

Bianca Mayara Marques

**Extrato do Chá Verde como Terapia Coadjuvante ao Tratamento
Mecânico da Periodontite Experimental**

ARAÇATUBA - SP

2015

Bianca Mayara Marques

**Extrato do Chá Verde como Terapia Coadjuvante ao Tratamento
Mecânico da Periodontite Experimental**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida

ARAÇATUBA - SP

2015

Dedicatória

A Deus primeiramente, por ser essencial em minha vida, meu guia. Ao meu pai **Guilherme Antônio Marques**, minha mãe **Sirlete Rosa da Silva Marques** e ao meu irmão **Danilo Marques da Silva**, o cuidado e dedicação deles que deram a esperança e força para seguir e concluir mais essa etapa na minha vida. Por essa razão, dedico essa conquista a vocês em nome de todo meu agradecimento e amor.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu professor, orientador e além de tudo amigo **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida** pela dedicação, paciência, cuidado e ajuda em todos os momentos não só na produção deste trabalho mas durante todo esse tempo de convivência. Todo agradecimento é pouco, o admiro muito pelo esforço diário, pela história de vida e pela dedicação que tem conosco.

À minha chefe **Vivian Cristina Noronha Novaes**, uma excelente profissional e pessoa. Sem dúvidas uma mulher diferenciada que conquista a todos a sua volta pelo seu jeito “Chefa – Mãe” de ser. Agradeço imensamente pela ajuda, paciência e cuidado que teve não só por mim, mas por todos durante esse tempo e principalmente na produção deste trabalho que mesmo sabendo de todas minhas dificuldades não mediu esforços para me ajudar.

À **Paula Lazilho Faleiros** amiga, companheira e professora pela imensa ajuda na elaboração deste trabalho, pelos ensinamentos diários, pelo companheirismo de sempre, pelos conselhos e pela paciência, com certeza, muita paciência durante a produção deste trabalho.

À banca examinadora, **Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida**, **Prof. Denise Pedrini Ostini** e a Doutoranda **Vivian Cristina Noronha Novaes**, pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

À disciplina de **Periodontia** e ao departamento de **Cirurgia e Clínica Integrada** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.

À Reitoria da UNESP e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo auxílio para desenvolvimento desta pesquisa (Processo FAPESP 2014/20163-4).

Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realizar esta graduação em Odontologia.

Aos meus pais **Guilherme** e **Sirlete** e ao meu irmão **Danilo** pela dedicação e carinho de sempre, por me deixar realizar este sonho. Acreditaram sempre em mim e sem eles nada disso seria possível, o esforço não foi só meu e sim a maior parte deles que meio as dificuldades não deixou de me apoiar para conseguir chegar onde estou agora.

Aos meus amigos **Victória Berriel, Dinah Fressato, Rafael Rocha, Débora Biléco, Paola Carneiro, Aline Ávila, Gabriela Ferreira, Ruan Neri, Tahiana Pigozzi, Nayara Hano, Caio Debortoli e Pedro Hiaggio** que estiveram presentes em todos os momentos da minha graduação e principalmente nos melhores momentos. Obrigada pela amizade, parceria e companheirismo durante todo esse tempo, são amizades que quero levar para todo sempre.

Aos meus companheiros de estágio e trabalho **Fred Lucas, Giovani Fernandes, Henrique Rinaldi e Clara Possarle** que ajudaram na realização deste trabalho e o tornaram mais divertido.

A turma 57 de Odontologia do campus de Araçatuba que tornaram esse sonho inesquecível pelos momentos vividos e que sempre vou me lembrar com o maior carinho e com a certeza que não seria melhor se não fosse com essa turma.

MARQUES, B.M. **Extrato do chá verde como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental**. 2015. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Resumo

Este estudo avaliou a perda óssea alveolar (POA) via análise fotométrica da influência da terapia coadjuvante com extrato de chá verde (*Camelia sinenses*) associada ao tratamento mecânico da periodontite experimental (PE). Foram utilizados 60 ratos machos, distribuídos em 4 grupos (n=15): SPE: apenas a simulação do ato da indução da PE no primeiro molar inferior. PE: indução da PE. PE-RAR-SS: indução da PE e após 7 dias estes animais foram submetidos à raspagem e alisamento radicular (RAR) seguido da irrigação subgengival com 1 ml de solução salina. PE-RAR-CH: indução da PE e após 7 dias da indução estes animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgengival com solução de extrato de chá verde (20mg/ml). Após 14, 22 e 37 dias da indução da PE, 5 animais de cada grupo foram eutanasiados. As hemimandíbulas coletadas foram processadas, posicionadas em mesa estativa e analisadas utilizando o método fotométrico por meio do programa de imagem Image J 1.49 V (National Institutes of Health, USA). Os dados coletados foram analisados estatisticamente (ANOVA e Tukey - Bioestat 5.0; $p \leq 0,05$). A simulação de indução da PE não promoveu POA na área do primeiro molar nos diferentes períodos e a indução da PE promoveu progressiva POA no decorrer dos períodos. O tratamento mecânico associado à solução salina não reduziu a POA enquanto a associação com o extrato de chá verde promoveu redução da POA quando comparado com os PE-RAR-SS e PE, nos respectivos períodos. Dentro dos limites do presente estudo, conclui-se que a terapia coadjuvante com extrato de chá verde promoveu redução na POA, sendo uma possível solução coadjuvante para tratamento da doença periodontal.

Palavras-chave: Doenças periodontais. *Camellia sinensis*. Periodontite.

MARQUES, B.M. **Green tea extract as a supporting role therapy to mechanical treatment of experimental periodontitis**. 2015. 35 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Abstract

This study evaluated the alveolar bone loss (ABL), via photometric analysis, the influence of adjuvant therapy with green tea extract (*Camellia sinenses*) associated with the mechanical treatment of experimental periodontitis (EP). 60 rats were randomly set into 4 groups (n = 15): SPE: only the simulation of EP inducing act on the first molar. PE: Induction of EP. PE-RAR-SS: induction of EP and after 7 days these animals were submitted to scaling and root planing (SRP) followed by subgingival irrigation with 1 mL of brine. PE-RAR-CH: Induction EP and after 7 days of induction these animals were SRP, followed by subgingival irrigation with green tea extract solution (20mg / ml). After 14, 22 and 37 days of induction of EP, 5 animals from each group were euthanized. The hemimandibles collected were processed, positioned on the stand table and analyzed using the photometric method. Data were statistically analyzed (ANOVA and Tukey - Bioestat 5.0; p = 0.05). The simulation of EP induction at the first molar area did not promote ABL, and the different EP induction periods promoted progressive ABL. The mechanical treatment associated with saline solution did not reduce the ABL, while the association with green tea extract promoted ABL reduction when compared with PE-RAR-SS and PE, in the respective periods. Within the limits of this study it is concluded that the adjuvant therapy with green tea extract promoted reduction in the ABL, been a possible solution for supporting the treatment of periodontal disease.

