

Isabela Joane Prado Silva

TESE DE DOUTORADO

**Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de ratos
normoglicêmicos e diabéticos**

ARAÇATUBA - SP

2024

Isabela Joane Prado Silva

**Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de ratos
normoglicêmicos e diabéticos**

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

Orientador: Prof. Assoc. Luciano Tavares Angelo
Cintra

ARAÇATUBA - SP

2024

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S586i Silva, Isabela Joane Prado.
Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de
ratos normoglicêmicos e diabéticos / Isabela Joane Prado
Silva. - Araçatuba, 2024
71 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Diabetes mellitus 2. Inibidores Teciduais de metalopro-
teinases 3. Terapia com luz de baixa intensidade 4. Metalopro-
teinases da matriz I. T.

Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, fonte da minha vida, inspiração e sabedoria. Até aqui o Senhor me sustentou e nunca me abandonou. Obrigada meu Deus por estar sempre comigo e pelo Teu grande amor.

Agradeço especialmente ao meu pai Justiniano Castilho Prado e a minha mãe Luzeni Flauzina Castilho Prado, que me ajudaram, me apoiaram e me fortaleceram durante esta jornada, vocês foram e são os meus maiores incentivadores e intercessores. Agradeço as minhas amadas irmãs: Milene Prado Figueredo e Hérica Prado Barros. Aos meus cunhados: Reyller Figueredo e Marcos Barros. As minhas sobrinhas: Bianca Prado, Mellyna Prado, Alice Prado, Helena Prado e Aurora Prado, que foram o meu sustento, a minha força e o meu amparo, eu amo vocês. Este título ao qual estou alcançando, também é de vocês. Obrigada por tanto.

Agradeço ao meu orientador, professor Doutor Luciano Tavares Angelo Cintra, por todo conhecimento compartilhado durante este período que estive em Araçatuba. Sempre o admirei pelo que ouvi falar do senhor professor, e hoje, eu lhe admiro pelo que aprendi, evolui e cresci, trabalhando com essa maravilhosa equipe. Sou grata a Deus por sua vida. Obrigada pelos ensinamentos, pelas cobranças, pelas broncas e por todos os incentivos, foram eles que me fizeram chegar até aqui. Sua seriedade, profissionalismo, maestria e dedicação são fontes de inspiração, que levarei sempre comigo. Tenho muito orgulho em dizer que fui orientada pelo grande Luciano Cintra.

Agradeço aos membros da banca examinadora, vocês foram escolhidos com muito carinho, respeito e admiração para fazerem parte deste momento único em minha vida. (citar o nome de cada membro assim que for definido)

Agradeço as amigas que a FOA/UNESP me trouxe, as quais farei questão de levar para minha vida, amigos que de uma forma ou de outra me estenderam a mão, quando eu estava mais vulnerável, me auxiliando com as dificuldades particulares e caminhando comigo por estes longos caminhos da pós-graduação, vocês estarão sempre em minhas orações.

Agradeço a todos os colaboradores da FOA/UNESP que tornaram amigos, obrigada por exercerem um papel tão lindo e único nesta instituição de ensino.

Agradeço aos meus familiares, por sonharem comigo. Chegar ao fim de mais uma etapa profissional ao lado de vocês, é motivo de grande honra, lembrar que estiveram comigo, desde a primeira conquista (a graduação) e estão até o dia de hoje é gratificante e honroso para mim. Sou grata por ter vocês comigo. Obrigada.

Por fim, agradeço aos meus colegas de trabalho, aqueles que compõe a equipe da Odontologia - UniBras Montes Belos, instituição a qual sou professora e coordenadora do curso de Odontologia. Vocês fazem parte desse processo. Obrigada ao magnífico reitor e a todos os demais colegas professores. Agradeço aos meus alunos que tornaram meus amigos, que sempre estão ao meu lado e vibram juntamente comigo por este momento.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

"Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença Divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo"

- Chico Xavier

Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos

Resumo

A fotobiomodulação tem sido empregada em diferentes tecidos, devido à sua eficácia analgésica, anti-inflamatória, bioestimulante e regenerativa. Este estudo avaliou o comportamento do tecido pulpar de ratos normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a fotobiomodulação. Foram utilizados 70 ratos *Wistar* distribuídos em 2 grupos, normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a FBM, as peças foram avaliadas por meio da análise da interleucina (IL)-6 e 10, dos fatores de crescimento transformante (TGF)- β e de fibroblastos (FGF)-2, da presença de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2). A DM foi induzida por estreptozotocina. Após confirmação da DM, todos os animais receberam aplicação do laser infravermelho (LIV) (808 nm por 30 s, 3J) nos molares superiores do lado direito, formando os subgrupos: N, D, N-LIV (N tratados com LIV) e D-LIV (D tratados com LIV). Após 0 horas, 2, 7, 15 e 30 dias (n=7), os animais foram eutanasiados e as maxilas processadas análise histológica e análise imunohistoquímica via densidade óptica de imunomarcção (DoI). Testes estatísticos foram aplicados ($p < 0,05$). Nenhum grupo apresentou inflamação pulpar, assim como alterações na DoI para IL-6 em nenhum dos períodos ($p > 0,05$). Os grupos N-LIV e D-LIV apresentaram maior DoI para IL-10 e TGF- β , comparado aos grupos N e D em todos os períodos. Para FGF-2, o grupo N-LIV apresentou maior DoI que o grupo N em todos os períodos ($p < 0,05$). Já o grupo D-LIV apresentou maior DoI que o grupo D nos 3 períodos iniciais ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças entre os grupos para os marcadores MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 ($p > 0,05$). Conclui-se que a FBM exerce ação de proteção, prevenindo a ocorrência de inflamação e estimulando a produção de IL-10, TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de ratos, independente da hiperglicemia.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, Fatores de crescimento, Inibidores teciduais das metaloproteinases, Laserterapia de baixa intensidade, Metaloproteinases da matriz, Resposta pulpar.

Influência da laserterapia de baixa intensidade sobre o tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos

Abstract

A fotobiomodulação tem sido empregada em diferentes tecidos, devido à sua eficácia analgésica, anti-inflamatória, bioestimulante e regenerativa. Este estudo avaliou o comportamento do tecido pulpar de ratos normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a fotobiomodulação. Foram utilizados 70 ratos *Wistar* distribuídos em 2 grupos, normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a FBM, as peças foram avaliadas por meio da análise da interleucina (IL)-6 e 10, dos fatores de crescimento transformante (TGF)- β e de fibroblastos (FGF)-2, da presença de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2). A DM foi induzida por estreptozotocina. Após confirmação da DM, todos os animais receberam aplicação do laser infravermelho (LIV) (808 nm por 30 s, 3J) nos molares superiores do lado direito, formando os subgrupos: N, D, N-LIV (N tratados com LIV) e D-LIV (D tratados com LIV). Após 0 horas, 2, 7, 15 e 30 dias (n=7), os animais foram eutanasiados e as maxilas processadas análise histológica e análise imunohistoquímica via densidade óptica de imunomarcacão (DoI). Testes estatísticos foram aplicados ($p < 0,05$). Nenhum grupo apresentou inflamação pulpar, assim como alterações na DoI para IL-6 em nenhum dos períodos ($p > 0,05$). Os grupos N-LIV e D-LIV apresentaram maior DoI para IL-10 e TGF- β , comparado aos grupos N e D em todos os períodos. Para FGF-2, o grupo N-LIV apresentou maior DoI que o grupo N em todos os períodos ($p < 0,05$). Já o grupo D-LIV apresentou maior DoI que o grupo D nos 3 períodos iniciais ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças entre os grupos para os marcadores MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 ($p > 0,05$). Conclui-se que a FBM exerce ação de proteção, prevenindo a ocorrência de inflamação e estimulando a produção de IL-10, TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de ratos, independente da hiperglicemia.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, Fatores de crescimento, Inibidores teciduais das metaloproteinases, Laserterapia de baixa intensidade, Metaloproteinases da matriz, Resposta pulpar.

Sumário

INTRODUÇÃO	9
II. ARTIGO	13
Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos	15
III. ANEXOS.....	53
Guidelines for Publishing Papers in the Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	54
Comitê de Ética do Uso de Animal	72

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma condição crônica caracterizada por anormalidades na secreção e/ou ação da insulina (American Diabetes Association 2010). O DM é uma doença que afeta todo o sistema e causa problemas em órgãos específicos, como, olhos, nervos e rins (Herman 2007). É uma doença que atualmente afeta 9,0% da população adulta, segundo a organização mundial de saúde (IDF 2022, Whitin et al 2011, Who 2022). A hiperglicemia está associada a um amplo espectro de complicações orais (Manfredi *et al* 2004) e influência na cicatrização pulpar (Garber *et al* 2009). Pacientes diabéticos tem menor resistência a infecções bacterianas e uma reduzida capacidade de reparo tecidual, aumentando a suscetibilidade a reações inflamatórias e infecções (Iacopino 2001).

Estudos anteriores mostram os efeitos do DM no tecido pulpar (Leite et al 2008, Inagaki et al 2010, Claudinho et al 2015), como um elevado índice inflamatório no tecido pulpar de ratos diabéticos (Cintra et al 2016). Os efeitos da fotobiomodulação (FBM) no tecido pulpar de animais hiperglicêmicos apresenta resultados ainda obscuros, necessitando que mais estudos para confirmar sua eficácia reparadora.

Com o avanço nos estudos das luzes, e sua eficácia, a terapia da FBM tem sido cada vez mais utilizada, com a finalidade de reduzir a inflamação e o edema (Bjordal *et al* 2003, Christie *et al* 2007, Jamtvedt *et al* 2008); promover cicatrização em tecidos mais profundos (Gigo-Benato *et al* 2005, Posten *et al* 2005); tratar distúrbios neurológicos e dor (Chow *et al* 2009). Estudos anteriores mostraram que a terapia com a FBM é capaz de promover a biomodulação e proliferação de uma ampla variedade de tipos celulares (Tuby *et al* 2007, Wu *et al* 2012, Karu *et al* 1987). Esta terapia aumenta as taxas de proliferação da medula óssea (Hou *et al* 2008), tecido cardíaco (Tuby *et al* 2007), tecido adiposo (Mvula 2008) e células do ligamento periodontal (Sorares *et al* 2013). Os seus efeitos estão relacionados aos parâmetros da luz, como energia, fluência e comprimento de onda, que podem influenciar de forma diferencial às reações biológicas (Moore 2005, Alghamdi 2012).

