



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA CAMPUS ARAÇATUBA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA RESTAURADORA

DISCIPLINA DE ENDODONTIA

LUANNA DE OLIVEIRA GONÇALVES

**EXPRESSÃO DE IL1- β E TNF- α NA RESPOSTA TECIDUAL
AO MTA EM ANIMAIS DIABÉTICOS**

Araçatuba - SP

2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

LUANNA DE OLIVEIRA GONÇALVES

Expressão de IL1- β e TNF- α na resposta tecidual ao MTA em animais diabéticos.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Titular João Eduardo Gomes Filho

Araçatuba – SP
2017

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos Gonçalves e Marilene de Oliveira Gonçalves, que desde sempre lutaram para me proporcionar a melhor educação possível, que se dedicaram com todo o carinho e amor para mostrar o valor da família, da honestidade e da luta por um sonho. Dedico esse trabalho a eles, que nunca deixaram faltar nada e que são os responsáveis por essa conquista.

Às minhas irmãs queridas, Larissa e Letícia de Oliveira Gonçalves, que fizeram parte de toda a minha trajetória, que estiveram comigo dividindo dificuldades, aventuras e grandes momentos de alegria.

Ao meu amigo, companheiro e grande amor Igor Jacometo, que entrou na minha vida me trazendo paz e conforto. Que sempre está do meu lado, nos momentos difíceis e nos momentos de felicidade.

E dedico ao Professor Titular João Eduardo Gomes Filho, que me acolheu nessa jornada, me incentivou e me proporcionou estar presente nesse projeto de pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me abençoar e me iluminar nas minhas escolhas. Por me dar sabedoria e força nos tempos difíceis.

Agradeço a minha família, que me deu todo o suporte para caminhar, que, apesar das dificuldades, sempre estiveram ali para me apoiar. Muito obrigada por tudo que fizeram e fazem para a realização desse sonho.

Ao Professor João, por sua sabedoria e humildade. Minha gratidão a você é imensa. Obrigada por ter me acolhido com tanto carinho, por ter me doado um pouco dos seus conhecimentos, por não ter desistido de mim. Você, com sua humildade, me mostrou a importância da pesquisa, do estudo e da dedicação.

À Índia Olinta de Azevedo Queiroz, Doutora em Endodontia pelo Departamento de Odontologia Restauradora. Obrigada por me ajudar tanto em todos os meus projetos, por me acolher tão prontamente e por me socorrer nas minhas dúvidas. Você me ajudou muito em todos os momentos. Minha admiração por você é imensa. Obrigada por tudo.

Aos meus queridos amigos da Surubateria, que me mostraram o valor da amizade, do companheirismo. Obrigada por todos os momentos que passamos, pelos desafios e pelas apresentações. Estarão sempre na minha memória.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela formação acadêmica e oportunidades de aprendizado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio no desenvolvimento dessa pesquisa. (Processo 2014-25475-4)

Ao Professor Doutor Edilson Ervolino, que cedeu seus conhecimentos em imunistoquímica, nos ajudando na realização dessa etapa e que, gentilmente, analisou os resultados para a conclusão desse trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão desse trabalho.

GONÇALVES, LO. **Expressão de IL1- β e TNF- α na resposta tecidual ao MTA em animais diabéticos**. 2017. 30f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de IL1- β e TNF- α na resposta tecidual ao MTA em animais diabéticos. Foram utilizados 20 ratos, distribuídos em 02 grupos de 10 animais: grupo I: ratos normais e grupo II: ratos com diabetes induzida por Alozano. Todos os animais receberam dois implantes de tubos de polietileno, um contendo o cimento testado e o outro um tubo vazio para controle. O período de avaliação foi de 30 dias, quando os animais foram eutanasiados e os tubos de polietileno juntamente com o tecido que o circunda foram removidos e fixados. Os tubos foram seccionados ao meio e uma parte foi processada, incluída em glicol metacrilato e corada por HE. O critério de avaliação foi de 0: nenhuma ou poucas células e nenhuma reação; 1: menos de 25 células e reação leve; 2: entre 25 e 125 células e reação moderada; 3: 125 ou mais células e severa reação. A outra metade dos tubos foi incluída em parafina para análise imunoistoquímica para a presença de IL1- β e TNF- α . O critério de avaliação da imunomarcagem foi: 1- alto (3/4 das células imunorreativas (IR) por campo microscópico); 2- moderado (1/2 das células IR); 3- baixo (1/4 das células IR); e 4-nulo (ausência de células IR). Os resultados foram analisados pelos testes de Kruskal Wallis seguindo do teste de Dunn ($p < 0.05$). Aos 30 dias, tanto no grupo controle quanto no grupo MTA foi observado uma resposta inflamatória leve, independente da condição diabética. Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre os padrões de imunomarcagem para IL1- β e para TNF- α entre os grupos normal e diabético. Concluiu-se que a Diabetes Mellitus não alterou a resposta tecidual nem a expressão de marcadores inflamatórios na presença do MTA Branco.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. Agregado Trióxido Mineral. IL1- β . TNF- α .

GONÇALVES, LO. **Expression of IL1- β and TNF- α in tissue response to MTA in diabetic animals**. 2017. 30f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

ABSTRACT

The aim objective of this study was to evaluate the expression of IL-1 β and TNF- α in tissue response to MTA in diabetic animals. Twenty rats were divided into two groups of 10 animals: group I: normal rats and group II: diabetic rats (Aloxan induced). All animals received two polyethylene tube implants, one containing the tested sealer and other an empty tube used as control. The evaluation time was 30 days, when the animals were sacrificed and the polyethylene tubes with the surrounding tissue were removed and fixed. The tubes were sectioned in half and one part was processed, included in glycol methacrylate and stained by HE. The evaluation criterion was 0: none or few cells and no reaction; 1: less than 25 cells and mild reaction; 2: between 25 and 125 cells and moderate reaction; 3: 125 or more cells and severe reaction. The other half of the tubes were included in paraffin for immunohistochemical analysis for the presence of IL-1 β and TNF- α . The immunostaining criteria were: 1 - high (3/4 of immunoreactive cells (IR) per microscopic field); 2- moderate (1/2 of IR cells); 3 cells (1/4 of the IR cells); And 4-null (absence of IR cells). The results were analyzed by the Kruskal Wallis test following the Dunn test ($p < 0.05$). At 30 days, both the control group and the MTA group showed a mild inflammatory response independent of the diabetic condition. No statistically significant difference was found between IL-1 β and TNF- α immunostaining standards between the normal and diabetic groups. It was concluded that Diabetes Mellitus did not alter the tissue response or the expression of inflammatory markers in the presence of MTA.

