

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

PEDRO VINICIO BARROS DE ABREU

**INFLUÊNCIA DO CHÁ VERDE NA DOENÇA
PERIODONTAL DE RATOS SUBMETIDOS À
TERAPIA ENDOVENOSA DE BISFOSFONATO
NITROGENADO**

BAURU
2013

PEDRO VINICIO BARROS DE ABREU

**INFLUÊNCIA DO CHÁ VERDE NA DOENÇA
PERIODONTAL DE RATOS SUBMETIDOS À
TERAPIA ENDOVENOSA DE BISFOSFONATO
NITROGENADO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Centro de Ciências da
Saúde como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Odontologia, sob orientação da Profa.
Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

BAURU
2013

Abreu, Pedro Vinicio Barros de

A162i

Influência do chá verde na doença periodontal de ratos submetidos à terapia endovenosa de bisfosfonato nitrogenado / Pedro Vinicio Barros de Abreu -- 2013.
33f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Pinto Saraiva.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP.

1. Bisfosfonato. 2. Doença periodontal. 3. Chá verde. I. Saraiva, Patricia Pinto. II. Título.

PEDRO VINICIO BARROS DE ABREU

**INFLUÊNCIA DO CHÁ VERDE NA DOENÇA PERIODONTAL DE
RATOS SUBMETIDOS À TERAPIA ENDOVENOSA DE
BISFOSFONATO NITROGENADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Patrícia Pinto Saraiva
Universidade do Sagrado Coração

Profa. Dra. Mirella Lindoso Gomes Campos

Profa. Dra. Mariza Akemi Matsumoto
Universidade do Sagrado Coração

Bauru, 13 de dezembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Queria agradecer primeiramente a Deus que me guiou e iluminou até aqui, aos meus pais Eva Márcia e Pedro de Abreu que me proporcionaram a melhor educação, exemplo e por terem me dado à possibilidade de estudar em uma Universidade de grande qualidade.

Agora o meu muito obrigado a minha professora/orientadora Patrícia por ter me ajudado nesses quatro anos de graduação, quero também expressar o meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e minha eterna gratidão pela forma com que conduziu minha orientação.

E como vários textos e ditados dizem por ai quem tem amigos, nunca está só. Felizmente, estou longe de ser uma pessoa sozinha. Não caberia nesse espaço, caso fosse citar um a um os nomes de todo os que me ajudaram chegar onde cheguei. Portanto meus amigos sintam-se abraçados e agradecidos.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da ingestão de chá verde no tratamento de doença periodontal induzida, em ratos submetidos à administração endovenosa de ácido zoledrônico. Foram utilizados 60 ratos Wistar machos divididos em quatro grupos: (G1) Controle com doença periodontal; (G2) Aplicação de zoledronato com doença periodontal; (G3) Ingestão de chá verde, com doença periodontal e (G4) Aplicação de zoledronato, ingestão de chá verde, com doença periodontal. Os animais do grupo 2 e 4 que foram tratados com bifosfonatos, na dose de 35 mg/kg de zoledronato por via endovenosa. O chá verde foi disponibilizado diariamente. A doença periodontal foi induzida pelo processo de ligadura dental. Os animais foram observados aos 7, 14 e 28 dias após a 1ª administração do zoledronato. Foram realizadas análises histológicas e histométricas da região de furca e da crista-óssea foram realizadas. A formação de sequestros ósseos foi observada nos grupos que utilizaram zoledronato sozinho ou associado a ingestão do chá verde. Embora tenha havido formação desta necrose óssea, o zoledronato apresentou um efeitos protetor do tecido ósseo nos períodos iniciais da análise, principalmente na região de furca. Além disso, o zoledronato tem a capacidade de reverter os efeitos reabsortivos causados pela ingestão de chá verde.

Palavras-chave: Bisfosfonato. Doença periodontal. Chá verde.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the intake of green tea in the treatment of periodontal disease induced in rats with intravenous administration of zoledronic acid . A total of 60 male Wistar rats divided into four groups (G1) to control periodontal disease (G2) Application of zoledronate with periodontal disease (G3) intake of green tea and periodontal disease (G4) applying zoledronate , intake green tea with periodontal disease. The animals in group 3 and 4 were treated with bisphosphonates , at a dose of 35 mg / kg zoledronate intravenously. Green tea is available daily . Periodontal disease was induced by ligation dental procedure . The animals were observed at 7, 14 and 28 days after the 1st administration zolendronate . We performed histological and histometric the furcation area and crest - bone were performed. The kidnappings bone formation was observed in the groups using zolendronate alone or associated with intake of green tea . Although there was formation of this bone necrosis , the zolendronate presented a protective effect of bone tissue in the initial analysis , mainly in the furcation area . In addition, the zolendronate is able to reverse the effects caused by resorption intake of green tea.

Keywords : Bisphosphonate . Periodontal disease. Green tea.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO/REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2	OBJETIVOS.....	11
2.1	OBJETIVO GERAL.....	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.2	LIGADURA DENTAL.....	12
3.3	ADMINISTRAÇÃO DO CHÁ VERDE.....	13
3.4	EUTANÁSIA ANIMAL E PREPARAÇÃO DO TECIDO.....	13
3.5	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	13
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4	RESULTADOS.....	15
4.1	ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	15
4.1.1	GRUPO CONTROLE.....	15
4.1.2	GRUPO ZOLENDRONATO.....	15
4.1.3	GRUPO CHÁ VERDE.....	17
4.1.4	GRUPO ZOLENDRONATO + CHÁ VERDE.....	18
4.2	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	19
4.2.1	REGIÃO DE FURCA.....	20
4.2.2	REGIÃO DE CRISTA ÓSSEA.....	23
5	DISCUSSÃO.....	26
6	CONCLUSÃO.....	29
	REFERÊNCIAS.....	30

1 INTRODUÇÃO / REVISÃO DE LITERATURA

A ação antirreabsortiva dos bifosfonatos (BFs) sobre o tecido ósseo tem contribuído para a ampla indicação destes medicamentos no tratamento de diversas doenças ósseas, tais como a osteoporose, doença de Paget e mieloma múltiplo, bem como metástases ósseas associadas a neoplasias malignas de mama e de próstata. (COXON et al., 2006). Entretanto, apesar dos comprovados benefícios desses fármacos no tratamento de tais doenças, estudos demonstram um grave efeito colateral, denominado osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bifosfonatos, ou BRONJ (*Biphosphonate Related Osteonecrosis of the Jaw.*) (GOYTIA et al., 2009).

A BRONJ caracteriza-se pela exposição óssea dos maxilares por um período maior que oito semanas em pacientes que façam ou tenham feito uso de bifosfonatos e que não tenham recebido tratamento radioterápico na região de cabeça e pescoço. (RUGGIERO et al., 2009). A lesão pode ser assintomática no início e até extremamente dolorosa em estágios mais avançados, estando acompanhada de sinais clínicos como ulceração, edema, supuração e presença de fistula intra ou extrabucal devido à infecção secundária. (MARX et al., 2005; OTTO et al., 2010). Nos exames por imagem visualiza-se, por vezes, uma lesão osteolítica, não raro envolvendo fratura patológica de mandíbula. (MARX et al., 2005; MARX et al., 2009).

Embora também tenham sido relatados casos de BRONJ induzida pelo uso prolongado de bifosfonatos menos potentes, administrados por via oral, a maior parte das ocorrências de BRONJ deve-se ao uso de bifosfonatos altamente potentes, o Pamidronato e o Zoledronato, ambos administrados por via endovenosa para o tratamento de doenças malignas. Estudos epidemiológicos apontam para uma incidência de BRONJ entre 0,8 e 12% induzida por Pamidronato e Zoledronato (contra 0,1% induzidas por bifosfonatos de uso oral. (BAMIAS et al., 2005; DIMIPOULOS et al., 2006; RUGGIERO et al., 2004; MARX et al., 2005; BAMIAS et al., 2005; BAGAN, 2006; DIMITRAKOPOULOS, 2006; MARX; CILLO; ULLOA, 2007; OTTO et al., 2010; LO et al., 2010).