Keywords: Periodontal diseases. *Camellia sinensis*. Periodontitis.

Lista de Figuras

Figura 1 Procedimentos de indução da periodontite	19
Figura 2 Procedimentos para tratamento da periodontite experimental	20
Figura 3 Solução de extrato de chá verde	20
Figura 4 Hemimandíbulas acondicionadas em cassetes histológicos	21
Figura 5 Imagem representativa da Análise fotométrica	22
Figura 6 Imagem representativa da POA do grupo PE-RAR-CH	24
Figura 7 Imagem representativa da POA do grupo PE-RAR-SS	24
Figura 8 Imagem representativa da POA do grupo PE	25
Figura 9 Imagem representativa da POA do grupo SPE	25

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Média e desvio padrão da análise fotométrica da POA em mm ²	23
---	----

Lista de Abreviaturas e Símbolos

PE = Periodontite experimental

POA = Perda óssea alveolar

RAR = Raspagem e alisamento radicular

ml = mililitro

mg = miligrama

% = percentagem

$\leq$ = menor ou igual

$\geq$ = maior ou igual

HBD = imuno defensinas

G = grama

$\pm$ = mais ou menos

$^{\circ}\text{C}$ = grau Celsius/centígrado

Kg = quilograma

Nº = número

Mm² = milímetro quadrado

Sumário

1 Introdução.....	11
2 Revisão de Literatura.....	13
3 Objetivos.....	16
4 Material e Métodos.....	17
5 Resultados.....	23
6 Discussão.....	26
7 Conclusão.....	29
Referências.....	30
Anexos.....	35

1 INTRODUÇÃO

A resposta inicial ao acúmulo de placa bacteriana é uma reação inflamatória local que ativa o sistema imune, resultando na liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios que se espalham pelo tecido gengival (PRESHAW; TAYLOR, 2011). Este processo inflamatório pode progredir apicalmente e destruir os tecidos de suporte dos dentes. Essa reação amplificada consiste na base da progressão da doença periodontal (COCHRAN, 2008).

A eliminação das espécies periodontopatogênicas presentes no biofilme supra e subgengival através da raspagem e alisamento radicular (RAR) tem como objetivo interromper a progressão da doença e restabelecer os níveis de inserção periodontal (PRATES et al. 2011). No entanto, apesar dos conceitos atuais de terapia periodontal serem baseados na remoção de depósitos bacterianos, cálculos e cimento contaminado por bactérias através da RAR (TAKASAKI et al. 2009; TELES et al. 2006), estudos relatam que o debridamento puramente mecânico não elimina completamente as bactérias que podem permanecer no cimento radicular, túbulos dentinários ou reservatórios teciduais (UMEDA et al. 2004). Além dos mais fatores anatômicos como bolsas periodontais profundas, concavidades e áreas de furca podem reduzir a eficácia do tratamento mecânico convencional (NOIRI; EBISU 2000, UMEDA et al. 2004), havendo a necessidade de terapia coadjuvantes.

A administração local de agentes antimicrobianos em bolsas periodontais foi sugerida como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico convencional da doença periodontal. Neste contexto, devido às suas propriedades antioxidante, antimutagênica, anticarcinogênica, anti-inflamatória e antimicrobiana de suas catequinas (VENKATESWARA et al. 2011), o extrato de chá verde tem sido proposto como coadjuvante no tratamento de doenças crônicas, tais como a doença periodontal.

Em sua complexa composição química, os compostos mais abundantes no chá verde são os polifenóis (VINSON, 2000). Os flavonoides, tais como as catequinas, não são conhecidos somente por seus efeitos antioxidantes, antimutagênicos e anticarcinogênicos (MUKHTAR et al., 1992), mas também por suas propriedades antiinflamatória (KOU et al. 2008) e antimicrobiana (YUN et al. 2004).

Com base nas evidências de que o extrato do chá verde poderia ser uma alternativa eficaz no tratamento da gengivite e periodontite, o presente estudo teve por objetivo avaliar o uso do chá verde como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental (PE) e, com isso, elucidar alguns pontos ainda obscuros na literatura a respeito da sua influência no processo de reparo periodontal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na literatura observa-se que o extrato de chá verde tem sido utilizado no tratamento da gengivite e da periodontite e os estudos encontrados apresentam diferentes formas de administração e avaliação do fitoterápico. Portanto, para maior compreensão do assunto, será apresentado uma breve revisão de literatura, que enfoca a utilização do extrato de chá verde na prevenção/tratamento da doença periodontal.

A aplicação local do extrato do chá verde associada ao procedimento de RAR foi proposto como uma de suas diversas formas de aplicação. Hirasawa et al. (2002) utilizou-se tiras de liberação lenta contendo as suas catequinas em bolsas periodontais após o tratamento mecânico de RAR, durante 8 semanas, uma vez por semana. Neste estudo, as catequinas do chá verde apresentaram efeito bactericida contra *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella* spp. Em outro estudo semelhante (HATTARKI et al. 2013), utilizou tiras contendo as mesmas catequinas associadas a RAR foi observado a redução significativa também de *Tannerella forsythus* e *Porphyromonas gingivalis*. Kudva et al. (2011) avaliou a associação das tiras contendo as catequinas do chá verde como coadjuvantes ao tratamento mecânico da doença periodontal em estudo clínico com 14 pacientes e os seguintes parâmetros clínicos foram avaliados: índice de placa, índice gengival e profundidade de sondagem. Os autores concluíram que a aplicação local de catequinas do chá verde em associação à RAR foi mais eficaz quando comparado ao tratamento puramente mecânico.

Outra forma de administração do extrato de chá verde são os enxaguatórios bucais. Esta forma de administração foi estudada por Jenabian et al. (2012). Os autores selecionaram 25 estudantes do sexo feminino com gengivite crônica generalizada induzida pela placa bacteriana, os quais receberam 5 ml de chá verde 5% ou solução salina, duas vezes ao dia para realização de bochecho. Foram avaliados o índice gengival, índice de placa e índice de sangramento no início do estudo e durante cinco semanas consecutivas. Concluiu-se que bochechos com extrato de chá verde podem ser um tratamento complementar seguro e viável para doenças inflamatórias periodontais. Em outro estudo, Awadalla et al. (2011) avaliaram pH da saliva, pH da placa, índice de Sangramento Gengival de 25

indivíduos antes e depois de enxaguar a boca com extrato de chá verde 2% por 5 min e comprovaram a eficácia da aplicação local do extrato de chá verde como material antibacteriano e anticariogênico. Kaur et al. (2014) avaliaram 30 indivíduos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais. Um grupo realizou bochecho com o antisséptico A (0,25% do chá verde) e o outro com o antisséptico B (0,12% de clorexidina), uma vez ao dia, durante 15 dias. Os resultados demonstraram que o antisséptico contendo extrato de chá verde obteve resultados comparáveis ao grupo que utilizou antisséptico contendo clorexidina, sugerindo que as catequinas do chá verde são eficientes como agente anti-placa.

