



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

ALINE ABADIA DE ÁVILA

**Avaliação da expressão de marcadores ósseos na
resposta tecidual ao MTA em animais diabéticos**

**Araçatuba – SP
2015**

ALINE ABADIA DE ÁVILA

**Avaliação da expressão de marcadores ósseos 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. Dr. João Eduardo Gomes Filho

ARAÇATUBA – SP
2015

Dedico este trabalho a minha família que sempre me apoiou e incentivou para a realização dos meus ideais, pela compreensão e contribuição para a minha formação acadêmica. Por estarem ao meu lado em todos os momentos e me darem força e coragem para seguir em busca dos meus objetivos. Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo fim de mais uma etapa, pelos sonhos que se concretizam. Por sempre estar presente em minha vida, me dando força para superar cada obstáculo.

Ao meu pai João, minha mãe Maria José e minha irmã Luiza que sempre estiveram presentes me apoiando e me dando forças para continuar. Obrigada por acreditarem em mim e compartilhar esse sonho comigo, sem vocês nada disso seria possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho pelo conhecimento adquirido por compartilhar comigo seu amor pela pesquisa e pelo trabalho, por sempre estar disposto a me ajudar, pela paciência e compreensão. Por ter me ajudado e me guiado ao longo desse trabalho.

À India Azevedo que se tornou uma grande amiga, sempre me ajudou quando eu precisei e me apoiou até mesmo de longe me dando todo suporte necessário para a realização desse trabalho. Muito obrigada pelos ensinamentos compartilhados.

Aos Prof. Dr Luciano Tavares Ângelo Cintra e Prof. Dr Paulo Henrique dos Santos, pela amizade, por terem aceitando o convite para serem minha banca examinadora e por ao longo da graduação terem compartilhado conhecimentos tão importantes para minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Edilson Ervolino, pelo apoio, auxílio e por ter participado de forma determinante para que esse trabalho acontecesse.

À Leandro Furlan de Carvalho pela amizade, carinho, compreensão, paciência e apoio nas horas em que mais precisei.

Às minhas amigas de Araxá, Mayara Marques, Gabrielle Ferreira e Vitória Ávila pela amizade e carinho. Por me apoiarem mesmo distante. Quero que sempre estejam presente em minha vida!

Aos amigos de Araçatuba, Bianca Marques, Dinah Fressato, Débora Bileco, Paola Carneiro, Victoria Berriel, Gabriela Iglesias, Amanda Pontes, Rafael Rocha e Ruan Neri, pela amizade ao longo desses anos, por serem minha família em Araçatuba e pela convivência e crescimento mútuo! Muito obrigada.

Às amigas de departamento Larissa Gonçalves, Luanna Gonçalves e Leticia Vernier pela amizade e enorme ajuda na realização desse trabalho, muito obrigada!

Aos docentes da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra, Prof. Dr. Elói Dezan Júnior, Prof.Dr. Gustavo, Prof. Dr. Rogério de Castilho Jacinto e novamente ao meu orientador Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho pelo aprendizado, apoio e contribuição na minha formação profissional!

Aos funcionários da disciplina de Endodontia, Nelci Vieira pela amizade, apoio e incentivo; Elaine Cristina Ferreira e Peterson Moura, pela amizade e carinho. Muito Obrigada!

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho digníssimo Vice-Diretor.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho! Muito obrigada.

ÁVILA, A. A. **Avaliação da expressão de marcadores ósseos na resposta tecidual ao MTA em animais diabéticos**. 2015. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2015.

Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a expressão de marcadores ósseos na resposta tecidual do cimento endodôntico MTA em animais diabéticos. Foram utilizados 24 ratos, divididos em 02 grupos de 12 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. Os períodos de avaliação foram de 07 e 30 dias. Após cada período pós-operatório, seis animais de cada grupo foram sacrificados 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 e incluída em glicol metacrilato, onde foi observada em coloração por HE. A outra metade dos tubos foi incluída em parafina para análise imunoistoquímica para a presença de Osteocalcina e Osteopontina. O grupo controle aos 07 e 30 dias apresentou um infiltrado inflamatório leve em ambos os grupos diabético e não diabético. O grupo MTA apresentou aos 07 dias, em ambos os grupos diabético e não diabético, uma resposta inflamatória moderada e aos 30 dias um infiltrado inflamatório leve em ambos os grupos diabético e não diabético. A análise imunoistoquímica revelou que no período de 30 dias, MTA expressou mais osteocalcina e osteopontina quando comparado com controle. No grupo MTA, a expressão de osteopontina e osteocalcina foi maior em animais normais do que nos diabéticos. A diabetes mellitus não influenciou a resposta tecidual e a expressão de marcadores ósseos do MTA Angelus Cinza®.

