

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 20/02/2018.

Índia Olinta de Azevedo Queiroz

Tese de Doutorado

**Análise de propriedades biológicas do MTA
em condição normal e hiperglicêmica**

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba – SP
2017

Índia Olinta de Azevedo Queiroz

**Análise de propriedades biológicas do MTA
em condição normal e hiperglicêmica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Endodontia.

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba – SP
2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

Q3a Queiroz, Índia Olinta de Azevedo.
Análise de propriedades biológicas do MTA em condição normal e hiperglicêmica : influência do diabetes na biomineralização do MTA / Índia Olinta de Azevedo Queiroz. – Araçatuba, 2017
184 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. João Eduardo Gomes Filho

1. Diabetes mellitus 2. Inflamação 3. Cimentos dentários
4. Calcificação fisiológica I. T.

Black D24
CDD 617.67

Dados Curriculares

Índia Olinta de Azevedo Queiroz

Nascimento

19/04/1986 - Caetité/BA

Filiação

Maria Suelly de Souza Azevedo Queiroz

João Queiroz Pinto

2004- 2008:

Curso de Graduação em Odontologia

Universidade Estadual de Montes Claros – UNIMONTES

2010- 2012:

Curso de Especialização em Endodontia

Associação Brasileira de Odontologia (ABO/MG)

2011- 2013:

Mestrado em Ciências Odontológicas, área de concentração
em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

FOA/UNESP

2013- 2016:

Doutorado Ciências Odontológicas, área de concentração
em Endodontia na Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

FOA/UNESP

Associações:

Associação Brasileira de Odontologia

Associação Mineira de Cirurgiões Dentistas

Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

International Association of Dental Research

American Association of Dental Research

Dedicatória

Dedico este trabalho...

A Deus

Pela bênção de viver.....

*"A vontade de Deus nunca irá leva-lo aonde a
Graça de Deus não possa protegê-lo."*

Francisco Cândido Xavier

A minha família...

À minha mãe, **Maria Suelly de Souza Azevedo Queiroz**, “Uma mãe é capaz de ensinar mais do que cem professores.” A minha inspiração, meu alicerce e meu exemplo de vida. Simplesmente a pessoa que não mede esforços para me ver feliz. Obrigado por todos os momentos dedicados a mim, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade e pelo afeto. Mãe, sem você isso não seria possível!!! Amo você!!!

Ao meu pai, **João Queiroz Pinto**, “Na longa jornada da vida muitos mestres encontramos, alguns seguimos, outros abandonamos, dentre todos, um deles é o que mais amamos”. Ao meu herói e meu maior exemplo de simplicidade e bondade. Obrigada por todos os ensinamentos passados, pelo amor, carinho, respeito e por sempre cuidar de mim... Amo você!!!

À minha irmã, **Indira Augusta de Azevedo Queiroz**, “A felicidade está em nossas mãos”. Sua simplicidade, sensibilidade e o jeito como você consegue abrir mão das coisas em função dos outros me fazem enxergar outro lado da vida. Obrigada pelo carinho, atenção e amor... Amo você!!!

À minha irmã, **Indiane Souza de Azevedo Queiroz**. “Pessoas grandes são aquelas que lutam por ideais”. Sua força de vontade, determinação e coragem me inspiram a cada dia. Obrigada por compartilhar comigo sua vida e sempre acreditar em mim. Tenho muito orgulho de ser sua irmã!!! Amo você!!!

Agradecimentos

Especiais

Aos professores responsáveis diretos pelo desenvolvimento deste trabalho...

Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Por simplesmente “ser você”. Por ser não somente um orientador e sim um mentor. Pela preocupação, paciência, respeito, calma e atenção que teve comigo durante toda a minha formação (mestrado e doutorado). Por acreditar em mim mesmo com toda a minha inexperiência. Pela liberdade que sempre me proporcionou para que fizesse minhas próprias escolhas e desenvolvesse minhas atividades. Por todas as vezes que dividir com você meus medos e anseios estando sempre disposto a me ajudar e ouvir. Obrigada por me fazer querer ser uma pessoa melhor. Ter você como meu orientador por todos esses anos foi uma honra e privilégio. Muito obrigada por tudo!!!

Prof. Dr. Edilson Ervolino

“Meu coorientador”, pela forma responsável e atenciosa com que me acolheu desde o meu mestrado, pela maneira como me ajudou, conduzi e orientou em todas as etapas deste trabalho. Muito obrigado pelos ensinamentos em biologia óssea, seu entusiasmo foi um dos motivos que me fizeram procurar um laboratório de biologia óssea nos EUA. Por todas as vezes que em que pode me escutar e me ajudar. Obrigada pela sua amizade e por dividir comigo parte do seu conhecimento.