Os efeitos sistêmicos promovidos pela ingestão constante do chá verde são de pleno conhecimento, desta forma diversos estudos afirmaram que a ingestão diária de chá verde também é eficiente na prevenção das doenças periodontais. Kushiyama et al. (2009) avaliaram 940 homens japoneses verificando a relação entre a ingestão do chá verde pelo número de xícaras por dia em um questionário e os parâmetros periodontais de profundidade de sondagem, perda de inserção clínica e índice de sangramento. Neste estudo concluiu-se que a ingestão diária de chá verde foi inversamente correlacionada com a progressão da doença periodontal. Já Koyama et al. (2010) aplicou questionários auto administrados sobre o consumo de chá verde e perda de dentes em 25.078 indivíduos, entre 40 e 64 anos no Japão. Por meio da avaliação desses questionários concluiu-se que o consumo de ≥ 1 copo / dia de chá verde foi significativamente associado à diminuição da probabilidade de perdas dentais, sugerindo uma associação do consumo de chá verde com diminuição das chances de perda do dente.

Em estudo clínico, Deshpande et al. (2012) avaliaram 30 indivíduos que foram divididos em três grupos de acordo com as diferentes terapias: I - apenas RAR, II - RAR no início do estudo juntamente com a ingestão de 4 xícaras de chá verde por dia durante 6 meses e III - apenas ingestão de 4 xícaras de chá verde por dia durante 6 meses. Os parâmetros clínicos foram registrados no início do estudo, 3 e 6 meses após o início, onde foi possível observar os efeitos benéficos da ingestão diária do chá verde sobre as doenças periodontais de forma profilática, assim como com finalidade terapêutica associada a RAR.

Além dos estudos que avaliaram as diversas formas de administração do extrato de chá verde, também foram realizados estudos in vitro que avaliaram suas

propriedades. Lombardo Bedran et al. (2014) analisaram células epiteliais gengivais que foram tratadas com várias concentrações de extrato de chá verde (25-200 mg / mL) mostrando sua capacidade para induzir a secreção de imunodefensinas (hBD) por células epiteliais e proteção da degradação proteolítica, demonstrando o potencial da atividade antimicrobiana inferindo que esses polifenóis possam ser um potencial agente terapêutico para o tratamento/prevenção de doenças periodontais. Em outro estudo Araghizadeh et al. (2013) analisaram vinte cepas de microrganismos, que foram isolados a partir de dentes cariados e bolsas periodontais e tratadas com diferentes concentrações de extrato de chá verde (1,56 – 50mg/ml). Este estudo demonstrou que o extrato de chá verde exibiu forte atividade antibacteriana sobre *S. mutans*, *A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *P. intermedia*, podendo então ser utilizado em bochechos ou dentifrícios para a prevenção da cárie e doenças periodontais. Já Sakanaka & Okada (2004) analisaram o efeito dos compostos polifenólicos isolados a partir do chá verde sobre a produção de metabólitos tóxicos de *Porphyromonas gingivalis* demonstrando que os polifenóis do chá verde inibiu completamente a produção de n-butírico e ácido propiónico, concluindo então que a aplicação contínua de polifenóis do chá verde em uma dieta diária alimentar pode ser considerado como um método útil e prático para a prevenção das doenças periodontais

As propriedades das catequinas do chá verde também foram apresentadas em revisões de literatura. Venkateswara et al. (2011) concluiu que o chá verde possui atividade antioxidante, antimicrobiana, anticolagenase e antimutagênica, sendo útil no tratamento de doenças crônicas, como a doença periodontal demonstrando que o chá verde também auxilia no aspecto da saúde geral por apresentar também atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica. Em outra revisão, Chatterjee et al. (2012) concluiu que o chá verde promove a saúde periodontal, reduzindo a inflamação, a reabsorção óssea e limitando do crescimento de certas bactérias associadas com doenças periodontais. Do mesmo modo, Nugala, et al. (2012) afirmou também que o chá verde inibe patógenos periodontais e reduz a destruição do tecido periodontal.

3 OBJETIVOS

Com base no exposto, o presente estudo tem por objetivo avaliar, através de análise fotométrica o efeito da terapia local com extrato do chá verde como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da doença periodontal experimental induzida em ratos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 280g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Araçatuba, os quais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada da FOA-UNESP, sob as condições: ciclo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro, temperatura ambiente de 22 ± 2 °C, sistema de ventilação/exaustão permitindo 20 trocas de ar por hora, umidade relativa do ar em torno de $55 \pm 5\%$. Durante todo o experimento, os animais consumiram ração sólida adequada e água ad libitum. O protocolo experimental do presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia - Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Araçatuba (**nº 2014-00543**). Os animais apresentavam-se saudáveis e em condições de se submeterem aos procedimentos experimentais. Os procedimentos de manipulação experimental foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pelo “Guide to the care and use of experimental animals” e “Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA).

Periodontite Experimental

Inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70 mg/Kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset® - Zoetis, Iowa – USA) e 6 mg/kg de cloridrato de xilazina (Rompun® - Bayer Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), aplicados intramuscular no *bíceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi complementada com a metade da dose inicial aplicada.

Grupos Experimentais

Seguindo uma tabela gerada por um programa de computador, os animais foram distribuídos em 4 grupos, cada um composto por 15 animais. Abaixo seguem as descrições dos grupos experimentais:

