bisettriz, utilizando o aparelho de raios-X odontológico (Heliodent - Siemens - NY - EUA), com 60 kVp e 10 mA e tempo de exposição de 1 segundo. As radiografias foram reveladas em câmara escura pelo método tempo/temperatura.

Todo o instrumental utilizado nos procedimentos operatórios foi esterilizado em autoclave a 121°C, por 20 minutos (Souza-Gugelmin et al., 2005) e os procedimentos operatórios foram realizados por um único profissional, com ampla experiência e capacitação em experimentação animal. Após a realização de profilaxia e raspagem dental, foi realizada a abertura coronária pela face oclusal utilizando pontas esféricas diamantadas nº 1015 (K.G. Sorensen - São Paulo - SP - Brasil) montadas em motor de alta rotação, refrigeradas com ar/água, complementadas com pontas diamantadas cônicas de extremidade inativa (nº 3083 - KG Sorensen). A seguir a polpa foi removida com uma lima tipo Hedströen e o dente foi mantido aberto por 7 dias, para que houvesse a contaminação por micro-organismos bucais. Após o período de 7 dias, os dentes foram selados provisoriamente com mechas de algodão e cimento de óxido de zinco e eugenol (IRM® - Dentsply Industria e Comércio Ltda. – Petrópolis – Brasil), para que pudesse ser formado um ambiente de anaerobiose, após a contaminação bacteriana, e conseqüentemente, a formação de lesão periapical (Leonardo et al., 1994).

Após a obtenção das lesões periapicais, que foram evidenciadas radiograficamente após 45 a 60 dias, iniciou-se o tratamento endodôntico sob isolamento absoluto, com dique de borracha, e antissepsia com digluconato de clorexidina a 2,0% (FCFRP – USP - Ribeirão Preto - SP). O cimento provisório e a mecha de algodão da câmara pulpar foram removidos com pontas diamantadas esféricas e os canais radiculares submetidos à neutralização imediata do conteúdo séptico-tóxico aplicando o princípio coroa/ápice, de acordo com Leonardo (2005),

empregando instrumentos de níquel-titânio do Sistema Protaper Universal (Dentsply/Maillefer), introduzindo os instrumentos com diminuição gradativa de diâmetros, acompanhados pela irrigação/aspiração e nova inundação com solução de hipoclorito de sódio a 2,5% (FCFRP, USP - Ribeirão Preto, SP).

Realizada a odontometria e determinado o Comprimento Real de Trabalho (CRT), o forame apical foi alargado mecanicamente com limas tipo K de nº 15, 20 e 25, sendo esta última lima designada de Instrumento Apical Foraminal (IAF), utilizada para padronização do diâmetro de abertura apical dos dentes em estudo. Na mesma sessão foi realizado o preparo biomecânico, empregando instrumentos de níquel-titânio do Sistema Protaper Universal (Dentsply/Maillefer) até o CRT, estabelecido aproximadamente a 1mm aquém do ápice radiográfico. Após a utilização de cada instrumento, foi realizada a irrigação/aspiração/inundação dos canais radiculares com solução de hipoclorito de sódio a 2,5%.

Terminado o preparo biomecânico, uma lima tipo K nº 25 (IAF) foi novamente utilizada em todo CRT, para remoção de possíveis raspas de dentina e resíduos acumulados na região do forame apical, em decorrência do preparo biomecânico. Após nova irrigação e aspiração, os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorvente esterilizadas e, a seguir, inundados com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), tamponado em pH 7,4 até o CRT e agitado por 3 minutos com lima. Após irrigação copiosa com solução de hipoclorito de sódio a 1% para neutralização do EDTA, foi realizada a secagem por aspiração e uso de pontas de papel absorvente, de calibre compatível com o diâmetro do último instrumento utilizado no CRT.

Após o preparo biomecânico, cada grupo recebeu a aplicação de um dos seguintes curativos de demora: pasta à base de EGCG, pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®). Cada medicação, ontida em tubetes, foi aplicada com o auxílio de seringa rosqueável ML (S.S. White Artigos Dentários Ltda. – Rio de Janeiro - Brasil) e agulha longa 27G (Septoject XL – Septodont – França), na medida de 1 mm além do CRT, com a finalidade de promover um pequeno extravasamento e proporcionar seu contato com a superfície apical externa. Em seguida, foi realizado selamento

coronário provisório com mecha de algodão esterilizada e cimento à base de óxido de zinco e eugenol (S.S. White Artigos Dentários Ltda. - Rio de Janeiro – RJ - Brasil).

Após 14 dias da aplicação do curativo de demora, sob nova anestesia geral, isolamento absoluto e antissepsia do campo operatório, foi removido o selamento provisório conforme descrito anteriormente e o curativo de demora mediante copiosa irrigação/aspiração com hipoclorito de sódio a 2,5%, coadjuvada com o último instrumento utilizado na confecção do batente apical no CRT. A seguir, os canais radiculares foram secos com pontas de papel absorventes esterilizadas e inundadas com EDTA até o CRT e agitado por 3 minutos com o IAF. Após irrigação copiosa com solução de hipoclorito de sódio a 1% para neutralização do EDTA, foi realizada nova secagem dos canais com pontas de papel absorventes esterilizadas. Para a obturação dos canais, os cones de guta-percha (principal e auxiliares) foram submetidos à desinfecção com solução de clorexidina a 2%. Após a seleção do cone, foi realizada comprovação radiográfica da escolha clínica do mesmo. Seguindo a técnica clássica modificada de obturação, o cone principal foi envolto no cimento obturador AH Plus (Dentsply/Detrey - Kontstanz, - Germany) em toda sua extensão e levado para o interior do canal radicular com um único movimento. A seguir, foi feita a condensação lateral ativa com o auxílio de espaçador digital e cones de guta-percha auxiliares. Após o corte do excesso da obturação e condensação vertical, as câmaras pulpares foram limpas com mechas de algodão esterilizadas umedecidas em álcool, sendo os dentes restaurados com amálgama de prata (Velvalloy – S.S.White Art. Dent. Ltda. – Rio de Janeiro – RJ) condensado sobre uma base de cimento de ionômero de vidro (Vidrion F – S.S.White Art. Dent. Ltda. – Rio de Janeiro – Brasil).

O protocolo experimental foi realizado com base nas normas da *International Organization for Standardization* (ISO) nº 7405:2008, com exceção dos períodos experimentais preconizados (28 e 90 dias). No presente estudo, os 3 cães foram acompanhados por um único período de 120 dias, visando restringir o número de animais ao mínimo indispensável para obtenção de resultados conclusivos, em atendimento à Lei Brasileira. Decorrido o período experimental de 120 dias, foi realizado exame radiográfico periapical final, e os animais foram submetidos à eutanásia por sobredose anestésica, de acordo com as Diretrizes da prática de

Eutanásia do CONCEA do Ministério da Ciência e Tecnologia. Inicialmente, foi realizada a anestesia por meio de injeção por via endovenosa de acepromazina (Acepran 0,2%), na dosagem de 0,2 mg/kg de peso. Após 15 minutos, foi realizada a anestesia com Tiopental (Thionembutal - Abbot Laboratórios do Brasil Ltda. - Rio de Janeiro - RJ - Brasil) endovenoso, na dosagem de 25 mg/kg de peso. Em seguida, foi realizada a eutanásia com cloreto de potássio a 20%, via endovenosa, na dosagem de 100 mg/kg de peso, injetado lentamente.

Processamento Histotécnico

Após a eutanásia dos animais, as maxilas e mandíbulas foram dissecadas, com auxílio de um bisturi, reduzidas em seu volume e as peças lavadas em água corrente. Para facilitar o processamento histotécnico, as peças foram seccionadas utilizando discos diamantados, sob constante refrigeração com água obtendo-se blocos das peças anatômicas contendo as raízes individualmente.

As peças foram submetidas à fixação em solução de formol tamponado a 10%, por 24 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, as peças foram imersas em um recipiente de vidro contendo uma solução à base de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA Disodium Salt Dihydrate – Merck – Darmstadt Alemanha) a 10% e submetidas à desmineralização acelerada pelo Vortex tipo Agitador KLINE NT151 (Novatecnica® – Piracicaba, São Paulo – Brasil). As peças foram imersas em solução EDTA a 22% e colocadas em agitação orbital a 70%, 8 horas por dia. No intervalo entre os dias, o material permaneceu na solução desmineralizadora sem agitação, à temperatura ambiente. A solução EDTA foi trocada semanalmente. A completa descalcificação das amostras, avaliadas por meio da penetração de uma agulha nos tecidos para verificação da sua consistência, foi obtida aproximadamente em 30 dias (Flower, 1951).

Após concluída a desmineralização, as peças foram neutralizadas em solução de sulfato de sódio a 5% (Sulfato de Sódio Anhido – J.T.Baker – Xalostoc – México) por 24 horas, lavadas em água corrente por 8 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (Álcool Etílico Absoluto Anhidro® –J.T.Baker), imersas em

Álcool Xilol 50% por 30 min, diafanizadas em xilol (Xylol® – Merck) 100%, sendo trocadas 3 vezes cada hora e inclusas em parafina (Histosec® Pastillen – Merck), de acordo com a rotina histotécnica. Os blocos contendo as raízes individualizadas foram reduzidos pela microtomia a cortes seriados longitudinais com 5µm de espessura em sentido mesio-distal.

Para a análise histopatológica os cortes foram inicialmente corados por hematoxilina e eosina (HE), e avaliados por microscopia de luz convencional e luz fluorescente (Leica DMR, Leica Microsystem Wetzlar GmbH; Wetzlar, Alemanha). A integridade da matriz extracelular e a presença e intensidade do infiltrado inflamatório foram avaliados nas lâminas coradas em HE por meio de análise descritiva e quantitativa. A avaliação do grau de desorganização tecidual foi realizado visando caracterizar o estágio de reparação por meio da reinserção e neoformação das fibras do ligamento periodontal fixadas ao terço apical. O grau de ruptura e desorganização das fibras de colágeno foi classificado como (1) ausente, (2) leve, (3) moderado ou (4) grave para indicar a nível de destruição do ligamento periodontal apical (Paula-Silva et al., 2010). A integridade do cemento e osso alveolar adjacentes também foi avaliada seguindo o mesmo critério. Quando necessário, foram realizados ajustes nas imagens, com alteração no contraste, brilho e aumento, para melhor visualização das áreas de reabsorção, infiltrado inflamatório e da integridade das fibras colágenas.

As análises microscópicas foram realizadas por dois examinadores, com o teste de concordância Kappa (K) em $k=0,81$ sem conhecimento prévio do grupo ao qual o espécime analisado pertence, em microscópio AXIO IMAGER M1 (Zeiss - Gottingen - Alemanha), acoplado a uma câmera AXIOCAM MRc5 (Zeiss).

Imunofluorescência

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois, e lavadas em água corrente por 4 vezes e mantidas em água para não desidratar. Após isso, as lâminas foram colocadas em uma caixa escura para

procedimentos de imunohistoquímica e separadas em dois grupos: MMP2 e MMP9. Feito isso, as lâminas foram limpas do excesso de água proveniente da hidratação. A seguir a recuperação antigênica com Proteinase K 1:500 (Invitrogen, Carlsbad, EUA) foi realizada por um período de 10 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em salina fosfatada tamponada (PBS) por 5 minutos três vezes. Após isso, foi aplicado nas lâminas, Borohidreto de Sódio 1mg/ml (Dinâmica Química Contemporânea LTDA, Indaiatuba, Brasil) por 15 minutos três vezes. A seguir foram lavadas em PBS por 5 minutos três vezes e os sítios de ligação não-específica foram bloqueados com albumina de soro bovino (Sigma, St Louis, EUA) a 1% por 60 minutos em temperatura ambiente. Os tecidos foram incubados com os anticorpos primários em concentração 1:50 tanto para MMP-2 (5 µg / ml; 53630, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), quanto para MMP-9 (5 µg / ml; 21736, Santa Cruz Biotechnology) a 4 °C em overnight. A seguir, as lâminas foram retiradas da geladeira e colocadas em temperatura ambiente por 1 hora. Após isso, foram lavadas em PBS por 5 minutos (3x). A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários anti-mouse FITC biotinilados em concentração 1:200 por 1 hora (Rabbit anti-mouse IgG-FITC sc-358916, Santa Cruz Biotechnology), lavadas em PBS por 5 minutos (3x), e por fim, as lamínulas foram colocadas utilizando UltraCruz® Aqueous Mounting Medium with DAPI (24941, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA). Lâminas-controle foram utilizadas para testar a especificidade da imunomarcagem nas quais foram omitido o anticorpo primário e as lâminas foram incubadas em tampão fosfato salina (PBS).

Além de análise microscópica descritiva, caracterizando a presença ou ausência de expressão, tipos celulares e localização da marcação na célula (membrana ou citoplasma) foi realizada análise quantitativa sendo atribuídos os mesmos escores utilizados na análise da desorganização tecidual e infiltrado inflamatório (escores de 1 a 4, sendo 1: ausente, 2: suave, 3: moderado e 4: severo).

As análises microscópicas foram realizadas por dois examinadores com o teste de concordância Kappa (K) em $k=0,83$, sem conhecimento prévio do grupo ao qual o espécime analisado pertence, em microscópio AXIO IMAGER M1 (Zeiss - Gottingen - Alemanha), acoplado a uma câmera AXIOCAM MRc5 (Zeiss).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com a gentil colaboração da Profa. Dra. Aline Evangelista (FORP-USP).