Palavras-chave: Diabetes Mellitus. MTA (Agregado Trióxido Mineral). Osteocalcina. Osteopontina

ÁVILA, A. A. **Evaluation of the bone markers expression on tissue response to MTA in diabetic animals.** 2015. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba 2015.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the expression of bone markers in tissue response to Gray MTA Angelus® in diabetic animals. Twenty-four rats were divided into two groups of twelve animals each: group 1: normal rats, group 2: diabetics rats induced by Alloxan. All animals received two implants of polyethylene tubes, one containing sealer to be tested and an empty tube for control. After 07 and 30 days, six animals of each group were killed and the tubes with surrounding tissues removed and fixed. The tubes were cut in half and a portion processed and included in glycol methacrylate to be observed in hematoxylin and eosin (HE) staining. The other half of the tubes was included in paraffin for immunohistochemistry for the presence of osteocalcin and osteopontin. The control group at 07 and 30 days showed a mild inflammatory response in both diabetic and non-diabetic groups. The MTA group showed at 07 days, in both diabetic and non-diabetic groups, a moderate inflammatory response and at 30 days a mild inflammatory response, in both diabetic and non-diabetic groups. Immunohistochemical analysis revealed that at 30day, MTA group expressed more osteopontin and osteocalcin than control group. In MTA group, the expression of osteopontin and osteocalcin in normal animals was higher than the diabetic. Diabetes mellitus did not influence the tissue response and expression of bone markers to MTA Angelus Cinza®.

Keywords: Diabetic Mellitus. MTA (Mineral TrioxideAggregate). Osteocalcin. Osteopontin.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Resposta inflamatória encontrada no grupo não diabético aos 7dia.	20
Figura 2 – Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 7 dia.	21
Figura 3 – Resposta inflamatória encontrada no grupo não diabético aos 30 dias	21
Figura 4 – Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 30 dias.	22
Figura 5 – Imunomarcção para osteocalcina aos 7 dias.	23
Figura 6 – Imunomarcção para osteopontina aos 7 dias.	23
Figura 7 – Imunomarcção para osteocalcina aos 30 dias.	24
Figura 8 – Imunomarcção para osteopontina aos 30 dias.	24

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Avaliação da expressão de osteocalcina no período de 7 dias.	25
Gráfico 2 – Avaliação da expressão de osteocalcina no período de 30 dias.	26
Gráfico 3 – Avaliação da expressão de osteopontina no período de 7 dias.	26
Gráfico 4 – Avaliação da expressão de osteopontina no período de 30 dias.	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Níveis glicêmicos dos animais durante o experimento.

39

LISTA DE ABREVIATURAS

DM – Diabetes Mellitus

GMA – Glicol Metacrilato

IDF – Internacional Diabetes Federation

IR – Imunorreactiva

MTA – Agregado Trióxido Mineral

OCN – Osteocalcina

OPN – Osteopontina

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Preposição	14
3	Materiais e métodos	15
3.1	Processamento laboratorial e técnica histológica para avaliação da resposta inflamatória	16
3.2	Técnica imunoistoquímica para detecção de Osteocalcina e Osteopontina	17
4	Resultados	20
4.1	Análise histomorfológica	20
4.2	Análise imunoistoquímica	22
5	Discussão	28
6	Conclusão	30
	Referências	31
	Anexos	38

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 insulina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013).

Dados do Internacional 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 Brasil (WHITING et al., 2011).

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 sistêmicas (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2013). Complicações estas que podem gerar disfunções e falência em vários órgãos como os olhos, rins, nervos, o coração, os vasos sanguíneos e osso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2011, BLAKYTNY et al., 2011; LU et al., 2003).

Estudos mostram que é comum a ocorrência de alterações ósseas em pacientes diabéticos (BOTUSHANOV; ORBETZOVA, 2009; VESTERGAARD 2007; YATURU, 2009).

O osso é um tecido dinâmico que sofre constante remodelação durante o seu desenvolvimento normal, envolvendo a interação de fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos. A diferenciação osteoblástica é muito importante durante esse processo (DATTA et al., 2008), sendo esta regulada por uma série de hormônios, citocinas e múltiplos fatores de transcrição (YAMAGUCHI et al., 2000). A osteocalcina (OCN) e a osteopontina (OPN) são proteínas que são expressas e participam diretamente dessa diferenciação.

A osteocalcina é a proteína secretada mais prevalente entre as proteínas não colágenas (LIAN; GUNDBERG, 1988; MOTYL et al., 2010), sendo encontrada no osso, na dentina (CHEN et al., 2009; FISCHER et al., 1990) e em pequenas quantidades na circulação sanguínea, onde seus níveis séricos são considerados marcadores da formação óssea (DELMAS et al., 2000). A osteocalcina desempenha um papel na mineralização, homeostase iônica de cálcio (CHEN et al., 2009; FISCHER et al., 1990) e influencia os níveis de insulina no sangue, tolerância à glicose, sensibilidade à insulina, massa gorda e a proliferação de células beta (DUCY, 2011).

A osteopontina é outra proteína estrutural da matriz extracelular e componente orgânico do osso (CHEN et al., 2009). Glicoproteína que encontra-se envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos: adesão celular (REINHOLT et al., 1990), angiogênese (ASOU et al., 2001), apoptose, respostas inflamatórias e metástases de tumores (DENHARDT;GUO, 1993; DENHARDT et al., 2001; HAYLOCK;NILSSON, 2006). A osteopontina pode se ligar ao cálcio e tem sido descrita como moduladora da mineralização e reabsorção óssea (HAYLOCK;NILSSON, 2006). Além de ser importante na resposta imune e na cicatrização de feridas, incluindo a cicatrização óssea (MCKEE; NANCI, 1996; MCKEE et al., 2011; NAKASE et al., 1998; O'REGAN; BERMAN, 2000).

As razões que levam as mudanças no estado de cicatrização óssea e suas fraturas em indivíduos diabéticos ainda não são totalmente conhecidas. Sabe-se que o controle da inflamação é essencial para que ocorra o processo de reparação óssea. A inflamação sistêmica induz um aumento no fluxo de neutrófilos para a região da fratura implicando em uma estimulação, pelos neutrófilos, da condrogênese e inibição da osteogênese (BASTIAN et al., 2011).