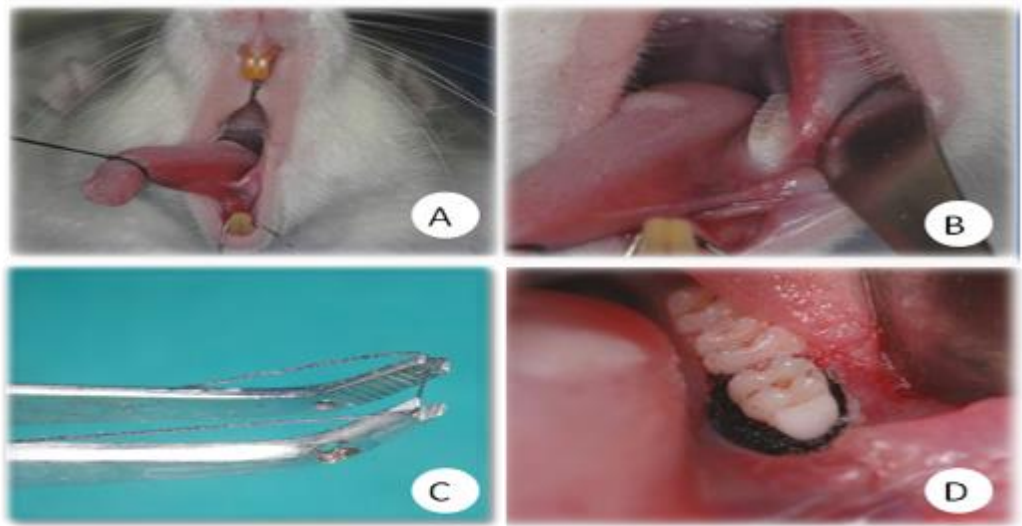
Grupo SPE: também chamado de grupo sham. Os animais pertencentes a este grupo não receberam a indução da PE, apenas a simulação do ato da indução no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Foi instalada a ligadura e no mesmo momento foi removida. Decorrido os períodos de 14, 22 e 37 dias após a simulação da indução da doença periodontal os animais foram submetidos à eutanásia. **Grupo PE:** Os animais pertencentes a este grupo receberam a indução da PE no primeiro molar inferior direito e esquerdo e a ligadura permaneceu durante todo o estudo. Decorrido os períodos de 14, 22 e 37 dias após a indução da PE os animais foram submetidos à eutanásia. **Grupo PE-RAR-SS:** os animais pertencentes a este grupo receberam a indução da PE no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Decorrido 7 dias da indução da PE a ligadura foi removida e estes animais foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgengival com 1 ml de solução salina. Decorrido os períodos de 14, 22 e 37 dias após indução da PE os animais foram submetidos à eutanásia. **Grupo PE-RAR-CH:** os animais pertencentes a este grupo receberam a indução da PE no primeiro molar inferior direito e esquerdo. Decorrido 7 dias da indução da PE a ligadura foi removida e estes foram submetidos à RAR seguido da irrigação subgengival com 1 ml de solução de extrato de chá verde. Decorrido os períodos de 14, 22 e 37 dias após indução da PE os animais foram submetidos à eutanásia.

Método de Indução da Periodontite Experimental (PE)

Após anestesia geral, os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos, facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula (fig.1 A e B). Com o auxílio de uma pinça modificada, foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 24; Coats Corrente, SP, Brasil.) ao redor dos primeiros molares inferiores de ambos os lados (direito e esquerdo), ao nível do sulco gengival e mantidos por meio

de nós cirúrgicos (fig.1 C e D). Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana.

Figura 1 - Procedimentos de indução da PE. (A) Posicionamento do animal na mesa cirúrgica; (B) Acesso ao primeiro molar inferior onde será induzida a doença periodontal; (C) Pinça modificada usada para adaptação do fio de algodão em torno do primeiro molar inferior; (D) Fio de algodão adaptado



Fonte: Do Autor.

Procedimento de Raspagem e Alisamento Radicular (RAR)

O procedimento de RAR foi realizado com curetas manuais “mini – five” número 5 e 6, através de 10 movimentos de tração disto-mesial nas faces vestibular e lingual. As áreas mesiais, interproximais e de furca, foram raspadas com as mesmas curetas através de movimentos de tração cérvico-oclusais (Fig.2 A). Os procedimentos de RAR foram realizados por um mesmo operador experiente e treinado. Os animais do Grupo **PE-RAR-SS**, após a RAR foram irrigados com 1ml de soro fisiológico e os animais do grupo **PE-RAR-CH** foram irrigados com 1ml de extrato de chá verde na concentração de 20 mg/ml (Fig.2 B e C). As soluções (Soro fisiológico e de extrato de chá verde) foram depositadas lentamente no interior da bolsa periodontal, utilizando uma seringa de insulina e agulha sem bisel.

Figura 2 - Procedimentos para tratamento da PE. (A) Raspagem e alisamento radicular; (B) extrato de chá verde na concentração de 20 mg/ml; (C) Irrigação da bolsa periodontal.



Fonte: Do Autor.

Preparo do Extrato de Chá Verde

A solução de extrato de chá verde utilizada no presente estudo foi formulada seguindo a proposta de Lee et al. (2004). A solução de extrato de chá verde foi preparada na concentração de 20 mg/ml, baseada em uma solução sem corante e sem álcool (Fig.3).

Figura 3 - Solução de extrato de chá verde na concentração de 20 mg/ml.



Fonte: Do Autor.

Períodos de Análise

Cinco animais de cada grupo experimental foram eutanasiados aos 14, 22 e 37 dias após indução da PE. A eutanásia foi realizada por meio de dose letal de anestésico (Thiopental 150 mg/kg). Logo após a eutanásia, a mandíbula de cada animal foi removida, separada em duas partes, acondicionadas em cassetes histológicos (Fig.4) e armazenados em frascos contendo solução de paraformolaldeído a 4% por um período mínimo de 48 horas.

Figura 4 - Hemimandíbulas acondicionadas em cassetes histológicos para processamento laboratorial.



Fonte: Do Autor.

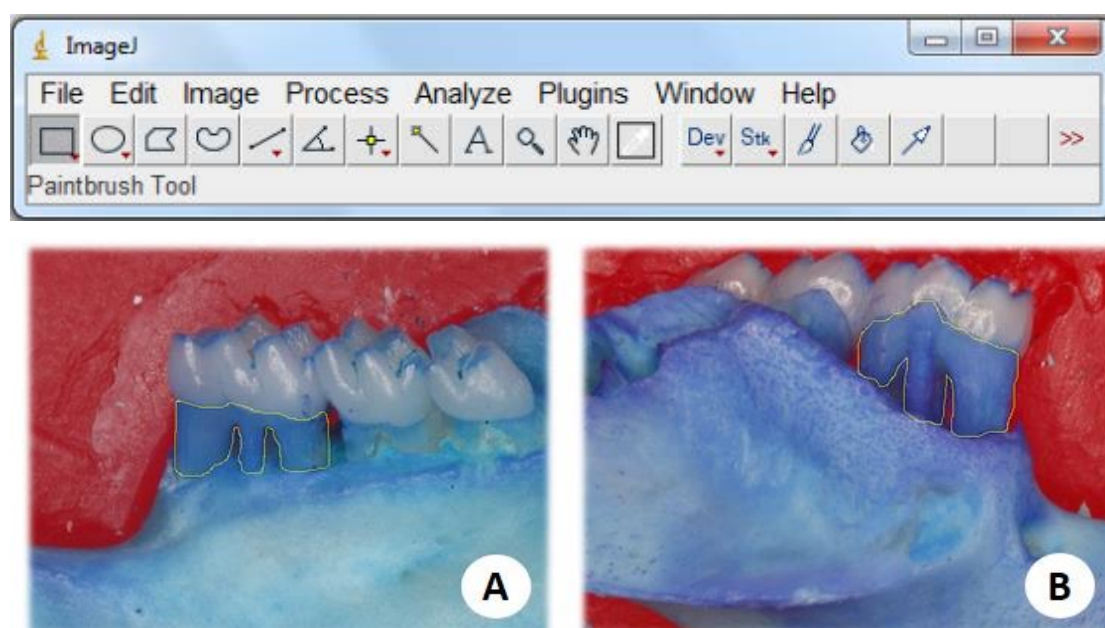
Análises dos Resultados

Fotometria

A análise fotométrica foi feita à partir de uma simples adaptação da metodologia previamente descrita por Tatakis e Guglielmoni (2000) utilizada para coleta dos dados fotométricos. Após a fixação em solução de paraformolaldeído a 4%, os espécimes foram lavados em água corrente por 24 horas e embebidos em solução de hipoclorito de sódio à 2,5% seguido pelo peróxido de hidrogênio para remoção da porção de tecido mole. Após secagem dos espécimes estes foram corados com solução de azul de metileno à 1%. Esta coloração facilitou a identificação da junção cimento esmalte. Os espécimes corados foram