Os resultados histopatológicos quantitativos (desorganização tecidual, infiltrado inflamatório e expressão de MMP 2 e 9) constituem variáveis ordinais, independentes com 3 categorias e tamanhos diferentes para os grupos experimentais e controle. Dessa forma, para cada variável, utilizou-se o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O software estatístico utilizado foi o SPSS na versão 25 (IBM, Chicago, EUA) com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA DESCRITIVA

4.1.1 Dentes hígidos

Os pré-molares hígidos apresentaram características de normalidade, com vitalidade da polpa na região coronária e radicular, integridade da região apical e periapical e ausência de infiltrado inflamatório (Figura 1.1-A e 1.1-B e Tabela 2). Observou-se expressão positiva e suave (escore 2) das MMP-2 e MMP-9 (Tabela 5 e Tabela 6), localizadas na membrana e citoplasma de fibroblastos situados entre as fibras do ligamento periodontal (Figura 1.1-C; 1.1-D), cementoblastos e osteoblastos, localizados na superfície cementária e óssea, respectivamente (Figura 1.1 E; Figura 1.1 F). Observou-se a expressão de MMP-9 nos osteoblastos presentes no osso maduro, com evidenciação do processo de transição de osso neoformado e osso lamelar durante o processo fisiológico de remodelamento ósseo (Figura 1.2 A)

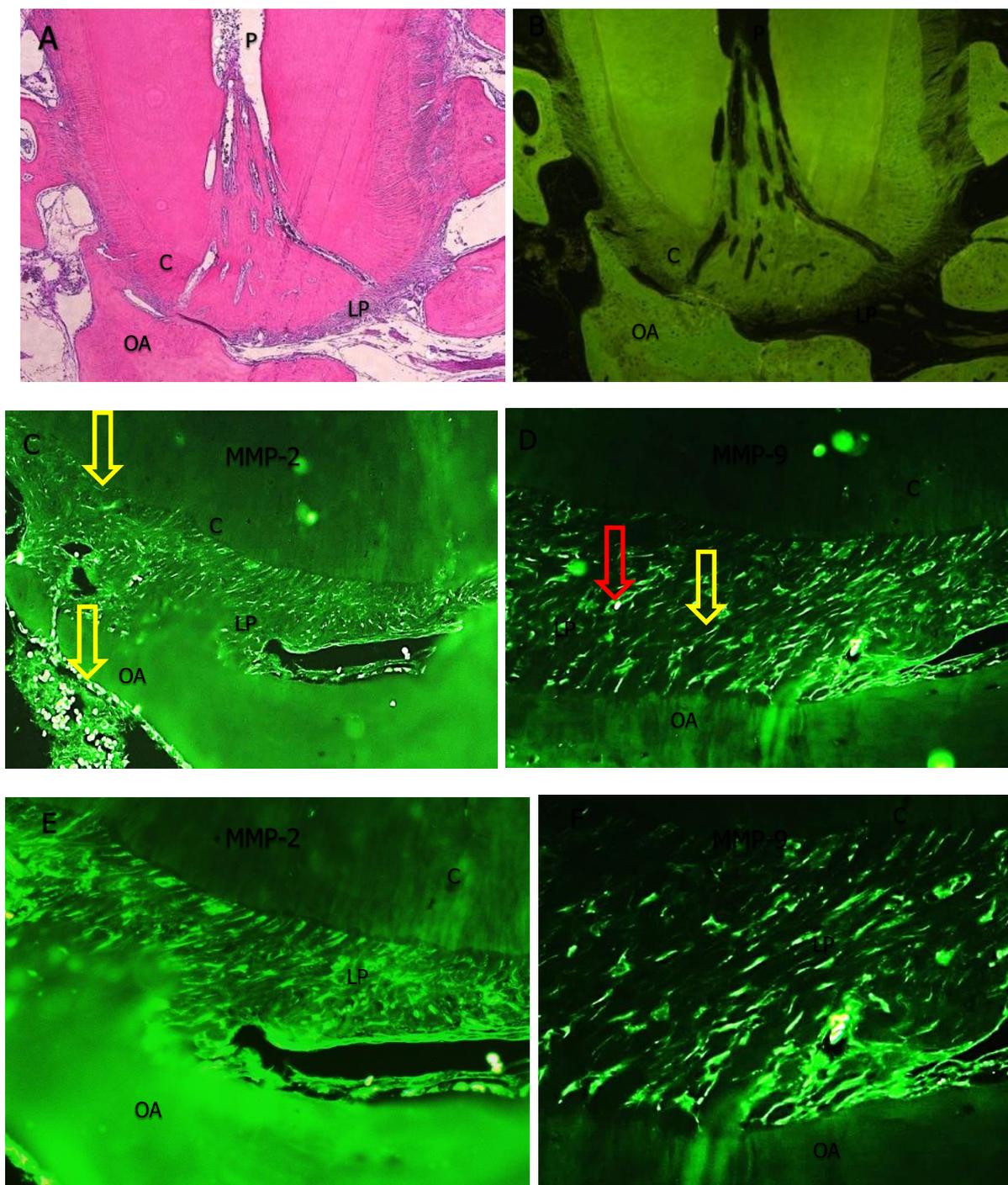


Figura 1 – Fotomicrografia representativa de um pré-molar inferior hígido, corado com HE e observado em microscopia de luz convencional **(A)** e de fluorescência **(B)**. **A e B**: observa-se vitalidade pulpar (P) e integridade da região apical e periapical, incluindo regularidade do cimento (C), osso alveolar (OA) e ligamento periodontal (LP). (**A**: HE e **B**: fluorescência; 5X). **C**: se observa a expressão positiva de MMP-2 nos fibroblastos presentes entre as fibras do ligamento periodontal. (**C**: Imunofluorescência; 10x). Em **(D)**, a Imunofluorescência da expressão de MMP-9 também nos fibroblastos do ligamento periodontal (seta amarela) e hemácia (seta vermelha). (**D**: Imunofluorescência; 20x). Figura **(E)**, Imunofluorescência da expressão de MMP-2 em fibroblastos, cementoblastos e osteoblastos. (**E**: Imunofluorescência; 20x). Figura **(F)**, Imunofluorescência da expressão de MMP-9 em fibroblastos. (**F**: Imunofluorescência; 40x)

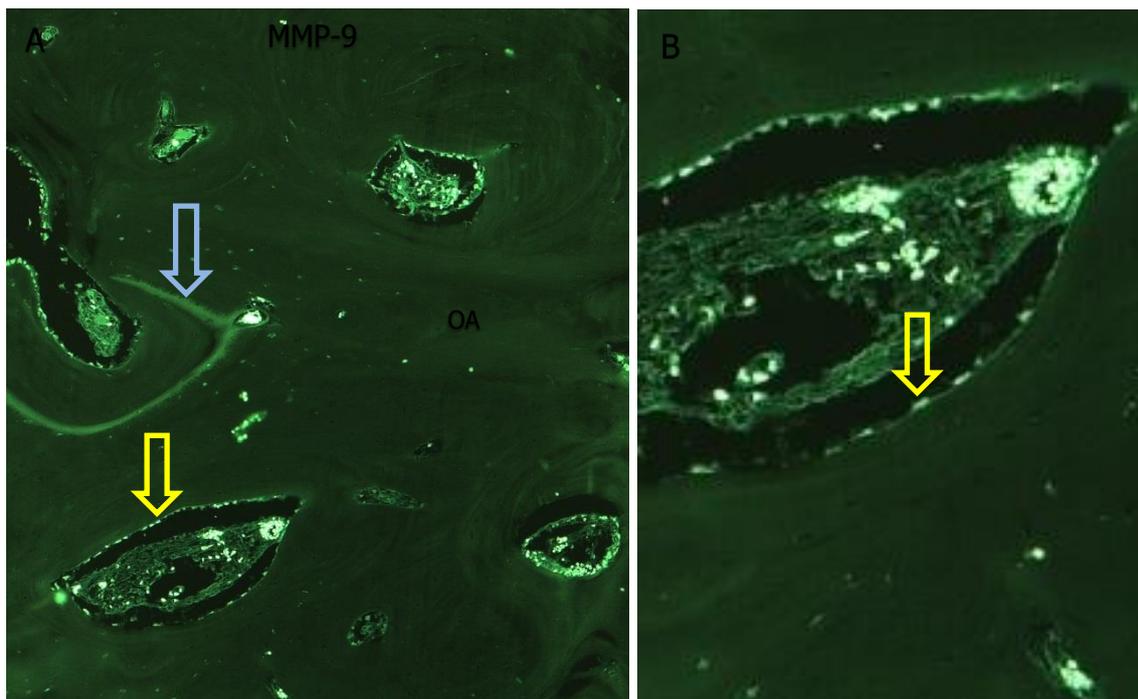


Figura 1.2 – Fotomicrografia representativa do osso alveolar de um pré-molar inferior hígido, corado por Imunofluorescência para MMP 9. **(A)** expressão positiva de MMP-9 nos osteoblastos presentes no osso maduro (seta amarela); Processo de remodelação óssea fisiológico evidenciado pela transição de osso maduro e osso neoformado (seta azul). (A: Imunofluorescência; 20x; B: Imunofluorescência 40x;)

4.1.2 Dentes portadores de lesão periapical não tratada

Nos dentes onde foi realizada apenas a indução de lesões periapicais, verificou-se a ocorrência de necrose pulpar em toda a extensão do canal radicular, presença de infiltrado inflamatório crônico, composto por células polimorfonucleares e mononucleares, reabsorção das fibras do ligamento periodontal na região apical, reabsorção cementária em sua superfície externa e no interior das lacunas antes preenchidas por osteócitos, com ausência de células em algumas delas (Figura 2.1-A e 2.1-B). Observou-se também a reabsorção do osso alveolar ao redor da lesão periapical.

Houve a imunomarcagem positiva e intensa de MMP-2 e MMP-9 na lesão periapical, localizadas no interior das lacunas dos cementócitos e nas células do infiltrado inflamatório e cementoblastos localizadas na saída do forame apical (Figuras 2.1-C; 2.1-D e 2.1-E); (Figura 2.2 A).

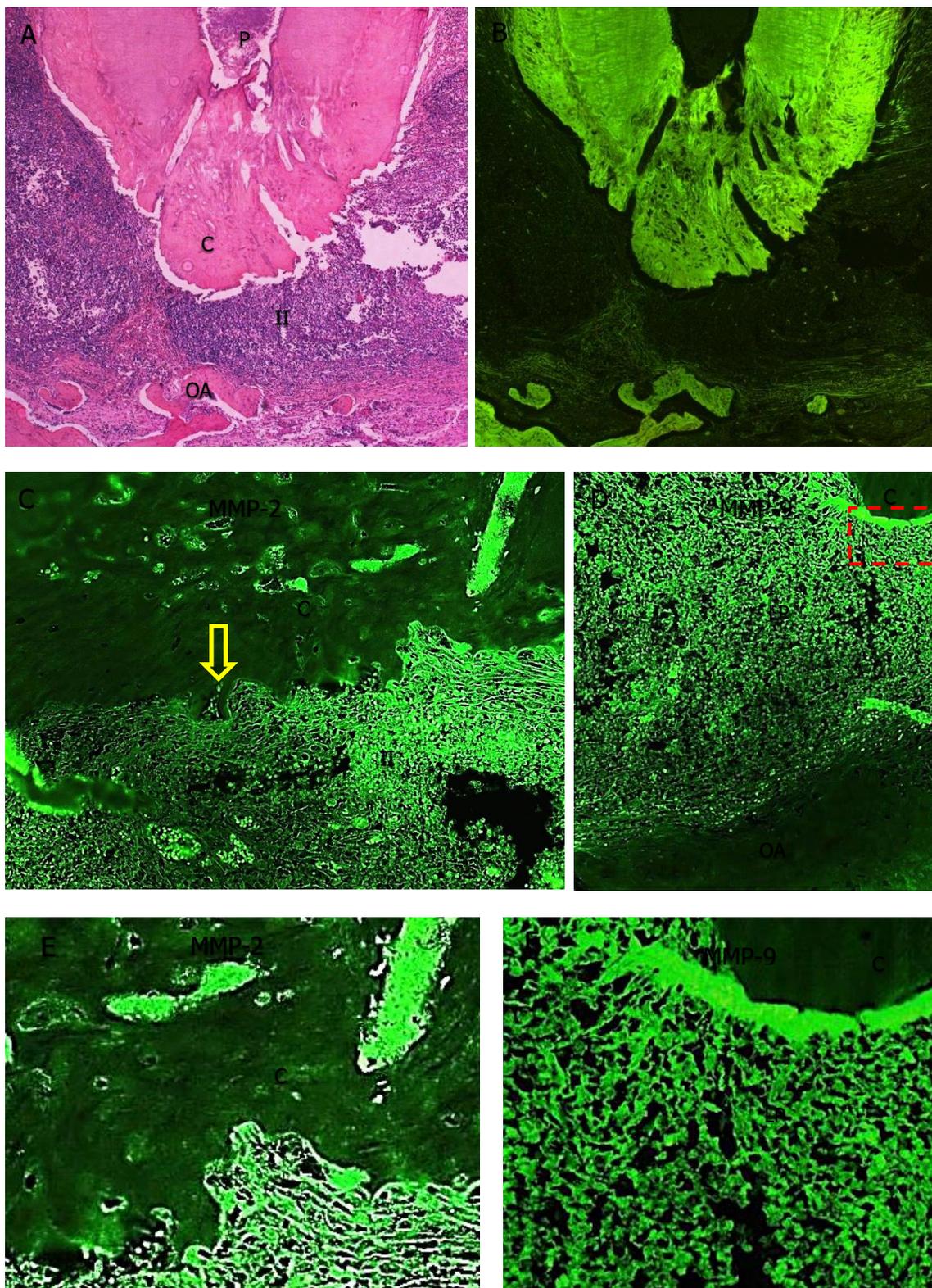


Figura 2.1 – Fotomicrografia representativa de um pré-molar inferior portador de lesão periapical não tratada, corado com HE e observado em microscopia de luz convencional **(A)** e de fluorescência **(B)**. **A e B:** observa-se necrose pulpar (P) e presença de lesão periapical caracterizada por reabsorção do cimento (C), osso alveolar (OA) e presença de numerosas células inflamatórias na região periapical (II). (A: HE e B: fluorescência; 5X). **C:** se observa a da expressão positiva de MMP-2 nas células inflamatórias e interior das lacunas dos cementócitos, e cementoblastos indicado pela seta amarela. (C: Imunofluorescência; 10x). **D:** expressão da MMP-9 no infiltrado inflamatório da região

periapical. (D: Imunofluorescência; 10x). **E:** expressão de MMP-2 nos cementócitos (E: Imunofluorescência; 40x).