Keywords: Diabetes Mellitus. Aggregate Mineral Trioxide. IL1- β . TNF- α .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Escores para a resposta inflamatória e para os padrões de imunomarcacão de IL1- β e TNF- α obtidos aos 30 dias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – MTA Angelus Branco®

Figura 2 – Inducão a diabetes

Figura 3 – Tricotomia da região dorsal do rato e anti-sepsia

Figura 4 - Incisão e confecção de duas bolsas por divulsionamento

Figura 5 – Sutura e anti-sepsia final

Figura 6 – Resposta inflamatória encontrada no grupo normal aos 30 dias.

Figura 7 – Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 30 dias.

Figura 8 – Resposta de imunomarcacão para IL1- β encontrada nos grupos normal e diabético aos 30 dias

Figura 9 – Resposta de imunomarcacão para TNF- α encontrada nos grupos normal e diabético aos 30 dias.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –Gráficoboxplot demonstrando os escores encontrados na imunomarcacão nos grupos controle e MTA Branco em condição normal e diabética.

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA – Comitê de Ética no Uso do Animal

CTL – Controle

DM – Diabetes Mellitus

GMA – Glicol Metacrilato

HRP – Peroxidase da Raiz Forte

IDF – Internacional Diabetes Federation

MTA – Agregado Trióxido Mineral Branco

N – Normal

PBS – Tampão fosfato salino

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	PROPOSIÇÃO	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1.	Teste de biocompatibilidade	14
3.2.	Indução a Diabetes	15
3.3.	Procedimentos cirúrgicos	16
3.4.	Processamento laboratorial e técnica histológica para avaliação da resposta inflamatória	17
3.4.1.	Critério para Análise Quantitativa	17
3.5.	Técnica Imunoistoquímica para detecção de IL1- β e TNF- α	18
3.5.1.	Critério para Análise de Escores	19
3.6.	Análise Estatística.....	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	23
6	CONCLUSÃO	24
7	REFERÊNCIAS	25

1. INTRODUÇÃO

Diabetes Mellitus (DM) é descrita como uma desordem de origem metabólica caracterizada por uma hiperglicemia crônica e alterações no metabolismo dos carboidratos, lipídios e proteínas resultantes da insuficiente secreção/ação do hormônio insulina¹.

A insulina é um hormônio produzido pelo pâncreas e normalmente liberado constantemente em pequenas quantidades no organismo, porém quando do consumo de alimentos, esta liberação é em maior quantidade. O organismo tem a capacidade de remover o excesso de glicose presente no sangue e estocá-la no fígado e músculo na forma de glicogênio ou convertê-la em gordura. Quando necessário, a glicose armazenada é liberada de volta à corrente sanguínea para ser levada as células com auxílio da insulina². Em pacientes diabéticos, este processo encontra-se alterado, pois a glicose é encontrada em excesso na corrente sanguínea devido à liberação insuficiente de insulina pelo pâncreas ou pela resistência celular à insulina.

Dados do International Diabetes Federation (IDF) mostram que a incidência dessa patologia vem aumentando de forma significativa. Estima-se que para o ano de 2030 existam 552 milhões de diabéticos em todo o mundo, sendo 12.9 milhões destes encontrados no Brasil³.

A hiperglicemia decorrente da DM causa efeitos moleculares e celulares, que são resultantes do estresse oxidativo, do aumento da resposta pró-inflamatória e das alterações vasculares que irão predispor os indivíduos a complicações sistêmicas¹. Complicações estas que podem gerar disfunções e falência em vários órgãos como os olhos, rins, nervos, o coração, os vasos sanguíneos e osso^{4,5,6}.

A hiperglicemia provoca um aumento nos níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos devido ao aumento da resposta inflamatória^{7,8}. DM, se não controlada, pode gerar complicações de saúde, levando ao aumento da susceptibilidade a infecção e inflamação⁹. E durante o processo inflamatório, numerosas citocinas pró e antiinflamatórias são secretadas; IL-1 e TNF são citocinas pró-inflamatórias produzidas nesse processo que são responsáveis por diversos acontecimentos, entre eles a exacerbação da resposta inflamatória.

A IL-1 β é uma citocina sintetizada por macrófagos que interfere na reabsorção óssea, é também um importante mediador da resposta inflamatória e esta envolvida numa variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação, a diferenciação e a apoptose celular^{10,11}.

O TNF- α é produzido por monócitos, macrófagos e linfócitos-T. É capaz de, após procedimento cirúrgico, trauma ou durante as infecções, provocar mudanças metabólicas e hemodinâmicas; ativar outras citocinas; estimular a expressão ou liberação de moléculas de adesão e influenciar na apoptose celular^{11,12,13}

Diabetes está associada estão com níveis elevados de marcadores sistêmicos e locais de inflamação. Fluido gengival humano de pacientes com diabetes e doença periodontal mostrou níveis mais elevados de prostaglandina E2 e IL-1 β em comparação com fluido de pacientes não diabéticos, com semelhante níveis de doença periodontal¹⁴. Além disso, monócitos isolados de pacientes periodontais com diabetes produziram quantidades significativamente maiores de TNF- α , IL-1 β e prostaglandina E2 em resposta ao lipopolissacárido quando em comparação com pacientes não diabéticos^{14,15}. Quando *P. Gingivalis* foi inoculado em tecido conjuntivo a resposta inflamatória após um dia é semelhante em camundongos diabéticos e controle. No entanto, em 3 dias, o infiltrado inflamatório que consistia em grande parte de leucócitos polimorfonucleares foi reduzida no grupo de controle, mas permaneceu elevado nos animais diabéticos⁷. Estudos sugerem que o aumento da apoptose num estado diabético provoca atraso na cicatrização de feridas incisionais^{16,17,18,19}. Contudo, nosso grupo não evidenciou diferença na resposta tecidual e no potencial de mineralização frente ao MTA independentemente da condição diabética²⁰

O MTA (Agregado Trióxido Mineral) é um cimento reparador utilizado para selar comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o dente e sua superfície externa^{21,22}. Estudos mostram que o MTA é um material biocompatível, radiopaco, possui atividade antimicrobiana, apresenta boa capacidade de selamento marginal, induz dentinogênese, cementogênese e osteogênese^{23,24,25,26}.