A irradiação do laser no tecido, causa um aumento nos produtos mitocondriais, como ATP, NADH, proteína e RNA (Passarella *et al* 1984). A terapia com a FBM está representada por uma ampla variedade de luzes, como os lasers no espectro de luz visível ou invisível (Arany 2016). O comprimento de onda do laser é que determina sua capacidade de penetração nos tecidos e seu consequente desempenho (Barbosa *et al* 2020, Buchalla & Attin 2007). O feixe do laser, é uma onda eletromagnética que difere da luz comum em sua monocromaticidade, coerência e colimação (Barbosa *et al* 2020, Moosavi *et al* 2016). Sabe-se que o laser infravermelho, tem maior capacidade de penetrar nos tecidos (Buchalla & Attin 2007). Para

que o uso da FBM tenha efeito no tecido pulpar, é necessário que o feixe do laser seja capaz de penetrar através do esmalte e dentina, e para melhores resultados, o uso do laser infravermelho é o mais indicado (Terayama *et al* 2020, Silva *et al* 2021).

A FBM através do uso do laser infravermelho envolve a exposição de células ou tecidos a uma luz com baixos níveis de energia, quando comparado a outros tipos de laser que são utilizados para ablação, corte e coagulação térmica (Chung *et al* 2012). Estudos anteriores mostram que a FBM mostra resultados excelentes nos tecidos, como aumento da síntese proteica e duplicação do DNA (Yu *et al* 1996), aumento da concentração de cálcio intracelular (Lubart *et al* 1997), além, de mostrar ser eficaz na indução da proliferação celular através da modulação de fatores de crescimento (May *et al* 2010, Yu *et al* 1996).

Algumas citocinas são importantes para promover um estado anti-inflamatório, e são indicadores de um efeito positivo para reverter uma inflamação intensa (Farges *et al* 2015), podendo nos indicar, por exemplo, se a FBM estaria atuando positivamente na resposta tecidual. A interleucina (IL) IL-10 é uma citocina imunossupressora produzida por células imunes e não imunes que modulam a resposta inflamatória, evitando inflamação excessiva ou desnecessária (Farges *et al* 2015). A IL-6 exerce um papel pró-inflamatório que pode ser atenuado por meio da expressão da IL-10 (Li Mo & Flavel 2008). Adicionalmente, a IL-10 foi expressa em células odontoblastóides *in vitro* sugerindo que os odontoblastos são capazes não apenas iniciar a resposta imune e inflamatória pulpar, mas também de limitar sua intensidade (Farges *et al* 2011).

O fator de crescimento transformante (TGF) TGF- β também é um importante regulador com potentes efeitos imunossupressores (Maciel *et al* 2012), com capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e antagonizar as atividades biológicas dessas citocinas (Sutton *et al* 2009). Em conjunto, parece que tanto o TGF- β quanto a IL-10 regulam as respostas pró-inflamatórias durante as fases aguda e crônica da inflamação (Maciel *et al* 2012).

Durante a formação da dentina no desenvolvimento dentário, proteínas colagenosas e não colagenosas são utilizadas (Widbiller *et al* 2018). Essas proteínas possuem ligação aos íons cálcio e controlam a proliferação celular e apoptose (Widbiller *et al* 2018). Dentre essas proteínas, estão o TGF- β e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) FGF-2 (Silva *et al* 2004, Smith *et al* 2016). A dentinogênese é regulada por odontoblastos altamente diferenciados, originados de células derivadas da crista neural da papila dentária (Linde & Goldberg 1993). Esses odontoblastos podem morrer caso a injúria dentária seja grave (Shao *et al* 2011). O TGF-

β foi visto como um importante mediador da remodelação da matriz extracelular, envolvido na regulação, apoptose, função imunológica e morfogênese celular (Van den Brink *et al* 2004).

O FGF-2 promove a diferenciação *in vitro* de células pulpares em odontoblastos (Hao *et al* 1999), além de estar envolvido na angiogênese e atuar como um mitógeno para as células progenitoras da polpa (Unda *et al* 2001, Mathieu *et al* 2013). Ainda, possui atividade indutiva na produção de cálcio (Mathieu *et al* 2013). A dentina é uma matriz bioativa capaz de liberar esses fatores de crescimento, que são importantes para a terapêutica e regeneração do tecido pulpar (Smith *et al* 2016, Galler *et al* 2011, sendo que TGF- β e FGF-2 parecem ser considerados como fatores chaves neste processo (Mathieu *et al* 2013). Alguns fatores de crescimento foram identificados de forma significativamente maior na polpa dentária de indivíduos diabéticos do que em indivíduos normoglicêmicos (Ilic *et al* 2012), porém, ainda não se sabe a ação de TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de indivíduos diabéticos.

Estudos anteriores relataram que várias metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-2 e MMP-9, estão envolvidas na destruição do tecido pulpar (Gusman *et al* 2002, Shun *et al* 2002, Jain *et al* 2015). Foi demonstrado que os níveis de MMP-9 são significativamente maiores em polpas inflamadas em comparação com as polpas saudáveis; em contrapartida, os níveis de MMP-2 foram significativamente menores na polpa inflamada, e níveis de outras MMPs foram pouco identificados no tecido pulpar (Gusman *et al* 2002). Assim, como as MMPs estão aumentadas na polpa inflamada e reduzem com a redução da resposta inflamatória, estas proteínas desempenham um papel importante na degradação da matriz extracelular, ao mesmo tempo em que são componentes essenciais para o processo de remodelação tecidual (Jain *et al* 2015).

É mostrado que o inibidor de metaloproteinases (TIMP)-1 atua como inibidor específico de MMP-9 (Kim *et al* 2012), enquanto TIMP-2 mostrou ser um modulador de MMP-2 (Kim *et al* 2012, Abadanei *et al* 2013). Acredita-se que o equilíbrio entre as MMPs e TIMPs é o que regula o turnover da matriz extracelular no tecido pulpar danificado (Wisithphrom *et al* 2006).

Considerando que a FBM pode exercer um papel fundamental no tecido pulpar, auxiliando na biomodulação, bem como auxiliar o processo reparativo e regenerativo, este estudo avaliou a influência da FBM sobre o tecido pulpar de ratos diabéticos através da análise da imunomarcagem das interleucinas 6 e 10. Além disso, este estudo avaliou o comportamento do tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos após a aplicação do laser infravermelho, por meio da análise de interleucinas (IL-6 e IL-10), dos fatores de crescimento transformante e de fibroblastos (TGF- β e FGF-2), da presença de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2). Foi adotada a hipótese nula de que a

FBM não influencia na imunomarcção das citocinas pró e anti-inflamatórias, IL-6 e IL-10, e também na imunomarcção de TGF- β , FGF-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

II. Artigo

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

Influência da fotobiomodulação sobre o tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos

PBM and the dental pulp

Key words: Diabetes mellitus, Growth factors, Tissue inhibitors of metalloproteinases, Low-intensity laser therapy, Matrix metalloproteinases, Pulp response.

Name and address of the corresponding author:

Prof. Assoc. Luciano Tavares Angelo Cintra

Department of Endodontics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, SP, Brazil;

R. José Bonifácio, 1193

CEP. 16015-050, Araçatuba, SP

Tel.: (18) 3636-3200

e-mail: luciano.cintra@unesp.br

Resumo

A fotobiomodulação tem sido empregada em diferentes tecidos, devido à sua eficácia analgésica, anti-inflamatória, bioestimulante e regenerativa. Este estudo avaliou o comportamento do tecido pulpar de ratos normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a fotobiomodulação. Foram utilizados 70 ratos *Wistar* distribuídos em 2 grupos, normoglicêmicos (N) e diabéticos (D), após a FBM, as peças foram avaliadas por meio da análise da interleucina (IL)-6 e 10, dos fatores de crescimento transformante (TGF)- β e de fibroblastos (FGF)-2, da presença de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2). A DM foi induzida por estreptozotocina. Após confirmação da DM, todos os animais receberam aplicação do laser infravermelho (LIV) (808 nm por 30 s, 3J) nos molares superiores do lado direito, formando os subgrupos: N, D, N-LIV (N tratados com LIV) e D-LIV (D tratados com LIV). Após 0 horas, 2, 7, 15 e 30 dias (n=7), os animais foram eutanasiados e as maxilas processadas análise histológica e análise imunohistoquímica via densidade óptica de imunomarcção (DoI). Testes estatísticos foram aplicados ($p < 0,05$). Nenhum grupo apresentou inflamação pulpar, assim como alterações na DoI para IL-6 em nenhum dos períodos ($p > 0,05$). Os grupos N-LIV e D-LIV apresentaram maior DoI para IL-10 e TGF- β , comparado aos grupos N e D em todos os períodos. Para FGF-2, o grupo N-LIV apresentou maior DoI que o grupo N em todos os períodos ($p < 0,05$). Já o grupo D-LIV apresentou maior DoI que o grupo D nos 3 períodos iniciais ($p < 0,05$), não foram observadas diferenças entre os grupos para os marcadores MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 ($p > 0,05$). Conclui-se que a FBM exerce ação de proteção, prevenindo a ocorrência de inflamação e estimulando a produção de IL-10, TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de ratos, independente da hiperglicemia.

Palavras-Chave: Diabetes mellitus, Fatores de crescimento, Inibidores teciduais das metaloproteinases, Laserterapia de baixa intensidade, Metaloproteinases da matriz, Resposta pulpar.