Figura 2.2 - Fotomicrografia representativa do cimento de um pré-molar inferior portador de lesão periapical não tratada, corado com Imunofluorescência para MMP2. Crateras de reabsorção na superfície externa (C) e interna do cimento (C2), e a expressão de MMP-2 em cementoblasto e seu prolongamento (seta amarela). (A: Imunofluorescência; 40x)

4.1.3 Dentes tratados em sessão única

Após o tratamento endodôntico realizado em sessão única, sem aplicação de curativo de demora, verificou-se persistência de lesão periapical, caracterizada por persistência de infiltrado inflamatório severo e desorganização tecidual, reabsorção dos tecidos mineralizados, incluindo cimento (C) e osso alveolar (OA) e ausência de reinserção de fibras do ligamento periodontal (Figura 3).

Neste grupo verificou-se expressão positiva e intensa das MMP-2 e MMP-9 na lesão periapical (LP), semelhante aos dentes portadores de lesão periapical não tratada. Pode-se verificar expressão das MMPs 2 e 9 nas células do infiltrado

inflamatório em toda a extensão da lesão e no interior das lacunas dos cementócitos, reabsorvidas em consequência da resposta inflamatória (Figuras 3-C e D).

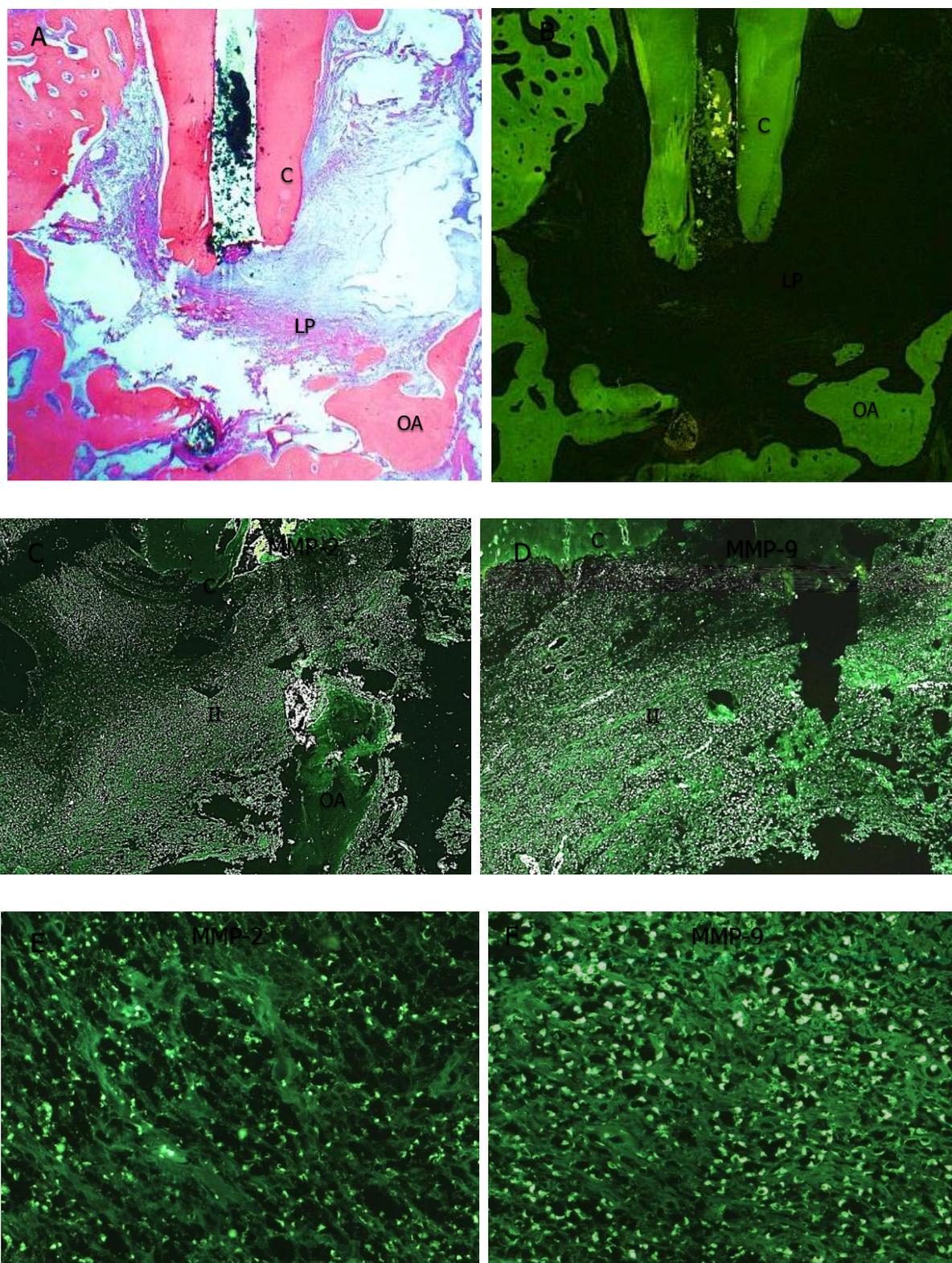


Figura 3 – Fotomicrografia representativa de um pré-molar inferior tratado em sessão única, corado com HE e observado em microscopia de luz convencional **(A)** e de fluorescência **(B)**. **A e B**: observa-se persistência de lesão periapical caracterizada por reabsorção do cimento (C), osso alveolar (OA) e

presença de numerosas células inflamatórias na região periapical (II). (A: HE e B: fluorescência; 5X). **C:** Se observa a expressão positiva de MMP-2 nas células inflamatórias e interior das lacunas dos cementócitos. (C: Imunofluorescência; 10x). **D:** expressão da MMP-9 no infiltrado inflamatório da região periapical. (D: Imunofluorescência; 10x). **E e F:** expressão de MMP-2 e 9, respectivamente nos cementócitos e células do infiltrado inflamatório (E e F: Imunofluorescência; 40x)

4.1.4 Dentes tratados com pasta à base de EGCG

No corte histológico corado em HE e HE fluorescente é possível visualizar nos dentes pré-molares a reparação das lesões periapicais, com reestabelecimento do espaço do ligamento periodontal, neoformação óssea e de cimento, reinserção de fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório, após a utilização da pasta à base de EGCG como curativo de demora no tratamento endodôntico (Figura 4.1-A e 4.1-B).

Foi observada nesse grupo, expressão suave de MMP-2 e MMP-9 na região periapical após o tratamento endodôntico com uma pasta à base de EGCG (Figuras 4.1-C e 4.1-D). Este grupo apresenta uma visualização da redução da expressão imunofluorescente das MMP-2 e MMP-9 depois de realizado o tratamento endodôntico, utilizando uma pasta à base de EGCG em comparação com a expressão das MMP-2 e MMP-9 nos dentes portadores de lesão periapical não tratada.

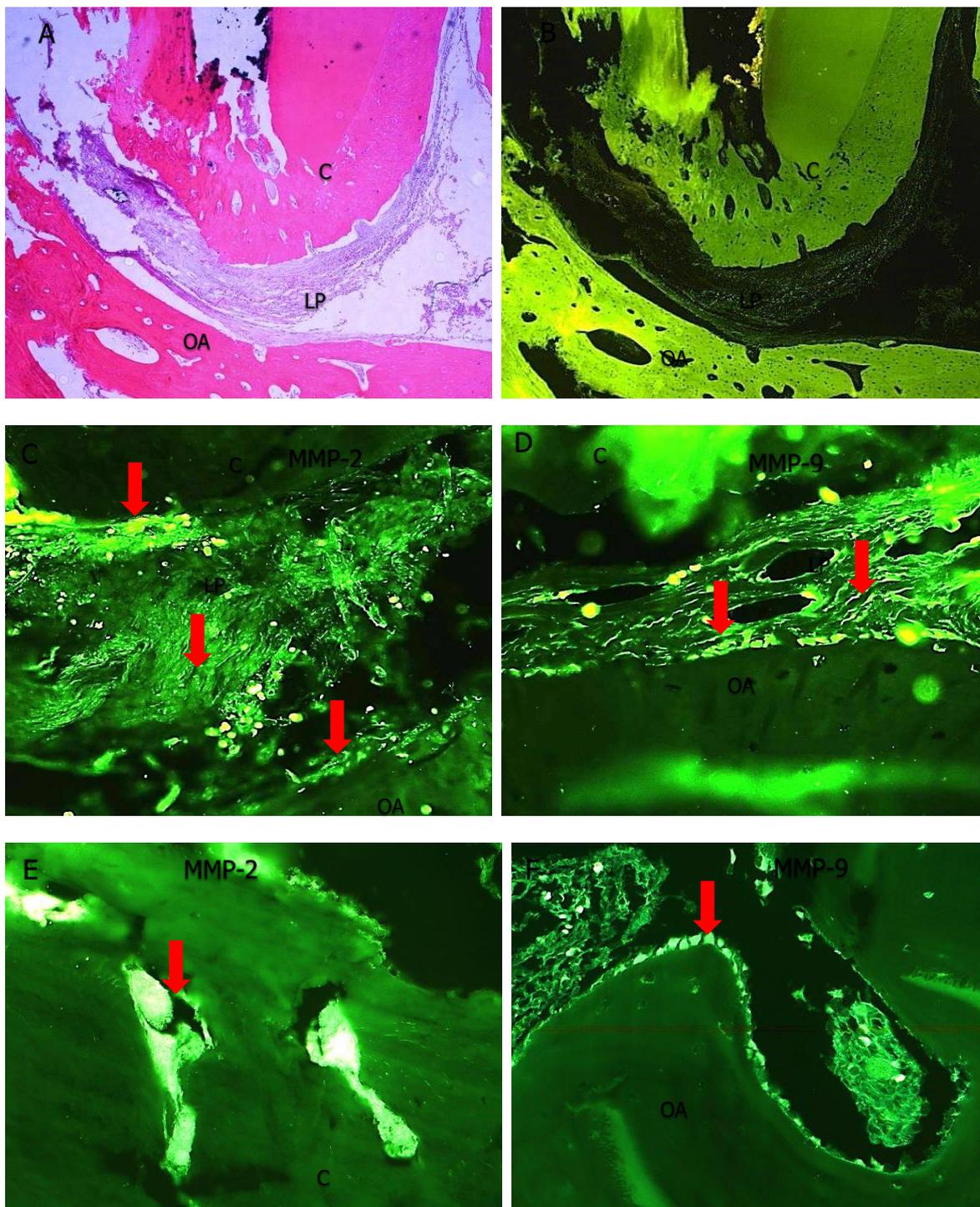


Figura 4.1 – Fotomicrografia representativa de um pré-molar inferior inferior tratado com pasta à base de EGCG, corado com HE e observado em microscopia de luz convencional **(A)** e de fluorescência **(B)**. **A e B**: observa-se reparação da lesão periapical caracterizada por neoformação do cemento (C), osso alveolar (OA) e fibras do ligamento periodontal (LP). (A: HE e B: fluorescência; 5X). **C**: se observa a da expressão positiva de MMP-2 nos cementoblastos e osteoblastos localizados na superfície do C e OA e fibroblastos no LP (setas). (C: Imunofluorescência; 10x). **D**: expressão da MMP-9 no infiltrado inflamatório da região periapical. (D: Imunofluorescência; 10x). **E e F**: expressão de MMP-2 e 9, respectivamente nos cementócitos e osteoblastos (E e F: Imunofluorescência; 40x).

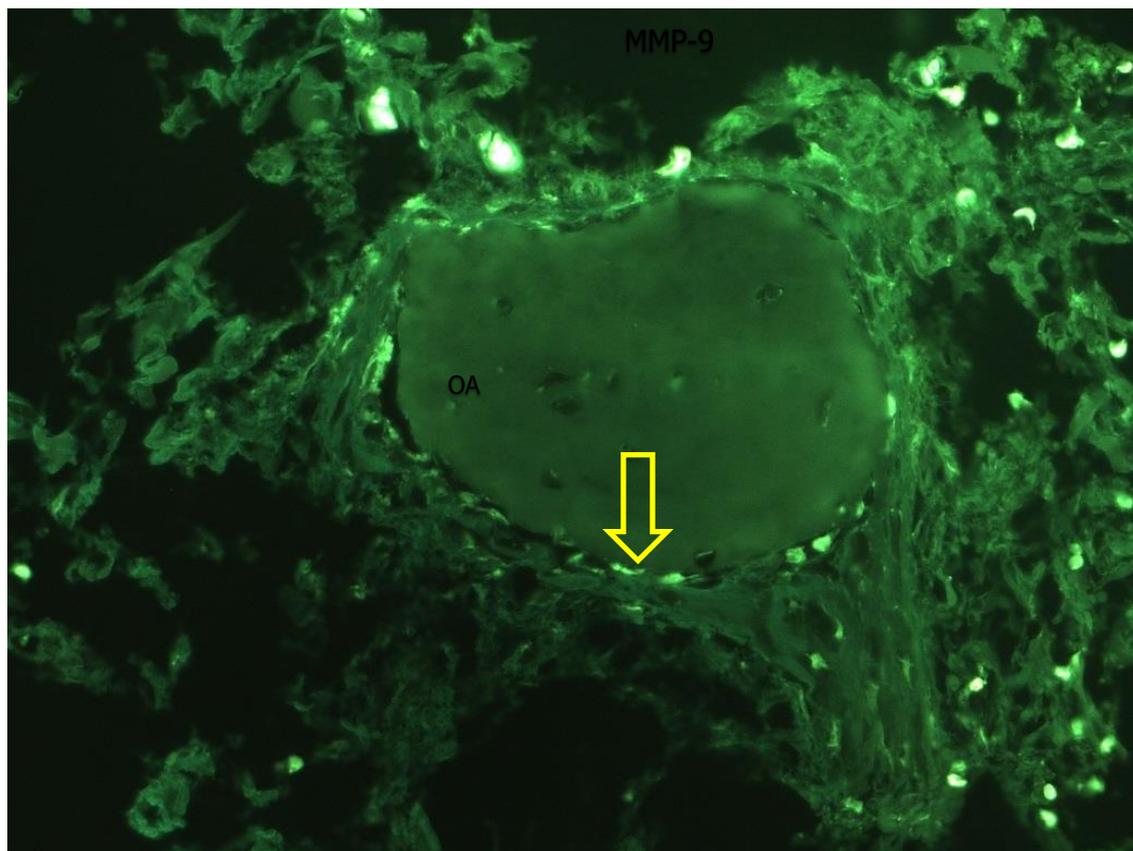


Figura 4.2 - Fotomicrografia representativa da região periapical de um pré-molar inferior inferior tratado com pasta à base de EGCG, corado com Imunofluorescência para MMP9. Observa-se a expressão de MMP-9 em osteoblastos no osso neoformado durante o processo de reparo e neoformação osséa na região periapical. (A: Imunofluorescência; 40x).