Encontra-se atualmente disponível no mercado nas cores cinza e branca, onde a principal diferença entre ambos parece ser nas concentrações de Al₂O₃, MgO e FeO, onde as concentrações desses óxidos são consideravelmente menores no MTA branco do que no cinza²⁷.

Os dados obtidos previamente²⁰ basearam-se em análise histológica com coloração por hematoxilina e eosina, Von Kossa e análise em luz polarizada, entretanto a análise por imunistoquímica de citocinas pode evidenciar diferenças em relação à resposta tecidual que ainda não puderam ser verificadas. Assim, justifica-se a avaliação da expressão citocinas pró-inflamatórias na resposta tecidual do MTA em animais diabéticos.

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão das citocinas inflamatórias IL1- β e TNF- α na resposta tecidual do MTA, em tecido subcutâneo de ratos normais e ratos diabéticos, por meio de técnicas histológicas e de imunistoquímicas.

Objetivos específicos:

- ✓ Analisar a resposta tecidual ao MTA, por meio da coloração em Hematoxilina e Eosina, em ratos normais e diabéticos;
- ✓ Avaliar a expressão de IL1- β e TNF- α na resposta inflamatória ao MTA, por meio de imunistoquímicas, em ratos normais e diabéticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Cimento Reparador MTA Angelus Branco®

Nesse estudo foi empregado o cimento reparador MTA Angelus Branco® (Angelus Industria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, Brasil).

MTA Angelus Branco® é um cimento composto de óxidos minerais na forma de finas partículas hidrofílicas. Apresenta na sua composição SiO_2 , K_2O , Al_2O_3 , Na_2O , Fe_2O_3 , SO_3 , CaO , Bi_2O_3 e MgO . Além de resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio.

Estudos mostraram que as concentrações Al_2O_3 , MgO e FeO , são consideravelmente menores no MTA branco do que no cinza.

Figura 1: MTA Angelus Branco®



3.1. Teste de biocompatibilidade

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 20 ratos machos Wistar, com idades aproximadas de 30 dias, pesando aproximadamente 250g, sendo provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba UNESP. Os animais foram mantidos em ambientes com temperatura entre 22°C e 24°C, com ciclo de Luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas, contendo seis ratos por gaiola, com ração sólida triturada e água “ad libitum”. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo ao Comitê de Ética no Uso do Animal (CEUA) processo no FOA-00557-2013.

3.2. Indução a Diabetes

Na primeira fase do experimento, metade dos animais (10 ratos) receberam uma dose única de 150mg/kg de Aloxano (Sigma Aldrich Corp., St. Louis, EUA) via intraperitoneal (Salil et al, 2011). E após o 3º dia dessa injeção foi realizada a mensuração da glicose sanguínea para confirmação da hiperglicemia. Foram selecionados somente os animais que obtiverem glicemia acima de 250 mg/dl e, este dia, foi considerado o primeiro dia da doença Diabetes.

Figura 2: Indução a diabetes em ratos utilizando Aloxano.



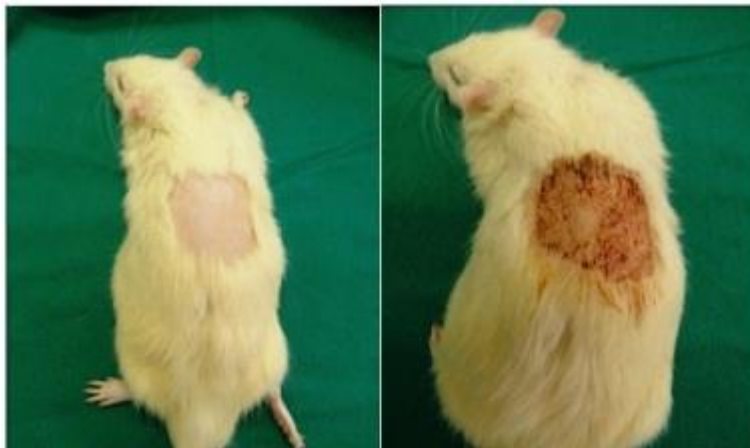
3.3. Procedimentos cirúrgicos.

Para a realização das intervenções cirúrgicas, os animais foram inicialmente pesados e anestesiados.

Após a anestesia dos 20 ratos (10 diabéticos e 10 não diabéticos), realizou-se a tricotomia da região dorsal e a lavagem da área com a finalidade de se

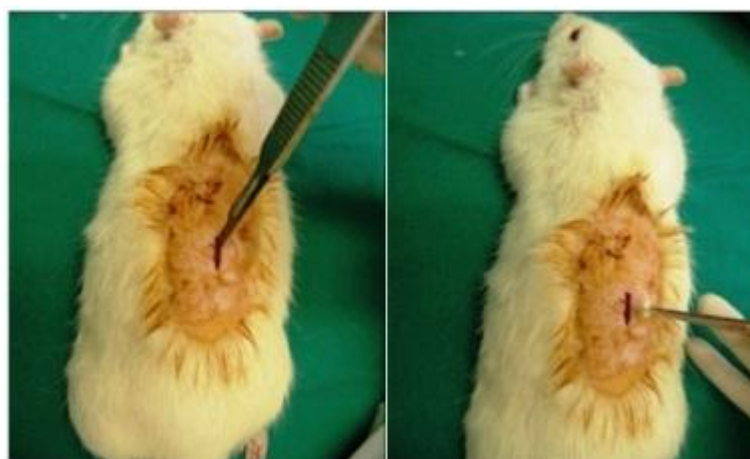
evitar contaminação do campo cirúrgico pela presença de pêlos. A anti-sepsia da área desprovida de pêlos foi efetuada esfregando uma gaze embebida em solução aquosa 10% de PVPI (Shangai-Med. Sn, Shangai, China) por dois minutos.