A fisiopatologia da BRONJ não está totalmente esclarecida, mas acredita-se que a capacidade dos bifosfonatos de suprimir a remodelação óssea, por meio da indução dos osteoclastos à apoptose torne o osso dos maxilares acelular e

avascular. Além disso, citam-se também outros mecanismos de supressão da remodelação, como a inibição do recrutamento e diferenciação de células precursoras de osteoclastos, bem como a inibição da angiogênese. (COXON et al., 2006; GOYTIA et al; 2009; SARATHY et al, 2005). Outro importante efeito dos bifosfonatos associado à fisiopatologia da BRONJ é a toxicidade dessa substância ao tecido mole, levando queratinócitos da mucosa oral à apoptose o que facilita a exposição do osso subjacente danificado ao meio bucal. (RESKA et al., 2001; LANDESBURG et al., 2008),

Dentre os principais fatores de risco elencados pela Associação Americana de Cirurgia Oral e Maxilofacial (AAOMS) para BRONJ (RUGGIERO et al, 2009; OTTO et al; 2010), estão: a classificação do fármaco, levando em conta sua potência e via de administração; e a presença de um agente desencadeador (MARX et al, 2007, RUGGIERO et al, 2009), o qual atua como um gatilho ao expor o tecido ósseo acelular e avascular. O principal agente desencadeador relatado é a extração dentária (MARX et al, 2005; DIMOPOULUS et al, 2008; BOONYPAKORN et al, 2007), cuja indicação está diretamente relacionada com o comprometimento dos tecidos periodontais (RUGGIERO et al, 2004, FICARRA et al, 2005, MARX et al, 2007). Ficarra et al (2005) diagnosticaram BRONJ em 9 pacientes que passaram por exodontias devido à doença periodontal. De todos os casos de BRONJ relatados por Marx et al (2005) que foram desenvolvidos após exodontias, 84% das extrações eram por indicação periodontal. Além disso, a presença da doença periodontal, independente de levar a extração do dente, já é considerada por si só um fator de risco para BRONJ, em virtude da presença do biofilme bacteriano (MARX et al 2007; RUGGIERO et al, 2009).

A doença periodontal tem altas taxas de prevalência na população mundial adulta, sendo a segunda principal doença dentária (PETERSEN; OGAWA, 2005; ALBANDAR et al, 1999). Sua patogênese inicia-se com formação do biofilme microbiano, que se adere a superfície do dente supragengival (DARVEAU et al, 1997; ZIJNGE et al, 2010; GREENSTEIN, 2000), ocorrendo a colonização por bactérias gram-positivas aeróbias como *Streptococcus sp.* (ZIJNGE et al, 2010), que possuem potencial para ativar a resposta inflamatória da gengiva em torno do dente, conhecida como gengivite (KINANE, 2001). A gengivite pode frequentemente preceder a periodontite (KINANE, 2001), já que o biofilme poderá invadir a porção subgengival (ZIJNGE et al, 2010; DARVEAU et al, 1997; KINANE, 2001). Com a

maturação do biofilme ocorrerá à transição de bactérias gram-positivas aeróbias para gram-negativas anaeróbias como *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (ROGERS et al, 2007; ZIJNGE et al, 2010; DARVEAU et al, 1997; KINANE, 2001; GREENSTEIN, 2000; VAN DYKE; SERHAN, 2003).

De fato, a presença de bactérias provenientes da doença periodontal colonizando o tecido ósseo avascular é um achado comum entre portadores de BRONJ. SEDGHIZADEH e colaboradores analisaram o osso necrótico removido de quatro pacientes com BRONJ em 2008 e de 10 pacientes em 2009 (em todos eles foi possível verificar grandes áreas de biofilme bem desenvolvido onde foram identificadas bactérias do gênero *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Selenomas* e *Bacillus* que consistem em gram-positivas e gram-negativas, bem como aeróbios e anaeróbios que são encontrados especificamente na doença periodontal). Vale ressaltar que essas bactérias não foram encontradas somente na superfície do osso, mas também em toda a sua extensão, visualizada por meio de cortes transversais (SEDGHIZADEH et al, 2008; SEDGHIZADEH et al, 2009).

Em indivíduos sem alterações sistêmicas, a presença de tais bactérias gera uma resposta inflamatória e imunológica (DARVEAU et al, 1997; GREENSTEIN, 2000; KINANE, 2001; ROGERS et al, 2007) que resultam na destruição tecidual e a reabsorção óssea alveolar (GEMMEL 1997; GREENSTEIN, 2000; KINANE, 2001; VAN DYKE; SERHAN, 2003; VAN DYKE, 2008; ROGERS et al, 2007;). Em indivíduos que fazem uso de bifosfonatos e são portadores de doença periodontal esta intensa atividade reabsortiva pode atrair um grande número moléculas de bisfosfonatos para o osso alveolar, uma vez que o fármaco se concentra em áreas de intensa remodelação. Sugere-se que a resposta ocasionada pela doença periodontal e a íntima relação entre o bisfosfonato e a cessação da reabsorção óssea dos maxilares desses pacientes, tenham um efeito cumulativo na formação de um osso acelular e necrótico, que poderá ser agravada se houver manipulação cirúrgica dos tecidos moles (MARX et al, 2005) culminando na BRONJ.

O tratamento periodontal inicial ou básico é realizado por meio da remoção de biofilme, depósitos bacterianos calcificados da superfície dos dentes e de suas raízes, por meio de procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR). A eliminação das bactérias permite que o tecido mole possa se recuperar e

reorganizar, controlando a progressão da doença. Ainda é considerado o meio mais eficiente de controle da doença (IOANNOU et al., 2009).

A realização da terapia periodontal básica, realizada com instrumentos mecânicos convencionais muitas vezes pode ser prejudicada pelo acesso incompleto às bolsas periodontais e a desinfecção destas áreas de doença pode ser incompleta.

As opções de tratamento da BRONJ descritas na literatura variam conforme a área médica de abordagem. Clark et al. (2007) concluíram que não existe um tratamento único que seja eficaz e sugere que a combinação de ciclos de antibioticoterapia com tratamentos cirúrgicos simples oferece a melhor hipótese de cura. Assim, antes de iniciar a terapêutica com bifosfonatos intravenosos, o doente deve ser submetido a um exame cuidado da cavidade oral, com otimização da saúde periodontal. (LOPES, 2009).

Considerando-se o crescente número de casos de BRONJ e da alta prevalência de doença periodontal na população adulta, o presente estudo pretende verificar a ação do procedimento de raspagem e alisamento radicular associado à ingestão de chá verde na resposta do tecido periodontal, em ratos tratados com ácido zoledrônico. (MARX et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da ingestão de chá verde no tratamento de doença periodontal induzida, em ratos submetidos à administração endovenosa (EV) de ácido zoledrônico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a severidade da doença periodontal induzida quando associada à administração EV do ácido zoledrônico;
- Analisar o padrão de reparação da doença periodontal frente à administração do BF, da ingestão de chá verde, bem como da associação de ambos, por meio de análise morfológica microscópica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizados para este experimento 60 ratos *Wistar* machos, pesando entre 350g e 400g, com idade de 5 meses. Todos os animais receberam cuidados humanos, em um ambiente controlado com temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo de claro-escuro de 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração padrão (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo e micronutrientes em concentrações adequadas) e água *ad libitum*. Os ratos foram acondicionados em caixas plásticas (5 ratos por caixa) e foram aleatoriamente divididos em 4 grupos:

- (G1) Controle com doença periodontal;
- (G2) Aplicação de zoledronato com doença periodontal;
- (G3) Ingestão de chá verde, com doença periodontal;
- (G4) Aplicação de zoledronato, ingestão de chá verde, com doença periodontal.

Cada grupo contou com uma amostragem de 5 animais cada, seguindo os tempos de análise de 7, 14 e 28 dias. Os animais do grupo 2 e 4 que foram tratados com bifosfonatos, receberam a dose de 35 mg/kg de zoledronato (ZOMETA® - Novartis) em 0,9% de NaCl por via endovenosa, na artéria caudal, com total de 5 aplicações de 15 em 15 dias. (HOKUGO et al., 2010).

Para o desenvolvimento da doença periodontal os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura dental, após a 3ª aplicação do medicamento. Sete dias após, a ligadura foi removida, e na mesma sessão, todos os animais dos diferentes grupos foram submetidos ao procedimento de RAR, realizados com cureta de *Gracey*.

3.2 LIGADURA DENTAL

Para a realização do procedimento de ligadura dental foi utilizado um suporte adaptado para manter o animal com a boca aberta, posicionando a língua de tal forma que deixasse livre o acesso ao primeiro molar inferior. Este procedimento foi realizado sob anestesia geral com quetamina e xilazina. O primeiro molar inferior esquerdo de cada animal recebeu uma amarração com linha de algodão número 20,

posicionado delicadamente no sulco gengival (GRAVES et al., 2008). Após 7 dias, a amarra foi removida, e o tratamento proposto foi iniciado.