4.1.5 Dentes tratados com pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®)

No corte histológico corado em HE e HE fluorescente foi possível visualizar processo de reparação das lesões periapicais, com reestabelecimento do espaço do ligamento periodontal, neoformação óssea e cementária, reinserção de fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório, após a utilização da pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®) como curativo de demora no tratamento endodôntico (Figura 5-A e B).

O tratamento endodôntico com a pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®) resultou em expressão positiva e suave de MMP-2 e 9, semelhante ao grupo tratado com pasta à base de EGCG, com redução da expressão imunofluorescente quando comparado aos dentes portadores de lesão periapical e aos dentes tratados em sessão única. Também foi possível visualizar a imunomarcação de MMP-2 e MMP-9 em células como odontoblastos e cementoblastos, o que configura a participação dessas proteases em processos fisiológicos de reparo tecidual ósseo e reparo tecidual do cimento radicular (Figura 5 C-F).

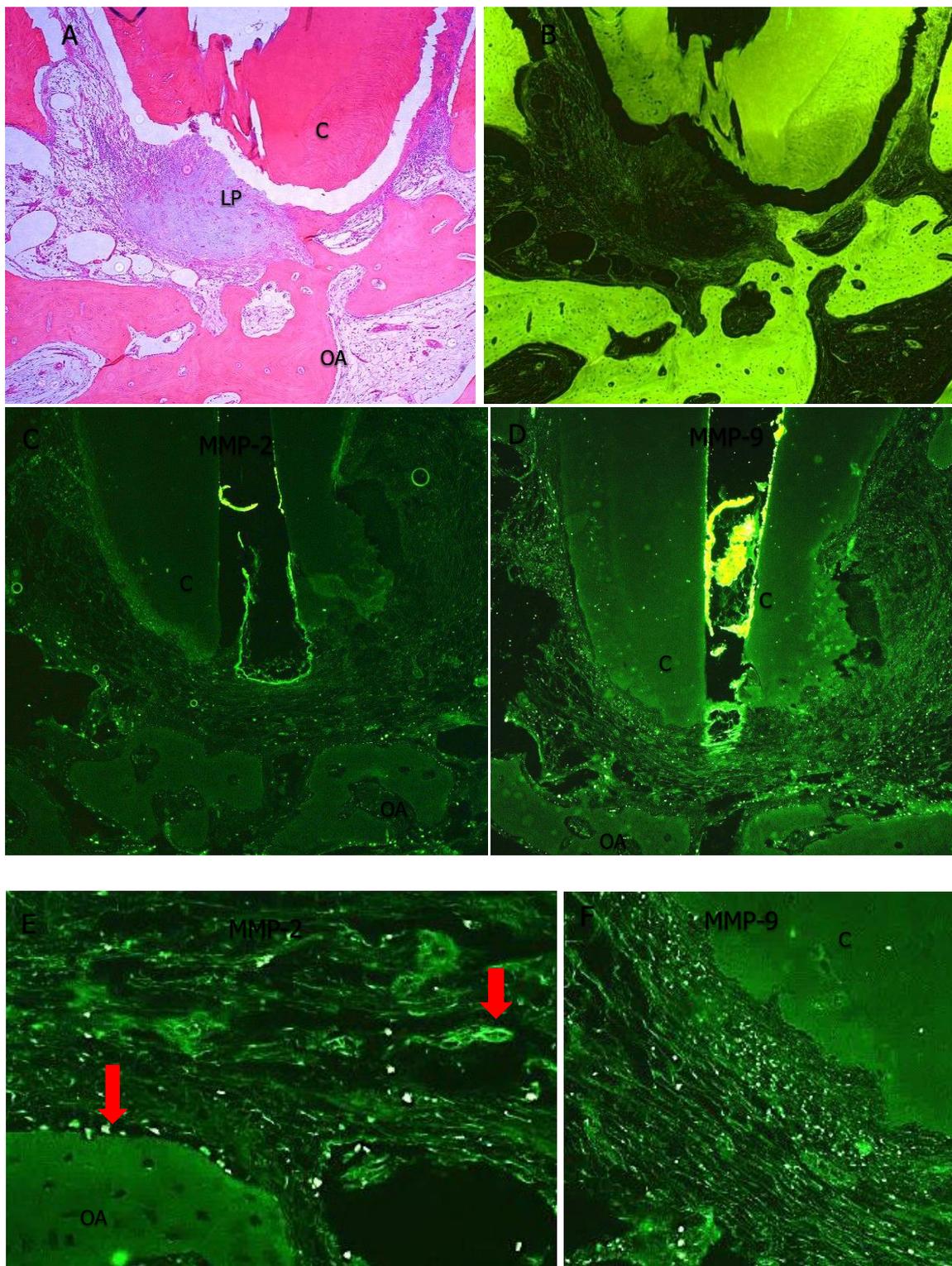


Figura 5 – Fotomicrografia representativa de um pré-molar inferior tratado com pasta à base de Hidróxido de cálcio (Calen®), corado com HE e observado em microscopia de luz convencional **(A)** e de fluorescência **(B)**. **A e B:** observa-se reparação da lesão periapical caracterizada por neoformação do cimento (C), osso alveolar (OA) e fibras do ligamento periodontal (LP). (A: HE e B: Fluorescência; 5X). **C e D:** se observa a da expressão positiva de MMP-2 e 9, respectivamente, nos cementoblastos, osteoblastos e fibroblastos. (C e D: Imunofluorescência; 10x) **E e F:** expressão de MMP-2 e 9, respectivamente nos osteoblastos e fibroblastos e células do infiltrado inflamatório (setas) (E e F: Imunofluorescência; 40x).

4.2. ANÁLISE QUANTITATIVA POR ESCORES

Os resultados das análises histológicas quantitativas (desorganização tecidual, infiltrado inflamatório e expressão de MMP 2 e 9) estão listados na Tabela 2. Verificou-se diferença estatisticamente significativa para todas as variáveis analisadas: desorganização tecidual ($p=0,000$), infiltrado inflamatório ($p=0,000$), MMP-2 ($p=0,002$), MMP-9 ($p=0,002$). O pós-teste de Dunn indicou que os dentes portadores de lesão periapical tratada com EGCG ou com pasta a base de hidróxido de cálcio não apresentaram diferença entre si. Da mesma maneira, os dentes portadores de lesão periapical não tratada ou tratadas em sessão única não apresentaram diferença significativa entre si, e foram diferentes dos dentes tratados em duas sessões.

TABELA 2 – Quantidade de espécimes de cada grupo (I a V) classificados nos escores de 1 a 4 para cada parâmetro avaliado.

Parametros Histológicos Quantitativos	Escore	Condições Clínicas e Tratamentos				
		Dentes Hígidos (I)	Lesão Periapical não tratada (II)	Sessão Única (III)	Pasta à base EGCG (IV)	Pasta de Hidróxido de Cálcio (V)
	1 Ausente	10	0	0	16	17
	2 Suave	0	0	0	4	3
Desorganização Tecidual	3 Moderado	0	0	3	0	0
	4 Severo	0	10	7	0	0
	<i>Análise Estatística</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

	1 Ausente	10	0	0	16	18
	2 Suave	0	0	0	4	2
Infiltrado Inflamatório	3 Moderado	0	0	3	0	0
	4 Severo	0	10	7	0	0
	<i>Análise Estatística</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	1 Ausente	0	0	0	0	0
	2 Suave	10	0	0	17	16
Expressão de MMP-2	3 Moderado	0	0	4	3	4
	4 Severo	0	10	6	0	0
	<i>Análise Estatística</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>
	1 Ausente	0	0	0	0	0
	2 Suave	9	0	0	16	17
Expressão de MMP-9	3 Moderado	1	0	3	4	3
	4 Severo	0	10	7	0	0
	<i>Análise Estatística</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>b</i>

(LETRAS IGUAIS INDICAM SEMELHANÇA ESTATÍSTICA)

Desorganização tecidual

Todos os dentes hígidos (100%) foram classificados no escore 1 (desorganização tecidual ausente). Já nos grupos, lesão periapical não tratada e lesão periapical tratada em sessão única, (100%) e (70%) dos espécimes respectivamente, apresentaram escore 4 (severo) de desorganização tecidual. No grupo que recebeu tratamento em sessão única apresentou o restante dos espécimes, (30%) foram classificados no escore 3 (moderado) de desorganização tecidual. Os grupos tratados com pasta à base de EGCG ou hidróxido de cálcio apresentaram 80% e 85% dos espécimes, respectivamente, no escore 1 (ausente), sendo o restante dos espécimes classificados no escore 2 (suave) de desorganização tecidual. A representação gráfica dos escores está ilustrada pode ser consultada abaixo na Figura 6.

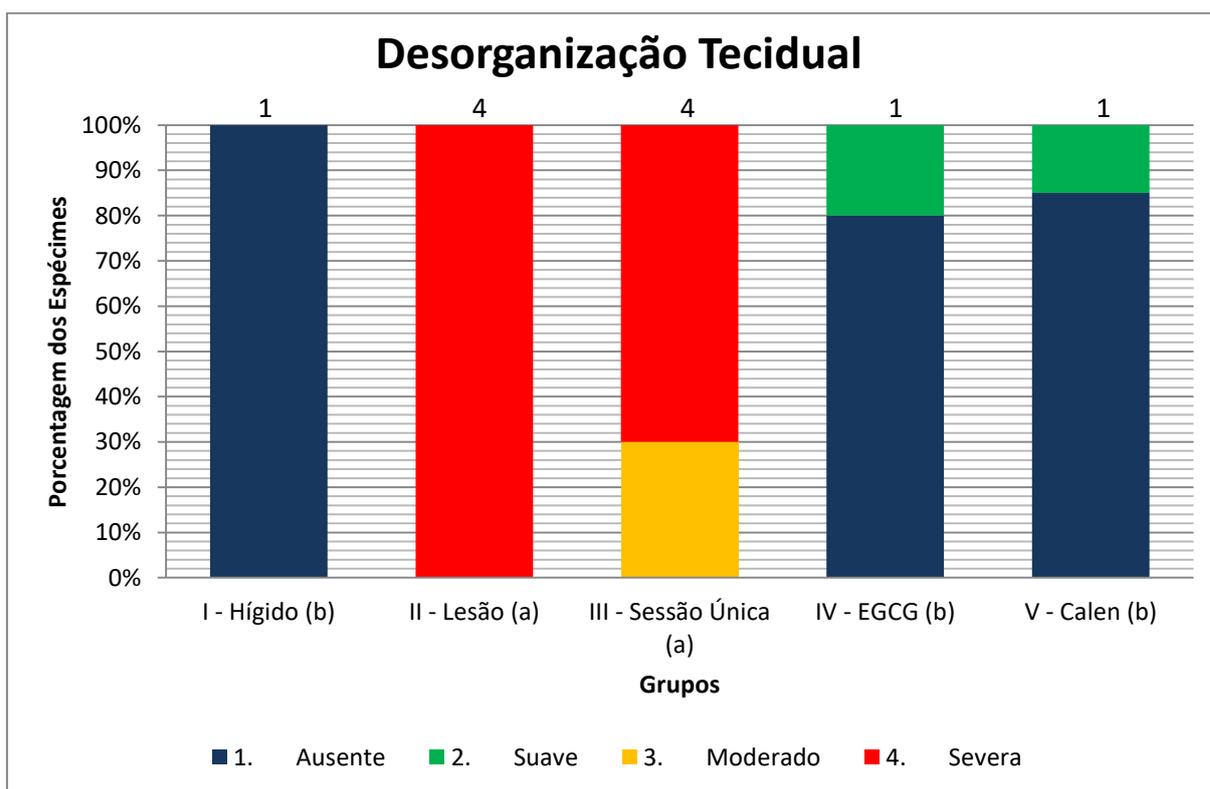


Figura 6 – Gráfico representativo contendo os escores de desorganização tecidual. Grupos, I – Hígido, IV – EGCG e V – Calen mostraram semelhança estatística entre si (b). Grupos, II – Lesão e III – Sessão única mostraram semelhança estatística semelhante entre si (a) e diferença estatística em comparação com (b).

Infiltrado Inflamatório

Todos os dentes Hígidos (100%) foram classificados no escore 1 (infiltrado inflamatório ausente). Já nos grupos, Lesão e Sessão Única, (100%) e (70%) respectivamente, apresentaram escore 4 (severo), de infiltrado inflamatório, e ainda, o grupo Sessão Única apresentou o restante dos espécimes, (30%), no escore 3 (moderado). Os grupos EGCG e Calen, (80%) e (90%) respectivamente, apresentaram novamente, de forma semelhante estatisticamente o escore 1 (ausente), no infiltrado inflamatório, sendo o restante dos espécimes apresentados pelos grupos EGCG e Calen, (20%) e (10%), respectivamente escore 2 (suave). A representação gráfica dos escores está ilustrada e pode ser consultada abaixo na Figura 7.