A Inflamação sistêmica decorrente da DM produz também alterações na cavidade oral (LAMEY et al., 1988; LAMSTER et al., 2008; MOORE et al., 2001; SAINI et al., 2010), podendo afetar a prevalência ou o prognóstico de alterações patológicas na cavidade bucal, inclusive as lesões de origem endodôntica (SEGURA-EGEA et al., 2012).

O MTA (Agregado Trióxido Mineral) é um cimento reparador utilizado para selar comunicações patológicas ou iatrogênicas entre o dente e sua superfície externa (LEE et al., 1993, MENTE et al., 2010). Porém, devido às suas excelentes propriedades passou a ser utilizado também em pulpotomias, capeamentos pulpares diretos, apicogêneses e apicificações (TORABINEJAD;CHIVIAN, 1999).

Estudos mostram que o MTA é um material biocompatível, radiopaco, possui atividade antimicrobiana, apresenta boa capacidade de selamento marginal, induz dentinogênese, cementogênese e osteogênese (MAROTO et al., 2006; TANOMARU et al., 2008; THOMSON et al., 2003; TORABINEJAD et al., 1995).

Considerando que uma das propriedades do MTA é participar da indução da mineralização nos tecidos onde é aplicado e que a Diabetes Mellitus é uma desordem metabólica que altera o processo de mineralização, justifica-se a avaliação da expressão de marcadores ósseos na resposta tecidual de materiais endodônticos indutores de mineralização em animais diabéticos.

2 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta tecidual e a expressão de marcadores ósseos do cimento endodôntico MTA, frente a tubos de polietileno implantados no tecido subcutâneo de ratos normais e ratos diabéticos, por meio de técnicas histológicas e imunoistoquímicas.

Objetivos específicos:

- ✓ Analisar a resposta inflamatória ao MTA, por meio da coloração em Hematoxilina e Eosina, em ratos normais e diabéticos.

- ✓ Avaliar a expressão de osteocalcina e osteopontina na resposta inflamatória ao MTA, por meio de imunoistoquímica, em ratos normais e diabéticos.

3 Materiais e Métodos

Animais

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 24 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.

Cimento Reparador MTA Angelus Cinza®

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

MTA Angelus Cinza® é um cimento composto de óxidos minerais na forma de finas partículas hidrofílicas. Apresenta na sua composição SiO₂, K₂O, Al₂O₃, Na₂O, Fe₂O₃, SO₃, CaO, Bi₂O₃ e MgO. Além de resíduos insolúveis de sílica cristalina, óxido de cálcio e sulfatos de potássio e sódio.

O seu tempo de presa inicial, segundo o fabricante, é de aproximadamente 10 minutos e o final de 15 minutos.

Anestésico

Foram empregados como sedativo Anasedan(Divisão Vetbrands Saúde Animal, São Paulo, Brasil), a base de xilazina (relaxante muscular, analgésico e sedativo) na dosagem de 10mg/Kg de peso corporal e como anestésico o Cetamin(Syntec do Brasil, São Paulo, Brasil), a base de cloridrato de ketamina a 5% na dosagem de 25mg/Kg de peso corporal.

Indução da diabetes

Na primeira fase do experimento, metade dos animais (12 ratos) receberam uma dose única de 150mg/kg de Aloxano(Sigma AldrichCorp., St. Louis, EUA) via intraperitoneal em

dose única (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.

Procedimentos Cirúrgicos

Para a realização das intervenções cirúrgicas, os animais foram inicialmente pesados e anestesiados. Após a anestesia dos 24 ratos (12 diabéticos e 12 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 pelos. A anti-sepsia da área desprovida de pelos foi efetuada esfregando uma gaze embebida em solução aquosa 10% de PVPI(Shangai-Med. Sn, Shangai – China) por dois minutos. Em seguida, iniciou-se o procedimento cirúrgico, fazendo uma incisão com lâmina de bisturi número 15 (Sigma AldrichCorp., St. Louis, EUA), no dorso do animal, (tendo a coluna vertebral como linha média de marcação), onde foram criadas duas bolsas por divulsionamento, uma de cada do lado da incisão. Noventa e seis tubos de polietileno (Abbott. Lab. do Brasil, São Paulo – SP) estéreis 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 Angelus Cinza® e um tubo vazio (controle). O tecido foi suturado com fio de seda (4,0) (Ethicon Inc., San Ângelo – EUA) não reabsorvível e anti-sepsia final, foi realizada com PVPI 10% novamente.

3.1 Processamento Laboratorial e técnica histológica para avaliação da resposta inflamatória

Os períodos de avaliação foram 07 e 30 dias e após cada período, seis animais de cada grupo (normal e diabético) foram sacrificados por meio de uma dose excessiva de anestésico Tiopental Sódico na dosagem de 100mg/kg de peso. Antes do sacrifício do grupo diabético foi realizada uma nova mensuração da glicose para comprovar que os mesmos ainda se encontravam em condições diabéticas. Após o sacrifício, os tubos foram localizados e

removidos juntamente com os tecidos que envolviam e foram fixados em solução formalina 10%.

As amostras foram processadas, incluídas em glicol metacrilato (GMA) e cortes seriados de 3µm 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 avaliadas sob a forma de escores de 0 a 3, para resposta inflamatória. Os resultados serão analisados estatisticamente por ANOVA, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância $p < 0,05$.