Figura 3: Tricotomia da região dorsal e anti-sepsia da área com solução de PVPI por dois minutos.



Em seguida, iniciou-se o procedimento cirúrgico, fazendo uma incisão com lâmina de bisturi número 15 (Ethicon Inc., San Ângelo, EUA) no dorso do animal, tendo a coluna vertebral como linha média de marcação, onde foram criadas duas bolsas por divulsionamento, uma de cada lado da incisão.

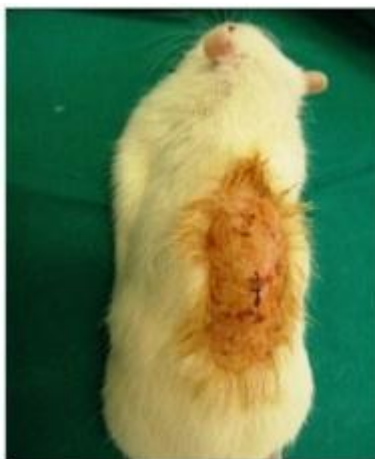
Figura 4: Incisão na região dorsal do animal e a confecção de duas bolsas por divulsionamento, uma em cada lado da incisão.



Noventa e seis tubos de polietileno estéreis (Abbott. Lab. Do Brasil, São Paulo, SP) foram preenchidos com os materiais, manipulados segundo as recomendações dos fabricantes, sendo que para o grupo controle, os tubos não foram preenchidos. Com auxílio de uma pinça reta, cada bolsa recebeu um tubo contendo o material que foi testado ou foi colocado o tubo vazio. Assim, cada animal

recebeu dois tubos, um preenchido com MTA Ângelus Branco® e um tubo vazio (controle). O tecido foi suturado com fio de seda 4,0 não reabsorvível e anti-sepsia final, foi realizada com PVPI 10% novamente.

Figura 5: Colocação de dois tubos nas bolsas; sutura do tecido e anti-sepsia final com solução de PVPI.



3.4. Processamento laboratorial e técnica histológica para avaliação da resposta inflamatória.

O período de avaliação foi de 30 dias e após esse período, os animais foram sacrificados por meio de uma dose excessiva de anestésico Tiopental Sódico na dosagem de 100mg/kg de peso. Antes do sacrifício dos animais do grupo diabético foi realizada uma nova mensuração da glicose para comprovar que os mesmo ainda se encontravam diabéticos. Após o sacrifício, os tubos foram localizados e removidos juntamente com os tecidos que o envolviam e foram fixados em solução formalina 10%.

As amostras foram processadas, incluídas em glicol metacrilato (GMA) e cortes seriados de 3 μ m para posterior coloração em hematoxilina e eosina foram feitos.

A análise histomorfológica qualitativa do processo inflamatório consistiu na descrição dos fenômenos inflamatórios observados microscopicamente nos cortes teciduais representativos de cada grupo e tempos pós-operatórios.

A análise quantitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando a importância dos fenômenos microscópicos observados separadamente. Foram determinadas as condições microscópicas das estruturas examinadas, em

itens distintos, e avaliados sob a forma de escores de 0 a 3, para resposta inflamatória.

3.4.1 Critério para Análise Estatística Quantitativa

A) Infiltrado Inflamatório:

0: Nenhuma: nenhuma ou poucas células;

1: Leve: inferior a 25 células;

2: Moderado: entre 25 e 124 células;

3: Severo: superior a 125 células.

3.5. Técnica Imunoistoquímica para detecção de IL1- β e TNF- α

As amostras foram processadas, incluídas em parafina e cortes histológicos seriados de 5 μ m foram realizados para análise imunoistoquímicas.

Para técnica de imunoistoquímicas, os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 100° - 100° - 90° - 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker[®], em câmara pressurizada DecloakingChamber[®] (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 20 minutos. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois das lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio de sítios inespecíficos. Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram divididas em três lotes e cada lote foi submetido à incubação com um dos seguintes anticorpos primários: IL1- β (Rabbit anti-IL1- β SC 7884) e TNF- α (Goatanti-TNF- α SC 1348). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subseqüentes, será empregado o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit[®] (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBSTX, procederá a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB

chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contra-corados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

No estudo proposto foram realizadas marcações imunoistoquímicas nos cortes histológicos. Foram utilizados anticorpos primários (1:100) contra a IL-1 β (Rabbit anti-IL-1 β SC 7884) e TNF- α (Goat anti-TNF- α SC 1348). Foi utilizado anticorpo secundário universal (1:200) - Dako.

O sinal da reação foi amplificado com o sistema avidinabiotina (Kit ABCVectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories) e a reação foi revelada utilizando a diaminobenzidina (DAB) como cromógeno.

A especificidade das marcações foi confirmada através da exclusão do anticorpo primário em lâminas controle. Todas as incubações dos anticorpos foram realizadas em câmara úmida à temperatura de 25°C.

Para adquirir as imagens foi utilizada uma câmera digital acoplada ao microscópio e conectada ao computador.

3.5.1 Critérios para análise de Escores

Padrão de imunomarcção:

Escore 0: ausência de imunomarcção

Escore 1: baixo padrão de imunomarcção

Escore 2: moderado padrão de imunomarcção

Escore 3: alto padrão de imunomarcção

3.6. Análise estatística

Os dados encontrados tanto para a análise histológica quanto para análise imunoistoquímica foram submetidos à análise estatística pelo programa GraphPadPrism. Para ambas as análises os testes utilizados foram Kruskal-Wallis seguindo do teste de Dunns, sendo o nível de significância entre os grupos de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

Aos 30 dias, nos grupos normal e diabético, foi observado um infiltrado celular inflamatório leve consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes na cápsula fibrosa fina em ambos os grupos Controle e MTA ($p=0,0965$) (Fig. 1 e Fig. 2)

Aos 30 dias, independente da condição diabética, também não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e MTA branco para imunomarcção de IL1- β e TNF- α . ($p=0,0054$) (Fig. 3 e Fig. 4)

A tabela 1 descreve os escores encontrados para a resposta inflamatória e para a imunomarcção observadas no controle e MTA branco em ambos os grupos, normal e diabético.