Prof. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira

Por ser uma inspiração para mim. Pela forma carinhosa como sempre me acolheu e me ensinou, bem como nos momentos onde fui “desabafar” e estava disposta a me ouvir. Pela prontidão em me atender em todos os momentos que precisei. Por confiar e acreditar em mim e por me oferecer uma oportunidade que jamais vou esquecer. Muito obrigada pela amizade, carinho e respeito. Admiro muito você!!!

Prof. Dr. Ivo Kalajzic

Rigor, exigência e competência te definem. Pela maneira como compartilhou comigo seus conhecimentos e experiências em biologia óssea através das aulas, reuniões e experimentos. Pela forma acolhedora como me recebeu

durante meu doutorado sanduíche, tentando do seu jeito fazer com que minha experiência em outro país fosse a melhor possível. Pelos “happy hour” no The Half Door, pelas conversas, conselhos e risadas no “lab time” (especialmente nas sextas-feiras). Muito obrigada por tudo!!!

Aos os grandes responsáveis por **“hold me”** todos esses anos, sem vocês não seria nada...

Thiago Machado, “Algumas vezes na vida, você encontra uma pessoa especial; a que muda sua vida simplesmente por estar nela; a que te faz rir até você não poder mais parar; a que te faz acreditar que realmente tem algo bom no mundo.” Pelo companheirismo, amizade, atenção, carinho, paciência e amor. Por estar sempre ao meu lado, principalmente nos momentos em que mais precisei. E por nunca desistir de mim...Muito obrigada por fazer parte da minha vida!!!

Loiane Massunari, “Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão. “Fiole”, às vezes eu me pergunto o que seria de mim sem você na minha vida para “puxar meu freio” rrsrrsrs.. Foi, sua amizade foi um dos melhores presentes que a pós-graduação me ofereceu. Muito obrigada, pela amizade, confiança, apoio, carinho e atenção que sempre teve comigo. Pelos nossas comilanças nos jantares, almoços e gelatos.. hehehe.. Adoro você “fiole”!!!

Renata Oliveira Samuel, “Amigo é coisa para se guardar do lado esquerdo do peito...” pelos momentos de carinho e amizade que divididos desde o primeiro dia do mestrado. Pelo tempo que passamos juntas, dividindo experiências, dificuldades, sonhos, anseio, desejos e aflições. Pelo seu jeito corajoso de ir atrás de seus sonhos. Por ser a melhor “roommate”. Pelas gargalhadas e lágrimas. Pelas noites regadas a vinho e pizzas. Pelas nossas noites solteiras. Pelas nossas viagens. Pelo carinho com que sempre teve comigo, mesmo com meus defeitos. Obrigada por todos esses anos!!!

Nelci Vieira, “Minha segunda mãe”. A mãezona, a que me escuta, me ajuda, me ensina, me aconselha. Nel, eu não tenho palavras para te descrever, ou descrever o que você representou e representa na minha vida. Obrigada por tudo minha mãezona!!! Amo você!!!

Simone Watanabe, minha eterna amiga/supervisora/orientadora. Japinha, eu devo a você parte da minha formação. Muito obrigada por me ensinar, me apoiar e estar sempre ao meu lado. Serei eternamente grata...

Gabrielly Cristinni Rezende, pela amizade, compreensão e ajuda. Muito obrigada pelo carinho com que sempre me acolheu, principalmente quando estava em Santa Fé. Por me escutar, pelas viagens, pelos tempos alegres/malucos na micro, pelas festas no rancho e pelas nossas comilanças nos jantares, almoços e gelatos...hehehe... Adoro você Gaby!!!

Ludmila Santos, “A vida é marcada pela presença de pessoas queridas e que apesar da distância, ficam sempre em nossos corações”. Lud, esse tempo que estive em Araçatuba, você foi capaz de me ajudar a viver novamente e a lembrar das minhas origens. Muito obrigada por tudo, pela amizade, alegria e carinho. Sinto sua falta...

Gustavo Sivieri de Araújo, “o amigo”, uma pessoa de uma bondade e natureza simples que poucos conhecem, escondido atrás do Professor Sivieri...hehehe...Muito obrigada por ter me deixado conhecer esse seu outro lado e por dividir uma parte da sua vida comigo nos trabalhos, festas, happy hours, drinks e viagens...

Agradecimientos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” – UNESP, na pessoa seu Diretor **Prof. Titular Wilson Roberto Poi** e Vice-Diretor **Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho**, pelo empenho e dedicação com que o conduz.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP representado pelo seu coordenador **Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pela competência e afinco na condução do programa de pós-graduação.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP**, pelo total apoio financeiro para a realização deste trabalho através da concessão da Bolsa de Doutorado (processo nº 2013/06641-8) e da Bolsa de Doutorado sanduíche (BEPE) (processo nº 2014/13750-0).