apropriadamente afixados em mesa estereoscópica e foram obtidas imagens digitais da porção vestibular e lingual do primeiro molar inferior. Para calibração das medidas digitais, no momento da captura das imagens digitais foi adaptada uma régua calibradora para servir de referência para as mensurações das imagens digitais. Com o auxílio do software Image J 1.49 V (National Institutes of Health, USA) de análise de imagens foi calculado a área (mm^2) de perda óssea ao redor do primeiro molar inferior em cada grupo e período experimental (Fig 5). Em cada espécime foi coletada 3 medidas de cada superfície (vestibular e lingual) realizada em dias diferentes com intervalo de 1 dia entre elas. As mensurações foram realizadas por um único examinador treinado, calibrado e blindado a que grupo pertence às imagens.

Figura 5 - Imagem representativa da análise fotométrica (Grupo PE-RAR-SS). (A) Análise da perda óssea da porção lingual; (B) Análise da perda óssea da porção vestibular.



Fonte: Do Autor.

5 RESULTADOS

Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Na análise intergrupos, o grupo PE-RAR-CH apresentou menor perda óssea alveolar (POA) quando comparado ao grupo PE-RAR-SS aos 22 e 37 dias ($p \leq 0,01$) (figuras 6 e 7) e ao grupo PE (figura 8) aos 37 dias ($p \leq 0,05$). O grupo PE-RAR-SS apresentou maior POA quando comparado ao grupo PE aos 22 e 37 dias ($p \leq 0,01$) (figuras 7 e 8). E os grupos PE e PE-RAR-SS apresentaram maior POA quando comparado ao grupo SPE (figuras 7, 8 e 9) em todos os períodos experimentais ($p \leq 0,01$).

Na análise intragrupo, o grupo PE-RAR-SS apresentou menor POA aos 14 dias, quando comparado aos 21 e 37 dias ($p \leq 0,01$) (figura 7).

Tabela 1 – Média e desvio padrão ($M \pm D$) dos dados fotométricos da perda óssea alveolar (mm^2) na região do primeiro molar, de acordo com cada grupo e período.

Grupos	Períodos de Eutanásia		
	14 dias	22 dias	37 dias
SPE	2,64 $\pm$ 0,25	2,78 $\pm$ 0,37	2,52 $\pm$ 0,36
PE	3,86 $\pm$ 0,43 ^{&}	3,98 $\pm$ 0,02 ^{&}	4,14 $\pm$ 0,23 ^{&}
PE-RAR-SS	4,22 $\pm$ 0,16 ^{&}	5,73 $\pm$ 0,59 ^{*&@}	5,67 $\pm$ 1,42 ^{*&@}
PE-RAR-CH	3,22 $\pm$ 0,24	3,01 $\pm$ 0,11 [#]	3,02 $\pm$ 0,07 ^{*#}

* Diferença estatisticamente significativa com grupo PE nos respectivos períodos. (ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$)

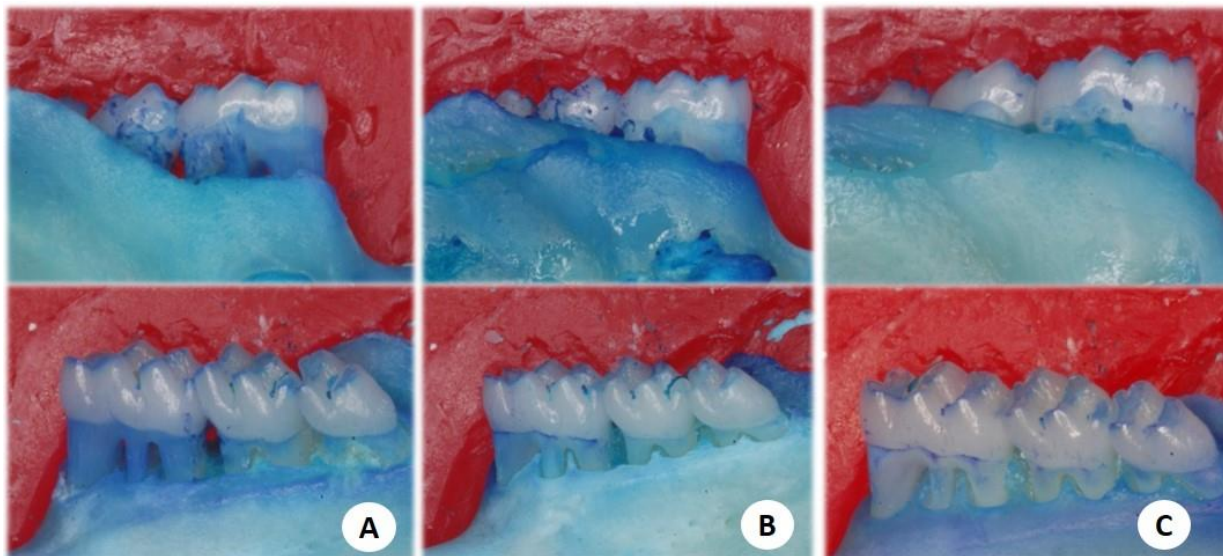
Diferença estatisticamente significativa com grupo PE-RAR-SS nos respectivos períodos. (ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$)

& Diferença estatisticamente significativa com grupo SPE nos respectivos períodos. (ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$)

@Diferença estatisticamente significativa no grupo PE-RAR-SS com o período de 14 dias. (ANOVA e Tukey, $p \leq 0,05$)