Tabela 1: Escores para a resposta inflamatória e para os padrões de imunomarcção de IL1- β e TNF- α obtidos aos 30 dias.

<i>Resposta inflamatória</i>	<i>Normal</i>		<i>Diabético</i>	
	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>
<i>Escores</i>				
<i>0 Ausente</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>1 Leve</i>	5/5	5/5	5/5	3/5
<i>2 Moderada</i>	0/5	0/5	0/5	2/5
<i>3 Severa</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Imunomarcção para IL1-β</i>	<i>Normal</i>		<i>Diabético</i>	
	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>
<i>Escores</i>				
<i>0 Ausente</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>1 Baixo</i>	5/5	5/5	1/5	1/5
<i>2 Moderado</i>	0/5	0/5	4/5	4/5
<i>3 Alto</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>Imunomarcção para TNF-α</i>	<i>Normal</i>		<i>Diabético</i>	
	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>	<i>Controle</i>	<i>MTA Branco</i>
<i>Escores</i>				
<i>0 Ausente</i>	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>1 Baixo</i>	5/5	5/5	1/5	1/5
<i>2 Moderado</i>	0/5	0/5	4/5	4/5
<i>3 Alto</i>	0/5	0/5	0/5	0/5

Figura 6: Resposta inflamatória encontrada no grupo normal aos 30 dias. Controle: Resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos (hematoxilina e eosina, 10X) (A); Controle (hematoxilina e eosina, 40X) (B); Controle (hematoxilina e eosina, 100X) (C); MTA Branco: Presença de cápsula fibrosa espessa com resposta inflamatória leve (hematoxilina e eosina, 10X) (D); MTA Branco (hematoxilina e eosina, 40X) (E); MTA Branco (hematoxilina e eosina, 100X) (F). Setas indicam presença de células inflamatórias.

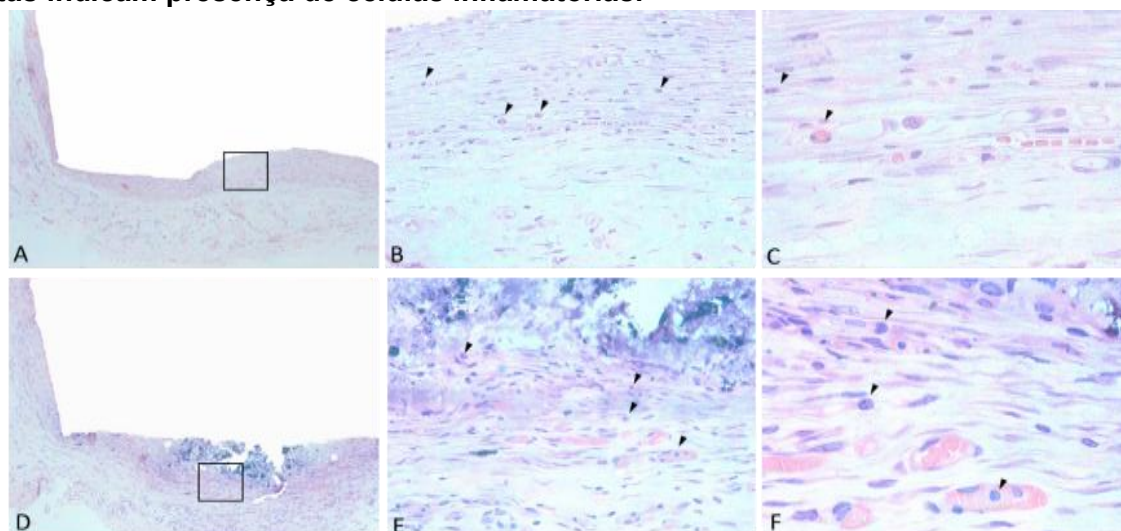


Figura 7: Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 30 dias. Controle: Presença de resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos (hematoxilina e eosina, 10X) (A); Controle (hematoxilina e eosina, 40X) (B); Controle (hematoxilina e eosina, 100X) (C); MTA Branco: Resposta inflamatória leve (hematoxilina e eosina, 10X) (D); MTA Branco (hematoxilina e eosina, 40X) (E); MTA Branco (hematoxilina e eosina, 100X) (F). Setas indicam presença de células inflamatórias.

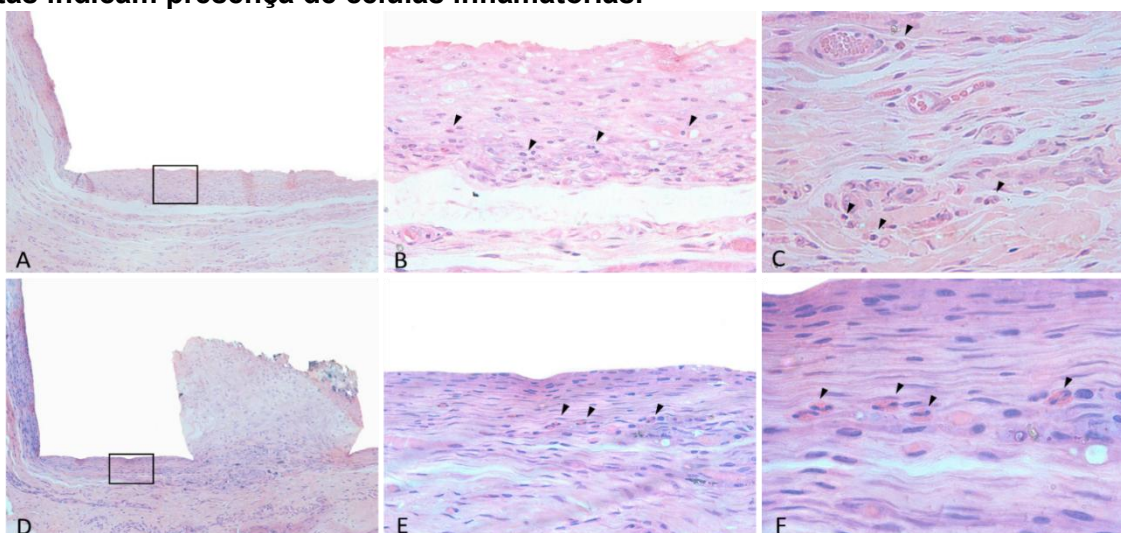


Figura 8: Resposta de imunomarcção para IL1- β encontrada nos grupos normal e diabético após 30 dias. (A) Controle do grupo normal; (B) MTA Branco do grupo normal; (C) Controle do grupo diabético; (D) MTA Branco do grupo diabético.