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 125 células;

3: Severo: superior a 125 células.

3.2 Técnica Imunoistoquímica para detecção Osteocalcina (OCN) e Osteopontina (OPN)

As amostras foram processadas, incluídas em parafina e cortes histológicos seriados de 5µm foram realizados para posterior análise imunoistoquímica. 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, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, depois de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos 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: Osteocalcina (Rabbitanti-osteocalcin SC18319), Osteopontina (Goatanti- osteopontin SC 10593). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes empregou-se 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 PBS-TX procedeu-se 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.

Foram realizadas marcações imunoistoquímica nos cortes histológicos. Foram utilizados anticorpos primários (1:100) contra Osteocalcina (Rabbitanti-osteocalcin SC18319), Osteopontina (Goatanti- osteopontin SC 10593). Foi utilizado anticorpo secundário universal (1:200) - Dako. O sinal da reação foi amplificado com o sistema avidinabiotina (Kit ABC-Vectastain Elite ABC – Peroxidase Standard, reagent A and B only – PK6100 – Vector Laboratories) e a reação 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 será utilizada uma câmera digital acoplada ao microscópio e conectada ao computador.

A avaliação microscópica dos cortes teciduais mais representativos de cada grupo e tempo pós-operatório foram realizados por dois observadores e os dados encontrados foram submetidos à análise estatística pelo programa SigmaPlot 12.3 utilizando-se o Teste de ANOVA e Kruskal Wallis, sendo o nível de significância entre os grupos de $p < 0,05$.

Critério Para Análise da Imunomarcção:

B- Celulas imunorreativas (IR) por campo microscópico:

- 1 Nulo (ausência de células IR)
- 2 Baixo ($\cong 1/4$ das células IR)

- 3 Moderado ($\cong 1/2$ das células IR)
- 4 Alto ($\cong 3/4$ das células IR)

4 Resultados

4.1 Análise histomorfológica

Controle (tubos vazios)

Aos 07 e 30 dias, foi observado um infiltrado celular inflamatório leve consistindo de linfócitos e macrófagos estavam presentes na cápsula fibrosa fina em ambos os grupos diabético e não diabético (Figuras 1A, 2A, 3A, 4A).

MTA Angelus Cinza®

Ao 7º dia, em ambos os grupos diabético e não diabético foi encontrada uma resposta inflamatória moderada consistindo de linfócitos e macrófagos (Figuras 1B, 2B).

Aos 30 dias, um infiltrado inflamatório leve constituído por algumas células inflamatórias crônicas foram observadas em ambos os grupos diabético e não diabético (Figuras 3B, 4B).

Figura 1 – Resposta inflamatória encontrada no grupo não diabético aos 07 dias. Controle: (A) Resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos (hematoxilina e eosina, 10X). MTA Cinza: (B) Presença de capsula Fibrosa espessa com resposta inflamatória moderada (hematoxilina e eosina, 10X

Figura 2 - Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 07 dias. Controle: (A) Presença de resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos

(hematoxilina e eosina, 10X). MTA Cinza: (B) Resposta inflamatória moderada (hematoxilina e eosina, 10X).

Figura 3 - Resposta inflamatória encontrada no grupo não diabético aos 30 dias. Controle: (A) Resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos (hematoxilina e eosina, 10X). MTA Cinza: (B) Presença de capsula Fibrosa espessa com resposta inflamatória leve (hematoxilina e eosina, 10X)

Figura 4 - Resposta inflamatória encontrada no grupo diabético aos 30 dias. Controle: (A) Resposta inflamatória leve consistindo de macrófagos e linfócitos (hematoxilina e eosina, 10X). MTA Cinza: (B) Presença de capsula Fibrosa espessa com resposta inflamatória leve (hematoxilina e eosina, 10X)

4.2 Análise imunoistoquímica

Controle (tubos vazios)

Aos 07 e 30 dias para osteocalcina e osteopontina a quantidade de células IR foi nula para o grupo diabético e não diabético (Figuras: 5a, 5c, 6a, 6c, 7a, 7c, 8a, 8c).

MTA Angelus Cinza[®]

Ao 7º dia para osteocalcina e osteopontina a quantidade de células IR foi nula para os grupos diabético e não diabético.

Ao 30º dia houve para osteocalcina e osteopontina uma quantidade de células IR baixa no grupo não diabético e nula no grupo diabético (Figuras: 5b, 5d, 6b, 6d, 7b, 7d, 8b, 8d).

Figura 5 - Imunomarcção para OCN aos 7 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN nos grupos NG-C (a), NG-MTA (b), DM-C(c) e DM-MTA(d). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm

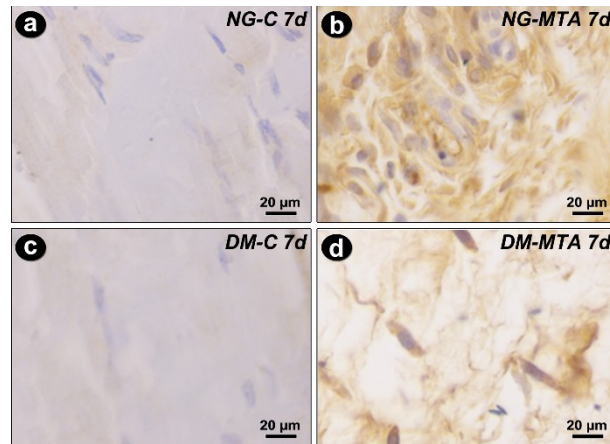


Figura 6 - Imunomarcção para OPN aos 7 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPN nos grupos NG-C (a), NG-MTA (b), DM-C(c) e DM-MTA(d). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm

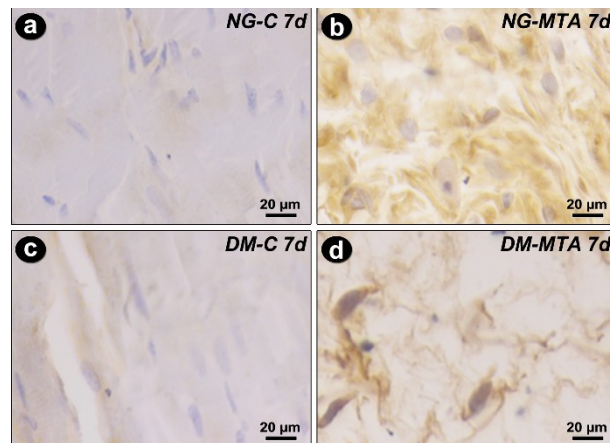


Figura 7 - Imunomarcção para o OCN aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OCN nos grupos NG-C (a), NG-MTA (b), DM-C (c) e DM-MTA (d). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm

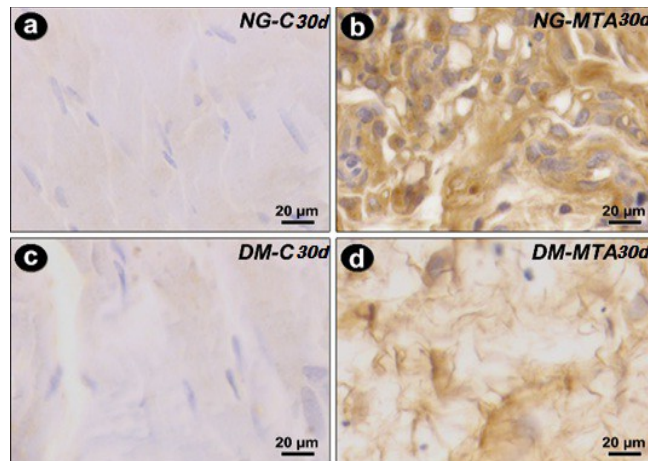
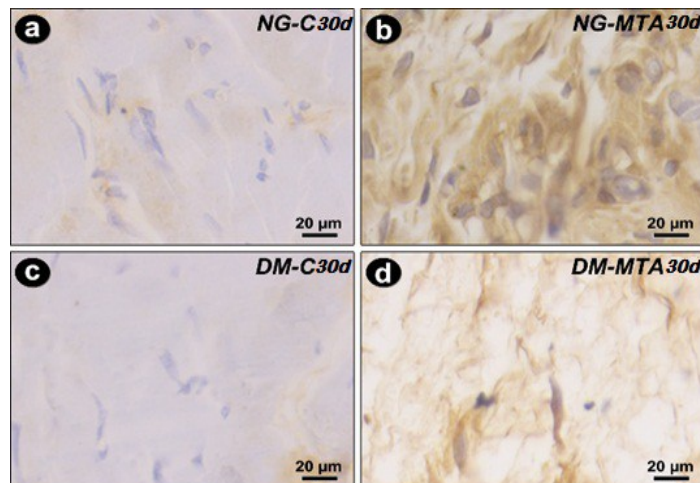


Figura 8 - Imunomarcção para OPN aos 30 dias pós-operatórios. Fotomicrografias evidenciando o padrão de imunomarcção para OPN nos grupos NG-C (a), NG-MTA (b), DM-C (c) e DM-MTA (d). Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Aumento original: 1000x. Barras de escala: 20 µm



Representando os resultados em escores ao 7º dia para a osteocalcina no grupo normoglicêmico ocorreu uma diferença no escore no MTA mas não estatisticamente suficiente para afirmarmos que houve expressão de osteocalcina. No controle foi encontrada uma

quantidade de células imunorreativas nula. No grupo diabético não foi encontrada expressão de osteocalcina (Gráfico 1).

Ao 30º dia para osteocalcina no grupo normoglicêmico ocorreu uma expressão de osteocalcina baixa no MTA e nula no controle. No grupo diabético a expressão de células imunorreativas também foi nula (Gráfico 2).

Para osteopontina ao 7º dia no grupo normoglicêmico ocorreu uma diferença no escore no MTA mas não estatisticamente suficiente para afirmamos que houve expressão de osteopontina. E no controle foi encontrada uma quantidade de células imunorreativas nula. No grupo diabético não foi encontrada expressão de células imurreativas (Gráfico 3)

Ao 30º dia para osteopontina no grupo normoglicêmico ocorreu uma expressão de osteopontina baixa no MTA e nula no controle. No grupo diabético a expressão de células imunorreativas também foi nula (Gráfico 4).

Gráfico 1 - Avaliação da expressão de osteocalcina no período de 7 dias.

Gráfico 2 - Avaliação da expressão de osteocalcina no período de 30 dias.

Gráfico 3: Avaliação da expressão de osteopontina no período de 7 dias.

Gráfico 4 - Avaliação de expressão de osteopontina no período de 30 dias.