Aos docentes da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, **Prof. Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, **Dr. Rogério de Castilho Jacinto**, **Prof. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo**, **Prof. Dr. Elói Dezan Júnior**, **Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho**, **Prof. Dr. Mauro Juvenal Nery**, e novamente ao meu orientador **Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho** pelo aprendizado, apoio e contribuição durante minha formação.

Ao Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, representado pelos **Prof. Dr. Edilson Ervolino**, pela oportunidade de realizar o processamento laboratorial imunoistoquímico; pela **Profa. Dr. Sandra Helena Penha de Oliveira**, por me proporcionar realizar todo o meu experimento *in vitro*; e pela **Profa. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles** pela disponibilidade de ceder todo material necessário para análises bioquímicas.

Ao Departamento de Odontologia Infantil e Social da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, representado pelo **Prof. Dr. Alberto Carlos Botazzo Delbem**, por

disponibilizar o laboratório e equipamentos necessários para realizar para análises bioquímicas.

Ao **Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra**, pelas conversas, conselhos e por sempre disposto a ensinar/ajudar. Por dividir seus conhecimentos, experiências e sempre buscar tirar o melhor de cada pessoa. Luciano, obrigada pelos ensinamentos/lições e por ter sido esse exemplo de professor/conselheiro/orientador durante minha formação; e ao **Prof. Dr. Eloi Dezan Júnior**, pela simplicidade, generosidade e paciência em dividir seus conhecimentos clínicos. Pelo seu jeito extrovertido, atencioso e por sempre “pensar” nos seus alunos, buscando ferramentas/meios de nos incentivar a sermos profissionais melhores.

Aos amigos **Wagner Garcez de Melo**, você realmente é o que podemos chamar de um excelente Profissional/Professor. Muito obrigada pela inestimável ajuda durante todos os meus experimentos nos finais de semana, na redação do texto, nas análises estatísticas e no mais importante em dividir comigo seus conhecimentos de forma tão gentil e espontânea; e **Luis Gustavo Narciso**, pela preciosa ajuda durante as coletas sanguíneas.

Aos amigos **Marcos Frozoni** e **Guilherme Bonduki**, pela confiança e por me ajudarem na realização do meu doutorado sanduíche, me proporcionando um crescimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata a vocês pelo que fizeram e pela amizade dispensada à minha pessoa.

Aos amigos do programa de pós-graduação Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Área de Concentração de Endodontia, **Diego Valentim, Ludmila Santos, Loiane Massunari, Gabrielly Rezende, Paulo Tobias, Renata Samuel, Marcelo Wayama, Mariane Azuma, Luciana Louzada, Annelise Katrine, Francine Beneti, Carlos Bueno, Christine Mem Martins, Renan Dal Fabro, Leticia, Camila, Amanda e Vanessa**, e da iniciação científica **Luanna Gonçalves, Larissa Gonçalves e Aline Ávila**, pela amizade e pelos momentos de alegria, conversas, brincadeiras e descontrações proporcionadas.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, **Aline Takamiya, Victor Balera, Dayane Queiroz, Leticia, Carluci Beltran, Maria Fernanda Lopes, Fernanda Demarqui**, pela paciência, apoio, ensinamentos e por sempre estarem dispostos a me ajudar e ensinar. Vou sentir saudades da “Farmaco B” que com certeza é a melhor!!!

Aos funcionários do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, **Nelci Vieira, Cláudia Neves Corrêa, Elaine Cristina Francischini Ferreira e Peterson Moura**, pela amizade, paciência e colaboração, apoio e incentivo. O que seria desse departamento sem a presença de vocês!!!

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Clínica Integrada, **Odair, Dirce e Paulo** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pelo carinho, dedicação e simpatia com que sempre me atenderam todas às vezes. Muito obrigada por me ensinarem e me ajudarem durante as etapas desse trabalho.

Aos funcionários da Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP, **Valéria Queiroz Marcondes Zagatto, Lílian Sayuri Mada e Cristiane Regina Lui Matos**, pela eficiência e presteza de sempre. Obrigada pela ajuda durante minha representação discente e por tudo o que fizeram por mim durante esses anos.

À **Alice e família**, pela amizade e pela forma como me acolheram em Araçatuba; Aos meus amigos de “Moc”, **Amanda Normanha, Geraldo Edson, Rafael Santiago, Paulo Sergio, Lara Mota, Mariana Silveira e Swed**, pela amizade, apoio e carinho sempre.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho!!!

To the responsible for my USA life experience...