Introdução

O diabetes mellitus (DM) é uma condição crônica caracterizada por anormalidades na secreção e/ou ação da insulina (American Diabetes Association 2010) o DM é uma doença que afeta todo o sistema e causa problemas em órgãos específicos, como, olhos, nervos e rins (Herman 2007). É uma doença que atualmente afeta 9,0% da população adulta, segundo a organização mundial de saúde (IDF 2022, Whitin et al 2011, Who 2022). A hiperglicemia está associada a um amplo espectro de complicações orais (Manfredi *et al* 2004) e influencia na cicatrização pulpar (Garber *et al* 2009). Pacientes diabéticos tem menor resistência a infecções bacterianas e uma reduzida capacidade de reparo tecidual, aumentando a suscetibilidade a reações inflamatórias e infecções (Iacopino 2001).

Estudos anteriores mostram os efeitos do DM no tecido pulpar (Leite et al 2008, Inagaki et al 2010, Claudinho et al 2015), como um elevado índice inflamatório no tecido pulpar de ratos diabéticos (Cintra et al 2016). Os efeitos da fotobiomodulação (FBM) no tecido pulpar de animais hiperglicêmicos apresenta resultados ainda obscuros, necessitando que mais estudos para confirmar sua eficácia reparadora.

Com o avanço nos estudos das luzes, e sua eficácia, a terapia da FBM tem sido cada vez mais utilizada, com a finalidade de reduzir a inflamação e o edema (Bjordal *et al* 2003, Christie *et al* 2007, Jamtvedt *et al* 2008); promover cicatrização em tecidos mais profundos (Gigo-Benato *et al* 2005, Posten *et al* 2005); tratar distúrbios neurológicos e dor (Chow *et al* 2009). Estudos anteriores mostraram que a terapia com a FBM é capaz de promover a biomodulação e proliferação de uma ampla variedade de tipos celulares (Tuby *et al* 2007, Wu *et al* 2012, Karu *et al* 1987). Esta terapia aumenta as taxas de proliferação da medula óssea (Hou *et al* 2008), tecido cardíaco (Tuby *et al* 2007), tecido adiposo (Mvula 2008) e células do ligamento periodontal (Sorares *et al* 2013). Os seus efeitos estão relacionados aos parâmetros da luz, como energia, fluência e comprimento de onda, que podem influenciar de forma diferencial às reações biológicas (Moore 2005, Alghamdi 2012).

A irradiação do laser no tecido, causa um aumento nos produtos mitocondriais, como ATP, NADH, proteína e RNA (Passarella *et al* 1984). A terapia com a FBM está representada por uma ampla variedade de luzes, como os lasers no espectro de luz visível ou invisível (Arany 2016). O comprimento de onda do laser é que determina sua capacidade de penetração nos tecidos e seu consequente desempenho (Barbosa *et al* 2020, Buchalla & Attin 2007). O feixe do laser, é uma onda eletromagnética que difere da luz comum em sua monocromaticidade, coerência e colimação (Barbosa *et al* 2020, Moosavi *et al* 2016). Sabe-se que o laser infravermelho, tem maior capacidade de penetrar nos tecidos (Buchalla & Attin 2007). Para

que o uso da FBM tenha efeito no tecido pulpar, é necessário que o feixe do laser seja capaz de penetrar através do esmalte e dentina, e para melhores resultados, o uso do laser infravermelho é o mais indicado (Terayama *et al* 2020, Silva *et al* 2021).

A FBM através do uso do laser infravermelho envolve a exposição de células ou tecidos a uma luz com baixos níveis de energia, quando comparado a outros tipos de laser que são utilizados para ablação, corte e coagulação térmica (Chung *et al* 2012). Estudos anteriores mostram que a FBM mostra resultados excelentes nos tecidos, como aumento da síntese proteica e duplicação do DNA (Yu *et al* 1996), aumento da concentração de cálcio intracelular (Lubart *et al* 1997), além, de mostrar ser eficaz na indução da proliferação celular através da modulação de fatores de crescimento (May *et al* 2010, Yu *et al* 1996).

Algumas citocinas são importantes para promover um estado anti-inflamatório, e são indicadores de um efeito positivo para reverter uma inflamação intensa (Farges *et al* 2015), podendo nos indicar, por exemplo, se a FBM estaria atuando positivamente na resposta tecidual. A interleucina (IL) IL-10 é uma citocina imunossupressora produzida por células imunes e não imunes que modulam a resposta inflamatória, evitando inflamação excessiva ou desnecessária (Farges *et al* 2015). A IL-6 exerce um papel pró-inflamatório que pode ser atenuado por meio da expressão da IL-10 (Li Mo & Flavel 2008). Adicionalmente, a IL-10 foi expressa em células odontoblastóides *in vitro* sugerindo que os odontoblastos são capazes não apenas iniciar a resposta imune e inflamatória pulpar, mas também de limitar sua intensidade (Farges *et al* 2011).

O fator de crescimento transformante (TGF) TGF- β também é um importante regulador com potentes efeitos imunossupressores (Maciel *et al* 2012), com capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , e antagonizar as atividades biológicas dessas citocinas (Sutton *et al* 2009). Em conjunto, parece que tanto o TGF- β quanto a IL-10 regulam as respostas pró-inflamatórias durante as fases aguda e crônica da inflamação (Maciel *et al* 2012).

Durante a formação da dentina no desenvolvimento dentário, proteínas colagenosas e não colagenosas são utilizadas (Widbiller *et al* 2018). Essas proteínas possuem ligação aos íons cálcio e controlam a proliferação celular e apoptose (Widbiller *et al* 2018). Dentre essas proteínas, estão o TGF- β e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) FGF-2 (Silva *et al* 2004, Smith *et al* 2016). A dentinogênese é regulada por odontoblastos altamente diferenciados, originados de células derivadas da crista neural da papila dentária (Linde & Goldberg 1993). Esses odontoblastos podem morrer caso a injúria dentária seja grave (Shao *et al* 2011). O TGF-

β foi visto como um importante mediador da remodelação da matriz extracelular, envolvido na regulação, apoptose, função imunológica e morfogênese celular (Van den Brink *et al* 2004).

O FGF-2 promove a diferenciação *in vitro* de células pulparem em odontoblastos (Hao *et al* 1999), além de estar envolvido na angiogênese e atuar como um mitógeno para as células progenitoras da polpa (Unda *et al* 2001, Mathieu *et al* 2013). Ainda, possui atividade indutiva na produção de cálcio (Mathieu *et al* 2013). A dentina é uma matriz bioativa capaz de liberar esses fatores de crescimento, que são importantes para a terapêutica e regeneração do tecido pulpar (Smith *et al* 2016, Galler *et al* 2011, sendo que TGF- β e FGF-2 parecem ser considerados como fatores chaves neste processo (Mathieu *et al* 2013). Alguns fatores de crescimento foram identificados de forma significativamente maior na polpa dentária de indivíduos diabéticos do que em indivíduos normoglicêmicos (Ilic *et al* 2012), porém, ainda não se sabe a ação de TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de indivíduos diabéticos.

Estudos anteriores relataram que várias metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-2 e MMP-9, estão envolvidas na destruição do tecido pulpar (Gusman *et al* 2002, Shun *et al* 2002, Jain *et al* 2015). Foi demonstrado que os níveis de MMP-9 são significativamente maiores em polpas inflamadas em comparação com as polpas saudáveis; em contrapartida, os níveis de MMP-2 foram significativamente menores na polpa inflamada, e níveis de outras MMPs foram pouco identificados no tecido pulpar (Gusman *et al* 2002). Assim, como as MMPs estão aumentadas na polpa inflamada e reduzem com a redução da resposta inflamatória, estas proteínas desempenham um papel importante na degradação da matriz extracelular, ao mesmo tempo em que são componentes essenciais para o processo de remodelação tecidual (Jain *et al* 2015).

É mostrado que o inibidor de metaloproteinases (TIMP)-1 atua como inibidor específico de MMP-9 (Kim *et al* 2012), enquanto TIMP-2 mostrou ser um modulador de MMP-2 (Kim *et al* 2012, Abadanei *et al* 2013). Acredita-se que o equilíbrio entre as MMPs e TIMPs é o que regula o turnover da matriz extracelular no tecido pulpar danificado (Wisithphrom *et al* 2006).

Considerando que a FBM pode exercer um papel fundamental no tecido pulpar, auxiliando na biomodulação, bem como auxiliar o processo reparativo e regenerativo, este estudo avaliou a influência da FBM sobre o tecido pulpar de ratos diabéticos através da análise da imunomarcagem das interleucinas 6 e 10. Além disso, este estudo avaliou o comportamento do tecido pulpar de ratos normoglicêmicos e diabéticos após a aplicação do laser infravermelho, por meio da análise de interleucinas (IL-6 e IL-10), dos fatores de crescimento transformante e de fibroblastos (TGF- β e FGF-2), da presença de metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e inibidores de metaloproteinases (TIMP-1 e TIMP-2). Foi adotada a hipótese nula de que a

FBM não influencia na imunomarcção das citocinas pró e anti-inflamatórias, IL-6 e IL-10, e também na imunomarcção de TGF- β , FGF-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2.

Material e Métodos

Modelo experimental

Foram utilizados 70 ratos *albinus Wistar* machos com 2 meses de idade, pesando aproximadamente 280g. O tamanho da amostra baseou-se em estudos anteriores (Benetti *et al* 2019, Cintra *et al* 2017]. Os animais foram mantidos em ambiente com ciclo de luz e temperatura controlada (22°C $\pm$ 1°C, 70% de umidade e 12 horas em ciclo claro-escuro) e receberam água e comida a vontade. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para cuidado e uso de animais do Laboratório do Instituto Nacional de Saúde (Bethesda, MD, USA). O protocolo experimental (CEUA-2018-0603) foi aprovado pelo Comitê de Ética local.