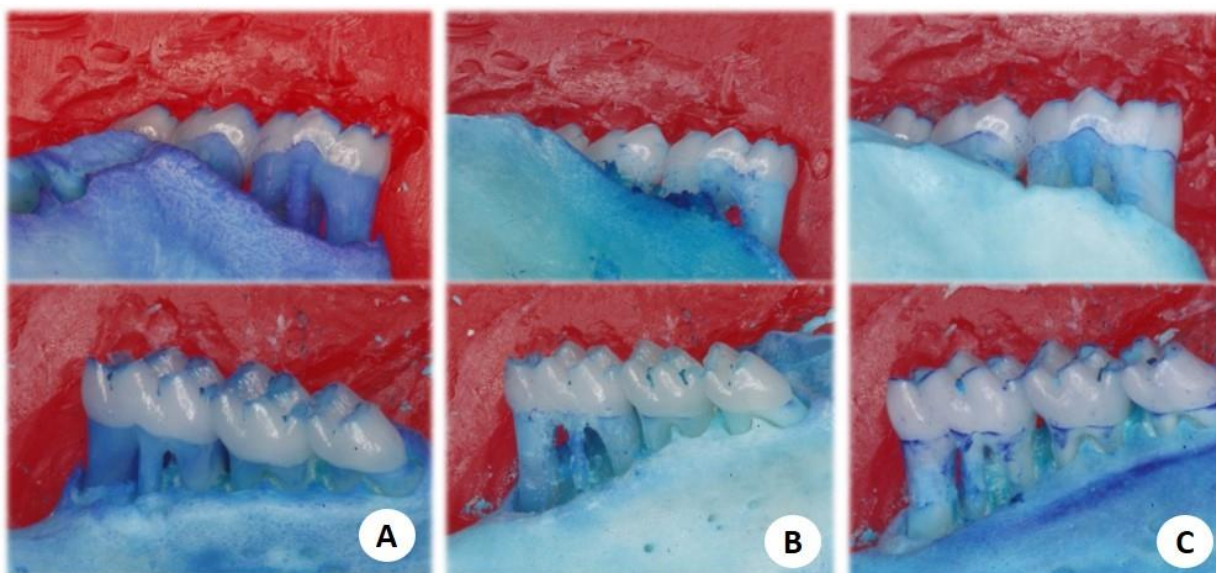
Fonte: Do Autor.

Figura 6 - Imagens representativas para fotometria do grupo PE-RAR-CH. (A) Grupo PE-RAR-CH 14 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo PE-RAR-CH 22 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo PE-RAR-CH 37 dias, imagens vestibular e lingual.



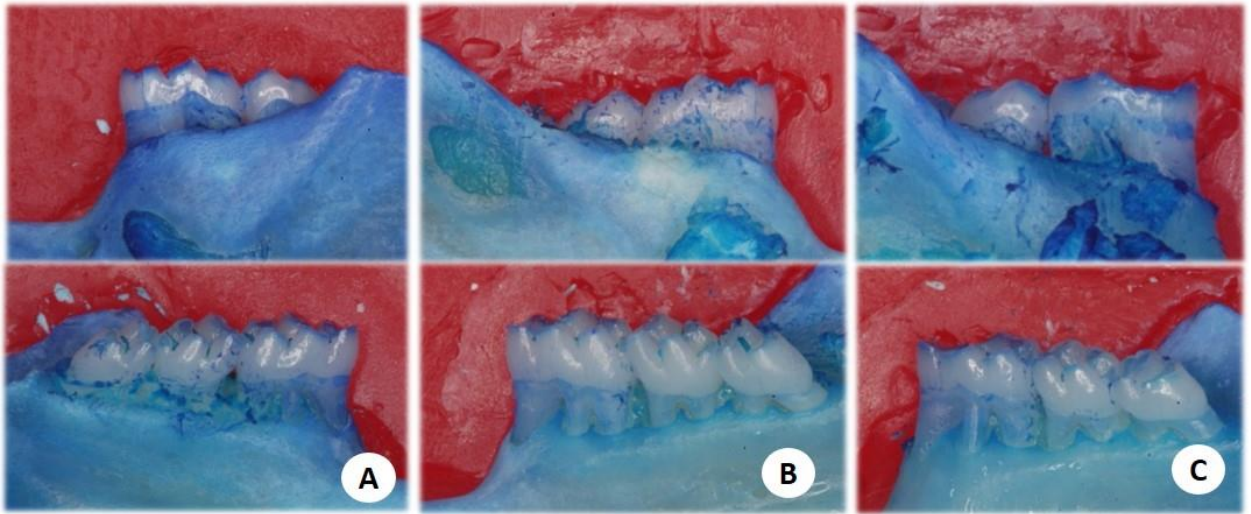
Fonte: Do Autor.

Figura 7 - Imagens representativas para fotometria do grupo PE-RAR-SS. (A) Grupo PE-RAR-SS 14 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo PE-RAR-SS 22 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo PE-RAR-SS 37 dias, imagens vestibular e lingual.



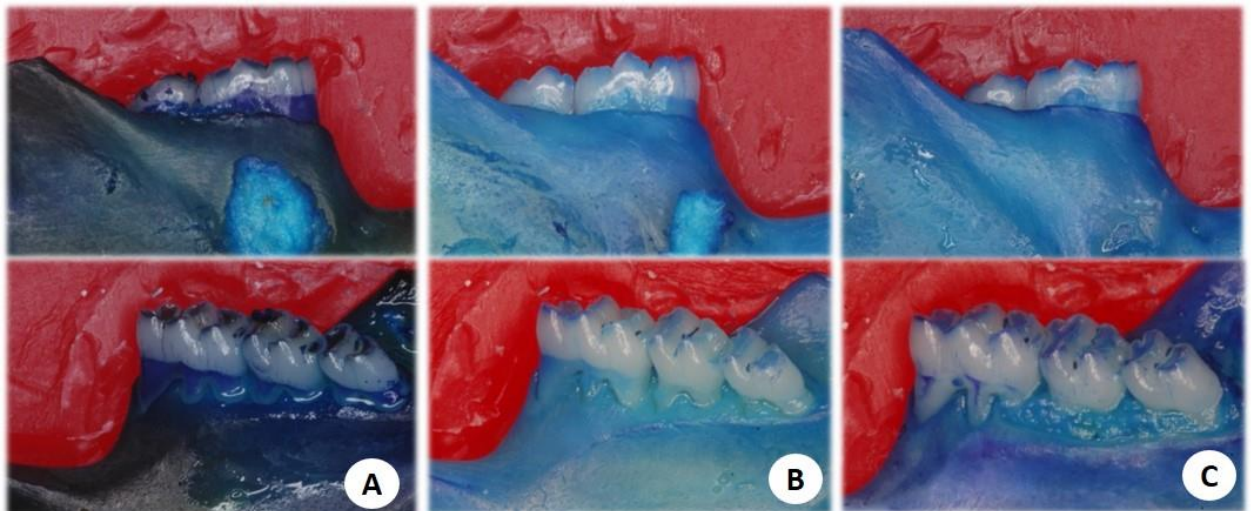
Fonte: Do Autor.

Figura 8 - Imagens representativas para fotometria do grupo PE. (A) Grupo PE 14 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo PE 22 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo PE 37 dias, imagens vestibular e lingual.



Fonte: Do Autor.

Figura 9 - Imagens representativas para fotometria do grupo SPE. (A) Grupo SPE 14 dias, imagens vestibular e lingual; (B) Grupo SPE 22 dias, imagens vestibular e lingual; (C) Grupo SPE 37 dias, imagens vestibular e lingual.