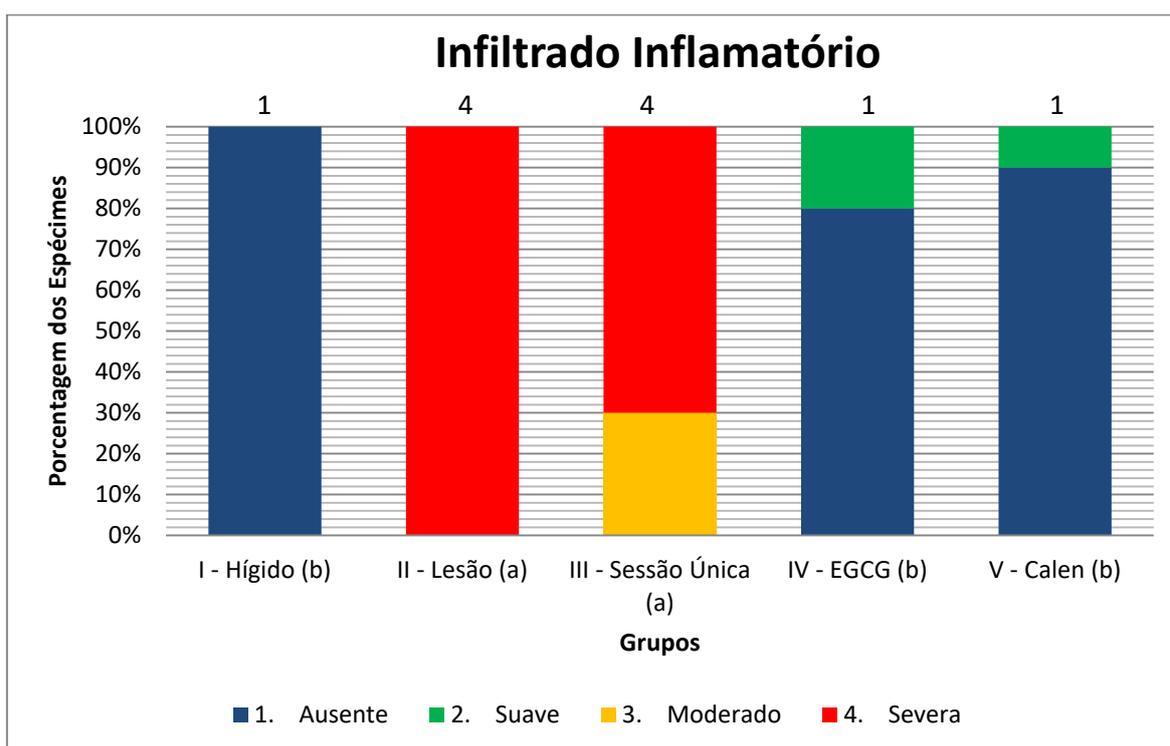


Figura 7 - Gráfico representativo contendo os escores de infiltrado inflamatório. Grupos, I – Hígido, IV – EGCG e V – Calen mostraram semelhança estatística entre si (b). Grupos, II – Lesão e III – Sessão única mostraram semelhança estatística semelhante entre si (a) e diferença estatística em comparação com (b).

Expressão de MMP2

A expressão de MMP-2, foi obtida em todos os dentes do grupo Hígido (100%) no escore 2 (suave). Em todos os dentes do grupo Lesão (100%), obteve-se o escore 4 (severa). O grupo dos dentes tratados em Sessão Única obtiveram o escore 3 (moderado) em (40%) dos espécimes, o restante (60%) obteve o escore 4 (severo), apresentando semelhança estatística com o grupo Lesão. Nos dentes dos grupos EGCG e Calen, (85%) e (80%) respectivamente, apresentaram o escore 2 (suave), na marcação da MMP-2, sendo o restante dos dentes apresentados pelos grupos EGCG e Calen, (15%) e (20%), respectivamente escore 3 (moderado), ambos os grupos apresentaram semelhança estatística com o grupo dos dentes Hígidos. A representação gráfica dos escores está ilustrada e pode ser consultada abaixo na Figura 8.

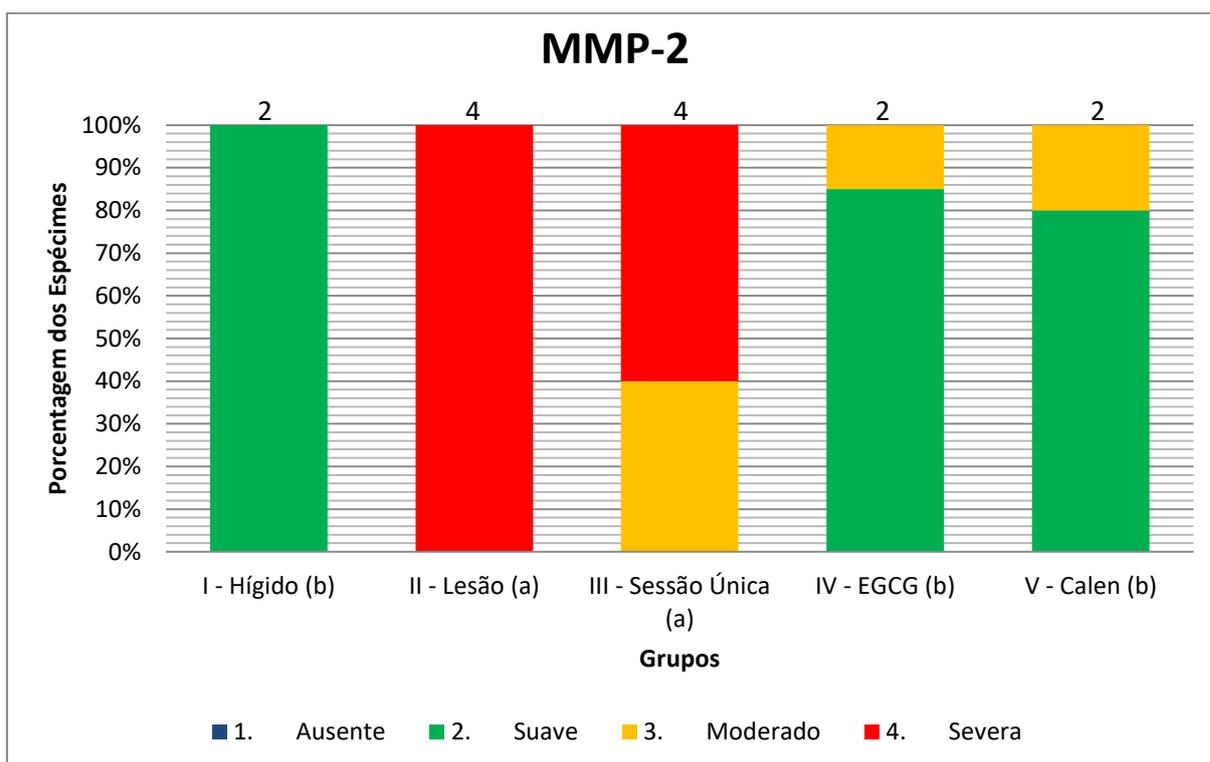


Figura 8 - Gráfico representativo contendo os escores de MMP-2. Grupos, I – Hígido, IV – EGCG e V – Calen mostraram semelhança estatística entre si (b). Grupos, II – Lesão e III – Sessão única mostraram semelhança estatística semelhante entre si (a) e diferença estatística em comparação com (b).

Expressão de MMP-9

Na expressão da MMP-9, os dentes do grupo Hígido (90%) obtiveram o escore 2 (suave) e (10%) no escore 3 (moderado). O grupo Sessão Única teve uma marcação de MMP-9 de (70%) no escore 4 (severo) e (30%) no escore 3 (moderado), apresentando semelhança estatística com o grupo Lesão, que obteve (100%) no escore 4 (severo). Já os grupos EGCG e Calen, obtiveram as marcações de MMP-9 em (80%) e (85%) respectivamente, no escore 2 (suave), sendo o restante dos espécimes, (20%) e (15%) respectivamente, no escore 3 (moderado), apresentando ambos os grupos, semelhança estatística com o grupo Hígido e diferença estatística quando comparado aos grupos Lesão e Sessão Única. A representação gráfica dos escores está ilustrada e pode ser consultada abaixo na Figura 9.

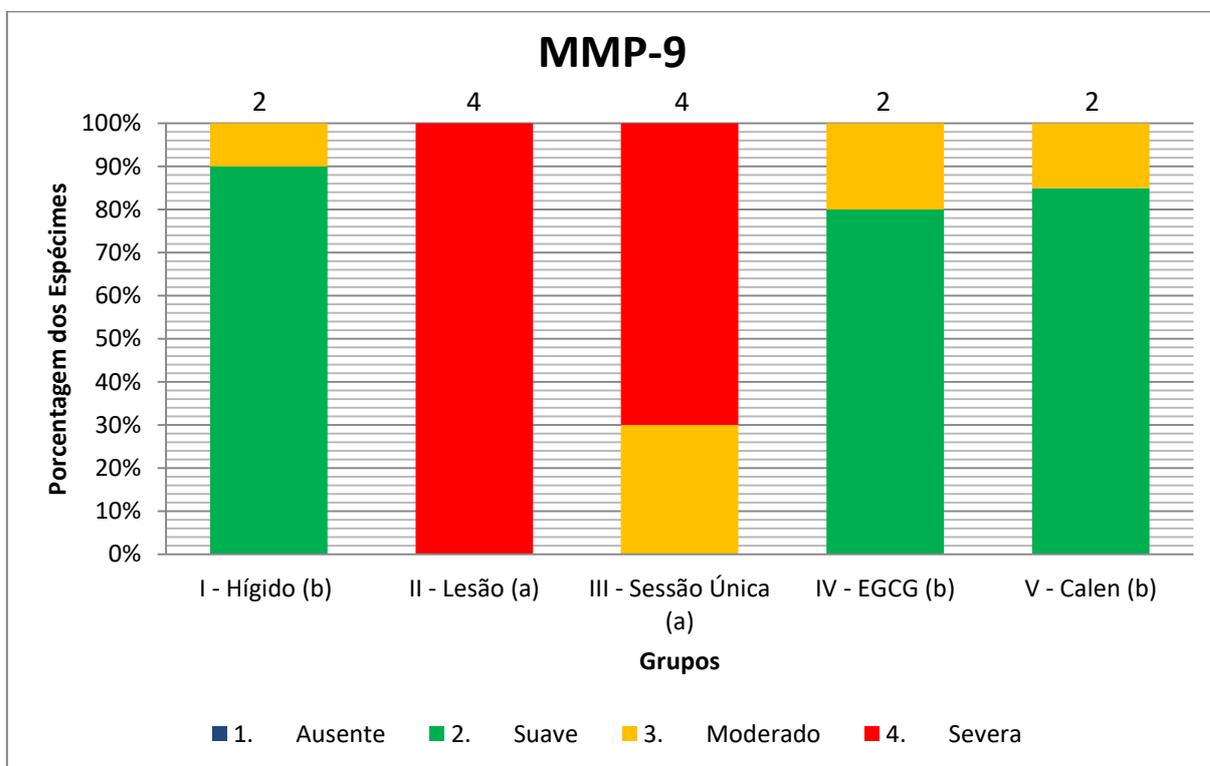


Figura 9 - Gráfico representativo contendo os escores de MMP-9. Grupos, I – Hígido, IV – EGCG e V – Calen mostraram semelhança estatística entre si (b). Grupos, II – Lesão e III – Sessão única mostraram semelhança estatística semelhante entre si (a) e diferença estatística em comparação com (b).

Discussão

5. DISCUSSÃO

A possibilidade do uso da EGCG derivada do chá verde como curativo intracanal para o tratamento das lesões periapicais foi proposto em função de constituir um agente fitoterápico com ações anti-inflamatória e antimicrobiana (Yang et al., 1998; Chu et al., 2019; Betts et al., 2019) e indutora de mineralização (Hong et al., 2015; Chu et al., 2019), que já estão sendo empregadas na prevenção e tratamento de várias doenças infecciosas e inflamatórias (Dudics et al., 2018; Reygaert, 2018), incluindo doenças periodontais (Jung et al., 2012; Asahi et al., 2014; Lagha et al., 2018) e não havia sido proposta como medicação intracanal.

Os efeitos sistêmicos da EGCG já foram previamente avaliados em lesões periapicais, proporcionando uma redução acentuada na extensão e gravidade das lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos (Lee et al., 2009). Porém, sabe-se que o sucesso dos tratamentos das infecções pulpares dependem da ação local realizada por meio da desinfecção mecânica e química do sistema de canais radiculares e região periapical, que abrigam os micro-organismos responsáveis pelo aparecimento, evolução e manutenção da doença (Takehashi et al., 1965; Tronstad, 1992), e que o insucesso no tratamento pode estar relacionado à persistência da infecção causada por estes micro-organismos e suas moléculas tóxicas (Pereira et al., 2017; Gutmann e Manjarrés, 2018; Machado et al., 2020).

A pasta à base de EGCG utilizada como curativo de demora no presente estudo foi preparada com os mesmos componentes presentes na pasta à base de hidróxido de cálcio (Calen®). Sendo assim, utilizamos a pasta à base de EGCG contendo como veículo o PEG 400 (800 µL), que mantém a pasta por mais tempo dentro do canal radicular, devido a sua propriedade de viscosidade, e por apresentar biocompatibilidade tecidual (da Silva et al., 1997; Alencar et al., 1997; Grecca et al., 2001; Berbert et al., 2002; De Rossi et al., 2005; da Silva et al., 2008; da Silva et al., 2008; Silva et al., 2008; Ito et al., 2011; Nalawade et al. 2015, Silva et al., 2019). A composição e a concentração de EGCG presente na pasta (1mg/ml), bem como sua compatibilidade tecidual, e o agente radiopacificador utilizado, o óxido de zinco (2g

foram definidos em estudos prévios de nosso grupo de pesquisa (Ferreira, 2013; Ferreira 2015; Liévana, 2018).