To **University of Connecticut Health Center – UCHC**, specially to Center of Regenerative Medicine and Skeletal Development, Department of Reconstructive Sciences of School of Dental Medicine for received and given me the opportunity to develop my PhD and improve my knowledge.

To Professor Dr. **Ivo Kalajzic**, Center of Regenerative Medicine and Skeletal Development, for open his lab and share with me your knowledge and experiences, to be a mentor that gave me the opportunity to know more about bone biology. Thank you for everything!!

To Professor Dr. **Mina Mina** and **Ivana Vidovic**, Department of Craniofacial sciences of School of Dental Medicine, for always be receptive, for the gentleness in share hers knowledge and for all the help in the *in vivo* experiment.

To my co-workers, **Emilie Roeder**, **Xi Wang**, **Paola Vizzarri**, **Brya Matthews**, **Devin Shaheen** and **Mara** for friendship, affection, dedication and sympathy that always had with me. Thanks for sharing yours expertise with me and help me all time and for the fun times together. I hope to see you all again.

To friends from Department of Reconstructive Sciences and Department of Craniofacial sciences of School of Dental Medicine, **Lipin**, **Yalin**, **Zhихua Wu (Lisa)**, **Bharbara** and **Anu** for friendship and attention that always had with me.

To **Dipika Gupta**, **Nidhi Gupta**, **Tulika Sharma**, **Marian George** and **Bandita Adhikari**, my “american/indian family”, thank you for taking care of me during my USA life, to make my life more happy, to teach me another culture and for the drinks and party that we shared. I miss our house, girls!!

To **Dipika Gupta**, roommate and friend, the girl that loves her job, the inspiration for everyone close to her and an example of researcher. A friend that listened me when I was crying and happy, holding me when I was drunk (hehe)

and capable to do everything to see a friend happy. Dipiii, I miss you so much, thanks for everything and as I said I will see you again soon.

To **Emilie Roeder**, for make my life in the lab easier, better and unforgettable, for sharing and teach me in the lab. For the trips together, for your patience, friendship and be an amazing friend....

To **Mariana Quezado**, for help and take care of me when I arrived, for the New York days, for all the happy hours together and for teach me chemistry and mathematics. See you soon in BH, Mari.

To the three Musketeers, **Fani Memi** and **Debargha Bassuli**, for the friendship, for listen me in the bad and good times, for trying to speaking and learning Portuguese, for all the drinks, talking, happy hours, for the new year's day/eve and for be the two most incredible friend that I knew...

To all my other USA/UCHC/World friend, **Fabiana Saoki**, **Martinna Bertolini**, **Alexandro Lima**, **Ivana Vidovic**, **Nilse dos Santos**, **Melissa Car**, **Hank Hrdlicka**, **Yulia Pustovalova**, **Alexandra Pozhidaeva**, **Anushree Vk**, **Guilia Vigone**, **Igor Matic**, **Ryan Russell**, **Sara Acevedo**, **Guivini Gomes**, **Alberto Ortega**, **Scotti Danger Adamson**, **Tosin Quadri**, **Nicole Glidden** and **Anilei Hoare**, **Luciana Arraes**, **Anthar Darwish**, **Jelena Vidas** and **Candace Reeve**, for friendship and all the good/funny times that we spend together.

Epígrafe

"Cada sonho que você deixa para trás é um pedaço do seu futuro que deixa de existir."

Steve Jobs

Resumo

Queiroz, IOA. **Análise de propriedades biológicas do MTA em condição normal e hiperglicêmica.** [Tese]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2017.

O objetivo deste estudo foi analisar as propriedades biológicas do MTA em condição normal e hiperglicêmica. Para tanto, esse trabalho foi dividido em duas partes, sendo que a primeira teve como objetivo avaliar o efeito do MTA no processo de reparo do Ligamento Periodontal (PDL) e na diferenciação de células mesenquimais progenitoras do PDL (PDSCs) e da Medula Óssea (BMSCc) após injúria dental. Uma perfuração na região de furca do primeiro molar superior de camundongos transgênicos (α SMACreERT2/Ai9/Col2.3GFP) foi realizada e os efeitos do MTA após 2, 17 e 30 dias de lesão, foram examinados e comparados com resina composta (AS) utilizando análise histológica e epifluorescência. Além disso, BMSCs e PDSCs desses camundongos foram isoladas, cultivadas e os efeitos do MTA na proliferação celular e diferenciação osteogênica foram avaliados. Os resultados indicaram que o MTA promoveu a regeneração do PDL e do osso alveolar na área da injúria dental. No entanto, demonstrou efeitos negativos na diferenciação osteogênica de PDSCs e BMSCc. A segunda parte, teve como objetivo avaliar a influência da Diabetes Mellitus na proliferação celular, produção de citocinas, resposta tecidual, capacidade de mineralização e na expressão local e sistêmica de marcadores ósseos. Para alcançar esses objetivos, células de linhagem fibroblástica L929 foram cultivadas em alta concentração de glicose e a influência do MTA na proliferação celular e na produção de citocinas das IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram observados às 6, 24, 48 e 72 horas; tubos de polietileno foram implantados no tecido subcutâneo de ratos normais e diabéticos (induzidos pelo Aloxano) e a influência do MTA na resposta tecidual, produção de citocinas e na capacidade de mineralização em condição diabética foram observadas através de técnicas histológicas e imunistoquímicas aos 07 e 30 dias; análises bioquímicas para Cálcio, Fósforo e Fosfatase Alcalina e imunistoquímica para osteocalcina e osteopontina, aos 07 e 30 dias, também foram realizadas com a finalidade de verificar a influência do MTA na expressão local e sistêmica de marcadores ósseos. O quadro hiperglicêmico promoveu, *in vitro*, um aumento da produção