Fonte: Do Autor.

6 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou, através de análise fotométrica da POA, a influência da terapia com extrato de chá verde como coadjuvante ao tratamento mecânico da PE induzida em ratos.

O presente estudo demonstrou que a associação da RAR com chá verde diminuiu a POA em relação à associação da RAR com soro aos 22 e 37 dias. Este resultado corrobora com os observados por Hirasawa et al. (2002), que verificaram melhora clínica e microbiana após a aplicação da catequina de chá verde com sistema de liberação local combinada à RAR, quando comparada ao debridamento puramente mecânico. O mesmo resultado foi observado por outro estudo mais recente, (KUDVA et al., 2011) que também observaram efeito benéfico desta associação no tratamento da doença periodontal em humanos. Kushiyama et al. (2009) ainda demonstraram que o chá verde diminuiu a profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e sangramento à sondagem. Contudo, diferenças metodológicas na sua forma de administração (ingestão diária) torna difícil a comparação com o presente estudo.

O efeito benéfico da aplicação local do extrato do chá verde associado à RAR é provavelmente explicado por sua ação antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp* (HIRASAWA et al., 2002) e *Tannerella forsythus* (KUDVA et al., 2011), as quais constituem o complexo vermelho de Socransky e Haffajee (2002), principais agentes etiológicos da doença periodontal. Tem sido sugerido que as catequinas do chá verde exercem efeito inibitório sobre a atividade da collagenase das bactérias orais (MAKIMURA et al., 1993). Por exemplo, elas podem inibir a atividade enzimática da *Porphyromonas gingivalis* de um modo semelhante ao da clorexidina e doxíciclina (SAKANAKA et al., 1996). Tais efeitos diminuem ainda mais os danos causados aos tecidos periodontais (VENKATESWARA et al., 2011). Os flavonóides, seus principais polifenóis, também inibem a produção de metabólitos tóxicos da *Porphyromonas gingivalis* (NUGALA et al., 2012).

Além da ação antibacteriana, outra provável explicação para redução da POA no grupo PE-RAR-CH do presente estudo pode estar relacionado ao efeito antioxidante do chá verde. Recentemente, foi relatado que os lipopolissacarídeos da *Porphyromonas gingivalis* aumentam o stress oxidativo nos fibroblastos do ligamento

periodontal e contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença periodontal (GOLZ et al., 2014). Uma vez que o chá verde atua eliminando espécies reativas de oxigênio e inibem enzimas oxidantes (VENKATESWARA et al., 2011), as quais têm sido implicadas na patogênese da doença periodontal (GÖLZ et al., 2014; GUENTSCH et al., 2008; TOMOFUJI et al., 2008) esta ação pode ter contribuído para prevenir a POA no presente estudo.

A literatura também relata que catequinas do chá verde inibem a expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2), metaloproteinase da matriz-1, interleucinas 1, 6 e 8 e ativação de fator nuclear kappa B (um dos principais reguladores positivos da expressão COX-2) (KOU et al., 2008), todos relacionados com o processo inflamatório. As catequinas do chá verde, através da inibição desses fatores, são eficazes na prevenção da inflamação gengival e periodontal. Por fim, além da sua atividade antiinflamatória, as catequinas do chá verde também exercem papel protetor sobre os tecidos periodontais através da indução da apoptose de osteoclastos multinucleados (NAKAMURA et al., 2010), os quais desempenham papel crucial na reabsorção óssea.

A inibição da expressão de metaloproteinases da matriz nos osteoblastos foi descrita por Yun et al. (2004). Algumas destas metaloproteinases, produzidas por neutrófilos presentes no infiltrado inflamatório, promovem a destruição dos tecidos via degradação de peptídeos associados à membrana plasmática e proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno (PRESHAW et al., 2004). Tais enzimas também são capazes de potencializar a atividade reabsortiva osteoclástica (PRESHAW et al., 2004). Consequentemente, a modulação da atividade de certas metaloproteinases interfere significativamente na destruição de tecidos moles e perda óssea na doença periodontal (PRESHAW et al., 2004). Assim, juntos, a indução da apoptose de osteoclastos e a diminuição na expressão de metaloproteinases da matriz também podem ter atuado na redução da POA no presente estudo.

A PE é caracterizada pela presença de infiltrado inflamatório, perda de inserção do ligamento periodontal, reabsorção óssea ativa, presença de neutrófilos, a partir do 4º dia e de macrófagos a partir do 5º dia do estabelecimento da PE, persistindo este infiltrado inflamatório até 7 dias com pico de perda óssea, ao redor do 7º dia (ALMEIDA et al., 2007; BEZERRA et al., 2000; JORDAN, KEYS, 1964;

SALLAY et al., 1982), e intenso processo inflamatório crônico e aos 30 dias um processo inflamatório crônico de menor intensidade (ALMEIDA et al., 2007). Assim, ao compararmos os resultados do Grupo PE com o Grupo PE-RAR-SS acreditamos que a terapia com RAR promoveu uma alteração no processo inflamatório, induzindo um processo inflamatório agudo ocasionando aumento a POA. Além do mais, estudos demonstram que a terapia com RAR apenas sem agentes coadjuvantes em dentes multirradiculados é falha no tratamento da PE (ALMEIDA et al., 2007; GARCIA et al., 2014, 2015).

É importante ressaltar que o presente estudo avaliou apenas a análise fotométrica, não sendo esta análise isolada totalmente suficiente para elucidar o mecanismo de ação das catequinas do chá verde como terapia coadjuvante a RAR. Tendo em vista que a patogênese da doença periodontal envolve diversos eventos com mecanismos complexos, nos quais abrangem a ação direta das bactérias nos tecidos periodontais e a destruição tecidual de maneira indireta ativada pelo sistema de defesa do hospedeiro, outras análises complementares tornam-se necessárias para elucidar de maneira mais abrangente a influência desta terapia sobre a doença periodontal. Além disso, uma padronização das metodologias aplicadas torna-se necessária, pois as grandes diferenças metodológicas entre os estudos dificultam a comparação entre eles.

7 CONCLUSÃO

Assim, dentro dos limites do presente estudo, pode-se concluir que o extrato do chá verde pode ser considerado um método eficaz e prático para ser utilizado como uma terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da PE, no entanto outros estudos são necessários para comprovarem a sua efetividade.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação radiográfica do comportamento do tecido ósseo alveolar após procedimento de indução de doença periodontal em ratos. **Periodontia**, v. 17, n. 4, p. 85-91, 2007.

ARAGHIZADEH, A; KOHANTEB, J; FANI, M M. Inhibitory activity of green tea (Camellia sinensis) extract on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. **Med. Princ. Pract.**, v. 22, n. 4, p. 368-372, 2013.

AWADALLA, H. I. et al. A pilot study of the role of green tea use on oral health. **Int. J. Dent. Hyg.**, v. 9, n. 2, p. 110-116, 2011.