3.3 ADMINISTRAÇÃO DO CHÁ VERDE

O chá verde foi preparado a partir de 3g de folha seca, vendido comercialmente (Mate Leão), para 1000ml de água filtrada. O chá permaneceu em infusão a 60 graus por um período de 10 minutos. Em sequência foi esfriado e colocado nas mamadeiras para o consumo dos animais, em substituição a água.

3.4 EUTANÁSIA ANIMAL E PREPARAÇÃO DO TECIDO

Todos os animais foram eutanasiados seguindo os períodos de análise de cada grupo (7, 14 e 28 dias), por inalação de CO₂. Em sequência, as mandíbulas foram removidas e pré-fixadas em formalina a 10%, neutra e tamponada, por 96 horas. Após este período, foi iniciada a descalcificação em EDTA a 10%. Com a completa descalcificação, a mandíbula foi seccionada longitudinalmente. Em seguida, a peça foi processada pela técnica de inclusão em parafina. As seções histológicas foram cortadas a 4µm e coradas pela técnica da hematoxilina-eosina e Goldner para avaliação histomorfométrica.

3.5 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Imagens das características estruturais do tecido periodontal foram adquiridas utilizando microscopia ótica de luz (Microscópio Nikon, Eclipse 80i. Japão). Medidas dos parâmetros morfométricos foram realizadas usando o software Image PRO PLUS para Windows 5.0 (Media Cybernetics, Inc, Silver Spring, MD, USA). As medidas foram:

- distância entre junção cimento-esmalte e a crista óssea (foi traçada uma linha reta entre o 1º e 2º molar, na região entre a junção amelo-cementária (JAC) e outra linha perpendicular a esta, partindo da crista óssea alveolar (COA) (WILLIAMS et al., 1985);
- distância entre o centro da região de furca e o ponto central do tecido ósseo localizado na região

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey. Para todas as análises, valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE HISTOLÓGICA

4.1.1 Grupo controle

Aos 7 dias observa-se tecido epitelial íntegro e presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo do periodonto de proteção. Aos 14 dias o processo inflamatório intensifica-se, promovendo aumento do número e calibre dos vasos sanguíneos. Neste período também é observada desestrutura dos epitélios do sulco e juncional, com a emissão de cristas para o tecido conjuntivo. (Fig.1).

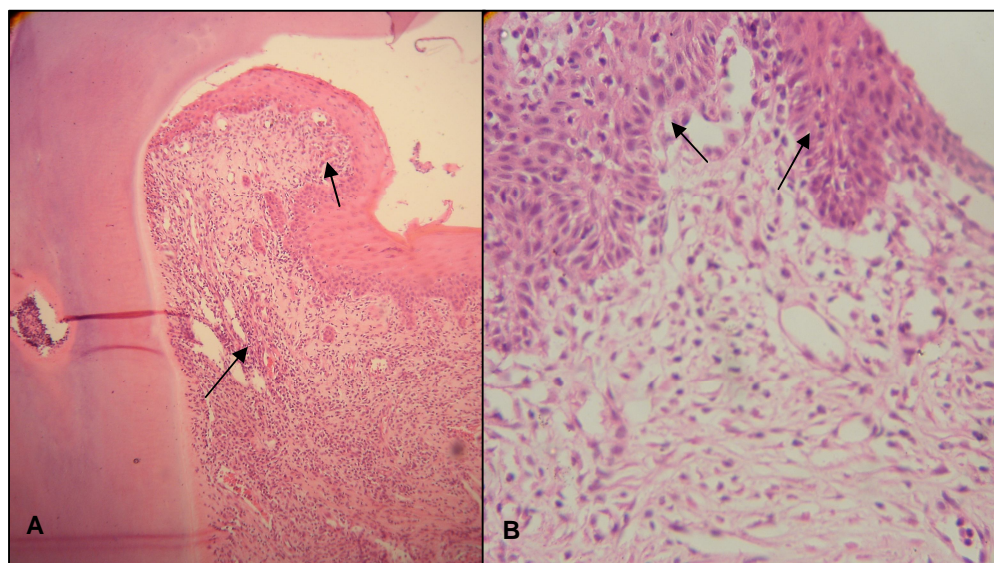


Figura 1 – Presença de infiltrado inflamatório (setas), em A, aos 7 dias. Em B, aos 14 dias, presença de cristas epiteliais no epitélio oral (setas). Coloração em HE. Aumento de 4x em A e 40x em B.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Grupo zolendronato

Aos 7 dias de tratamento já são observados sequestros ósseos na região de furca, indicando o processo de reabsorção óssea irregular causado pelo zolendronato. Aos 14 dias a formação de sequestros aumenta, com a diminuição do tamanho dos fragmentos. Aos 28 dias o padrão de destruição tecidual permanece (Fig. 2)

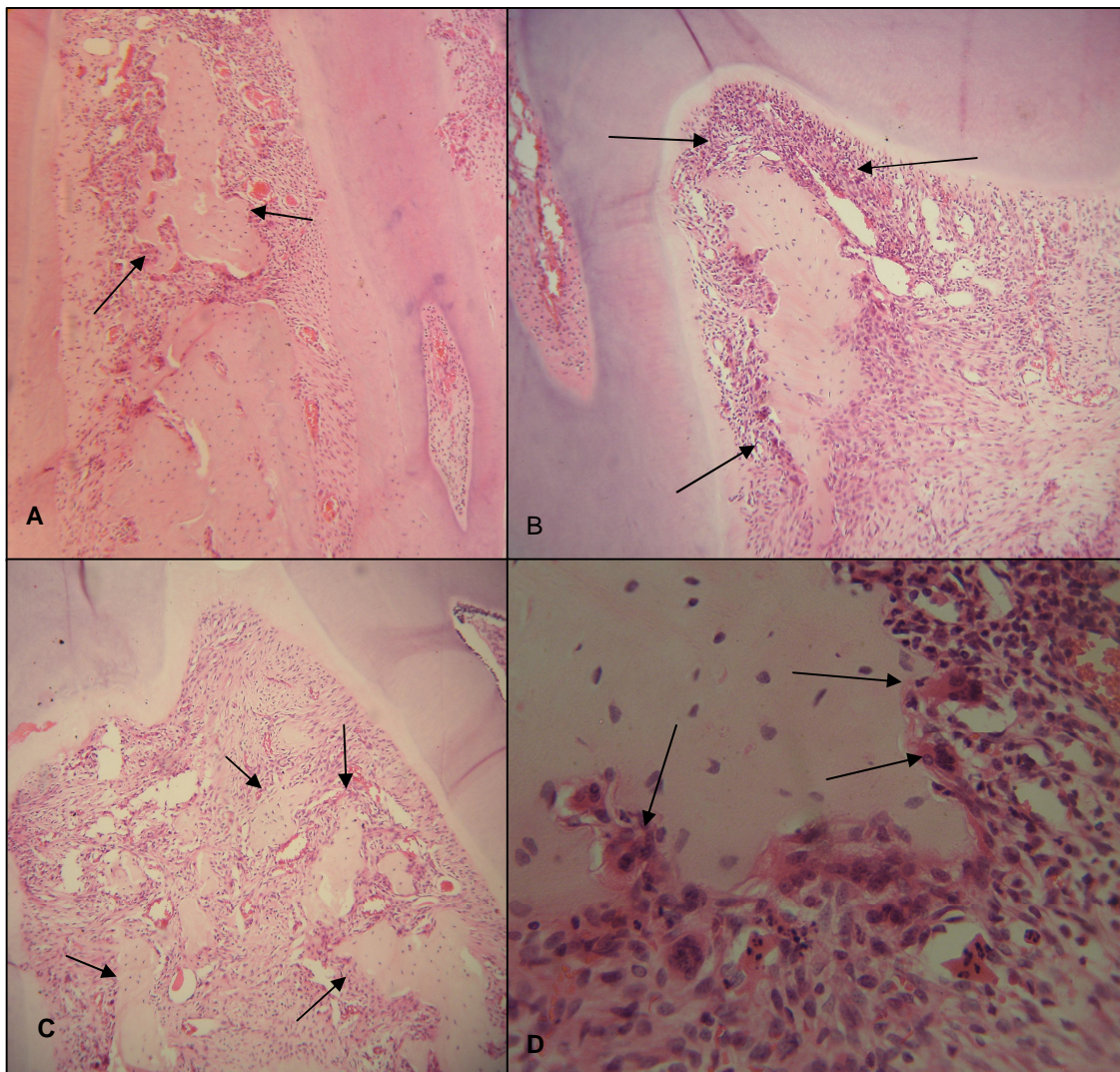


Figura 2 – Em A, aos 7 dias há a formação de sequestros ósseos (setas), rodeados por intenso infiltrado inflamatório (setas), em B. Aos 14 dias (C) nota-se que os sequestros ósseos aumentam (setas). Em D, aos 28 dias, a presença de osteoclastos (setas) permanece em determinadas regiões. Coloração em HE, aumento de 4x em A, B e C e 40x em D.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Grupo chá verde

O grupo que ingeriu chá verde mostra intensa reabsorção de tecido ósseo, acompanhado por intenso infiltrado inflamatório e desorganização epitelial, características observadas nos três períodos analisados (Fig. 3).