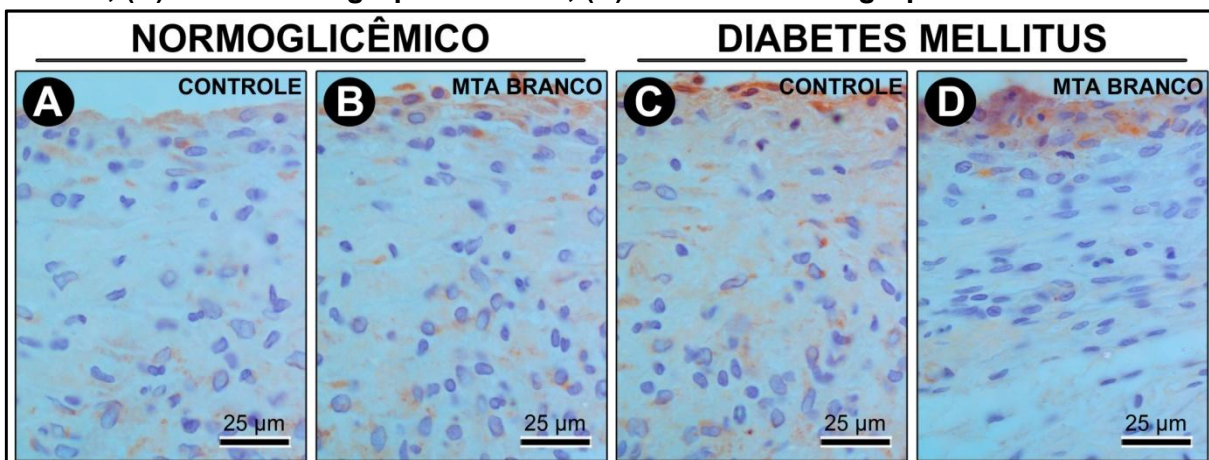


Figura 9: Resposta de imunomarcção para TNF- α encontrada nos grupos normal e diabético após 30 dias. (A) Controle do grupo normal; (B) MTA Branco do grupo normal; (C) Controle do grupo diabético; (D) MTA Branco do grupo diabético.

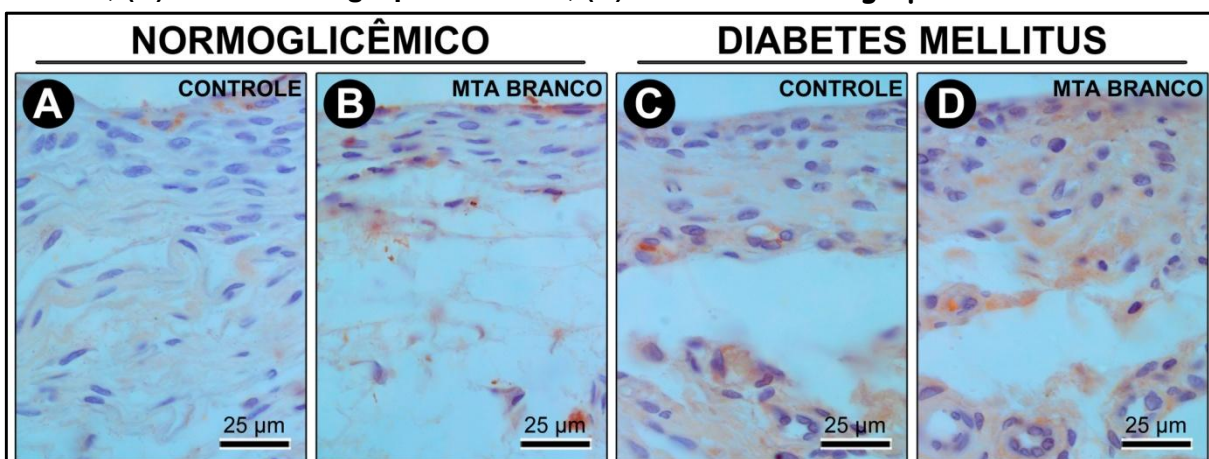
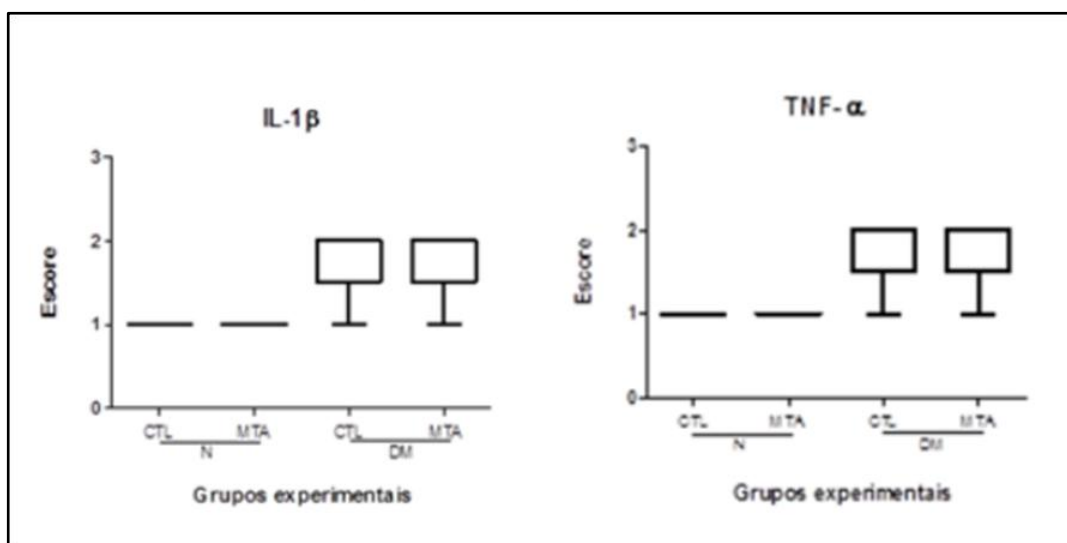