O presente estudo que teve como objetivo geral, avaliar o efeito da aplicação de EGCG, como curativo de demora, nas MMPs 2 e 9 de dentes de cães portadores de lesões periapicais induzidas experimentalmente, nos mostra, primeiramente, na análise histopatológica, que o uso da pasta à base de EGCG e da pasta de hidróxido de cálcio proporcionaram a reparação das lesões periapicais, com reestabelecimento do espaço do ligamento periodontal, neoformação óssea e de cemento, reinserção de fibras colágenas e ausência de infiltrado inflamatório. A ocorrência de reparação de lesões periapicais após a utilização de pasta à base de hidróxido de cálcio já foi comprovada em diversos estudos (da Silva et al., 1997; Leonardo et al., 1994; Grecca et al., 2001; Berbert et al., 2002; Leonardo et al., 2002; Leonardo et al., 2006; da Silva et al., 2008; Silva et al., 2008; da Silva et al., 2009; Paula-Silva et al., 2010; Ito et al., 2011; de Castro Rizzi-Maia et al., 2016; Donyavi et al., 2016).

Por outro lado, o tratamento em sessão única não promoveu significativo reparo das lesões periapicais, com persistência de infiltrado inflamatório e reabsorção de tecidos mineralizados. Estudos anteriores realizados por análises radiográficas, microbiológicas e histopatológicas já provaram que o tratamento de lesões periapicais em duas sessões resulta em uma taxa de sucesso maior que o tratamento em sessão única por promover melhor redução da infecção endodôntica intra e extra radicular (Leonardo et al., 2000; De Rossi, 2005; de Paula-Silva et al., 2009; Paula-Silva et al., 2010; Silva et al., 2012; Borsatto et al., 2016; Donyavi et al., 2016; Hidalgo et al., 2016).

Na análise por meio da imunofluorescência, o presente estudo mostra pela primeira vez, que o uso da pasta à base de EGCG (Grupo – III) e o uso da pasta de hidróxido de cálcio (Calen®) (Grupo – IV) como curativo de demora no tratamento endodôntico de lesões periapicais induzidas experimentalmente em dentes de cães, promovem de forma semelhante, redução na expressão de MMPs 2 e 9 na região apical e periapical, quando comparado aos dentes portadores de lesão periapical não tratadas (Grupo – II) ou tratadas em única sessão (Grupo – V). Estes últimos apresentaram intensa imunomarcagem de MMPs 2 e 9 na região periapical. A

hipótese do presente estudo, de que a EGCG é capaz de reduzir a expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9, quando utilizada como curativo de demora no tratamento endodôntico de dentes de cães portadores de lesões periapicais, foi confirmada ao comparar os grupos, lesão periapical e o grupo tratado em sessão única (Grupo - II e Grupo - V respectivamente) ao grupo da pasta à base de EGCG (Grupo - III). Estas proteases são importantes enzimas no processo de desenvolvimento e manutenção das lesões periapicais, sendo assim a inibição pela EGCG, uma substância de origem natural, derivada do chá verde, configura ser interessante de ser utilizada nesse tipo de tratamento.

Um estudo anterior, realizado como o objetivo de investigar o efeito de duas formas de EGCG (solução de EGCG e EGCG lipossômico) sobre parâmetros de estresse oxidativo, capacidade antioxidante, inibição de MMP 2 e 9 séricas e função pancreática e hepática revelou que a nanoformulação lipossômica do EGCG pode servir como uma terapia adjuvante no diabetes mellitus devido ao seu efeito modulador único no estresse oxidativo / biomarcadores antioxidantes e atuar na inibição de MMP 2 e 9 (Bulboaca et al., 2020).

O presente estudo permitiu visualizar a marcação positiva para MMPs 2 e 9 em células como odontoblastos, osteoblastos, cementoblastos, cementócitos, fibroblastos e vasos sanguíneos o que mostra a importante participação dessas enzimas em processos de reparo tecidual do osso alveolar e cimento radicular, após o tratamento endodôntico utilizando uma pasta à base de EGCG. A EGCG inibiu a formação e diferenciação de osteoclastos via inibição de MMPs 2 e 9 em ratos (Oka et al., 2012). Além disso, a EGCG poderia impedir a reabsorção óssea alveolar que ocorre nas doenças periodontais, inibindo a expressão de MMP-9 nos osteoblastos e a formação de osteoclastos (Yun et al., 2004). Outro estudo mostrou que, a MMP-2 exossômica derivada de osteoblastos maduros promove angiogênese de células endoteliais através da via de sinalização VEGF/Erk1/2 (Tang et al., 2019). Outros estudos mostram também, a imunomarcação de MMP-2 e MMP-9 em osteoblastos, no entanto, nos respectivos estudos, foram utilizados como modelo animal experimental, ratos e camundongos (Nichols et al., 2016; Svandova et al., 2018).

A EGCG devido aos seus efeitos antioxidantes e ação inibitória nas proteínas tirosina quinases, reduz a atividade da MMP-9 ao reduzir sua liberação a partir de neutrófilos ativados. (Kim-Park et al., 2015). Um estudo já mostrou o local alvo da EGCG na MMP-2, e concluiu que, as repetições de fibronectina tipo II estão presentes apenas nas MMP-2 e MMP-9, os resultados projetam a EGCG como um potencial composto, que pode ser adaptado para inibição específica de gelatinases (Jha et al., 2016). Há também outras evidências de que a EGCG pode inibir a MMP 2 (Djerir et al., 2018). Já foi mostrado que a imunolocalização de MMP-2, MMP-9 e MMP-13 na osteoporose induzida por prednisolona em camundongos, e que as MMPs podem ser novos alvos terapêuticos em potencial para prevenção e tratamento da osteoporose induzida por glicocorticóides, especialmente a osteólise osteocítica (Sun et al., 2016).

Diante disso, o nosso estudo mostra, a imunomarcagem de MMP-2 e MMP-9 presentes na lesão periapical e no grupo tratado em sessão única de forma intensa (Grupo - II e Grupo - V respectivamente). A expressão de MMPS e sua associação com os receptores Toll-like 2 e 4 na periodontite apical sintomática e assintomática, pode explicar as apresentações clínicas e a evolução da periodontite apical e pode representar alvos-chave para novas abordagens de diagnóstico e tratamento (Fernández et al., 2019).

A expressão da MMP-9 e do fator de crescimento transformador beta (TGF- β 1) foi avaliada em amostras de lesões periapicais e correlacionadas com a intensidade do infiltrado inflamatório e a espessura do revestimento epitelial, mostrando que o processo de remodelação da matriz extracelular dependente da MMP-9 parece ser semelhante para granulomas periapicais e cistos radiculares. O TGF- β 1 e a MMP-9 podem desempenhar um papel importante na manutenção de lesões periapicais (Álvares et al., 2017). A deficiência de MMP-9 pode aumentar o tamanho da periodontite apical induzida experimentalmente (Wan et al., 2014). Além disso, MMP-2 e a MMP-9 desempenham um papel crítico no desenvolvimento de lesões inflamatórias periapicais, provavelmente envolvidas na degradação da matriz extracelular (MEC) durante a fase inicial do desenvolvimento da lesão periapical em ratos (Corotti et al., 2009).

No presente estudo, também verificamos que o tratamento com a pasta à base de EGCG proporcionou redução na expressão das MMPs 2 e 9 das paredes dos canais radiculares, de maneira superior aos dentes tratados em sessão única e semelhante ao tratamento com a pasta à base de hidróxido de cálcio. Estudos anteriores já mostraram que, quando utilizado como solução irrigadora, além da ação antimicrobiana (Prabhakar et al., 2010; Lee et al., 2009), a EGCG aumenta a adesão do cimento para as paredes do canal radicular (Pheenithicharoenkul et al., 2016; Yu et al., 2017) por apresentar um forte poder antioxidante, que neutraliza oxigênio e NaOCl residual e também inibindo MMPs (Yu et al., 2017). No entanto o efeito da pasta à base de EGCG e hidróxido de cálcio na força de adesão do cimento obturador ou na possível redução na microinfiltração não foi avaliada no presente trabalho, podendo servir de base para estudos futuros.

A forma pura da EGCG, extraída da planta *Camellia sinensis*, é comercializada em forma de Pó, pela empresa (Sigma Aldrich Co.- St. Louis – MO – USA). Sendo assim, uma limitação de se trabalhar atualmente com a EGCG é devido aos elevados custos de importação para sua obtenção. Apesar dos efeitos semelhantes promovidos no tratamento das lesões periapicais e inibições de MMPs apresentadas no presente estudo, tanto pela EGCG quanto pelo hidróxido de cálcio, e além dos amplos estudos discorridos e bem consolidados sobre este último, ainda é mais viável, a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intra canal no tratamento de lesões periapicais, uma vez que, ainda não há uma forma de obtenção da forma pura da EGCG, economicamente viável.

Assim, em função dos resultados obtidos, a utilização de hidróxido de cálcio como medicação intracanal no tratamento de lesões periapicais permanece sendo economicamente e comercialmente mais viável, em função de custo e disponibilidade no comércio uma vez que, ainda não há uma forma de obtenção e comercialização da EGCG purificada, já que sua obtenção se dá atualmente pela importação. Além disso, são necessários mais estudos para maior compreensão da participação da EGCG nas vias de sinalização das MMPs 2 e 9 além do estudo dessa expressão com outras MMPs expressas nas doenças periapicais e de seus inibidores teciduais, que não foram realizadas no presente estudo em função da suspensão das atividades

laboratoriais durante a pandemia, mas que podem ser avaliadas em estudos futuros com diferentes metodologias serem empregadas durante os processos de tratamento e reparação dos tecidos mineralizados e não mineralizados da região periapical.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a pasta à base de EGCG utilizada como curativo de demora promoveu redução na expressão de MMP-2 e MMP-9 e a reparação das lesões periapicais, de maneira semelhante à pasta à base de hidróxido de cálcio e superior ao tratamento de dentes portadores de lesão periapical realizado em sessão única. A expressão das MMPs 2 e 9 foi encontrada em odontoblastos, osteoblastos, cementoblastos, células do infiltrado inflamatório, vasos sanguíneos, fibroblastos e cementócitos.

Referências

Alencar AH, Leonardo MR, Silva LA, Silva RS, Ito IY. Determination of the p-monochlorophenol residue in the calcium hydroxide + P-monochlorophenol combination used as an intracanal dressing in pulpless teeth of dogs with induced chronic periapical lesion. *J Endod.* 1997 Aug;23(8):522-4.

Álvares PR, Arruda JAA, Silva LPD, Nascimento GJFD, Silveira MFD, Sobral APV. Immunohistochemical expression of TGF- β 1 and MMP-9 in periapical lesions. *Braz Oral Res.* 2017 Jul 3;31:e51.

Andonovska B, Dimova C, Panov S. Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2008;65(12):882-6.

Arafa MH, Atteia HH. Protective Role of Epigallocatechin Gallate in a Rat Model of Cisplatin-Induced Cerebral Inflammation and Oxidative Damage: Impact of Modulating NF- κ B and Nrf2. *Neurotox Res.* 2019 Aug 13.

Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S. Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol* 2014;16(5):1164-71.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol* 1996;12(2):66-9.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Quantification of lipoteichoic acid contents and cultivable bacteria at the different phases of the endodontic retreatment. *Journal of Endodontics.* 2016;42(4):552-556.

Belmar MJ, Pabst C, Martinez B, Hernandez M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105 (6): 801-6.

Berbert FL, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Bramante CM. Influence of root canal dressings and sealers on repair of apical periodontitis after endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002 Feb;93(2):184-9.

Betts JW, Hornsey M, Higgins PG, Lucassen K, Wille J, Salguero FJ, Seifert H, La Ragione RM. Restoring the activity of the antibiotic aztreonam using the polyphenol epigallocatechin gallate (EGCG) against multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2019 Aug 16.

Borsatto MC, Correa-Afonso AM, Lucisano MP, Bezerra da Silva RA, Paula-Silva FW, Nelson-Filho P, Bezerra da Silva LA. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an in vivo study. Int Endod J. 2016 Jun;49(6):511-8.

Bulboaca AE, Boarescu PM, Porfire AS, Dogaru G, Barbalata C, Valeanu M, Munteanu C, Râjnoveanu RM, Nicula CA, Stanescu IC. The Effect of Nano-Epigallocatechin-Gallate on Oxidative Stress and Matrix Metalloproteinases in Experimental Diabetes Mellitus. Antioxidants (Basel). 2020 Feb 20;9(2). pii: E172.

Buzalaf MA, Kato MT, Hannas AR. The role of matrix metalloproteinases in dental erosion. Adv Dent Res. 2012 Sep;24(2):72-6.

Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kucukyildirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 108 (5): e 121-6.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Jan;107(1):127-32.

Carneiro E, Parolin AB, Wichnieski C, Rosa EA, Silva Neto UX, Westphalen VP, et al. Expression levels of the receptor activator of Nf-kB ligand and osteoprotegerin and the number of gram-negative bacteria in symptomatic asymptomatic periapical lesions. Arch Oral Biol. 2017 Jan;73:166-171.

Chen ST, Kang L, Wang CZ, Huang PJ, Huang HT, Lin SY, Chou SH, Lu CC, Shen PC, Lin YS, Chen CH. Epigallocatechin-3-Gallate Decreases Osteoclastogenesis via Modulation of RANKL and Osteoprotegerin. *Molecules*. 2019 Jan 3;24(1). pii: E156.

Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontol Res*. 2002 Jun;37(3):196-203.

Chu C, Wang Y, Wang Y, Yang R, Liu L, Rung S, Xiang L, Wu Y, Du S, Man Y, Qu Y. Evaluation of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) modified collagen in guided bone regeneration (GBR) surgery and modulation of macrophage phenotype. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Jun;99:73-82.

da Silva LA, Leonardo MR, da Silva RS, Assed S, Guimarães LF. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J*. 1997 May;30(3):205-9.

da Silva LA, de Paula e Silva FW, Leonardo MR, Assed S. Radiographic evaluation of pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J Dent Child (Chic)*. 2008 Jan-Apr;75(1):14-9.

da Silva LA, de Freitas AC, de Carvalho FK, de Queiroz AM, Nelson-Filho P, Porto-Neto ST. Direct pulp capping with a self-etching adhesive system: histopathologic evaluation in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jul;108(1):e34-40.