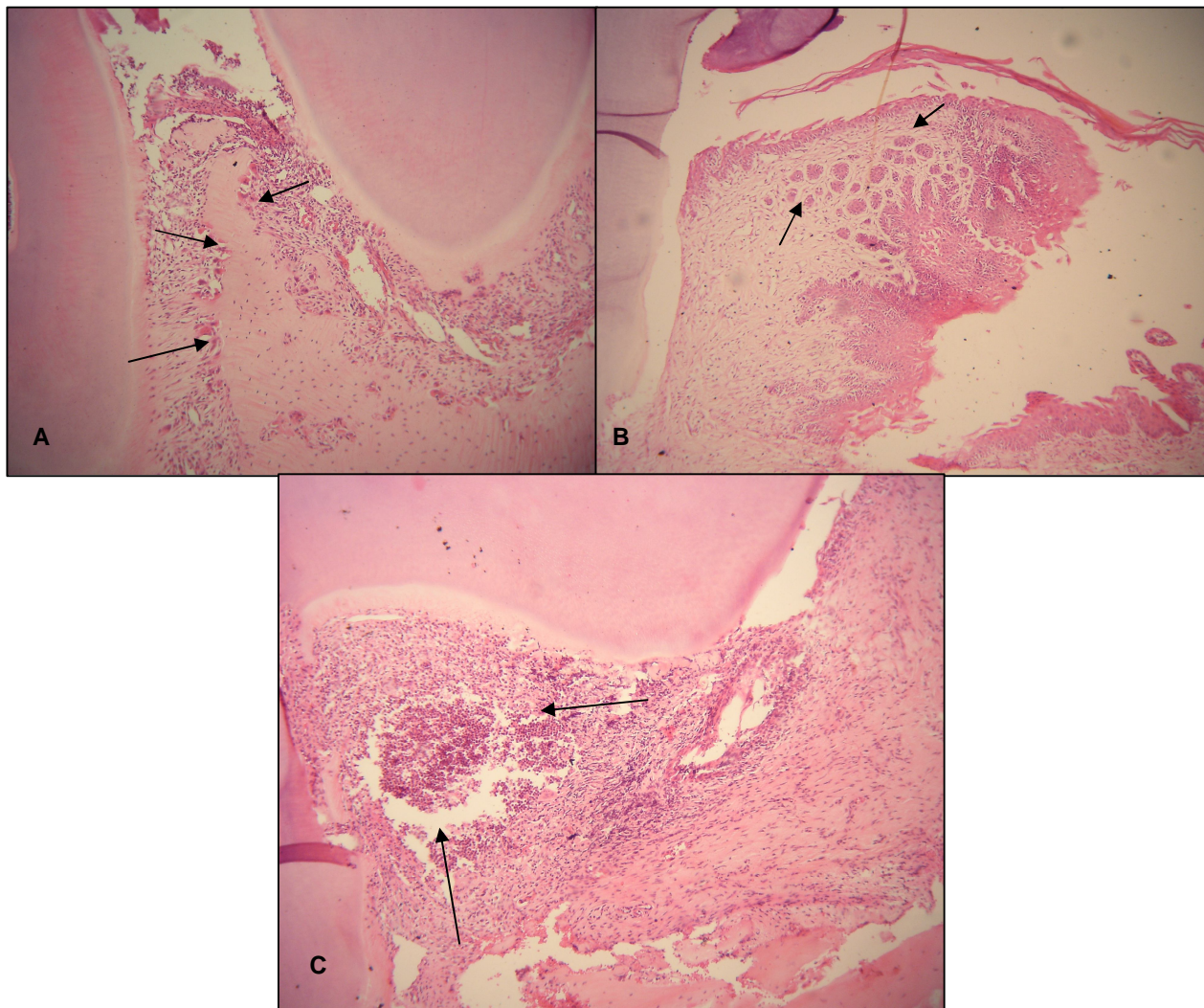


Figura 3 – Em A, aos 7 dias o chá verde promove intenso processo de reabsorção, com a presença de grande quantidade de osteoclastos e suas lacunas de Howship (setas). Em B, aos 14 dias são observadas áreas de grande desestruturação do epitélio, com a formação de pequenas ilhas epiteliais no interior do tecido conjuntivo (setas). Em c, aos 28 dias, a presença de intenso infiltrado inflamatório (setas) permanece. Coloração em HE. Em A e B aumento de 4x. Em C, aumento de 40x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Grupo zolendronato + chá verde

Aos 7 dias a associação do zolendronato com chá verde já evidenciava a presença de sequestros ósseos, semelhante aos encontrados naquele que utilizou somente zolendronato. Aos 14 dias, além das alterações ósseas evidentes, intensas alterações epiteliais também ocorrem, tornando este epitélio irregular, possibilitando a entrada de microrganismos para o conjuntivo com maior facilidade. Aos 28 dias as alterações epiteliais e ósseas continuam (Fig. 4).