BEZERRA, M. M. et al. Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J. Periodontol.**, v. 71, n. 6, p. 1009-1014, 2000.

CHATTERJEE, A. et al. Green tea: a boon for periodontal and general health. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 16, n. 2, p. 161-167, 2012.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 8, p. 1569-1576, 2008.

DESHPANDE, N. et al. Evaluation of intake of green tea on gingival and periodontal status: an experimental study. **J. Interdiscip. Dent.**, v. 2, n. 2, p. 108-112, 2012.

GARCIA, V. G. et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.**, v. 49, n. 5, p. 584-594, 2014.

GARCIA, V. G. et al. Evaluation of the progression and treatment of experimental periodontitis in rats subjected to chemotherapy with 5-fluorouracil. **Support. Care Cancer**, v. 23, n. 7, p. 2007-2017, 2015.

GÖLZ, L. et al. LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, 2014.

GUENTSCH, A. et al. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis patients: effect of smoking and periodontal treatment. **Clin. Oral Investig.**, v. 12, n. 4, p. 345-352, 2008.

HATTARKI, S. A.; PUSHPA, S. P.; BHAT, K. Evaluation of the efficacy of green tea catechins as an adjunct to scaling and root planing in the management of chronic periodontitis using PCR analysis: a clinical and microbiological study. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 17, n. 2, p. 204-209, 2013.

HIRASAWA, M. et al. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. **J. Periodontal Res.**, v. 37, n. 6, p. 433-438, 2002.

JENABIAN, N. et al. The effect of *Camellia Sinensis* (green tea) mouthwash on plaque-induced gingivitis: a single-blinded randomized controlled clinical trial. **DARU**, v. 20, n. 1, p. 39, 2012.

JORDAN, H. V.; KEYES, P. H. Aerobic, gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. **Arch. Oral Biol.**, v. 9, n. 4, p. 401, 1964.

KAUR, H.; JAIN, S.; KAUR, A. Comparative evaluation of the antiplaque effectiveness of green tea catechin mouthwash with chlorhexidine gluconate. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 18, n. 2, p. 178-182, 2014.

KOU, Y. et al. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 1, p. 174-180, 2008.

KOYAMA, Y. et al. Association between green tea consumption and tooth loss: Cross-sectional results from the Ohsaki Cohort 2006 Study. *Prev. Med.*, v. 50, n. 4, p. 173-179, 2010.

KUDVA, P.; TABASUM, S. T.; SHEKHAWAT, N. K. Effect of green tea catechin, a local drug delivery system as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis patients: a clinicomicrobiological study. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 15, n. 1, p. 39-45, 2011.

KUSHIYAMA, M. et al. Relationship between intake of green tea and periodontal disease. **J. Periodontol.**, v. 80, n. 3, p. 372-377, 2009.

LEE, Y. K. et al. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Blood**, v. 104, n. 3, p. 788-794, 2004.

LOMBARDO BEDRAN, T. B. et al. Green tea extract and its major constituent, epigallocatechin-3-gallate, induce epithelial beta-defensin secretion and prevent beta-defensin degradation by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Periodontal Res.*, v. 49, n. 5, p. 615-623, 2014.

MAKIMURA, M. et al. Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity. **J. Periodontol.**, v. 64, n. 7, p. 630-636, 1993.

MUKHTAR, H. et al. Tea components: antimutagenic and anticarcinogenic effects. **Prev. Med.**, v. 21, n. 3, p. 351-360, 1992.

NAKAMURA, H. et al. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption in vivo. **J. Periodontal Res.**, v. 45, n. 1, p. 23-30, 2010.

NOIRI, Y.; EBISU, S. Identification of periodontal disease-associated bacteria in the "plaque-free zone". **J. Periodontol.**, v. 71, n. 8, p. 1319-1326, 2000.

NUGALA, B. et al. Role of green tea as an antioxidant in periodontal disease: the Asian paradox. **J. Indian Soc. Periodontol.**, v. 16, n. 3, p. 313-316, 2012.

PRATES, R. A. et al. Histomorphometric and microbiological assessment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photomed. Laser Surg.*, v. 29, n. 12, p. 835-844, 2011.

PRESHAW, P. M. et al. Subantimicrobial dose doxycycline as adjunctive treatment for periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, v. 31, n. 9, p. 697-707, 2004.

PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **J. Clin. Periodontol.**, v. 38, suppl. 11, p. 60-84, 2011.

SAKANAKA, S. et al. Inhibitory effects of green tea polyphenols on growth and cellular adherence of an oral bacterium, *Porphyromonas gingivalis*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 60, n. 5, p. 745-749, 1996.

SAKANAKA, S; OKADA, Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-disease-causing anaerobic bacterium *Porphyromonas gingivalis*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 6, p. 1688-1692, 2004.

SALLAY, K. et al. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. **J. Periodontal Res.**, v. 17, n. 3, p. 263-274, 1982.

SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontology** 2000, v. 28, n. 1, p. 12-55, 2002.

TAKASAKI, A. A. et al. Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. **Periodontol.** **2000**, v. 51, n. 1, p. 109-140, 2009.

TATAKIS, D. N.; GUGLIELMONI, P. HLA-B27 transgenic rats are susceptible to accelerated alveolar bone loss. **Journal of periodontology**, v. 71, n. 9, p. 1395-1400, 2000.

TELES, R. P.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbiological goals of periodontal therapy. **Periodontol.** **2000**, v. 42, n. 1, p. 180-218, 2006.

TOMOFUJI, T. et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. **Arch. Oral Biol.**, v. 53, n. 12, p. 1113-1118, 2008.

UMEDA, M. et al. Effects of nonsurgical periodontal therapy on the microbiota. **Periodontol.** **2000**, v. 36, n. 1, p. 98-120, 2004.

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

VINSON, J. A. Black and green tea and heart disease: a review. **Biofactors**, v. 13, n. 1-4, p. 127-132, 2000.

YUN, J.H. et al. Inhibitory effects of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate on the expression of matrix metalloproteinase-9 and on the formation of osteoclasts. **J. Periodontal Res.**, v. 39, n. 5, p. 300-307, 2004.

ANEXO A - CERTIFICADO DA APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "Extrato do chá verde como terapia coadjuvante ao tratamento mecânico da periodontite experimental", Processo FOA nº 2014-00543, sob responsabilidade de Juliano Milanezi de Almeida apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 26 de junho de 2014.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Julho de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Agosto de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "Green tea extract for the adjuvant therapy to mechanical treatment of experimental periodontitis", Protocol FOA nº 2014-00543, under the supervision of Juliano de Almeida Milanezi presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on June 26, 2014.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: July 31, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: August 30, 2017.

Prof. Dr. Edison Ervelino
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Aracatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Aracatuba
Rua José Bonifácio, 1193 - Vila Mendonça - CEP: 16015-050 - ARAÇATUBA - SP
Fone (16) 3635-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br