de IL-6 e comprometeu a proliferação celular após 72hs. Independente da condição diabética, a resposta tecidual e a capacidade de produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α de ambos MTA não foi alterada, embora uma redução na intensidade de fluorescência do MTA Branco foi observada aos 14 dias em animais diabéticos. Por outro lado, o quadro hiperglicêmico inibiu a produção local de osteocalcina e osteopontina na presença dos dois MTA e aumentou os níveis séricos de Fósforo e Fosfatase Alcalina. Assim, concluiu-se que, o MTA promoveu a regeneração do PDL e do osso alveolar na área da injúria dental, contudo, apresentou um efeito negativo com relação à diferenciação osteogênica e, que em condições hiperglicêmicas, o MTA Cinza melhores resultados biológicos quando comparado ao MTA Branco.

Palavras-chaves: Diabetes Mellitus, Inflamação, Cimentos Dentários, Calcificação Fisiológica.

Abstract

Queiroz, IOA. **Analysis of biological properties of MTA in normal and hyperglycemic conditions.** [Thesis]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2017.

The aim of this study was to analyze the biological properties of MTA in normal and hyperglycemic conditions. Therefore, this study were divided into two parts; the first part aim was to evaluate MTA effect on healing of periodontal ligament (PDL) and differentiation of mesenchymal progenitor cells in PDL (PDSCs) and bone marrow stromal cells (BMSCc) following dental injury. Perforation on the pulp floor in the furcation area in the first maxillary molars of transgenic mice (α SMA $CreERT2/Ai9/Col2.3GFP$) were performed and the effects of MTA after 2, 17, 30 days of injury, were examined and compared to AS using histological and epifluorescence analysis. Additionally, BMSCs and PDSCs from these mice were isolated, cultured and the effects of MTA on cell proliferation and osteogenic differentiation were evaluated. The results indicated that MTA promoted regeneration of injured PDL and alveolar bone in the area of dental injury. However, it has demonstrated negative effects on the osteogenic differentiation of PDSCs and BMSCs. The aim of second part was to evaluate the influence of Diabetes Mellitus on cell proliferation, cytokine production, tissue response, mineralization ability and local and systemic expression of bone markers. To achieve these goals, L929 fibroblasts cell line were cultured under high glucose concentration and the influence of MTA on cell proliferation and production of cytokine IL-1 β , IL-6 and TNF- α were observed at 6, 24, 48 and 72 hours; polyethylene tubes were implanted in the subcutaneous tissue of normal and diabetic rats (induced by Alloxan) and the influence of MTA on tissue response, cytokines production and mineralization ability in diabetic condition were observed by histological and immunohistochemical techniques at 07 and 30 days; biochemical analysis for Calcium, Phosphorus and Alkaline Phosphatase and immunohistochemistry for osteocalcin and osteopontin were also performed, at 07 and 30 days, in order to verify the influence of MTA on the local and systemic expression of bone markers. The hyperglycemic state promoted an increase on IL-6 production and impaired L929 proliferation after 72hs. Independent of the diabetic condition, the tissue response and ability to produces IL-1 β , IL-6 and TNF- α by both MTA was not change, although a

reduction on fluorescence intensity of White MTA was observed after 14 days in diabetic animals. Moreover, hyperglycemia state inhibited the local production of osteocalcin and osteopontin in the presence of both MTA and increased serum levels of Phosphorus and Alkaline Phosphatase. Thus, it was concluded that MTA promoted regeneration of PDL and alveolar bone in the area of dental injury, moreover, it had a negative effect in relation to osteogenic differentiation; and under hyperglycemic condition, Gray MTA showed better biological results when compared with White MTA.

Keywords: Diabetes Mellitus, Inflammation, Dental Cements, Physiological Calcification.