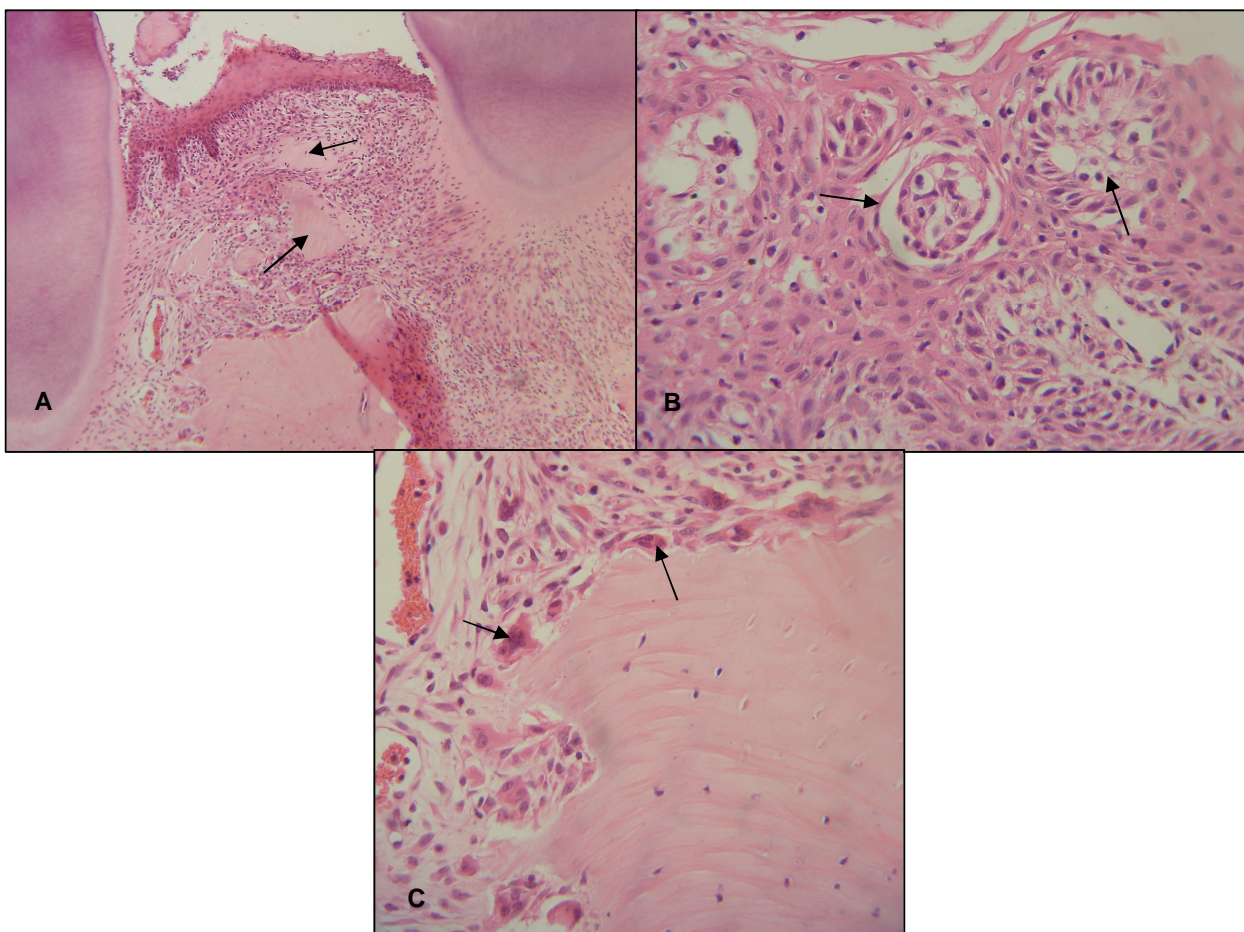


Figura 4 – Em A, aos 7 dias, nota-se a presença de sequestros ósseos (setas), rodeados por infiltrado inflamatório. Em B, aos 14 dias, nota-se alteração do padrão histológico do epitélio (setas). Em C, aos 28 dias, presença de grande quantidade de osteoclastos (setas), continuando o processo de reabsorção óssea. Coloração por HE. Em A aumento de 4x. Em B e C aumento de 40x.
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

A análise morfométrica foi realizada em duas regiões: do centro da área de furca até o tecido ósseo e da junção cemento-esmalte (JCE) até a crista óssea, entre 1º e 2º molares. Para esta medida foi traçada uma linha que liga a JCE 1º molar à JCE do segundo molar. Do centro desta distância é traçada uma linha até a crista óssea (Fig. 5).



Figura 5 – Esquema representativo da forma de cálculo para a distância da JCE até a crista óssea.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise das medidas das estruturas observadas estão representadas nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Médias e desvio-padrão ($m \pm dp$) da distância entre centro da área de furca e crista óssea, nos diferentes grupos, aos 7, 14 e 28 dias.

		Tratamentos			
		Controle	Zolendronato	Chá verde	Zolendronato + Chá verde
Períodos	7 dias	1078,25±44,54	394,45±63,38	1409,02±352,30	491,11±151,03
	14 dias	1623,13±504,74	683,55±23,97	1192,66±448,31	500,16±103,06
	28 dias	1581,81±99,38	961,46±284,41	1563,69±270,35	1275,28±590,68
N		5	5	5	5

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Médias e desvio-padrão ($m \pm dp$) da distância da JCE e crista óssea, nos diferentes grupos, aos 7, 14 e 28 dias.

		Tratamentos			
		Controle	Zolendronato	Chá verde	Zolendronato + Chá verde
Períodos	7 dias	902,29±489,30	1576,33±303,77	1625±285,43A	1336,05±167,62
	14 dias	1652,84±330,26	1375,31±351,05	2136,76±367,90	1444,18±203,87
	28 dias	1736,92±596,68	1934,01±339,12	1376,06±301,70	1512,37±280,95
N		5	5	5	5

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.1 Região de Furca

Quando foi comparado os diferentes tempos, dentro do mesmo grupo de tratamento notou-se que nos animais controle existiu uma tendência para significância ($p=0,0531$) entre os períodos de 7 e 14 dias, com maior perda de tecido ósseo aos 14 dias de observação. Esta perda óssea na região de furca foi mantida entre os períodos de 14 e 28 dias.

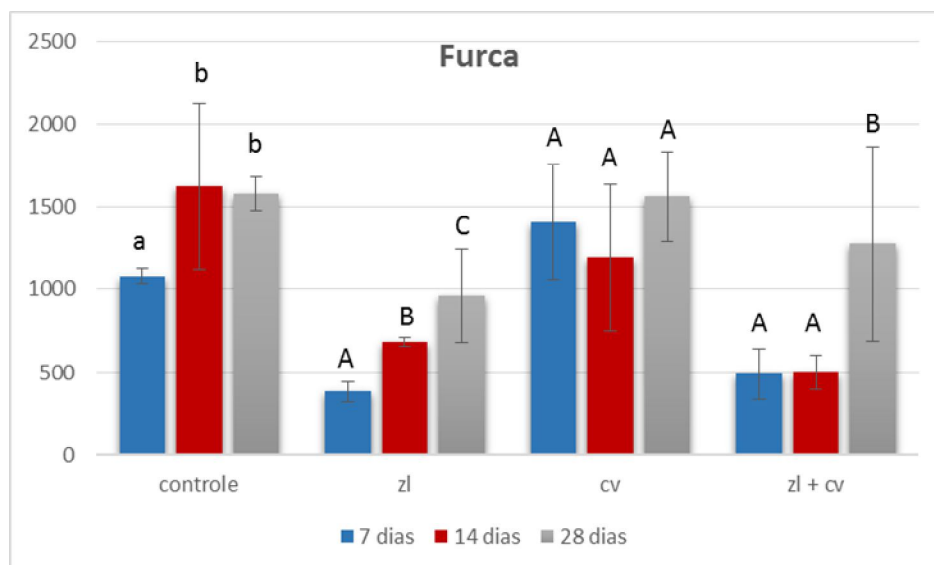


Figura 6 – Diferenças entre os tempos de análise, dentro do mesmo grupo de tratamento, da reabsorção óssea, em μm na região de furca. ANOVA com pós teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam tendência à significância. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação ao grupo que utilizou somente o zolendronato foi notado um crescimento da perda óssea (estatisticamente diferente entre os grupos) à medida que o tempo de observação foi aumentando ($p < 0,005$).

O grupo que recebeu somente chá verde não apresentou diferença na avaliação da perda de tecido ósseo entre os tempos observados ($p > 0,05$). Já quando a aplicação do zolendronato foi associada à ingestão do chá verde notou-se que a perda óssea foi semelhante nos períodos de 7 e 14 dias, aumentando de forma intensa no período de 28 dias ($p < 0,05$) (Fig.6).

Na comparação entre os diferentes tipos de tratamento, no período de 7 dias, nota-se que a aplicação de zolendronato promoveu uma proteção ao tecido ósseo, diminuindo o processo de reabsorção, quando comparado ao controle ($p < 0,001$). Esta mesma diferença foi observada quando o zolendronato foi associado à ingestão do chá verde. Não foi observada diferença entre a perda óssea encontrada no controle e no grupo que fez a ingestão do chá verde (Fig.7).

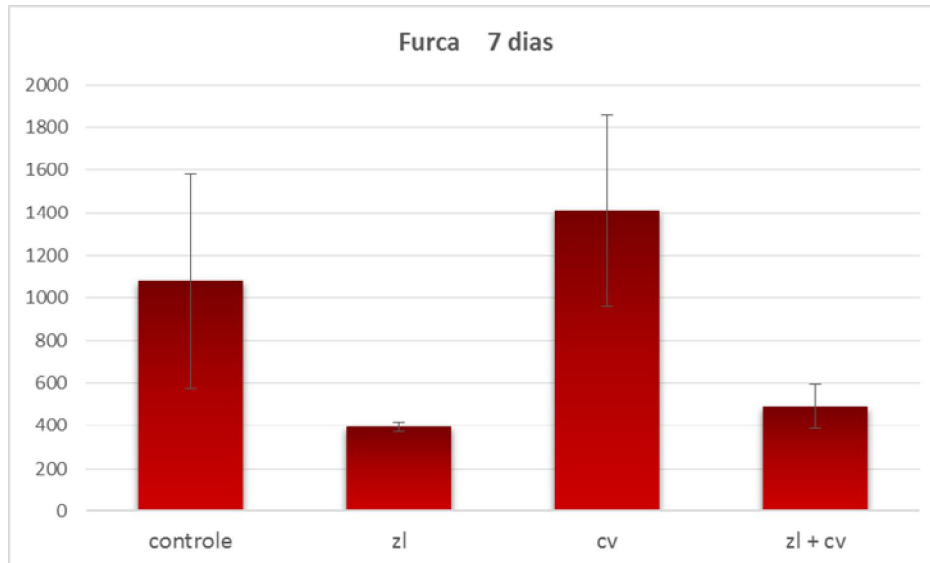


Figura 7 – Reabsorção do tecido ósseo na região de furca, em µm, entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 7 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No período de 14 dias de tratamento o padrão de perda óssea mantém-se semelhante ao período de 7 dias, sendo que a perda óssea no controle e animais que ingeriram chá verde é semelhante, mas são muito maiores que nos grupos que utilizaram somente zolendronato ($p < 0,05$) e na associação do zolendronato com o chá verde ($p < 0,01$) (Fig.8).