5 Discussão

Nesse estudo foram utilizados ratos com idade de aproximadas de 30 dias, pesando aproximadamente 250g e com glicemia normal. O modelo animal, particularmente o rato, é comumente utilizado em pesquisas por possibilitar a padronização dos espécimes e ser representativo para a correlação com estudos em humanos (AZEEZ et al., 2010).

A DM foi induzida pela administração de aloxano (SALIL et al., 2011). O aloxano exerce uma ação citotóxica direta sobre o pâncreas, eliminando a produção de insulina o que causa hiperglicemia severa no animal (SZKUDELSKI, 2001). A hiperglicemia está associada com níveis elevados de marcadores de inflamação sistêmica (DANDONA et al., 2004) e o estado inflamatório elevado contribui para complicações orais, tais como infecções endodônticas. (CATANZARO et al., 2006; LEITE et al., 2008; SEGURA-EGEA et al., 2012).

DM pode modular o fator de infecções endodônticas e pode comprometer o processo de cicatrização dos tecidos periapicais (FOUAD, 2003). O MTA é um material endodôntico com propriedades químicas que favorecem o processo de cicatrização (HOLLAND et al., 1985, 1999, SALLES et al., 2012). O óxido de cálcio presente no material reage com os fluidos do tecido para formar hidróxido de cálcio, que, em contato com água dissociam em íons cálcio e íons hidroxila. Os íons de cálcio reagem com o dióxido de carbono nos tecidos o que estimula a deposição de tecido duro (HOLLAND et al., 1999).

Vários estudos tem demonstrado a biocompatibilidade do MTA, sua atividade antimicrobiana, sua capacidade osteocondutora e de promover a formação de tecido duro. Além de aumentar os níveis de fosfatase alcalina, osteopontina e osteocalcina e estimular a liberação do íon cálcio. (AL-HEZAIMI et al., 2006; DE VASCONCELOS et al., 2009; DUARTE et al., 2003; GANDOLFI et al., 2014; HOLLAND et al., 1999, 2002; HUANG et al., 2005; KOH et al., 1997, 1998; LEE et al., 2014; TANOMARU et al. 2008; TANOMARUFILHO et al., 2009; THOMSON et al, 2003).

Em nosso estudo, a hiperglicemia causada pela doença DM não influenciou a resposta inflamatória e a capacidade de mineralização desse cimento. Embora o estado inflamatório produz um ambiente desfavorável para a angiogênese, proliferação celular e cicatrização de feridas (GARBER et al., 2009), os nossos resultados discordam uma vez que não foi observada alteração na resposta inflamatória independente do estado diabético (GARBER et al., 2009; KOHSAKA et al., 1996; NAGY et al., 2001).

Os marcadores ósseos são proteínas derivadas de osteoblastos que refletem a formação óssea. A OPN e a OCN são proteínas presentes nos tecidos conjuntivos mineralizados (ERIKSEN, 2010; SEIBEL, 2005; THOMPSON et al., 2012).

No nosso estudo houve diferença na expressão de osteopontina e osteocalcina no período de 30 dias, onde o MTA Cinza expressou mais osteopontina e osteocalcina que o controle no grupo normal. O MTA promove a formação de hidróxido de cálcio, mas pouco se sabe sobre o mecanismo pelo qual o hidróxido de cálcio funciona. O íon cálcio (Ca^{2+}) proporciona a dissociação de hidróxido de cálcio e é um importante regulador de funções celulares (HOLLAND et al., 1999, MATSUMOTO et al., 2013; RASHID et al., 2003, TADA et al., 2010; YASUDA et al., 2008). O nível mais elevado de Ca^{2+} induz um aumento na expressão de marcadores ósseos (RASHID et al., 2003, TADA et al. 2010).

Tem sido relatado que os níveis elevados de glicose aumentam a expressão do OPN nas artérias de pacientes diabéticos, e que a OPN implica em outras complicações vasculares diabéticas (TAKEMOTO et al., 2000).

Níveis elevados de osteopontina também foram observados em tecido pulpar de animais diabéticos quando comparados com normais, estimulando assim, a formação de calcificação pulpar (INAGAKI et al., 2010). Porém em nosso estudo no período de 30 dias houve diferença na expressão de osteopontina entre o MTA Cinza normal e o diabético, onde o MTA cinza normal expressou mais osteopontina que o diabético. A OPN é uma glicoproteína multifuncional secretada a partir de vários tipos de células, tais como osteoclastos, linfócitos, macrófagos, células epiteliais e as células do músculo liso vascular. Embora a OPN não esteja presente na maioria dos tecidos moles normais, é altamente localizada nas superfícies de depósitos calcificados, sugerindo que essa proteína possa ser um regulador importante da calcificação ectópica (YAMAGUCHI et al., 2004).

6 Conclusão

Nesse estudo a diabetes mellitus não influenciou na resposta tecidual e na expressão de proteínas ósseas do MTA Angelus Cinza[®].