Diabetes Mellitus

Os animais foram anestesiados por via intramuscular, através da injeção de Ketamina (Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A – Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil) e Xilazina (Xilazin 2%, Syntec do Brail LTDA – Cotia, São Paulo, Brasil). A DM foi induzida através da injeção peniana de estreptozotocina (35 mg/kg, ip) diluída em tampão citrato (10 mmol/L citrato de sódio, pH 4,5) em metade dos animais e confirmada 6 dias após a indução, utilizando um aparelho de monitoramento de glicose apropriado (Accu-Chek Advantage, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) Os animais inclusos no grupo diabético, foram aqueles animais que apresentaram os níveis glicêmicos igual ou superior a 250.

Fotobiomodulação

Os molares superiores direitos dos ratos receberam de forma aplicação do laser infravermelho (Terayama *et al* 2020). O aparelho utilizado foi o semiconductor duo (GaAlAs) (MM Optics Ltda, São Carlos, SP, Brasil) no uso do laser infravermelho (LIV) com comprimento de onda de 808nm, aplicado por 30 segundos. O dispositivo apresenta potência fixa de 100 mW. A saída do feixe com uma área de 3 mm², foi mantida em contato com a face ocluso-vestibular dos molares superiores do lado direito, a espessura do esmalte e dentina do dente do animal, é semelhante ao dente humano, fator em que levou a seleção da realização do trabalho *in vivo*.

Durante a aplicação do laser os animais foram colocados em uma mesa cirúrgica para promover a abertura bucal, em seguida, foi feita uma cobertura no centro do palato do animal, para proteger os molares do lado oposto, para tal finalidade, foi utilizado uma espátula metálica número 24 envolta em um tecido escuro, para vedar a passagem de luz entre os arcos, mantendo a incidência da luz somente nos dentes do lado selecionado para receber a FBM.

O modelo de boca dividida foi estabelecido entre os grupos com ou sem laser, sendo normoglicêmico ou diabético determinando os seguintes subgrupos: N, N-LIV, D e D-LIV. Conforme a figura 1.

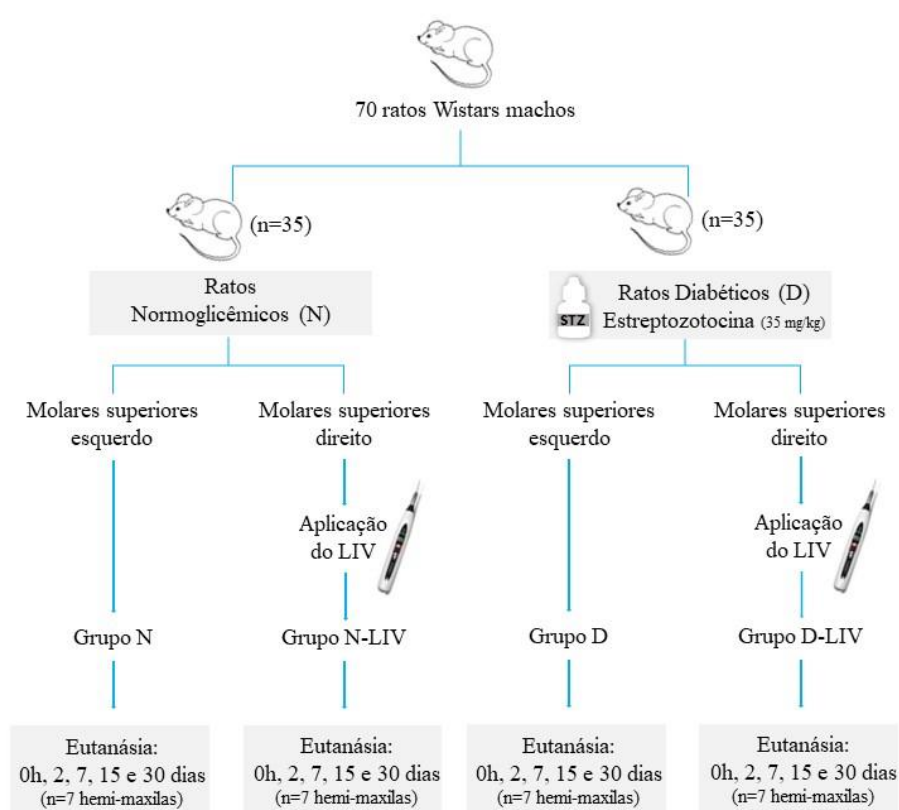


Figura 1. Diagrama mostrando a distribuição e randomização dos ratos em cada grupo.

Sacrifício e processamento laboratorial

Em 0h, 2, 7, 15 e 30 dias os animais foram eutanasiados com superdosagem de Tiopental de Sódico (150 mg/kg; Thipentax, Cristália, Produtos Químicos Farmacêuticos LTDA, Itapira, SP, Brasil). As hemi-maxilas foram separadas e fixadas em solução de formalina a 10% (18 horas). As peças foram descalcificadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 3% por aproximadamente 3 meses. Em seguida, foram desidratadas, clarificadas e incluídas em

parafina. Cortes histológicos de cada espécime foram selecionados, tendo como referência a raiz mesial do primeiro molar, que deveria estar disposta em total extensão longitudinal. Os cortes histológicos foram realizados com 5µm de espessura e as lâminas histológicas foram montadas com 3 corte cada. Duas lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina para análise usando microscopia óptica (ampliação de 400x, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Outras 2 lâminas com 3 cortes histológicos cada foram obtidos para avaliação imunoistoquímica, e foram divididas para cada um dos marcadores: IL-6, IL-10, TGF-β, FGF-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em uma série decrescente de etanol. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão dos cortes histológicos em tampão Diva Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. As lâminas foram lavadas em tampão fosfato salino ao final de cada etapa. Os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos. As lâminas histológicas foram divididas e incubadas com um dos seguintes anticorpos primários: anti-IL-6, anti-IL-10, anti-TGF-β, anti-FGF-2, anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-1, anti-TIMP-2 (anticorpos primários de coelho; Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA).

Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Os cortes histológicos foram incubados no anticorpo secundário biotinilado por 1 hora e 30 minutos e posteriormente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora e 30 minutos. Depois de lavar as lâminas em solução de PBS-TX procedeu-se a revelação utilizando como cromógeno o 3,3'-tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA) e contracorados com hematoxilina.

Análise Histológica e imunohistoquímica

Para cada espécime foram utilizadas 2 lâminas com 3 cortes teciduais cada. A câmara pulpar foi dividida em terços oclusa, médio e cervical e a análise do infiltrado inflamatório foi realizada por meio de escores segundo critérios previamente definidos: escore 1 - Células inflamatórias ausentes ou em número desprezível; escore 2 - Infiltrado inflamatório leve (<25 células por campo); escore 3 - Infiltrado inflamatório moderado (entre 25 e 125 células por campo); escore 4 - Infiltrado inflamatório severo (>125 células por campo); e escore 5 – Necrose (Cintra et al 2017, Benetti et al 2018).

Para as análises da imunomarcção, as seções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão). As imunomarcções foram definidas como aquelas de coloração acastanhada presente nas células e/ou na matriz extracelular, foi analisado todo o tecido pulpar, através de imagens obtidas com um aumento de 400x. Com o auxílio de um software de análise de imagem (Axiovision 4.8.2® Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), a área correspondente à imunomarcção foi delineada utilizando a ferramenta de limiar de cor para obter a densidade óptica de imunomarcção, expressa em porcentagem de unidade de densidade óptica (média $\pm$ desvio padrão) [36].

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas por um histologista calibrado e cego (E.E.), proporcionando dados para análise estatística. Os dados foram submetidos aos testes Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, Shapiro-Wilk, ANOVA e teste T utilizados para comparações estatísticas e imunoistoquímica, com nível de significância de 5%.

Resultados

A prevalência do DM tem aumentado constantemente nas últimas décadas (Amutha & Mohan 2016), estudos anteriores mostram que essa alteração, provoca efeitos no tecido pulpar, como a inflamação (Cintra *et al* 2016). No presente estudo, seis dias após a indução do diabetes, foi feita a verificação dos níveis glicêmicos, para que fosse confirmada a hiperglicemia nos animais.

Os grupos diabéticos, a verificação dos níveis glicêmicos, foi realizada antes de cada período experimental, para confirmar que o animal estava diabético antes do experimento e eutanásia. Foi levado em consideração os níveis glicêmicos normais conforme estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS), onde, o estado de normalidade da glicemia em jejum é de 70 mg/dl a 100mg/dl. Aqueles animais que apresentaram resultados glicêmicos inferior a 150 mg/dl, foram excluídos no presente estudo. Os animais que apresentaram níveis glicêmicos igual ou superior a 150 mg/dl, foram incluídos no presente estudo.

Análise Histológica

A figura 2 mostra as imagens representativas dos cortes teciduais corados em H.E. nos períodos de 0h, 2, 7, 15 e 30 dias, e a tabela 1, mostra os resultados obtidos.

Nos resultados, podemos observar que não houve alteração de normalidade nas condições avaliadas em nenhum dos períodos de avaliação em nenhum grupo. Os grupos N, N-LIV, D e D-LIV apresentaram aspectos de normalidade e homeostasia pulpar, sem alterações morfológicas celulares ou de estrutura de dentina, pré-dentina ou matriz extracelular no interior da polpa dentária ($p>0,05\%$). Estes achados indicam que o protocolo de FBM empregado não induziu alteração no tecido pulpar, mesmo nos grupos diabéticos.