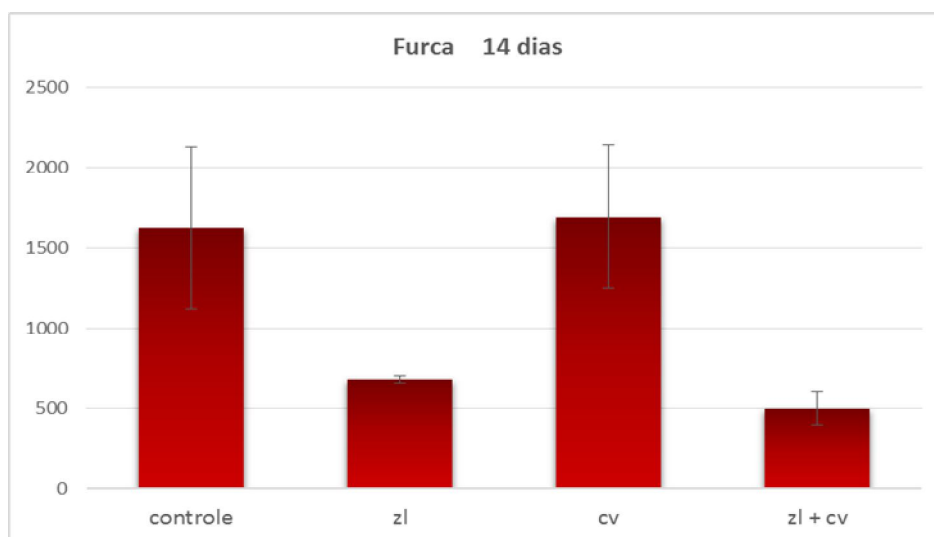


Figura 8 – Reabsorção do tecido ósseo na região de furca, em µm, entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 14 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Aos 28 dias de tratamento observa-se um processo de estabilização da perda óssea, tornando estatisticamente semelhante entre os grupos analisados ($p>0,05$) (Fig.9).

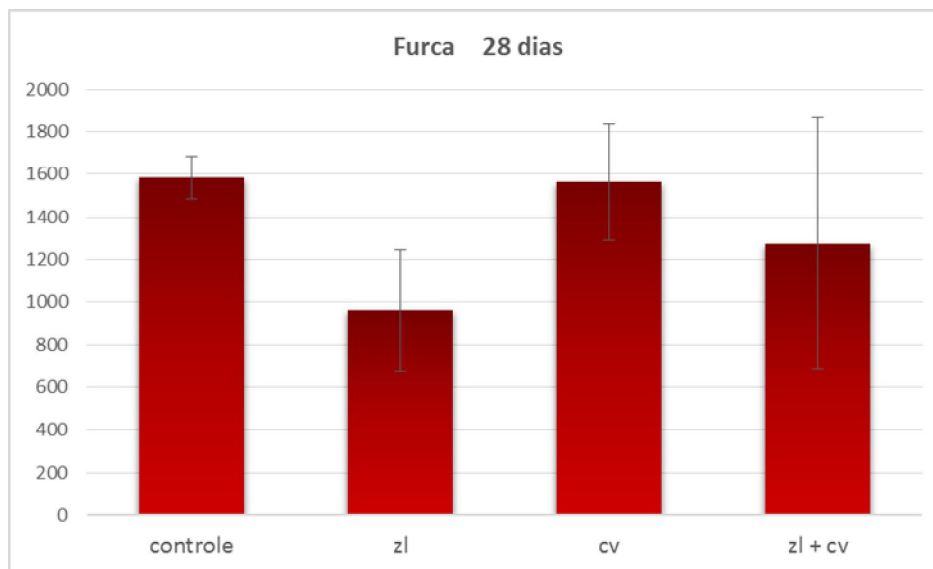


Figura 9 – Reabsorção do tecido ósseo na região de furca, em μm , entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 28 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2 Região de crista óssea

Comparando-se o tempo dentro do mesmo tipo de tratamento pode-se notar que houve um aumento da perda óssea no grupo controle do período de 7 para 14 dias, com tendência à significância ($p=0,07$). Nos períodos de 14 e 28 dias a perda óssea foi semelhante.

Para o grupo que realizou tratamento com zolendronato a perda óssea mante-se semelhante nos diferentes períodos analisados ($p>0,05$). Já nos animais que fizeram ingestão de chá verde foi observada uma diminuição da distância entre JCE e crista óssea na passagem dos períodos de 14 para 28 dias ($p<0,05$), tornando semelhante àquela notada aos 7 dias ($p>0,05$).

Quando a associação do zolendronato com o chá verde foi realizada a perda óssea foi semelhante nos períodos analisados ($p>0,05$) (Fig.10).

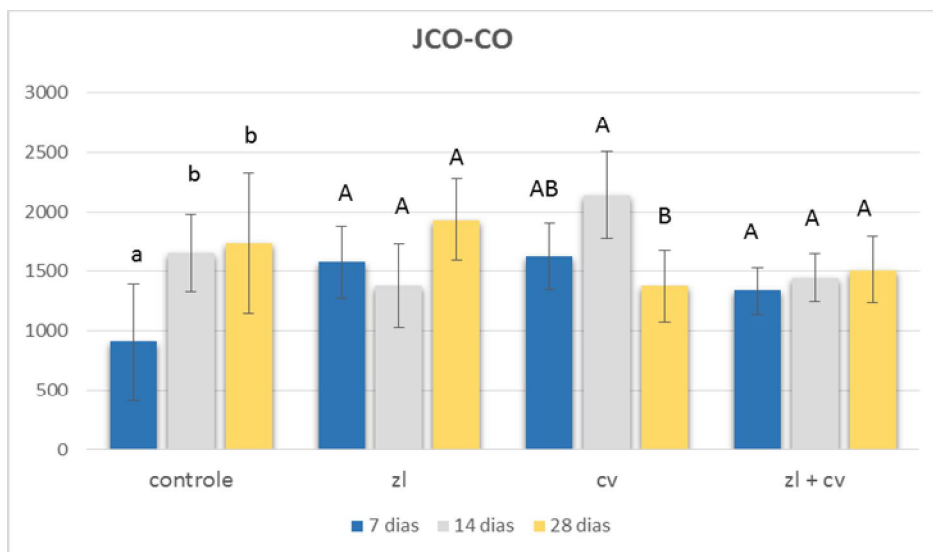


Figura 10 - Diferenças entre os tempos de análise, dentro do mesmo grupo de tratamento, da reabsorção óssea, em μm na região de crista óssea. ANOVA com pós teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes indicam tendência à significância. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Comparando-se os diferentes tipos de tratamentos, aos 7 dias, nota-se que o grupo que ingeriu o chá verde apresentou uma perda de tecido ósseo maior que aquela observada no controle ($p < 0,05$), mas foi semelhante aos demais grupos. Também não notou-se diferença entre os outros grupos analisados e o controle ($p > 0,05$) (Fig.11).

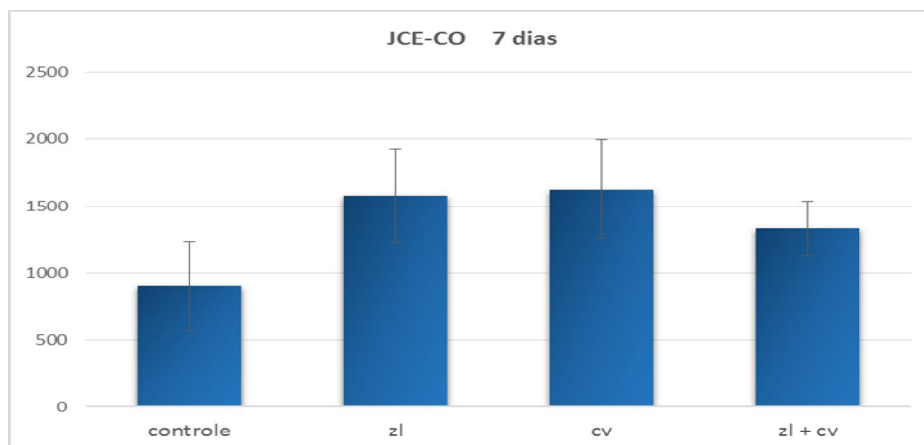


Figura 11 – Reabsorção do tecido ósseo na região de crista óssea, em μm , entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 7 dias.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Aos 14 dias de tratamento o grupo controle mante-se semelhante aos demais tratamentos propostos ($p>0,05$). Já os animais que ingeriram chá verde apresentaram perda de crista óssea maior em relação ao grupo que utilizou somente o zolendronato, e também em relação à associação entre zolendronato e chá verde ($p<0,05$ (Fig.12).