Referências

- Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, et al. Antibacterial effect of two mineral trioxide aggregate (MTA) preparations against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus sanguis* in vitro. *J End* 2006;32:1053–6.
- American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2011;34Suppl 1:S62–9
- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2013;36Suppl 1:S11-66.
- Asou, Y, Rittling, SR, Yoshitake, H, et al. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. *Endocrinology* 2001;142:1325–32.
- Azeez OI, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO, Odetola AA. Ameliorative effects of *Cnidocolusaconitifolius* on alloxan toxicity in Wistar rats. *Afr Health Sci* 2010;10(3):283-91.
- Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koenderman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. *J LeukocBiol* 2011;89(5):669-73.
- Blakytyn R, Spraul M, Jude EB. The diabetic bone: a cellular and molecular perspective. *Int J Lower Extrem Wounds* 2011;10(1):16–32.
- Botushanov NP, Orbetzova MM. Bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Folia Medica* 2009;51(4):12-7.
- Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, et al. Diabetes and its effects on dental pulp. *J Oral Sci* 2006; 48:195-9.
- Chen CL, Huang TH, Ding SJ, Shie MY, Kao CT. Comparison of calcium and silicate cement and mineral trioxide aggregate biologic effects and bone markers expression in MG63 cells. *J Endod* 2009;35(5):682-5.
- Dandona P, Aljada A, Bandyopadhyay A. Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol* 2004;25:4-7.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J ClinPathol*. 2008;61(5):577-87.
- De Vasconcelos BC, Bernardes RA, Cruz SM, et al. Evaluation of pH and calcium ion release of new root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod* 2009;108:135-9.

- Delmas PD, Eastell R, Garnero P, et al. The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. Committee of Scientific Advisors of the International Osteoporosis Foundation. *OsteoporosInt* 2000;11Suppl 6:S2-17.
- Denhardt DT, Guo X. Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J* 1993;7:1475–82.
- Denhardt, DT, Noda, M, O'Regan, AW, et al. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J ClinInvestig* 2001;107:1055–61.
- Duarte MA, Demarchi ACO, Yamashita JC, et al. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod* 2003;36:610–5.
- Ducy P. The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism. *Diabetologia* 2011;54(6):1291-7.
- Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev EndocMetab Dis* 2010;11:219–27.
- Fisher LW, McBride OW, Termine JD, et al. Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *J BiolChem* 1990;265:2347–51.
- Fouad AF. Diabetes mellitus as a modulating factor of endodontic infections. *J Dent Educ.* 2003;67:459-67.
- Gandolfi MG, Siboni F, Primus CM, Prati C. Ion release, porosity, solubility, and bioactivity of MTA Plus tricalcium silicate. *J Endod* 2014;40:1632-7.
- Garber SE, Shabahang S, Escher AP, et al. The effect of hyperglycemia on pulpal healing in rats. *J Endod* 2009;35:60-2.
- Haylock DN, Nilsson SK. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *Br J Haematol* 2006;134(5):467-74.
- Holland R, Souza V, Nery MJ et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide. *J Endod* 1999;25:161-6.
- Holland R, Souza V. Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endod* 1985;11:535–43.
- Holland R, Souza Vd, Nery MJ et al. Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2002;13:23–6.

- Huang TH, Yang CC, Ding SJ et al. Biocompatibility of human osteosarcoma cells to root end filling materials. *J Biomed Mater Res B Applied Biomater* 2005;72:140–5.
- Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, et al. High glucose levels increase osteopontin production and pathologic calcification in rat dental pulp tissues. *J Endod* 2010;36:1014-20.
- Koh ET, McDonald F, Pitt Ford TR, Torabinejad M. Cellular response to mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1998;24:543–7.
- Koh ET, Torabinejad M, Pitt Ford TR, et al. Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res* 1997;37:432-9.
- Kohsaka T, Kumazawa M, Yamasaki M, et al. Periapical lesions with streptozotocin-induced diabetes. *J Endod* 1996;22:418-21.
- Lamey PJ, Darwaza A, Fisher BM, Samaranayake LP, Macfarlane TW, Frier BM. Secretor status, candidal carriage and candidal infection in patients with diabetes mellitus. *J Oral Pathol* 1988;17(7):354-7.
- Lamster IB, Lalla E, Borgnakke WS, Taylor GW. The relationship between oral health and diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc* 2008;139 Suppl:19S-24S.
- Lee BN, Kim HJ, Chang HS, et al. Effects of mineral trioxide aggregate mixed with hydration accelerators on osteoblastic differentiation. *J Endod* 2014;40:2019-23.
- Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993;11:541-4.
- Leite MF, Ganzerla E, Marques MM, et al. Diabetes induces metabolic alterations in dental pulp. *J Endod* 2008;34:1211-4.
- Lian JB, Gundberg CM. Osteocalcin: biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* 1988;(226):267-91.
- 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: 346–52.
- Maroto M, Barbería E, Vera V, Garcia-Godoy F. Dentin bridge formation after white mineral trioxide aggregate (white MTA) pulpotomies in primary molars. *Am J Dent* 2006;19(2):75-9.
- Matsumoto S, Hayashi M, Suzuki Y, Suzuki N, Maeno M, Ogiso B. Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage. *J Endod* 2013;39:68-75.