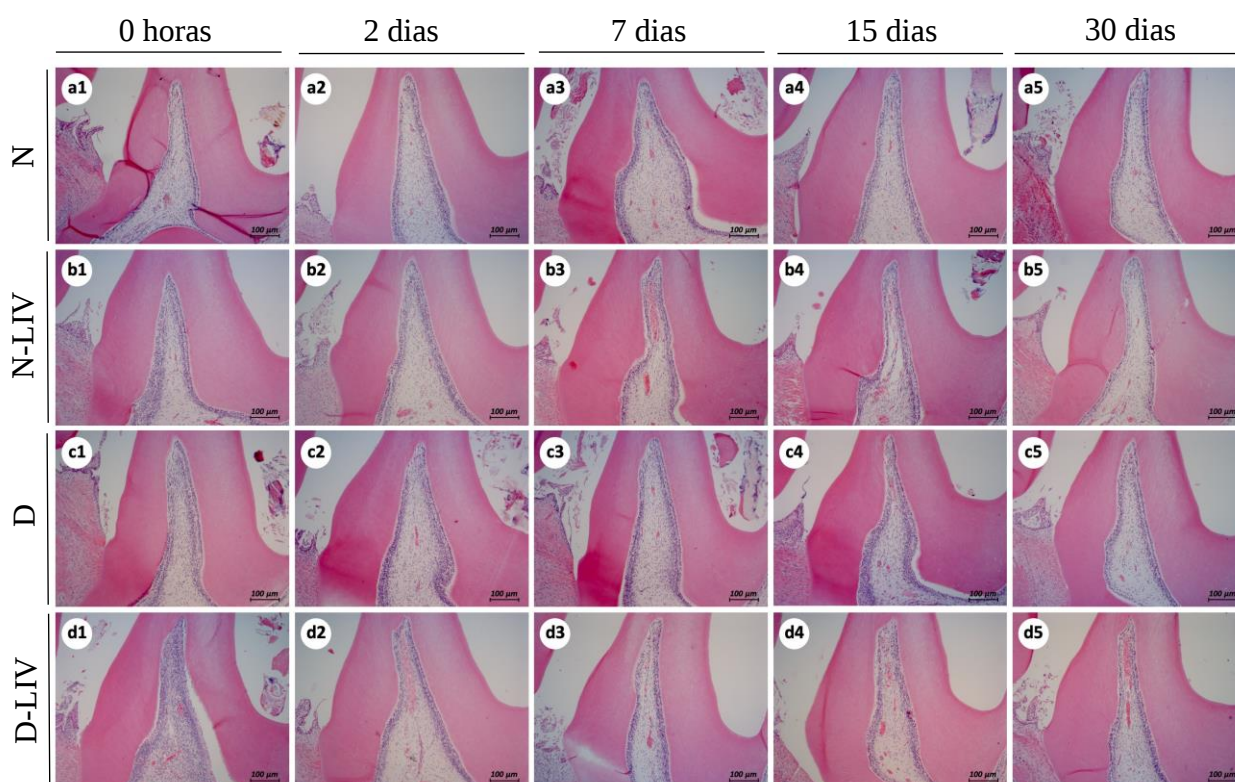


Figura 2. Imagens representativas da coloração de H.E. Os grupos representados na figura, mostram uma semelhança dos resultados nas condições estudadas. Mostrando que não há diferença estatística significativa entre os grupos ($p>0,05\%$). Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [H.E., 100x].

Tabela 1 - The Median Scores, Interquartile Ranges, Mean, Standard Deviation (SD), and P values of Inflammatory infiltrate, and IL-6 and IL-10 percentage of optical density unit findings in rats from all groups

Histologic and Immunohistochemical criteria	Periods	Experimental groups				ANOVA test and p value
		N	LIV	D	D-LIV	
Inflammatory infiltrate* (median scores and interquartile ranges)	0h	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	N x N-LIV, p = 1; D x D-LIV, p = 1
	2 days	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	N x N-LIV, p = 1; D x D-LIV, p = 1
	7 days	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	N x N-LIV, p = 1; D x D-LIV, p = 1
	15 days	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	N x N-LIV, p = 1; D x D-LIV, p = 1
	30 days	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	1 (1-1) ^a	N x N-LIV, p = 1; D x D-LIV, p = 1
IL-6 (percentage of optical density unit (mean ± standard deviation)	0h	19.13 ± 3.51 ^a	19.34 ± 4.17 ^a	18.60 ± 4.32 ^a	19.85 ± 2.96 ^a	N x N-LIV, p = 0.918; D x D-LIV, p = 0.540
	2 days	18.60 ± 3.79 ^a	18.67 ± 3.07 ^a	18.29 ± 3.82 ^a	19.45 ± 1.37 ^a	N x N-LIV, p = 0.967; D x D-LIV, p = 0.498
	7 days	21.04 ± 3.35 ^a	20.53 ± 2.78 ^a	20.91 ± 3.39 ^a	20.88 ± 3.97 ^a	N x N-LIV, p = 0.785; D x D-LIV, p = 0.988
	15 days	21.37 ± 4.62 ^a	21.62 ± 3.13 ^a	22.60 ± 1.13 ^a	21.22 ± 2.93 ^a	N x N-LIV, p = 0.882; D x D-LIV, p = 0.427
	30 days	21.09 ± 3.53 ^a	21.79 ± 4.10 ^a	22.51 ± 3.13 ^a	20.98 ± 4.39 ^a	N x N-LIV, p = 0.734; D x D-LIV, p = 0.462
IL-10 (percentage of optical density unit (mean ± standard deviation)	0h	21.36 ± 3.89 ^a	32.00 ± 2.04 ^b	20.65 ± 2.71 ^a	31.42 ± 4.37 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	2 days	23.12 ± 4.40 ^a	30.71 ± 3.07 ^b	19.33 ± 3.82 ^a	30.96 ± 2.40 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	7 days	20.44 ± 4.25 ^a	28.48 ± 3.96 ^b	19.82 ± 3.59 ^a	31.64 ± 3.97 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	15 days	20.26 ± 4.62 ^a	32.25 ± 3.13 ^b	19.44 ± 2.78 ^a	28.88 ± 2.95 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	30 days	16.83 ± 3.30 ^a	30.59 ± 4.73 ^b	20.76 ± 3.51 ^a	29.86 ± 3.57 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001

*Different superscript letters represent statistically significant differences in lines (p < 0.05)

Análises Imunoistoquímica

A figura 3 mostra as imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica para IL-6. Os grupos N e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica (Tabela 1). Os grupos de ratos normoglicêmicos e diabéticos tratados com LIV (N-LIV e D-LIV) apresentaram valores semelhantes para densidade óptica de imunomarcção de IL-6 em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$). Este achado indica que o LIV não influencia na produção de IL-6.

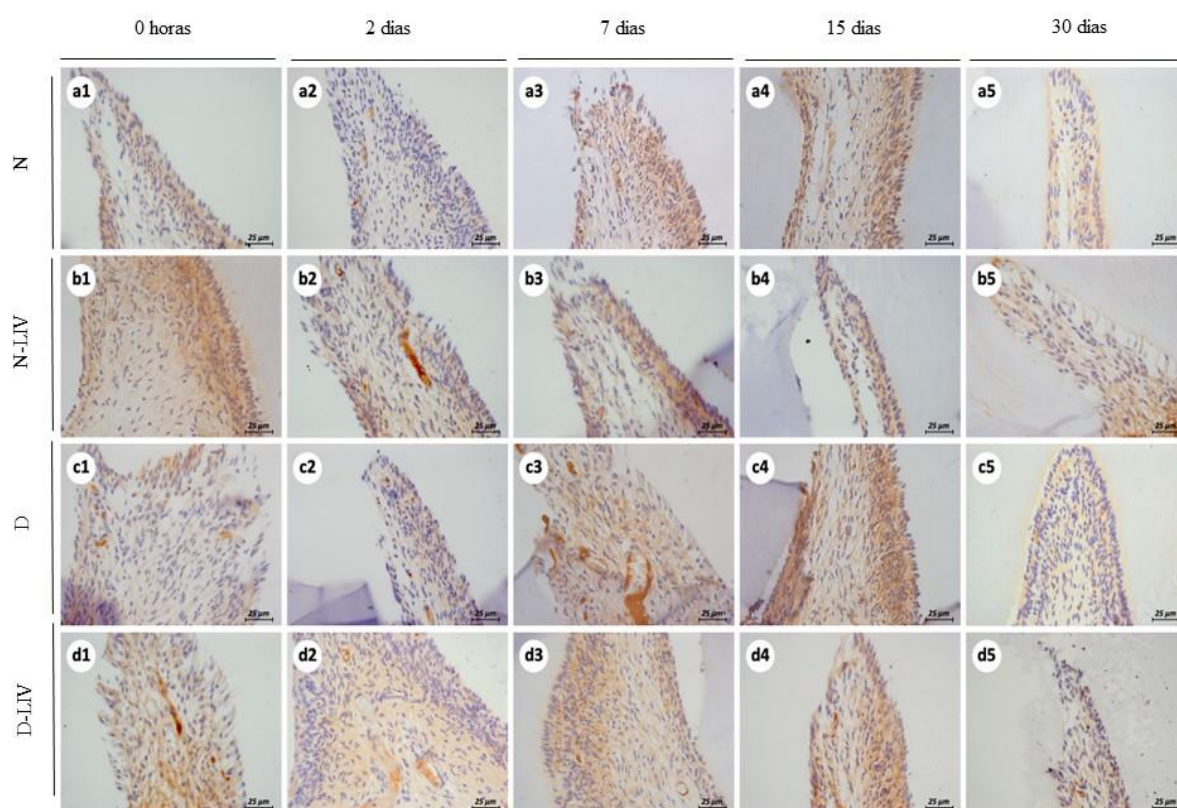


Figura 3. Imagens representativas da imunomarcção para IL-6. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [IL-6, 400x].

A figura 4 mostra as imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica para IL-10. Os grupos de ratos N e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica em todos os períodos experimentais. Na presença do LIV o grupos N-LIV e D-LIV apresentam valores superiores quando comparados aos grupos N e D em todos os períodos, mas semelhantes entre si, também em todos os períodos experimentais ($p < 0,05\%$). Este achado indica que o LIV eleva a produção de IL-10, independente da presença da diabetes (Tabela 1).