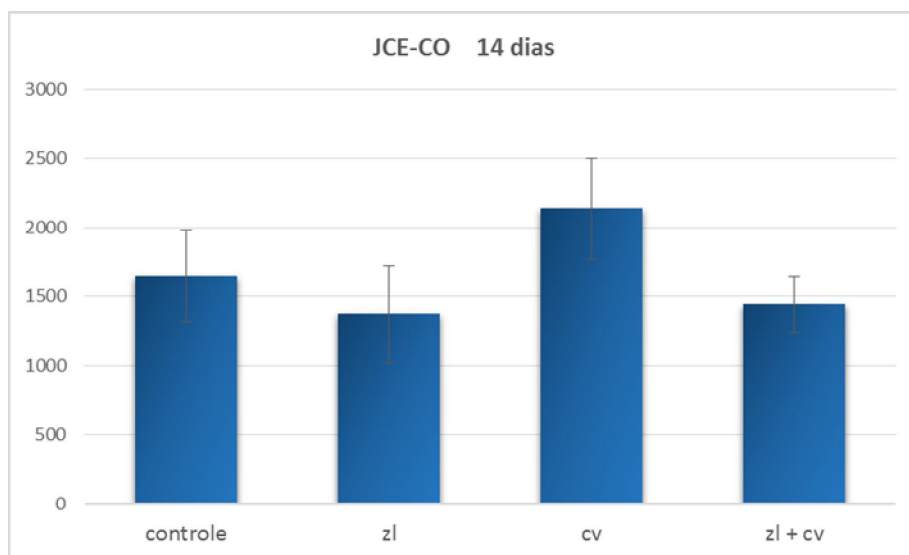


Figura 12 – Reabsorção do tecido ósseo na região de crista óssea, em μm , entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 14 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

No período de 28 dias não se observa diferença entre os grupos analisados ($p>0,05$) (Fig.13).

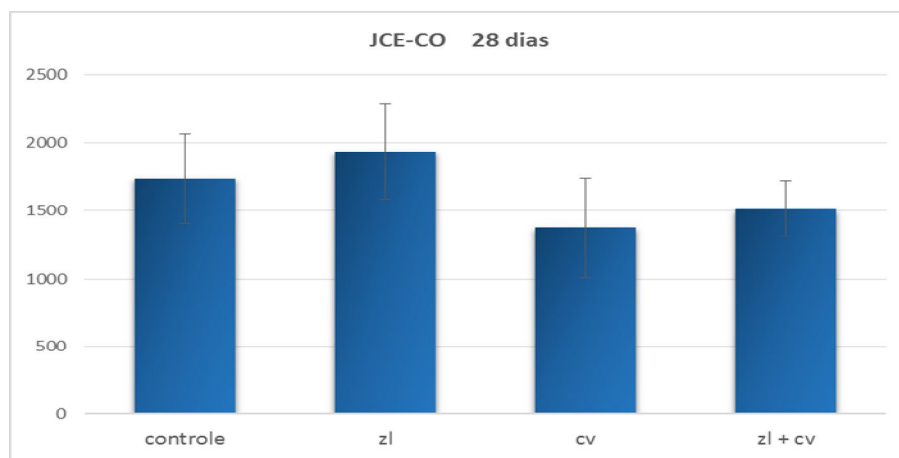


Figura 13 – Reabsorção do tecido ósseo na região de crista óssea, em μm , entre os diferentes tratamentos utilizados, aos 28 dias.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Os bisfosfonatos são um grupo de agentes farmacológicos utilizados com funções anti-osteoclástica, anti-reabsorção, em desordens do metabolismo do cálcio e hipercalemia de caráter maligno (FLEISCH, 1998). Utilizamos o bisfosfonato (zolendronato) neste trabalho para verificar se ação anti-reabsortiva ocorreria quando houvesse o desenvolvimento de doença periodontal. Conjuntamente analisamos a ação da ingestão de chá verde, que possui ação antiinflamatória na doença periodontal isolada, e quando este chá foi associado ao bisfosfonato.

Alguns efeitos colaterais destes medicamentos foram observados. Quando administrado por via oral, os BFs podem induzir úlceras recorrentes com sensação de ardor e bolhas na cavidade oral, esofagite erosiva, estenose esofágica, úlceras gástricas e dor abdominal (KHARAZMI, 2012). Estas alterações são causadas em decorrência da desorganização epitelial produzida pelo bisfosfonato. Embora nossa administração tenha sido via endovenosa, as análises histológicas também mostraram que alterações epiteliais ocorrem quando o medicamento é utilizado.

No entanto, o efeito colateral mais grave, a osteonecrose dos maxilares relacionada ao uso de bifosfonatos, é vista mais comumente após a administração intravenosa de bisfosfonatos nitrogenados, tais como o pamidronato e zoledronato (FORTUNA et al., 2012). Processos que caracterizam osteonecrose, como a formação de sequestros ósseos, foram observados nos animais que receberam o medicamento nesta forma de administração.

A formação de pequenos sequestros ósseos foram observadas principalmente na região de furca. A ocorrência mais frequente destes sequestros nesta área talvez possa ser explicada pela quantidade de tecido ósseo na região de furca ser maior que aquela presente na região de crista óssea. Na área de crista óssea a tendência é ocorrer perda de tecido ósseo em altura. Esta situação pode justificar a perda de tecido ósseo na região de crista óssea ter sido maior que na região furca.

Os polifenóis do chá verde demonstraram ser capaz de inibir o desenvolvimento de placa bacteriana, produzindo hidrofobicidade na superfície celular e sua capacidade de produzir sacarose, que permite a formação de placa bacteriana. (OOSHIMA et al., 1994).

Para tratamento da doença periodontal existe a necessidade de eliminação de bactérias periodontopatogênicas na total profundidade de bolsas periodontais. Para que este controle possa ocorrer, principalmente nas bolsas mais profundas e estreitas, é fundamental que se realize procedimentos de raspagem e alisamento radicular (JENABIAN et al., 2012). Para que fosse levado em consideração o fato de que a ação isolada da ingestão do chá verde sobre a resposta do tecido periodontal não seria suficiente, realizamos neste estudo, o procedimento de RAR em todos os animais analisados. Portanto, o chá verde atuou como um tratamento adjunto à doença periodontal.

Vários estudos que analisam a ação do chá verde sobre o periodonto utilizam o princípio ativo do chá sobre formas de aplicação local, principalmente na forma de enxaguatórios bucais (KANEKO et al., 1993; HIRASAWA et al., 2002; SAKANAKA; OKADA, 2004). Poucos deles analisam os resultados da ingestão do chá verde sobre o periodonto (NAKAMURA et al., 2009), como foi realizado neste estudo.

O extrato de chá verde pode ter vários efeitos sobre os patógenos e tecidos periodontais, como diminuição do processo inflamatório, e conseqüentemente redução do sangramento, sendo que quanto maior a concentração de catequinas melhor os benefícios para a saúde (VENKATESWARA, et al., 2011). Se há diminuição do processo inflamatório, conseqüentemente a reabsorção óssea também está diminuída. Quando analisamos nossos resultados observamos que na região de furca o chá verde apresentou uma grande perda de tecido ósseo, comparado aos demais grupos. Já na região de crista óssea esta diferença aparece por volta dos 14 dias, com maior perda óssea, até mesmo quando comparado ao controle, mas estabiliza-se novamente aos 28 dias. Nos parece, portanto, que a forma de administração do chá verde mostra uma diferença essencial para a ação sobre o periodonto e as bactérias patogênicas. Talvez sua ação seja efetiva quando a administração é local, e não sistêmica.