*Lista de
Abreviaturas*

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – Associação Americana de Diabetes
Al₂O₃ – Óxido de Alumínio
ALP – Fosfatase Alcalina
ANOVA – Análise de Variância
AS – Compósito resinoso autoadesivo
BMSCs – Células Mesenquimais da Medula Óssea.
BSP – Sialoproteína Óssea
Ca – Cálcio
CaP – Cálcio Fosfato
cDNA – Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEUA – Comissão de Ética no Uso Animal
CO₂ – Gás carbônico
DM – Diabetes Mellitus
DMEM – Meio Essencial Mínimo de Dulbecco
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FAPESP = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS – Soro Fetal Bovino
FeO – Óxido de Ferro
Fe₂O₃ – Óxido Férrico
Fig. – Figura
g – Gramas
GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP - Proteína Verde Fluorescente
GMA – Glicol metacrilato
g/mL– Gramas por Mililitros
GMTA – Mineral Trióxido Agregado Cinza
h – Horas
H&E – Hematoxilina e Eosina
IDF – Federação Internacional de Diabetes
IL1-β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6
IP – Intraperitoneal
IR – Imunorreatividade
Kg – Quilogramas
L-929 – Células de Linhagem Fibroblástica L-929
M – Molar
Mg – Magnésio
mg – Miligramas
mg/dL – Microgramas por Decilitros
mg/kg – Miligramas por Quilogramas
mg/ml – Miligramas por Mililitros
MgO – Óxido de Magnésio
min – minutos
mL – Mililitros
mm – Milímetro
mM – Milimolar
MSCs – Células mesenquimais indiferenciadas
MTA – Mineral Trióxido Agregado
MTA-CM – Meio de cultura condicionado com Mineral Trióxido Agregado
nm – Nanômetro
OC – Osteocalcina
OCN – Osteocalcina
OH⁻ - Hidroxila
OPN – Osteopontina
OZE – Óxido de Zinco e Eugenol
P – Fósforo
PBS – Tampão fosfato-salino
PDL – Ligamento Periodontal
PDSCs – Células Progenitoras do Ligamento Periodontal.
pH – potencial Hidrogeniônico
RNA – Ácido Ribonucleico
rpm – Rotação por minuto
RT-qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase com transcriptase reversa em tempo real

Runx-2 – Fator de transcrição relacionado ao Runt 2

s – Segundos

Si – Silício

TM – Tamoxifeno

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UV- Luz Ultravioleta

U/L – Unidades por Litro

U/mL – Unidades por Mililitros

VH – Veículo

VK – Von Kossa

vs – versus

WMTA – Mineral Trióxido Agregado Branco

ZOE – Óxido de Zinco e Eugenol

% – Por cento

°C – Graus Célsius

® – Marca registrada

α – alfa

β – Beta

x – Vezes

n – Tamanho da amostra

α -MEM – Meio Essencial Mínimo alfa

α -SMA – Actina de Músculo Liso alfa

α -SMACreERT2/Ai9/Col2.3GFP – Animal Triplo Transgênico

μ g – Microgramas

μ m – Micrômetros

μ m² – Micrometros quadrados

μ g/g – Microgramas por gramas

μ g/ml – Microgramas por Mililitros

*Lista de Figuras
e Tabelas*

Artigo 1:

Figure 1: Effects of experimental perforation of the integrity of PDL and alveolar bone _____	61
Figure 2: Effect of MTA on regeneration of PDL and the underlying alveolar bone _____	62
Figure 3: Effect of MTA on apical region _____	63
Figure 4: Effect of MTA-CM on cell viability and osteogenesis of PDLCs____	64
Figure 5: Effect of MTA-CM on cell viability and osteogenesis of BMSC cultures _____	65
Figure 6: Effects of MTA-CM on the SMA9 ⁺ progenitors and their osteogenic differentiation in vitro _____	66
Supplemental Figure 1: Schematic representation of experimental PDL injury _____	67

Artigo 2:

Figure 1: Effect of both Gray MTA and White MTA extract on L929 proliferation under high or normal glucose concentration after 6, 24, 48, and 72 hs _____	80
Figure 2: Influence of hyperglycemic condition on IL-6 production by fibroblasts upon MTA treatment _____	81
Figure 3: Graph showing immunostaining patterns for IL-1 β and IL-6 observed in normal and diabetic groups _____	82
Figure 4: Immunostaining patterns for TNF- α observed in the normal and diabetic groups _____	83

Artigo 3:

Table 1: Inflammatory scores specimens stained with hematoxylin-eosin____	95
Table 2: Medium of samples in Each Group categorized necrosis, presence of mineralization and Fluorescence intensity _____	95
Figure 1: Response found in normal group at 30 days _____	96
Figure 2: Response found in diabetic group at 30 days _____	98