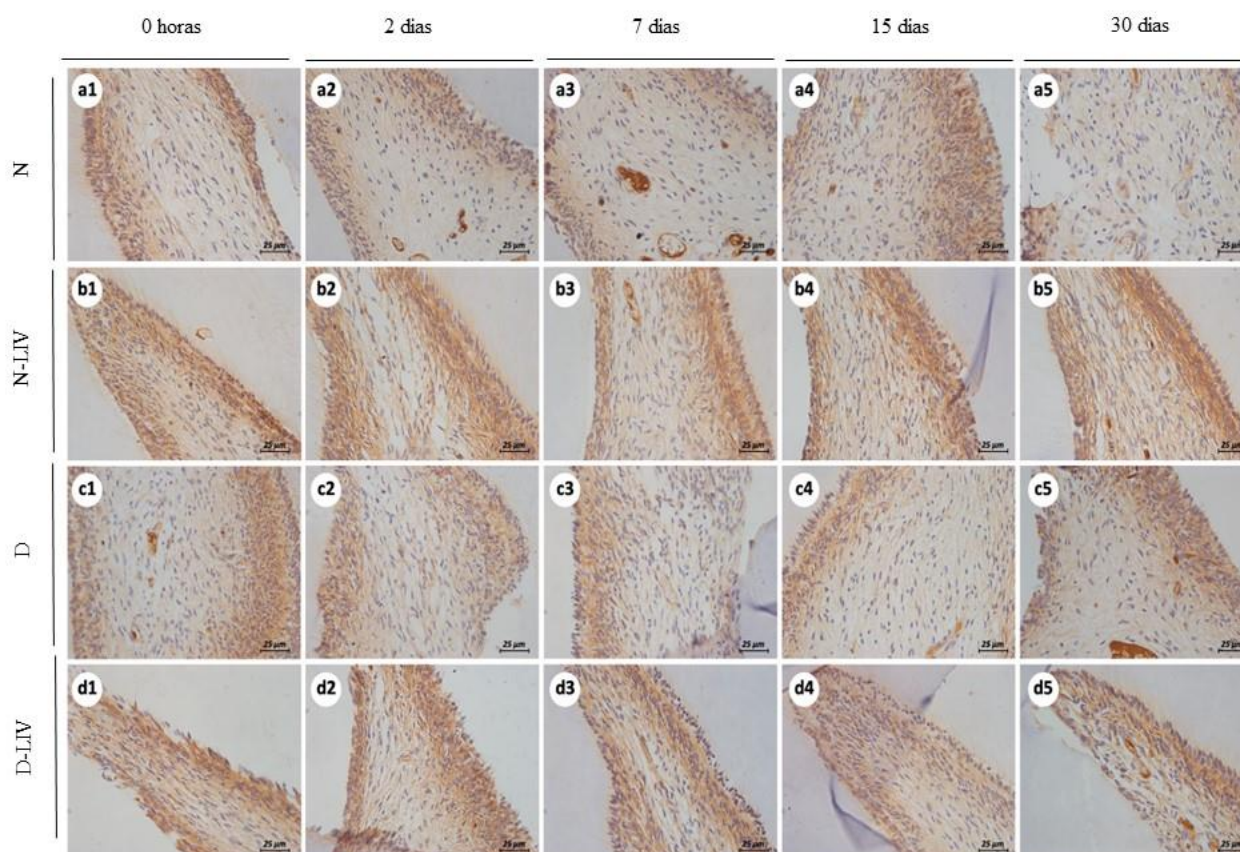


Figura 4. Imagens representativas da imunomarcacão para IL-10. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [IL-10, 400x].

A figura 5 mostra as imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica para TGF- β . Foi observado densidade de imunomarcacão mais elevada nos grupos em que receberam LIV em todos os períodos experimentais. Este achado indica que a diabetes eleva a produção de TGF- β no tecido pulpar. Já o grupo D-LIV apresentou valores superiores para densidade óptica de imunomarcacão para TGF- β comparado ao grupo D na maioria dos períodos experimentais ($p < 0,05$), exceto no período imediato ($p = 0,695$). Este achado indica que a LIV eleva a produção de TGF- β em ratos diabéticos, após um período de aplicação (Figura 5; Tabela 2).

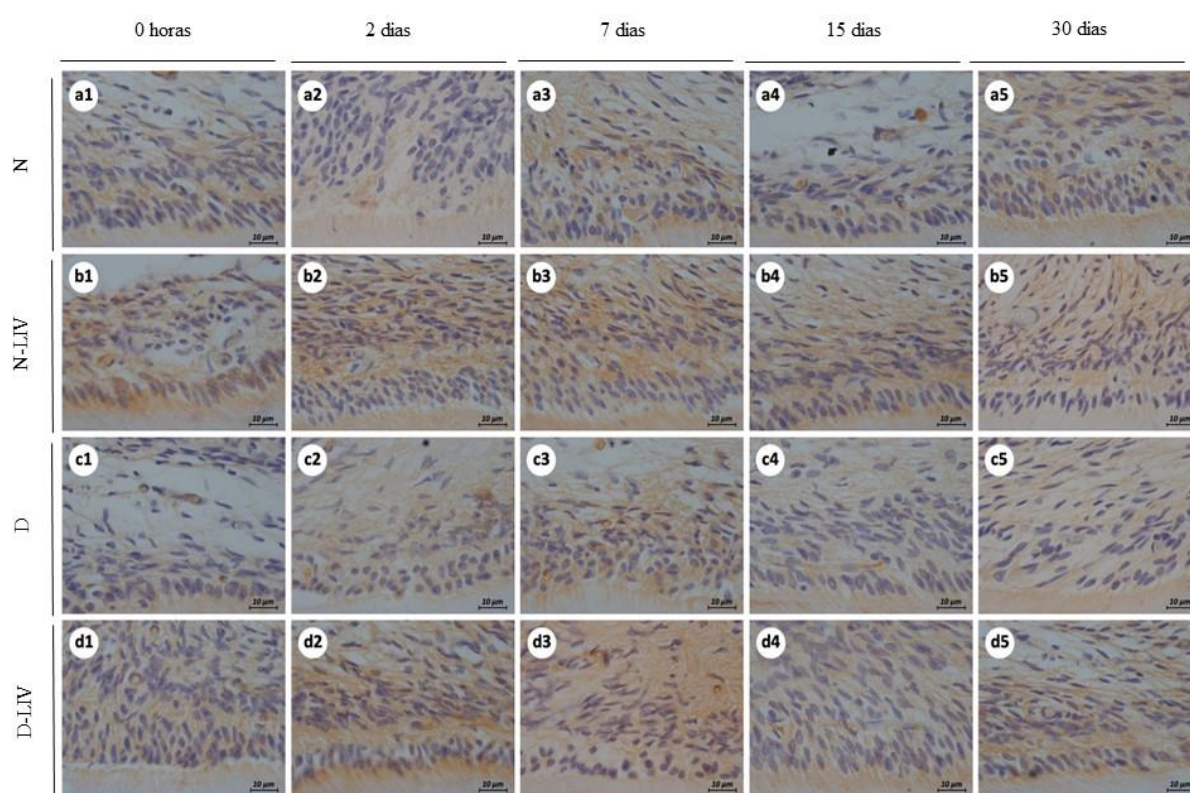


Figura 5. Imagens representativas da imunomarcacão para TGF- β . Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [TGF- β ,

A figura 6 mostra as imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica para FGF-2. Foi observado que os grupos N e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica em todos os períodos experimentais. Este achado mostra que a diabetes não influenciou na produção de FGF-2 no tecido pulpar. Os grupos que recebem o LIV (N-LIV e D-LIV) apresentaram valores superiores quando comparado a seus respectivos controles (N e D) ($p < 0,05$). O grupo D-LIV, apresentou imunomarcação para FGF-2 nos 3 períodos iniciais (0h, $p = 0,003$; 2d, $p = 0,002$; 7d, $p = 0,004$). Estes achados mostram que o LIV estimulou produção de FGF-2 no tecido pulpar, no entanto, na presença do diabetes, o estímulo ocorre durante um menor período (Figura 6; Tabela 2).

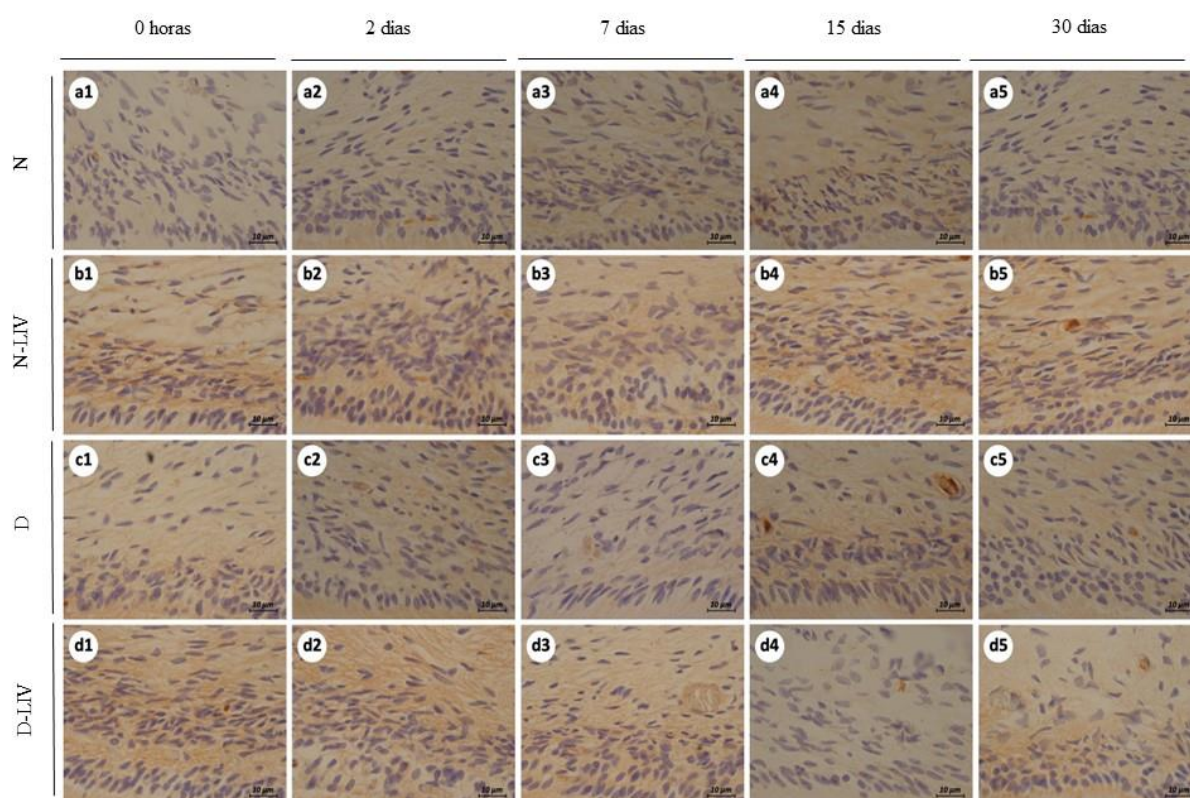


Figura 6. Imagens representativas da imunomarcação para FGF-2. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [FGF-2, 1000x].