Na região de furca pudemos observar claramente que o zolendronato exerce uma ação protética sobre o tecido ósseo, diminuindo o processo de reabsorção, principalmente no período inicial de sua utilização. Como passar do tempo esta ação tende a diminuir, mas ainda é significativa em relação ao controle e ao grupo que fez a ingestão do chá verde. Na área de crista óssea esta proteção ao osso não foi tão evidente, talvez justificada pelas diferenças entre os fatores anatômicos já discutidos anteriormente.

O que nos chamou a atenção é que o zolendronato consegue reverter a ação deletéria do chá verde, fazendo com que os resultados fiquem muito semelhantes à aplicação isolada do zolendronato. De alguma forma, deve haver um bloqueio da atividade do princípio ativo do chá verde.

Assim, verificamos que existem vários fatores que possam interferir com os resultados obtidos, e assim, novos estudos devem ser realizados para buscarmos respostas às diferenças apresentadas entre os vários grupos, e a maneira de ação das substâncias testadas.

6 CONCLUSÃO

Baseando-nos na metodologia utilizada podemos concluir que:

O zolendronato atua como protetor ósseo de forma mais eficiente nos períodos iniciais e tem a capacidade de reverter os efeitos reabsortivos causados pela ingestão de chá verde.

REFERÊNCIAS

ALBANDAR, J. M.; BRUNELLE, J. A.; KINGMAN, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **Journal of the International Academy of Periodontology**, London, v. 70, n. 1, p. 13-29, Jan. 1999.

BAGAN, J. V. et al. Jaw osteonecrosis associated with bisphosphonates: multiple exposed areas and its relationship to teeth extractions. Study of 20 cases. **Journal Oral Oncology**, Amsterdam, v. 42, p. 327-329, 2006.

BAMIAS, A. et al. Osteonecrosis of the Jaw in Cancer After Treatment With Bisphosphonates: Incidence and Risk Factors. **Journal of clinical and experimental oncology**, Henderson, v. 23 p. 8580-8587, 2005.

COXON, E. P., TOMPSON, K., ROGERS, M. J. Recent advances in understanding the mechanism of action of biphosphonates. **Current opinion in pharmacology**, Oxford, v. 6, n. 3, p.307-312, 2006.

DARVEAUN, R. P., TANNER, A., PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 14, p. 12-32, 1997.

DIMITRAKOPOULOS, I. C., MAGAPOULOS, D. K. Bisphosphonates-induced avascular osteonecrosis of the jaws: a clinical repot of 11 cases. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, Copenhagen, v. 35, p. 588-593, 2006.

DIMOPOULOS, M. A. et al. Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid, **Annals of Oncology**, v. 20 p. 117–120, 2009.

FLEISCH, H. Bisphosphonates: mechanisms of action. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v.19, p.80–100, 1998.

FORTUNA, G.; RUOPPO, E.; POLLIO, A.; ARIA, M.; ADAMO, D.; LEUCI, S.; ORABONA, G.D.; MIGNOGNA, M.D. Multiple myeloma vs. breast cancer patients with bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaws: a comparative analysis of response to treatment and predictors of outcome. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v.41, p.222–228, 2012.

GEMMELL, E., MARSHALL, R. I. , SEYMOUR, G. J. Cytokines and prostaglandins in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v.14, p. 112-143, 1997.

GOYTIA, R.N.; SALAMA, A; KHANUJA, H.S. Biphosphonates and Osteonecrosis: Potential Treatmente or Serious Complication. **Orthopaedic physical therapy clinics of North America**, Philadelphia, p. 223-224, 2009.

GRAVES, D. et al. The use of rodent models to investigate host-bacteria interaction related to periodontal diseases. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 35 (2), p. 89 – 105, 2008.

GREENSTEIN, G. Nonsurgical periodontal therapy in 2000: A literature review. **The journal of the American dental association**, v.131, p. 1580-1592, 2000.

HIRASAWA, M. et al. Improvement of periodontal status by green tea catechin using a local delivery system: a clinical pilot study. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 37, p. 433-8, 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 Journal of Pharmaceutical Sciences**, London, v. 20, p. 2-6, 2012

KANEKO, K. et al. Effects of tea catechins on oral odor and dental plaque. **Journal of oral therapeutics and pharmacology**, Baltimore, v. 12, p. 189-97, 1993.

KHARAZMI, M.; PERSSON, U.; WARFVINGE, G. Pharmacovigilance of oral bisphosphonates: adverse effects manifesting in the soft tissue of the oral cavity. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v.70, p.2793–2797, 2012.

KINANE, D. F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 25, p. 8-20, 2001.

LANDESBERG, R. et al. Inhibition of Oral Mucosal Cell Wound Healing by Bisphosphonates. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 66, n.5, p. 839–847, 2008.

LO, J.C. et al. Predicting Risk of Osteonecrosis of the Jaw with Oral Biphosphonate Exposure (PROBE) Investigators. Prevalence of osteonecrosis of the jaw in patients with oral bisphosphonate exposure. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 68, n. 2, p. 243- 53, 2010.

MARX , R.E. et al. Oral Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis: Risk Factors, Prediction of Risk Using Serum CTX Testing, Prevention, and Treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, 2007.

MARX, R. E. et al. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 33, p. 1567-1575, 2005.

MARX, R. Reconstruction of Defects Caused by Bisphosphonate-Induced Osteonecrosis of the Jaws. *American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 67, p. 107-119, 2009.

MARX, R.E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: A growing epidemic. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v 61, p.1115-1117, 2003.

- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; TAMURA, Y.; HAMADA, S. Reduction of dental plaque deposition in humans by oolong tea extract. **Caries Research**, v.28, p. 146–149, 1994.
- NAKAMURA, H. et al. In vivo Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption. **Journal of periodontal research**, Copenhagen, v. 45, p. 23-30, 2009.
- OTTO et al. Osteoporosis and bisphosphonates-related osteonecrosis of the jaw: Not just a sporadic coincidence e a multi-centre study. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, New Delhi, 2010.
- PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. Strengthening the Prevention of Periodontal Disease: The WHO Approach. **Journal of Periodontology**, v. 76, p. 2187- 2193, 2005.
- PINHEIRO, A. et al. Effect of 830-nm laser light on the repair of bone defects grafted with inorganic bovine bone and decalcified cortical osseous membrane. **Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery**, New York, v. 2, p. 383–388, 2003.
- RESZKA, A. A. et al. Nitrogen-Bisphosphonates Block Retinoblastoma Phosphorylation and Cell Growth by Inhibiting the Cholesterol Biosynthetic Pathway in a Keratinocyte Model for Esophageal Irritation. **Molecular Pharmacology**, Bethesda, v. 59, p.193–202, 2001.
- ROGERS, J. E. et al. Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharde mediated experimental bone loss model for aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.78, p. 1259-1265, 2009.
- RUGGIERO, L.S. et al. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons Position Paper on Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the Jaws—2009 Update. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 67, p. 2-12, 2009.
- RUGGIERO, S. L., et al. Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, New Delhi, v. 62, p. 527-534, 2004.
- SAKANAKA, S.; OKADA, Y. Inhibitory effects of green tea polyphenols on the production of a virulence factor of the periodontal-diseasecausing anaerobic bacterium Porphyromonas gingivalis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, p.1688-92, 2004.
- SARATHY, A. P., BOURGEOSIS, Jr., GOODELL, G. G. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws and endodôntico treatment: two case reports. **Journal of endodontics**, Chicago, v. 31, p. 759-763, 2005.
- SEDGHIZADEH, P. P. et al. Identification of microbial biofilms in osteonecrosis of the jaws secondary to bisphosphonate therapy. **American Association of oral and Maxillofacial surgeons**, Rosemont, v.66, p. 767-775, 2008.

SEDGHIZADEH, P. P. et al. Microbial biofilms in osteomyelitis of the jaw and osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy. **The journal of the American dental associated**, v.140, p. 1259-1265, 2009.

VAN DYKE, T. E. The management of inflammation in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, Chicago, v.79, p. 1601-1608, 2008.

VAN DYKE, T. E., SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: A new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 82, p. 82-90, 2003.

Venkateswara, nome. et al. Green tea extract for periodontal health. **Journal of Indian Society of Periodontology**, Mumbai, v. 15, Issue 1, Jan-Mar 2011, p.18-22.

ZIJNGE, V. et al. Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. **Plos one**, San Francisco, v. 5, p. 1-9, 2010.