Artigo 4:

Figure 1: Graph showing the serum levels of calcium, phosphorus and alkaline phosphatase for healthy group (a, b, c) and diabetic group (d, e, f) on days 7 and 30_____ **118**

Figure 2: Graph showing comparison between the calcium, phosphorus and alkaline phosphatase serum levels in healthy and diabetic groups on day 7 (a, b, c) and 30 (d, e, f)_____ **119**

Figure 3: Photomicrographs showing the histological appearance of immunolabelling for OCN and OPN found in healthy and diabetic groups on day 30_____ **120**

Sumário

Sumário

Introdução	42
Proposição	46
Artigo 1: <i>Mineral Trioxide Aggregate improves healing response of periodontal tissue to injury</i>	48
Artigo 2: <i>Hyperglycemic condition interferes on cell proliferation and IL-6 production stimulated by Gray MTA</i>	69
Artigo 3: <i>Diabetes mellitus affects mineralization ability of white mineral trioxide aggregate</i>	85
Artigo 4: <i>Effect of Diabetes Mellitus on local and systemic bone marker expression induced by Gray versus White Mineral Trioxide Aggregate</i>	101
Conclusão	121
Referências	123
Anexos	130
<i>Anexo 1 – Comitê de Ética</i>	130
<i>Anexo 2 – Protocolos experimentais – In vitro</i>	131
<i>Anexo 3 – Protocolos experimentais – In vivo</i>	137
<i>Anexo 4 - Diretrizes para publicação dos trabalhos</i>	150

Introdução

Introdução

A "Medicina Endodôntica" visa estudar a relação e/ou associação entre doenças sistêmicas e as de origem endodônticas (1-4). Entre elas, a Diabetes Mellitus (DM) que é uma doença complexa, progressiva e debilitante de origem metabólica caracterizada por um quadro de hiperglicemia crônica que promove alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios, proteínas, água e eletrólitos resultantes da insuficiente secreção/ação do hormônio insulina (5).

DM é considerada como um fator modulador das infecções endodônticas (6). No entanto, esta relação ainda não está completamente elucidada, estudos mostram que as alterações na resposta imune e a persistência do estado inflamatório associadas a DM podem interferir e comprometer o reparo dos tecidos periapicais (7-9).

A hiperglicemia crônica decorrente da DM promove a ativação de vias que aumentam a inflamação (3,5). Assim, a elevação dos níveis inflamatórios sistêmicos altera diversas funções do sistema imune (10,11) como o comprometimento da resposta leucocitária e o aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, promovendo uma redução da capacidade de defesa celular e aumentando a susceptibilidade à infecção e inflamação, afetando diretamente a integridade dos tecidos pulpare e periapicais e interferindo no processo de reparo (3, 12-14).

DM também tem sido associada com alterações no processo de reparo ósseo (15,16), onde mecanismos fisiopatológicos relacionados à perda óssea como a redução da atividade osteoblástica, diminuição da síntese de colágeno e alterações no metabolismo do cálcio e fósforo e na expressão de marcadores de formação óssea tem sido observados em indivíduos diabéticos (17,18). Entretanto, os mecanismos pelos quais a DM interfere no metabolismo ósseo e, portanto, no processo de reparo/cicatrização ainda precisam ser esclarecidos, sabe-se, que controle da inflamação é essencial para que o processo de reparo ocorra, uma vez que, na presença de um quadro hiperglicêmico, a persistência da inflamação leva uma estimulação, pelos neutrófilos, da condrogênese e inibição da osteogênese (19,20).

O osso é um tecido dinâmico que está em constante remodelação e a diferenciação osteoblástica é regulada por uma série de hormônios, citocinas e múltiplos fatores de transcrição (21-23) e que podem ser inibidos e/ou alterados pelo quadro hiperglicêmico (24). Deste modo, a estimulação da reabsorção óssea, através da inibição da osteogênese, acarreta no aumento da reabsorção óssea periapical (25,26). Além disso, em indivíduos diabéticos, a redução da capacidade de reparo também está associada a diminuição da resistência à infecção bacteriana e maior susceptibilidade as infecções endodônticas (6, 27, 28).

A infecção endodôntica é tratada através da eliminação dos micro-organismos patogênicos e o restabelecimento da normalidade dos tecidos apicais e periapicais afetados, bem como da utilização de materiais capazes de promover reações de teciduais favoráveis, apresentarem adequadas propriedades físicas e químicas, que sejam indutores de mineralização e que possam favorecer e contribuir para a reparo periapical (29,30).