Gráfico 1: Gráfico boxplot demonstrando os escores encontrados na imunomarcção dos grupos controle e MTA Branco em condição normal e diabética. Abreviações: N: Normal; DM: Diabetes Mellitus; CTL: Controle; MTA: MTA Branco.



5. DISCUSSÃO

O teste em tecido subcutâneo de animais é um dos ensaios mais utilizados para determinar os efeitos locais e biocompatibilidade de materiais^{28,29}. A resposta do organismo perante a um material é complexa e depende da resposta imunológica inata e não específica, uma vez que, dependendo das propriedades físicas e químicas do material, a cascata inflamatória pode ser acionada, inativando o processo inflamatório e contribuindo ou não para um processo de reparo^{29,30}.

Diabetes Mellitus (DM) é uma desordem metabólica que, quando não controlada, pode gerar problemas bucais, como por exemplo, alterações nos tecidos pulparens^{31,32}. Algumas pesquisas relatam que a DM altera a resposta inflamatória^{31,33,34}, reduzindo o número e função dos leucócitos polimorfonucleares^{35,36}, podendo assim alterar a resposta imune^{36,37}, aumentar a susceptibilidade a infecções³⁸ e atrasar o processo de reparo³⁵. Além disso, a DM tem sido associada com a homeostasia alterada do cálcio, o que leva a uma redução da capacidade de formação e mineralização óssea^{4,39,40}.

Nesse estudo, em condições normais, ambos os grupos Controle e MTA apresentaram uma resposta inflamatória leve aos 30 dias. Esses resultados corroboram com prévios estudos^{20,28,41}. Entretanto, nenhuma correlação direta entre DM e a resposta inflamatória promovida pelo MTA foi observada. Esses resultados concordam com nosso estudo anterior que mostrou que a DM não interferiu na resposta tecidual e na capacidade de mineralização do MTA Cinza²⁰.

Nesse estudo, a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL1- β e TNF- α , foi observada na presença do MTA, em ambos os grupos normal e diabético. Nossos resultados concordam com estudos que mostram a estimulação da produção das citocinas IL1- β ^{42,43} e TNF- α ⁴⁴ na presença do MTA. Entretanto, nenhuma diferença entre a expressão de citocinas entre o grupos normal e diabético foi observado em nosso estudo. Nós acreditamos que o efeito anti-inflamatório promovido pelo MTA demonstrado por Barbosa Silva *et al.* (2008), bem como suas excelentes propriedades biológicas^{20,28,41} podem justificar nossos resultados.

6. CONCLUSÃO

Assim, com base nos nossos resultados, podemos concluir que a Diabetes Mellitus não alterou a resposta tecidual nem a expressão de marcadores inflamatórios na presença do MTA Branco.

7. REFERÊNCIAS

1. American Diabetes Association. **Standards of medical care in diabetes.** Diabetes Care 2013 January; 36 Suppl 1:S11-S66.
2. Guyton, AC. **Tratado de fisiologia médica.** 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier:2006.
3. WHITING DR, GUARIGUATA L, WEIL C, SHAW J. **IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030.** Diabetes Research and Clinical Practice 2011 Dec;94(3):311-21.
4. LU H, KRAUT D, GERSTENFELD L, GRAVES D. **Diabetes interferes with the bone formation by affecting the expression of transcription factors that regulate osteoblast differentiation.** Endocrinology 2003; 144: 346–352.
5. American Diabetes Association. **Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 2011 January; 34 Suppl 1: S62– S69.
6. BLAKYTTY R, SPRAUL M, JUDE EB. **The Diabetic Bone: A Cellular and Molecular Perspective.** The International Journal of Lower Extremity Wounds 2011; 10(1): 16–32.
7. GRAVES DT, LIU R, OATES TW. **Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis: impact on periodontal pathosis.** Periodontol 2000. 2007; 45: 128-37.
8. DANDONA P, ALJADA A, BANDYOPADHYAY A. **Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes.** Trends Immunol 2004;25:4-7.
9. LIMA SM, GRISI DC, KOGAWA EM, ET AL. **Diabetes mellitus and inflammatory pulpal and periapical disease: a review.** International Endodontic Journal 2013;46:700–709.

10. GRAVES DT & COCHRAN D. **The contribution of interleukin-1 and tumorNecrois factor to periodontal tissue destruction.** J Periodontol 2003 74(3):391-401.
11. OLIVEIRA CMB, SAKATA RK, ISSY AM, GEROLA LR, SALOMÃO R. **Citocinas e dor.** RevBrasAnesthesiol 2011;61(2):260-65.
12. CURFS JH, MEIS JF, HOOBKAMP-KORSTANJE JA. **A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers.** ClinMicrobiol Rev 1997;10:742-780.
13. RAEBURN CD, SHEPPARD F, BARSNESS KA ET AL. **Cytokines for surgeons.** Am J Surg, 2002;183:268-273.
14. SALVI GE, YALDA B, COLLINS JG, JONES BH, SMITH FW, ARNOLD RR, OFFENBACHER S. **Inflammatory mediator response as a potential risk marker for periodontal diseases in insulin-dependent diabetes mellitus patients.** J Periodontol. 1997a Feb;68(2):127-35.
15. SALVI GE, COLLINS JG, YALDA B, ARNOLD RR, LANG NP, OFFENBACHER S. **Monocytic TNF alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases.** J ClinPeriodontol. 1997b Jan;24(1):8-16.
16. CARLSON M, LONGAKER M, THOMPSON J. **Wound splinting regulates granulation tissue survival.** J Surg Res 2003: 110:304–309.
17. DARBY I, BISUCCI T, HEWITSON T, MACLELLAN D. **Apoptosis is increased in a model of diabetes-impaired wound healing in genetically diabetic mice.** Int. J. Biochem Cell Biol 1997;29: 191–200.
18. DESMOULIERE A, REDARD M, DARBY I, GABBIANI G. **Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.** Am J Pathol 1995;146: 56–66.