- McKee MD, Nanci A. Osteopontin at mineralized tissue interfaces in bone, teeth, and osseointegrated implants: ultrastructural distribution and implications for mineralized tissue formation, turnover, and repair. *Microsc Res Tech* 1996;33(2):141-64.
- McKee MD, Pedraza CE, Kaartinen MT. Osteopontin and wound healing in bone. *Cells Tissues Organs* 2011;194(2-4):313-9.
- 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. *J Endod* 2010;36(2):208-13.
- Moore PA, Guggenheimer J, Etzel KR, Weyant RJ, Orchard T. Type 1 diabetes mellitus, xerostomia, and salivary flow rates. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92(3):281-91.
- Motyl KJ, McCabe LR, Schwartz AV. Bone and glucose metabolism: a two-way street. *Arch Biochem Biophys* 2010;503(1):2-10.
- Nagy A, Nagashima H, Cha S, 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;50:2100-4.
- Nakase, T, Sugimoto, M, Sato, M, et al. Switch of osteonectin and osteopontin mRNA expression in the process of cartilage-to-bone transition during fracture repair. *Acta Histochemica* 1998;100:287-95.
- O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exper Pathol* 2000;81:373-90.
- Rashid F, Shiba H, Mizuno N, et al. (2003) The effect of extracellular calcium ion on gene expression of bone-related proteins in human pulp cells. *J Endod* 2003;29:104-7.
- Reinholt, FP, Hultenby, K, Oldberg, A, Heinegard, D. Osteopontin: a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 4473-5.
- Saini R, Al-Maweri SA, Saini D, Ismail NM, Ismail AR. Oral mucosal lesions in non-oral habit diabetic patients and association of diabetes mellitus with oral precancerous lesions. *Diabetes Res Clin Pract* 2010;89(3):320-6.
- Salil G, Nevin KG, Rajamohan T. Arginine rich coconut kernel protein modulates diabetes in Alloxan treated rats. *Chem Biol Interact* 2011; 189:107-11.

Salles LP, Gomes-Cornélio AL, Guimarães FC, et al. Mineral trioxide aggregate-based endodontic sealer stimulates hydroxyapatite nucleation in human osteoblast-like cell culture. *J Endod* 2012;38:971-6.

Segura-Egea JJ, Castellanos-Cosano L, Machuca G, López-López J, Martín-González J, Velasco-Ortega E, Sánchez-Domínguez B, López-Frías FJ. Diabetes mellitus, periapical inflammation and endodontic treatment outcome. *Med Oral Patol Cir Bucal* 2012;17(2):e 356-61.

Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *ClinBiochem* 2005;26:97-122.

Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res* 2001;50:537-46.

Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *BiochemBiophys Res Commun* 2010;394:1093-7.

Takemoto M, Yokote K, Nishimura M, et al. Enhanced expression of osteopontin in human diabetic artery and analysis of its functional role in accelerated atherogenesis. *ArteriosclerThrombVascBiol* 2000;20(3):624-8.

Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M, Hotta J, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of endodontic sealers based on calcium hydroxide and MTA. *Acta Odontol Latinoam* 2008;21(2):147-51.

Tanomaru Filho M, Chaves Faleiros FB, Saçaki JN, Hungaro Duarte MA, Guerreiro-Tanomaru JM. Evaluation of pH and calcium ion release of root-end filling materials containing calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2009;35:1418-21.

Thompson WR, Rubin CT, Rubin J. Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene* 2012;503:179-93.

Thomson TS, Berry JE, Somerman MJ, Kirkwood KL. Cementoblasts maintain expression of osteocalcin in the presence of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2003;29:407-12.

Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25(3):197-205.

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. *J Endod* 1995;21:295-9.

Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *OsteoporosInt* 2007;18:427-44.

Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res ClinPract* 2011;94(3):311-21.

Yamaguchi A, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *EndocrRev*2000;21:393–411.

Yamaguchi H, Igarashi M, Hirata A, et al. (2004) Progression of diabetic nephropathy enhances the plasma osteopontin level in type 2 diabetic patients. *Endocr J* 2004;51(5):499-504.

Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T. The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: an in vitro study. *J Endod* 2008;34:1057-60.

Yaturu S. Diabetes and skeletal health. *J Diabetes* 2009;1(4):246-54.

Anexo A - Comitê de ética



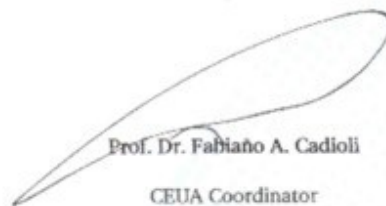
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Avaliação da resposta tecidual e da capacidade de mineralização dos cimentos Sealapex®, MTA Fillapex® e Ângelus MTA® e sua inter-relação entre a diabetes mellitus. Estudo histológico em ratos" sob responsabilidade do Pesquisador JOÃO EDUARDO GOMES FILHO e colaboração de Índia Olinta de Azevedo Queiroz e Simone Watanabe está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 01777-2011.

CERTIFICATE

We certify that the research "Evaluation of tissue response and mineralization ability of Sealapex®, MTA Fillapex® and Ângelus MTA® and their relationship with diabetes mellitus. Histological study in rats", protocol number 01777-2011, under responsibility of JOÃO EDUARDO GOMES FILHO and with collaboration of Índia Olinta de Azevedo Queiroz and Simone Watanabe agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fábio A. Cadioli
CEUA Coordinator

Anexo B- Tabela de controle de Glicemia

Tabela 1 - Níveis glicêmicos dos animais durante o experimento

	<i>Animais</i>	<i>Níveis glicêmicos antes da indução</i>	<i>Níveis glicêmicos antes da indução/ 1º dia do experimento</i>	<i>Níveis glicêmicos/ Sacrifício</i>
7 dias	I	99	501	501
	II	102	562	HI
	III	86	456	523
	IV	94	HI*	HI
	V	105	HI	HI
	VI	89	HI	HI
30 dias	VII	89	575	HI
	VIII	93	500	520
	IX	97	476	HI
	X	101	HI	HI
	XI	98	HI	HI
	XII	100	HI	HI

*HI: Níveis glicêmicos maiores que 600mg/dl.