Uma vez que, os cimentos reparadores e obturadores estão em íntimo contato com tecidos perirradiculares, sua composição química, bem como, compostos tóxicos liberados pelos mesmos podem interferir na resposta inflamatória e, conseqüentemente, no processo de reparo (31-33). Assim, materiais com as mais variadas bases: óxido de zinco e eugenol, resina epóxica, ionômero de vidro, hidróxido de cálcio e Agregado Trióxido Mineral (MTA), podem ser encontrados.

Óxido de Zinco e Eugenol (ZOE) é um cimento composto de um pó de Óxido de Zinco e um líquido o Eugenol, utilizado que nos mais diversos procedimentos endodônticos: proteção pulpar direta, em selamento provisório, como obturador endodôntico, em revestimento de cavidades profundas. É um cimento que apresenta ação antimicrobiana (34), bom selamento marginal (35), ação anestésica e anti-inflamatória local (36). No entanto, devido ao seu componente líquido: Eugenol quando aplicado diretamente sobre os tecidos pode desencadear uma resposta inflamatória crônica dos tecidos periapicais (37) e danos sobre o tecido pulpar (38).

MTA é um cimento reparador à base de silicato de cálcio que foi introduzido em 1993 por Torabinejad (39) com a finalidade de proporcionar o

selamento de comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o dente e sua superfície externa (49,41). Entretanto, devido às suas excelentes propriedades físicas, químicas e biológicas (42,43) este passou a ser rotineiramente utilizado nas mais diversas situações clínicas (pulpotomias, capeamentos pulpare, apicogêneses, apicificações e obturação dos canais radiculares) (41).

Estudos, *in vitro* e *in vivo*, mostram que o MTA é um material bioativo (44); biocompatível (45); promove a proliferação e diferenciação de células mesenquimais/progenitoras da polpa dentária (46) e ligamento periodontal (47), além de induz dentinogênese (48), cementogênese (49) e osteogênese (50). MTA também é capaz de estimular a produção de citocinas (51,52) e a expressão marcadores ósseos (49, 53). Inclusive em condições hiperglicêmicas o MTA mostrou-se biocompatível, promoveu mineralização (54) e foi capaz de induzir a formação de ponte de dentina (55,56).

MTA encontra-se atualmente disponível sob duas formas MTA Cinza e MTA Branco, onde a principal diferença entre ambos está na redução das concentrações de Al_2O_3 , MgO, e FeO encontras no MTA Branco (57). Apenas poucos estudos comparando MTA Cinza e MTA foram realizados, alguns mostrando semelhanças; são biocompatíveis (58), capazes de induzir a proliferação celular (59) e de estimular a formação de ponte de dentina (60), e outros diferenças; MTA Cinza favorece a adesão osteoblástica (61), porém cementoblastos e queratinócitos crescem melhor na superfície do MTA Branco (62). Embora, o MTA Branco tenha sido introduzido como uma alternativa para evitar a pigmentação dental produzida pelo MTA Cinza, estudos *in vitro* e em *in vivo*, também verificaram pigmentação dental causada pelo MTA Branco (63,64).

Recentemente, o MTA também começou a ser empregado em procedimentos endodônticos regenerativos (65,66), uma vez que os tecidos dentários (polpa dentária, ligamento periodontal e osso alveolar) são fonte rica e acessível de células mesenquimais/progenitoras (67,68), e tais procedimentos envolvem a interação e diferenciação das células mesenquimais/progenitoras, bem como a utilização de biomateriais (69). No entanto, os mecanismos envolvidos nessa interação ainda não estão totalmente explicados.

A diferenciação de células osteoprogenitoras é um principais processos responsáveis pela formação e remodelação óssea, com isso, torna-se um pré-requisito compreender e analisar as vias envolvidas no desenvolvimento ósseo (70). Em função disso, investigações tem utilizando animais transgênicos e marcadores visuais (GFP - proteína verde fluorescente) sob o controle da actina de músculo liso (α -SMA) (promoter) e do colágeno tipo I 2.3kb (promoter) expressado por osteoblastos maduros com a finalidade de identificar a subpopulação de células progenitoras que expressam α -SMA e exibem um potencial osteogênico (71-73).

Deste modo, como uma das propriedades do MTA é induzir a mineralização e promover o reparo nos tecidos onde é aplicado, torna-se relevante compreender e verificar a influência do MTA no processo de diferenciação osteogênica de células mesenquimais, bem como, no processo de reparo dos tecidos periodontais após injúria dental, através da utilização de animais transgênicos. Ao mesmo tempo, como a DM é uma desordem metabólica que altera a resposta inflamatória e, portanto, afeta o processo de mineralização, justifica-se o estudo da influência dos MTA Cinza e MTA Branco na viabilidade celular, resposta tecidual, produção de citocinas, capacidade de mineralização e na expressão local e sistêmica de marcadores ósseos em condição diabética.