19. SLOMIANY B, SLOMIANY A. **Disruption in gastric mucin synthesis by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide involves ERK and p38 mitogen-activated protein kinase participation.** *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 220–224.
20. GOMES-FILHO JE, DE AZEVEDO QUEIROZ ÍO, WATANABE S, DA SILVA SANTOS LM, LODI CS, OKAMOTO R, ERVOLINO E, DEZAN E JR, CINTRA LT. **Influence of diabetes mellitus on tissue response to MTA and its ability to stimulate mineralization.** *Dent Traumatol.* 2015 Feb; 31(1):67-72.
21. LEE SJ, MONSEF M, TORABINEJAD M. **Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations.** *Journal of Endodontics* 1993;11:541-4.
22. MENTE J, HAGE N, PFEFFERLE T, KOCH MJ, GELETNEKY B, DREYHAUPT J, MARTIN N, STAEHLE HJ. **Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations.** *Journal of Endodontics* 2010 February; 36(2):208-13.
23. TANOMARU JM, TANOMARU-FILHO M, HOTTA J, WATANABE E, ITO IY. **Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA.** *Acta Odontológica Latinoamericana* 2008; 21(2):147-51.
24. TORABINEJAD M, SMITH PW, KETTERING JD, PITT FORD TR. **Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials.** *Journal of Endodontics* 1995; 21:295-9.
25. THOMSON TS, BERRY JE, SOMERMAN MJ, KIRKWOOD KL. **Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate.** *Journal of Endodontics* 2003; 29:407-12.

26. MAROTO M, BARBERÍA E, VERA V, GARCIA-GODOY F. **Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars.** American Journal of Dentistry 2006 Apr;19(2):75-9.
27. ASGARY S, PARIROKH M, EGHBAL MJ, BRINK F. **Chemical differences between white and gray mineral trioxide aggregate.** J Endod. 2005 Feb;31(2):101-3.
28. HOLLAND R., SOUZA V., NERY M.J., FARACO JÚNIOR I.M., BERNABÉ P.F., OTOBONI FILHO JA., ET AL. **Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate.** Brazilian Dental Journal 2002 13(1):23– 6.
29. ANDERSON JM. **Biological responses to materials.** Annual Review of Materials Research 2001; 31:81–110.
30. SCHUTTE R.J., XIE L., KLITZMAN B. & RECHERT W.M. **In vivo cytokine associated responses to biomaterials.** Biomaterials 2009 30(2):160-8.
31. GARBER S.E., SHABAHANG S., ESCHER A.P. & TORABINEJAD M. (2009). **The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats.** Journal of Endodontics, 35 (1):60-2.
32. IWAMA A., NISHIGAKI N., NAKAMURA K., IMAIZUMI I., SHIBATA N., YAMASAKI M., ET AL. **The effect of high sugar intake on the development of periradicular lesions in rats with type 2 diabetes.** Journal of Dental Research 2003 82(4):322–5.
33. KOHSAKA T., KUMAZAWA M., YAMASAKI M. & NAKAMURA H. (1996). **Periapical lesions in rats with streptozotocin-induced diabetes.** Journal of Endodontics, 22(8):418–21.
34. NAGY A., NAGASHIMA H., CHA S., OXFORD G.E., ZELLES T., PECK A.B., ET AL. **Reduced oral wound healing in the NOD mouse model for type 1**

autoimmune diabetes and its reversal by epidermal growth factor supplementation. Diabetes 2001 50(9):2100-4.

35. DELAMAIRE M., MAUGENDRE D., MORENO M., LE GOFF M.C., ALLANNIC H. & GENETET B. **Impaired leukocyte functions in diabetic patients.** Diabetic Medicine: a journal of the British Diabetic Association 1997 14 (1):29-34.

36. SAIKI O., NEGORO S., TSUYUGUCHI I. & YAMANURA Y. **Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced diabetes.** Infection and Immunity 1980 28(1):127-31.

37. GEERLINGS S.E. & HOEPELMAN A.I. **Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM).** FEMS Immunology and Medical Microbiology 1999 26 (3- 4):259-65.

38. IWAMA A., MORIMOTO T., TSUJI M., NAKAMURA K., HIGUCHI N., IMAIZUMI I., ET AL. **Increased number of anaerobic bacteria in the infected root canal in type 2 diabetic rats.** Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics 2006 101 (5):681- 6.

39. BOTUSHANOV N.P. & ORBETZOVA M.M. **Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus.** Folia Medica 2009 51 (4):12-7.

40. WARD D.T., YAU S.K., MEE A.P., MAWER E.B., MILLER C.A., GARLAND H.O., ET AL. **Functional, molecular, and biochemical characterization of streptozotocin induced diabetes.** Journal of the American Society of Nephrology: JASN 2001 12(4):779-90.

41. HOLLAND R., SOUZA V., NERY M.J., OTOBONI-FILHO J.A., BERNABÉ P.F.E. & DEZAN-JÚNIOR E. **Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide.** Journal of Endodontics 1999 25(3):161-6.

42. KOH ET, MCDONALD F, PITT FORD TR, TORABINEJAD M. **Cellular response to Mineral Trioxide Aggregate.** J Endod. 1998 Aug;24(8):543-7.

43. GOMES-FILHO JE, GOMES AC, WATANABE S, OLIVEIRA SH, BERNABÉ PF, PERCINOTO C. **Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus.** J Appl Oral Sci. 2011 Aug;19(4):329-36.

44. BARBOSA SILVA MJ, VIEIRA LQ, SOBRINHO AP. **The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008 May;105(5):e70-6.