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, Faccioli LH, de Medeiros AI. Effect of a calcium hydroxide-based paste associated to chlorhexidine on RAW 264.7 macrophage cell line culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 Nov;106(5):e44-51.

da Silva RA, Leonardo MR, da Silva LA, de Castro LM, Rosa AL, de Oliveira PT. Effects of the association between a calcium hydroxide paste and 0.4% chlorhexidine on the

development of the osteogenic phenotype in vitro. *J Endod.* 2008 Dec;34(12):1485-9.

de Castro Rizzi-Maia C, Maia-Filho EM, Nelson-Filho P, Segato RA, de Queiroz AM, Paula-Silva FW, da Silva Pereira SM, Borges AH, da Silva LA. Single vs Two-session Root Canal Treatment: A Preliminary Randomized Clinical Study using Cone Beam Computed Tomography. *J Contemp Dent Pract.* 2016 Jul 1;17(7):515-21.

de Paula-Silva FW, Santamaria M Jr, Leonardo MR, Consolaro A, da Silva LA. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Nov;108(5):796-805.

De Rossi A, Ferreira DCA, Silva LAB, Silva RS, inventores, Universidade de São Paulo, cessionário. Formulacão à base de EGCG e seu uso. Brazil patente BR 1020140141871. Patente depositada junto ao Instituto Nacional da Propriedade industrial, em 11 de junho de 2014.

De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotatory or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;99:628-36.

Donyavi Z, Ghahari P¹, Esmailzadeh M², Kharazifard M³, Yousefi-Mashouf R⁴. Antibacterial Efficacy of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine Mixture for Treatment of Teeth with Primary Endodontic Lesions: A Randomized Clinical Trial. *Iran Endod J.* 2016 Fall;11(4):255-260.

Djerir D, Iddir M, Bourgault S, Lamy S, Annabi B. Biophysical evidence for differential gallated green tea catechins binding to membrane type-1 matrix metalloproteinase and its interactors. *Biophys Chem.* 2018 Mar;234:34-41.

Dudics S, Langan D, Meka RR, Venkatesha SH, Berman BM, Che CT, Moudgil KD. Natural Products for the Treatment of Autoimmune Arthritis: Their Mechanisms of

Action, Targeted Delivery, and Interplay with the Host Microbiome. *Int J Mol Sci*. 2018 Aug 24;19(9).

Fernández A, Cárdenas AM, Astorga J, Veloso P, Alvarado A, Merino P, Pino D, Reyes-Court D, Hernández M. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2019 Dec;23(12):4205-4212.

Ferreira D. C. A. (2013). Desenvolvimento e caracterização química de um sistema para liberação intracanal de Epigallocatequina-3-galato e seu efeito na cor dos dentes [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

Ferreira D. C. A. (2015). Formulação à base de epigallocatequina-3-galato, derivada do chá verde, desenvolvida para uso endodôntico: estudo físico-químico e biológico [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Geurts N, Opdenakker G, Van Den Steen PE. Matrix Metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics*, v.133, n.3, p.257-279, 2012.

Ghajar CM, George SC, Putnam AJ. Matrix Metalloproteinase Control of Capillary Morphogenesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2008; 18(3): 251–278.

Gharagozlian S, Svennevig K, Bangstad HJ, Winberg JO, Kolset SO. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. *BMC Clin Pathol*. 2009 Sep 16;9:7.

Ghasempour M, Moghadamnia AA, Abedian Z, Amir MP, Feizi F, Gharekhani S. In vitro viability of human periodontal ligament cells in green tea extract. *J Conserv Dent*. 2015;18(1):47-50.

Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011;3.

Grecca FS, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, Borges MA. Radiographic evaluation of periradicular repair after endodontic treatment of dog's teeth with induced periradicular periodontitis. *J Endod.* 2001 Oct;27(10):610-2.

Guo R, Zhou FM, Su CJ, Liu TT, Zhou Y, Fan L, Wang ZH, Liu X, Huang Y, Liu T, Yang J, Chen LH. Epigallocatechin-3-gallate attenuates acute and chronic psoriatic itch in mice: Involvement of antioxidant, anti-inflammatory effects and suppression of ERK and Akt signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Feb 19;496(4):1062-1068.

Gutmann JL, Manjarrés V. Historical and Contemporary Perspectives on the Microbiological Aspects of Endodontics. *Dent J (Basel).* 2018 Sep 22;6(4).

Hadziabdic N, Kurtovic-Kozaric A, Pojskic N, Sulejmanagic N, Todorovic L. Gene-expression analysis of matrix metalloproteinases 1 and 2 and their tissue inhibitors in chronic periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med.* 2016;45(3):224-30.

Hidalgo LR, da Silva LAB, Nelson-Filho P et al. Comparison between one-session root canal treatment with aPDT and two-session treatment with calcium hydroxide-based antibacterial dressing, in dog's teeth with apical periodontitis *Lasers Med Sci* 2016;31:1481.

Hong JY, Yon J, Lee JS, Lee IK, Yang C, Kim MS, Choi SH, Jung UW. Effects of epigallocatechin-3-gallate on the healing of extraction sockets with a periapical lesion: A pilot study in dogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015 May;103(4):727-34.

Horiba N, Maekawa Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: antibacterial and bactericidal effects. *J Endod.* 1991;17(3):122-4.

Ho HC, Huang CC, Lu YT, Yeh CM, Ho YT, Yang SF, Hsin CH, Lin CW. Epigallocatechin-3-gallate inhibits migration of human nasopharyngeal carcinoma cells by repressing MMP-2 expression. *J Cell Physiol.* 2019 Nov;234(11):20915-20924.

Hwang JY, Choi SC, Park JH, Kang SW. The use of green tea extract as a storage medium for the avulsed tooth. *J Endod*. 2011;37(7):962-7.

Ito IY, Junior FM, Paula-Silva FW, Da Silva LA, Leonardo MR, Nelson-Filho P. Microbial culture and checkerboard DNA-DNA hybridization assessment of bacteria in root canals of primary teeth pre- and post-endodontic therapy with a calcium hydroxide/chlorhexidine paste. *Int J Paediatr Dent*. 2011 Sep;21(5):353-60.

Jha S, Kanaujia SP, Limaye AM. Direct inhibition of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by (-)-epigallocatechin-3-gallate: A possible role for the fibronectin type II repeats. *Gene*. 2016 Nov 15;593(1):126-130.

Jung IH, Lee DE, Yun JH, Cho AR, Kim CS, You YJ, Kim SJ, Choi SH. 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*. 2012;42(6):185-95.

Jung IH, Yun JH, Cho AR, Kim CS, Chung WG, Choi SH. Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on maintaining the periodontal ligament cell viability of avulsed teeth: a preliminary study. *J Periodontal Implant Sci* 2011;41:10-6.

Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20: 340-9.

Kalaiselvam R, Ganesh A, Rajan M, Kandaswamy D. Evaluation of bioflavonoids on the immediate and delayed microtensile bond strength of self-etch and total-etch adhesive systems to sound dentin. *Indian J Dent Res*. 2018 Mar-Apr;29(2):133-136.

Kanlaya R, Thongboonkerd V. Protective Effects of Epigallocatechin-3-Gallate from Green Tea in Various Kidney Diseases. *Adv Nutr*. 2019 Jan 1;10(1):112-121.

Kato MT, Leite AL, Hannas AR, Buzalaf MA. Gels containing MMP inhibitors prevent dental erosion in situ. *J Dent Res*. 2010 May;89(5):468-72.

Kim-Park WK, Allam ES, Palasuk J, Kowolik M, Park KK, Windsor LJ. Green tea catechin inhibits the activity and neutrophil release of Matrix Metalloproteinase-9. *J Tradit Complement Med*. 2015 Apr 29;6(4):343-346. eCollection 2016 Oct.

Kook YJ, Tian J, Jeon YS, Choi MJ, Song JE, Park CH, Reis RL, Khang G. Nature-derived epigallocatechin gallate/duck's feet collagen/hydroxyapatite composite sponges for enhanced bone tissue regeneration. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2018 May - Jun;29(7-9):984-996.

Kupai K, Szucs G, Cseh S, Hajdu I, Csonka C, Csont T, Ferdinandy P. Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. *Journal of Pharmacological and toxicological methods*, v.61, n.2, p.205-209, 2010.

Kwon YS, Kim HJ, Hwang YC, Rosa V, Yu MK, Min KS. Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. *Journal of endodontics*. 2017;43(2):289-296.

Lagha AB, Haas B, Grenier D. Tea polyphenols inhibit the growth and virulence properties of *Fusobacterium nucleatum*. *Scientific Reports*. 2017;7: 44815.

Lagha AB, Groeger S, Meyle J, Grenier D. Green tea polyphenols enhance gingival keratinocyte integrity and protect against invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Pathog Dis*. 2018 Jun 1;76(4).

Lee YL, Hong CY, Kok SH, Hou KL, Lin YT, Chen MH, Wang CC, Lin SK. An extract of green tea, epigallocatechin-3-gallate, reduces periapical lesions by inhibiting cysteine-rich 61 expression in osteoblasts. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):206-11.

Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol*. 2015 Mar;60(3):393-9.

Lee SY, Jung YO, Ryu JG, Oh HJ, Son HJ, Lee SH, Kim HY. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates autoimmune arthritis by reciprocal regulation of T helper-17 regulatory T cells and inhibition of osteoclastogenesis by inhibiting STAT3 signaling. *Journal of leukocyte biology*. 2016;100(3): 559-568.

Lee S, Al Razqan GS, Kwon DH. Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β -lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*. 2017;24: 49-55.

Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, da Silva LAB. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dog's teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(2):232-238.

Leonardo MR, Silva LAB.; Leonardo, RT. Tratamento de canal radicular em sessão única: Crença vs. Ciência. In: Feller C.; Gorab R, editores. *Atualização na clínica odontológica: cursos antagônicos*. São Paulo: Artes Médicas, 2000. p.29-57.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LA, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different times. *Braz Dent J*. 2002;13(1):17-22.

Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;102(5):680-685.

Letra A, Ghaneh G, Zhao M, Ray H Jr, Francisconi CF, Garlet GP, et al. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis. *J Endod*. 2013;39(9):1141-6.

Li G, Yue Y, Tian Y, Li JL, Wang M, Liang H, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-1, 3, 9, interleukin (IL)-2, 8 and cyclooxygenase (COX)-2 gene polymorphisms with chronic periodontitis in a Chinese population. *Cytokine*. 2012 Nov;60(2):552-60.

Liévana F. S. (2018). Efeito do curativo de demora com EGCG, derivada do chá verde, na lesão periapical em cães. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo.

Linhartova PB, Deissova T, Kukletova M, Holla LI. Matrix metalloproteinases gene variants and dental caries in Czech children. BMC Oral Health. 2020; 20: 138.

Liu N, Cao Y, Zhu G. Expression of matrix metalloproteinases-2, 9 and reversionInducing cysteinerich protein with Kazalmotifs in gingiva in periodontal health and disease. Arch Oral Biol. 2017 Mar;75:62-67.

Lopes RG, Oliveira-Reis B, Maluly-Proni AT, Silva MHT, Briso ALF, Dos Santos PH. Influence of green tea extract in the color of composite resin restorations. J Mech Behav Biomed Mater. 2019 Aug 27;100:103408.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, da Rosa Cardoso FG, Valera MC. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. Clin Oral Investig. 2020 Jan 13.

Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. Cell Tissue Res. 2013; 351 (2): 255-68.

Martinho FC, Teixeira FF, Cardoso FG, Ferreira NS, Nascimento GG, Carvalho CA, et al. Clinical Investigation of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases, and Matrix Metalloproteinases/Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Complexes and Their Networks in Apical Periodontitis. J Endod. 2016 Jul;42(7):1082-8

Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L. Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. J Dent Res. 2015 Feb;94(2):241-51.

Melok AL, Lee LH, Mohamed Yussof SA, Chu T. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate-Stearate Inhibits the Growth of Streptococcus mutans: A Promising New Approach in Caries Prevention. Dent J (Basel). 2018 Aug 6;6(3).

Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. J Endod. 2012;38(5):604-7.

Morin MP, Grenier D. Regulation of matrix metalloproteinase secretion by green tea catechins in a three-dimensional co-culture model of macrophages and gingival fibroblasts. *Archives of oral biology*. 2017;75: 89-99.

Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Soares Dutra Oliveira AM, Costa FO. Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. *J Periodontol*. 2017 Aug;88(8):778-787.

Murphy G. Matrix Metalloproteinases. *Encyclopedia of Cell Biology Volume 1*, 2016, Pages 621-629.

Nalawade TM, Bhat K, Sogi SH. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015 Mar-Apr;5(2):114-9.

Naujokat C, McKee DL. The "Big Five" Phytochemicals Targeting Cancer Stem Cells: Curcumin, EGCG, Sulforaphane, Resveratrol and Genistein. *Curr Med Chem*. 2020 Feb 27.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod* 2002;28(10):694-6.

Nichols RA Jr, Niagro FD, Borke JL, Cuenin MF. Mechanical Stretching of Mouse Calvarial Osteoblasts In Vitro Models Changes in MMP-2 and MMP-9 Expression at the Bone-Implant Interface. *J Oral Implantol*. 2016 Apr;42(2):138-44.

Oka Y, Iwai S, Amano H, Irie Y, Yatomi K, Ryu K, Yamada S, Inagaki K, Oguchi K. Tea Polyphenols Inhibit Rat Osteoclast Formation and Differentiation. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(1):55-64. doi: 10.1254/jphs.11082FP. Epub 2019 Jun 11.

Oliveira KMHD, Nelson-Filho P, da Silva LAB, Küchler EC, Gatón-Hernandez P, da Silva RAB. Three-Dimensional Micro-Computed Tomography Analyses of Induced Periapical Lesions in Transgenic Mice. *Ultrastructural pathology*. 2016;39(6):402-407.

Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod.* 2010 Feb;36(2):231-7.

Paula-Silva FW, D'Silva NJ, Silva LA, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod.* 2009; 35(9):1234-42.

Passos VF, Melo MAS, Lima JPM, Marçal FF, Costa CAGA, Rodrigues LKA, Santiago SL. Active compounds and derivatives of *camellia sinensis* responding to erosive attacks on dentin. *Braz Oral Res.* 2018 May 24;32:e40.

Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, Gueiros S, Pereira GS, Avila-Campos MJ. Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe.* 2017 Dec;48:12-18.

Pheenithicharoenkul S, Panichuttra A. Epigallocatechin-3-gallate increased the push out bond strength of an epoxy resin sealer to root dentin. *Dental materials journal.* 2016; 35(6): 888-892.

Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *J Endod.* 2010;36(1):83-6.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Muwaquet-Rodríguez S, Albero-Monteagudo A. Update of the therapeutic planning of irrigation and intracanal medication in root canal treatment. A literature review. *J Clin Exp Dent.* 2019 Feb 1;11(2):e185-e193.

Prasanth MI, Sivamaruthi BS, Chaiyasut C, Tencomnao T. A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. *Nutrients*. 2019 Feb 23;11(2). pii: E474.

Queiroz AM, Bonilla CMC, Palma-Dibb RG, Oliveira HF, Nelson-Filho P, Silva LAB, Lucisano MP, Paula-Silva FWG. Radiotherapy Activates and Protease Inhibitors Inactivate Matrix Metalloproteinases in the Dentinoenamel Junction of Permanent Teeth. *Caries Res*. 2019;53(3):253-259

Reygaert WC. Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int*. 2018 Jul 17;2018:9105261.

Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, Rath M. Modulation of MMP-2 and -9 secretion by cytokines, inducers and inhibitors in human melanoma A-2058 cells. *Oncol Rep*. 2017 Jun;37(6):3681-3687.

Seiki M. Membrane-type matrix metalloproteinases. *APMIS* 107: 137– 143, 1999.

Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, et al. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112 (4): 548-54.

Silva LA, Novaes AB Jr, de Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria M Jr, Silva RA. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod*. 2012;38(3):360-6.

Silva LAB, Silva RAB, Branco LGS, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Brazilian dental jornal*. 2008; 19(4): 296-300.

Silva LABD, Lopes ZMS, Sá RC, Novaes Júnior AB, Romualdo PC, Lucisano MP, Nelson-Filho P, Silva RABD. Comparison of apical periodontitis repair in endodontic treatment with calcium hydroxide-dressing and aPDT. *Braz Oral Res.* 2019 Sep 26;33:e092.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod.* 2002;28(3):181-4.

Siqueira JF Jr, Alves FR, Rôças IN. Pyrosequencing analysis of the apical root canal microbiota. *J Endod* 2011; 37(11): 1499-503.

Singh P, Nagpal R, Singh UP. Effect of dentin biomodifiers on the immediate and long-term bond strengths of a simplified etch and rinse adhesive to dentin. *Restor Dent Endod.* 2017 Aug;42(3):188-199.

Snoek-van B, Von Den Hoff, JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques*, v.38, n.1, p.73-83, 2005.

Sorsa T, Mantyla P, Tervahartiala T, Pussinen PJ Gamonal J, Hernandez M. MMP activation in diagnostics of periodontitis and systemic inflammation. *J Clin Periodontol* 2011 Sep;38(9):817-9.

Sorsa, T., Tervahartiala, T., Leppil ahti, J., Hernandez,M., Gamonal, J., Tuomainen, A. M., Lauhio, A.,Pussinen, P. J. & Ma`ntyla`P. Collagenase-2(MMP-8) as a point-of-care biomarker in perio-dontitis and cardiovascular diseases. Therape uticresponse to non-antimicrobial properties of tetra-cyclines. *Pharmacological Research* 2011 63, 108–113.

Sorsa T, Tjaderhane L, Konttinen YT, Lauhio A, Salo T, Lee HM, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med.* 2006;38(5):306-21.

Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix

metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol.* 2014;59(9):944-53.

Stape THS, Tjäderhane L, Tezvergil-Mutluay A, Da Silva WG, Dos Santos Silva AR, da Silva WJ, Marques MR. In situ analysis of gelatinolytic activity in human dentin. *Acta Histochem.* 2018 Feb;120(2):136-141.

Sun B, Sun J, Han X, Liu H, Li J, Du J, Feng W, Liu B, Cui J, Guo J, Amizuka N, Li M. Immunolocalization of MMP 2, 9 and 13 in prednisolone induced osteoporosis in mice. *Histol Histopathol.* 2016 Jun;31(6):647-56.

Suzuki Y, Isemura M. Binding interaction between epigallocatechin gallate causes impaired spreading of cancer cells on fibrinogen. *Biomedical Research.* 2013; 34(6):301-308.

Svandova E, Vesela B, Lesot H, Sadoine J, Poliard A, Matalova E. FasL Modulates Expression of Mmp2 in Osteoblasts. *Front Physiol.* 2018 Sep 19;9:1314.

Takahama A Jr, Rôças IN, Faustino ISP, Alves FRF, Azevedo RS, Gomes CC, Araújo-Filho WR, Siqueira JF Jr. Association between bacteria occurring in the apical canal system and expression of bone resorbing mediators and matrix metalloproteinases in apical periodontitis. *Int Endod J.* 2018 Jul;51(7):738-746.

Tang H, He Y, Li L, Mao W, Chen X, Ni H, Dong Y, Lyu F. Exosomal MMP2 derived from mature osteoblasts promotes angiogenesis of endothelial cells via VEGF/Erk1/2 signaling pathway. *Exp Cell Res.* 2019 Oct 15;383(2):111541.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LAB, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Brazilian Dental Journal.* 2008;19(2): 124-129.

Tanomaru JMG. Métodos de indução experimental de lesão periapical em dentes de cães. Análise histopatológica e histomicrobiológica. Tese (Doutorado em Endodontia): universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2004.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998 Aug;77(8):1622-9.

Trombone APF, Cavalla F, Silveira EMV, Andreo CB, Francisconi CF, Fonseca AC, Letra A, Silva RM, Garlet GP. MMP1-1607 polymorphism increases the risk for periapical lesion development through the upregulation MMP-1 expression in association with pro-inflammatory milieu elements. *J Appl Oral Sci*. 2016 Jul-Aug; 24(4): 366–375.

Tronstad L. Recent development in endodontic research. *Scand J Dent Res* 1992; 100(1): 52-9

Vernal R, Dezerega A, Dutzan N, Chaparro A, León R, Chandia S, et al. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Dis*. 2006;12(3):283-9.

Vilela, M. M. (2015). Formulação à base de um extrato do chá verde desenvolvida para uso bucal: avaliação da atividade antimicrobiana e da alteração de cor dental. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Vilela MM, Salvador SL, Teixeira IGL, Del Arco MCG, De Rossi A. Efficacy of green tea and its extract, epigallocatechin-3-gallate, in the reduction of cariogenic microbiota in children: a randomized clinical trial. *Arch Oral Biol*. 2020 Jun;114:104727.

Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang L, Zhang J, et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod*. 2014 May;40(5):658-64.

Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L. Epigallocatechin-3-gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase-2. *Mol Med Rep*. 2014;9(3):1085-9.

Wang Q, Zhang J, Li Y, Shi H, Wang H, Chen B, Wang F, Wang Z, Yang Z, Wang L. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate increases atherosclerotic plaque stability in apolipoprotein E-deficient mice fed a high-fat diet. *Kardiol Pol.* 2018;76(8):1263-1270.

Wang T, Zhou H, Xie H, Mu Y, Xu Y, Liu J, Zhang X. Epigallocatechin-3-gallate inhibits TF and TNF- α expression induced by the anti- β 2GPI/ β 2GPI complex in human THP-1 cells. *Int J Mol Med.* 2014;33(4):994-1002.

Wu Y, Cui J. (-)-Epigallocatechin-3-gallate provides neuroprotection via AMPK activation against traumatic brain injury in a mouse model. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2020 Feb 15.

Yamagata K. Polyphenols regulate endothelial functions and reduce the risk of cardiovascular disease. *Curr Pharm Des.* 2019 Jul 21.

Yang F, de Villiers WJ, McClain CJ, Varilek GW. Green tea polyphenols block endotoxin-induced tumor necrosis factor-production and lethality in a murine model. *J Nutr.* 1998 Dec;128(12):2334-40.

Yang SB, Pang BX, Xue J, Yuan RT. Epigallocatechin-3-gallate inhibits proliferation and induces apoptosis in odontogenic keratocyst keratinocytes. *Oral Dis.* 2019 May;25(4):1175-1184.

Yousaf S, Butt MS, Suleria HA, Iqbal MJ. The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia. 2014;5(3):545-56.

Yu HH, Zhang L, Xu S, Li F, Yu F, Liu ZY, Huang L, Chen JH. Effects of Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on the bond strength of fiber posts to Sodium hypochlorite (NaOCl) treated intraradicular dentin. *Sci Rep.* 2017 Jun 26;7(1):4235.

Yu HH, Zhang L, Yu F, Li F, Liu ZY, Chen JH. Epigallocatechin-3-gallate and Epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate Enhance the Bonding Stability of an Etch-and-Rinse Adhesive to Dentin. *Materials (Basel)*. 2017 Feb 15;10(2).

Yu J, Yang H, Li K, Ren H, Lei J, Huang C. Development of Epigallocatechin-3-gallate-Encapsulated Nanohydroxyapatite/Mesoporous Silica for Therapeutic Management of Dentin Surface. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2017 Aug 9;9(31):25796-25807.

Yun JH, Pang EK, Kim CS, Yoo YJ, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Inhibitory effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. *J Periodontal Res*. 2004 Oct;39(5):300-7.

Anexos

Anexo A – APROVAÇÃO DA CEUA FORP-USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Proc. nº 11.1.1405.53.8) intitulado "Caracterização das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Epigallocatequina-3-galato, Derivada do Chá Verde, para uso Terapêutico na Odontologia", de autoria de **Danielly Cunha Araújo Ferreira** e de **Andiara De Rossi**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** da USP de Ribeirão Preto foi aprovado em reunião da CEUA de 04/07/2012.

This is to certify that the work (Proc. nº 11.1.1405.53.8), entitled: "Caracterização das Propriedades Físico-Químicas e Biológicas da Epigallocatequina-3-galato, Derivada do Chá Verde, para uso Terapêutico na Odontologia", by **Danielly Cunha Araújo Ferreira** and **Andiara De Rossi**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the USP of Ribeirão Preto, and was approved in the meeting, July 04, 2012.

Ribeirão Preto, 6 de julho de 2012.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro

ANEXO B – ESPECIFICAÇÕES DA EGCG



3050 Spruce Street
 Saint Louis, Missouri 63103 USA
 Telephone 800-325-5832 • (314) 771-5765
 Fax (314) 286-7828
 email: techserv@sial.com
 sigma-aldrich.com

Product Information

(-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATE

Sigma Prod. No. **E4143**

Store at 2-8° C

CAS NUMBER: 989-51-5

SYNONYM: (2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol 3-(3,4,5-trihydroxybenzoate); (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate¹; EGCG¹

PHYSICAL DESCRIPTION:

Appearance: powder

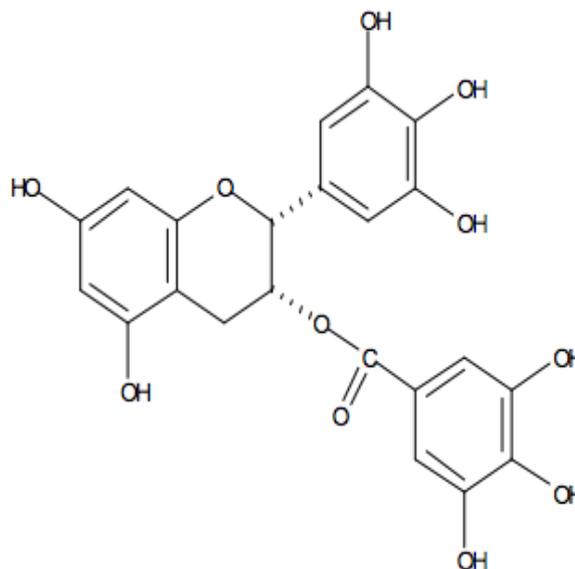
Molecular formula: $C_{22}H_{16}O_{11}$

Molecular weight: 458.4

Melting point: 218°C¹

$E^M(275\text{ nm}) = 11,500$ (ethanol)¹

Optical rotation: $-185^\circ \pm 2^\circ$ (ethanol)¹



STORAGE / STABILITY AS SUPPLIED:

SOLUBILITY:

This is soluble in water at least to 5 mg/mL, giving a clear faint yellow solution. The stability of a solution of this product in water at a concentration of 0.3 mg/mL was tested. A sample left for 2.5 hours at room temperature was found to have significantly decreased in purity (from 99.6% to 81.7%, by HPLC). A sample left for 2 hours at 4°C was found to have decreased only slightly (from 99.5% to 99.3%).

GENERAL NOTES:

Epigallocatechin gallate (EGCG) is a polyphenolic compound found in green tea leaves. Studies with EGCG indicate it has antitumor promoting activity.^{1,2}

METHOD OF PREPARATION:

It is isolated by extracting the tea leaves with hot water, back-extracted with ethyl acetate. The EGCG is chromatographically isolated from the organic phase.³

(-)-EPIGALLOCATECHIN GALLATESigma Prod. No. **E4143****HPLC SYSTEM:⁴**

Column: YMC ODS-A 15 cm x 4.6 mm ID Particle size 5 µm

Mobile phase:acetonitrile:ethyl acetate:0.05% H₃PO₄ (12:2:86)

Flow rate: 1.0 mL/min

Solvent: Product dissolved at 0.3 mg/mL in water, 20 µL injected

Detection at 280 nm

Retention time for major peak ≈12 minutes

Determination of this compound in plasma and urine by HPLC has been reported.⁵**REFERENCES:**

1. *Merck Index*, 12th ed., #3568 (1996).
2. Yamane, T. et al., *Cancer Res.*, 55, 2081 (1995).
3. Supplier information.
4. Sigma quality control.
5. Lee, M.-J. et al., *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 4, 393 (1995).

Sigma warrants that its products conform to the information contained in this and other Sigma-Aldrich publications. Purchaser must determine the suitability of the product(s) for their particular use. Additional terms and conditions may apply. Please see reverse side of the invoice or packing slip.