Table 2. The Median Scores, Interquartile Ranges, Mean, Standard Deviation (SD), and P values of TGF- β and FGF-2 percentage of optical density unit findings in rats from all groups

Immunohistochemical criteria	Periods	Experimental groups				ANOVA test and p value
		C	LIV	D	D-LIV	
TGF-β (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	6.54 $\pm$ 1.24 ^a	8.89 $\pm$ 2.04 ^b	6.70 $\pm$ 2.26 ^a	9.74 $\pm$ 0.95 ^b	N x N-LIV, p = 0.017; D x D-LIV, p = 0.003
	2 days	6.29 $\pm$ 1.21 ^a	12.82 $\pm$ 1.71 ^b	6.54 $\pm$ 2.27 ^a	13.60 $\pm$ 2.07 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	7 days	7.16 $\pm$ 1.68 ^a	10.41 $\pm$ 1.81 ^b	8.13 $\pm$ 2.03 ^a	11.61 $\pm$ 1.31 ^b	N x N-LIV, p = 0.002; D x D-LIV, p < 0.001
	15 days	5.61 $\pm$ 1.01 ^a	10.77 $\pm$ 2.53 ^b	6.69 $\pm$ 1.13 ^a	10.29 $\pm$ 1.75 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p < 0.001
	30 days	6.49 $\pm$ 1.42 ^a	10.94 $\pm$ 1.47 ^b	7.74 $\pm$ 1.41 ^a	10.16 $\pm$ 1.28 ^b	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p = 0.003
FGF-2 (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	10.87 $\pm$ 2.39 ^a	13.96 $\pm$ 2.04 ^b	10.00 $\pm$ 1.79 ^a	14.08 $\pm$ 2.35 ^b	N x N-LIV, p = 0.013; D x D-LIV, p = 0.002
	2 days	11.19 $\pm$ 1.80 ^a	13.58 $\pm$ 2.07 ^b	10.55 $\pm$ 2.07 ^a	14.97 $\pm$ 2.37 ^b	N x N-LIV, p = 0.043; D x D-LIV, p < 0.001
	7 days	10.20 $\pm$ 1.66 ^a	13.15 $\pm$ 1.55 ^b	10.88 $\pm$ 1.55 ^a	13.11 $\pm$ 1.24 ^b	N x N-LIV, p = 0.001; D x D-LIV, p = 0.011
	15 days	10.24 $\pm$ 2.65 ^a	15.53 $\pm$ 2.82 ^b	10.01 $\pm$ 2.21 ^a	9.88 $\pm$ 1.83 ^a	N x N-LIV, p < 0.001; D x D-LIV, p = 0.920
	30 days	11.54 $\pm$ 2.24 ^a	15.70 $\pm$ 3.18 ^b	10.49 $\pm$ 1.79 ^a	10.35 $\pm$ 2.64 ^a	N x N-LIV, p = 0.005; D x D-LIV, p = 0.923

*Different superscript letters represent statistically significant differences in lines (p < 0.05)

As figuras 7 e 8 mostram as imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica MMP-2 e MMP-9, respectivamente. Para ambos marcadores, os grupos N e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica, assim como os grupos N-LIV e N e D-LIV e D, que também apresentaram valores semelhantes para densidade óptica em todos os períodos experimentais ($p < 0,05\%$). Este achado indica que tanto a diabetes como o LIV não influenciaram a produção de MMP-2 (Figura 7) e de MMP-9 (Figura 8) no tecido pulpar, em todos os grupos (Tabela 3).

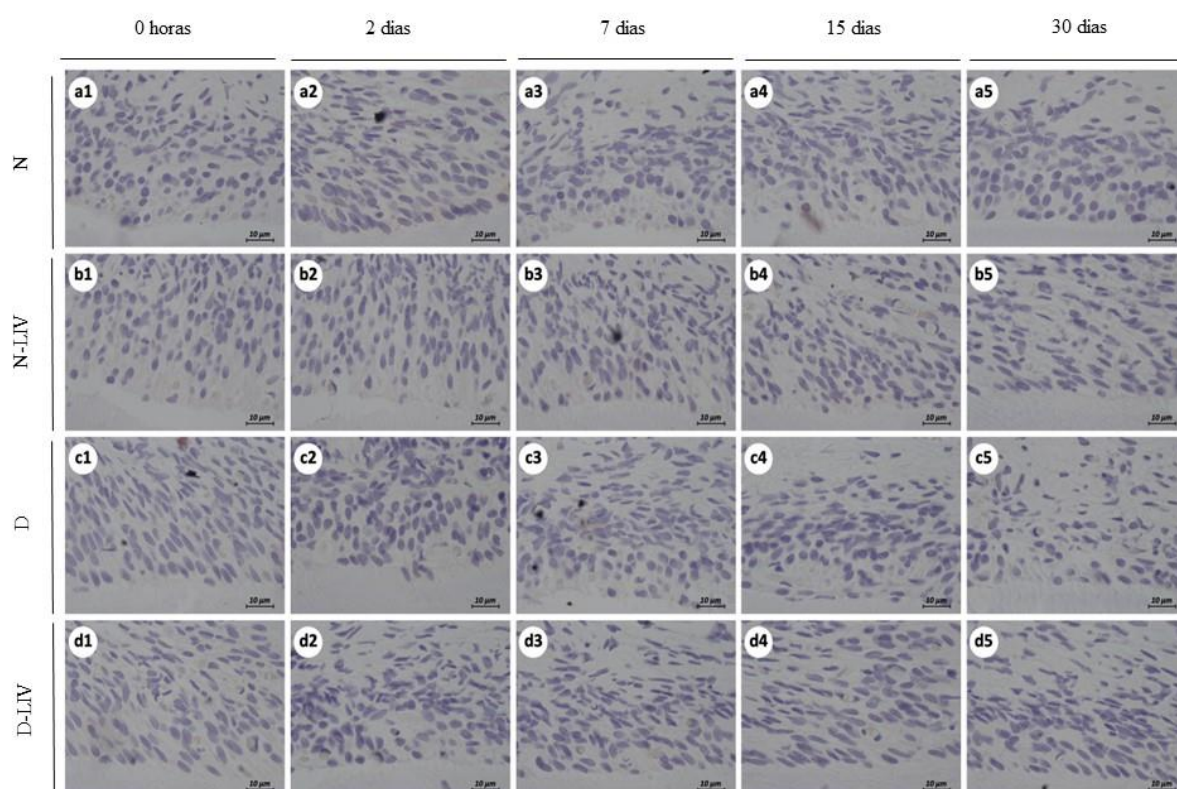


Figura 7. Imagens representativas da imunomarcaco para MMP-2. Os grupos esto representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observao por nmeros (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [MMP-2, 1000x].

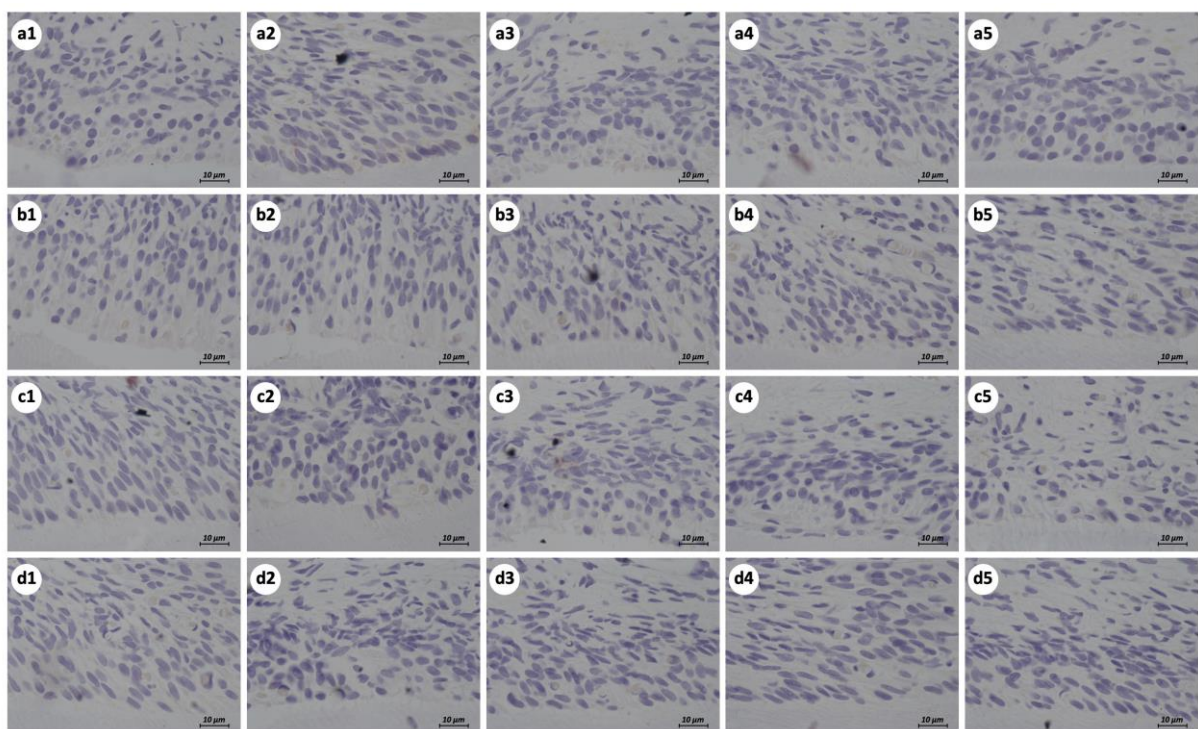


Figura 8. Imagens representativas da imunomarcção para MMP-9. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [MMP-9, 1000x].

As figuras 9 e 10 mostram imagens representativas da análise da marcação imunoistoquímica TIMP-1 e TIMP-2, respectivamente. Para ambos marcadores, também foi observado que os grupos N e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica em todos os períodos experimentais, assim como também os grupos N-LIV e N, e, D-LIV e D apresentaram valores semelhantes para densidade óptica ($p < 0,05$). Este achado indica que tanto a diabetes como o LIV não influenciam na produção de TIMP-1 (Figura 9) e TIMP-2 (Figura 10) no tecido pulpar (Tabela 3).

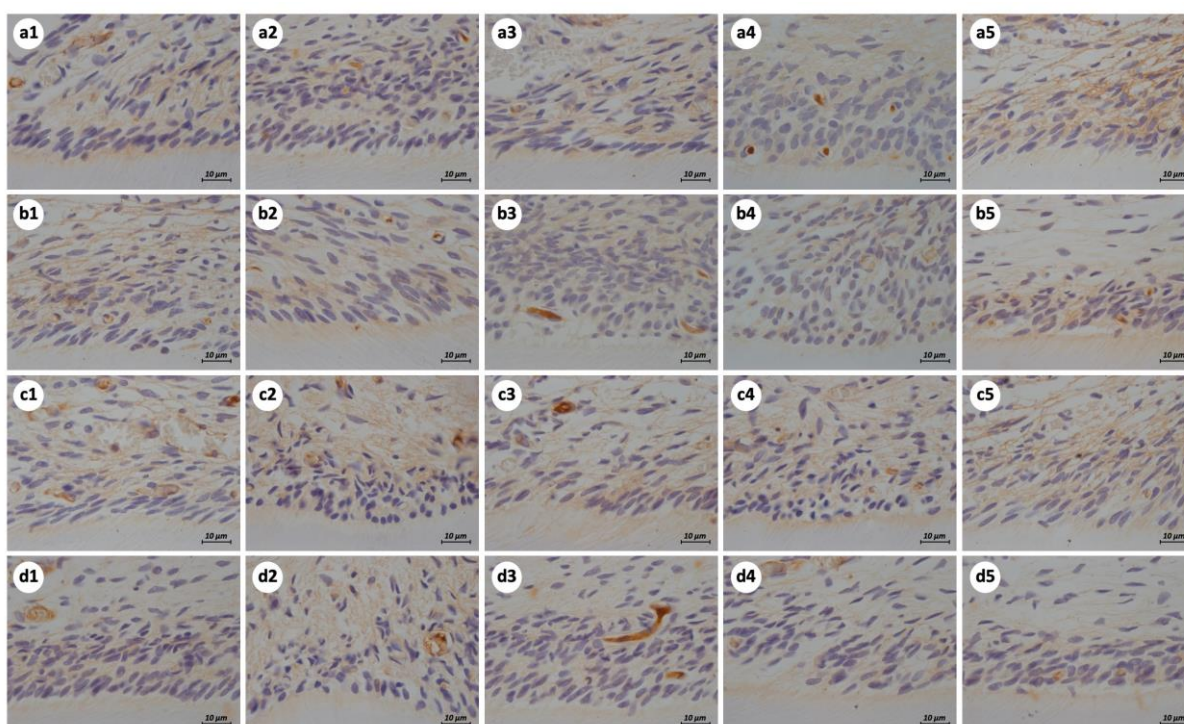


Figura 9. Imagens representativas da imunomarcacão para TIMP-1. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observacão por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [TIMP-1, 1000x].

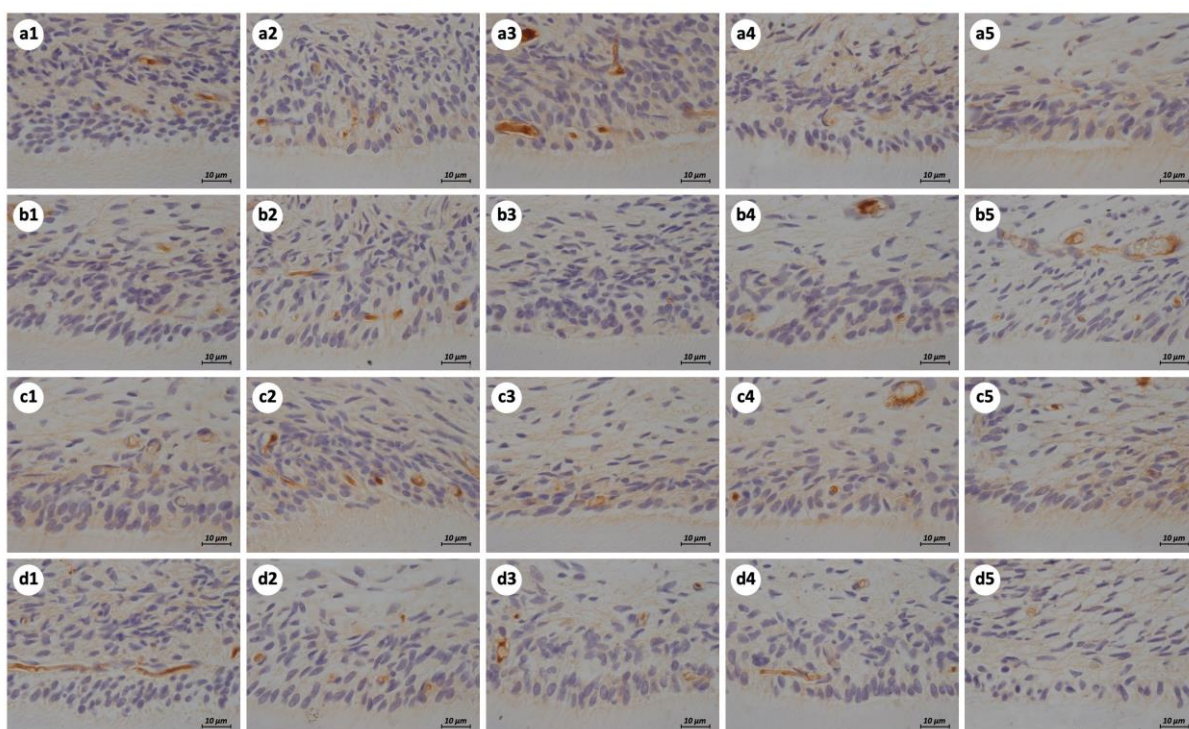


Figura 10. Imagens representativas da imunomarcção para TIMP-2. Os grupos estão representados por letras (a-d) de acordo com cada linha e os tempos de observação por números (1-5) de acordo com cada coluna. Grupos: N (a), N-LIV (b), D (c), D-LIV (d). Tempos experimentais: 0h (1), 2d (2), 7d (3), 15d (4) e 30 d (5). [TIMP-2, 1000x].

Table 3. The Median Scores, Interquartile Ranges, Mean, Standard Deviation (SD), and P values of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 percentage of optical density unit findings in rats from all groups

Immunohistochemical criteria	Periods	Experimental groups				ANOVA test and p value
		N	N-LIV	D	D-LIV	
MMP-2 (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	12.62 $\pm$ 2.25 ^a	12.93 $\pm$ 2.04 ^a	13.07 $\pm$ 2.02 ^a	12.67 $\pm$ 1.80 ^a	N x N-LIV, p = 0.776; D x D-LIV, p = 0.717
	2 days	12.65 $\pm$ 2.08 ^a	12.18 $\pm$ 1.14 ^a	12.65 $\pm$ 1.42 ^a	13.34 $\pm$ 1.40 ^a	N x N-LIV, p = 0.573; D x D-LIV, p = 0.411
	7 days	12.96 $\pm$ 1.53 ^a	12.94 $\pm$ 2.18 ^a	13.92 $\pm$ 1.55 ^a	12.02 $\pm$ 2.05 ^a	N x N-LIV, p = 0.981; D x D-LIV, p = 0.066
	15 days	11.93 $\pm$ 1.92 ^a	12.12 $\pm$ 1.57 ^a	12.18 $\pm$ 1.73 ^a	13.33 $\pm$ 1.75 ^a	N x N-LIV, p = 0.836; D x D-LIV, p = 0.231
	30 days	13.32 $\pm$ 1.91 ^a	13.28 $\pm$ 1.67 ^a	13.02 $\pm$ 1.78 ^a	14.22 $\pm$ 1.76 ^a	N x N-LIV, p = 0.966; D x D-LIV, p = 0.223
MMP-9 (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	2.72 $\pm$ 1.16 ^a	2.86 $\pm$ 1.31 ^a	2.70 $\pm$ 1.11 ^a	2.97 $\pm$ 1.28 ^a	N x N-LIV, p = 0.833; D x D-LIV, p = 0.674
	2 days	2.88 $\pm$ 0.64 ^a	2.88 $\pm$ 1.04 ^a	3.24 $\pm$ 0.36 ^a	2.89 $\pm$ 1.01 ^a	N x N-LIV, p = 0.987; D x D-LIV, p = 0.425
	7 days	2.41 $\pm$ 0.98 ^a	2.66 $\pm$ 1.35 ^a	2.25 $\pm$ 1.12 ^a	2.50 $\pm$ 0.77 ^a	N x N-LIV, p = 0.664; D x D-LIV, p = 0.668
	15 days	2.63 $\pm$ 1.52 ^a	2.64 $\pm$ 1.45 ^a	3.18 $\pm$ 0.96 ^a	2.52 $\pm$ 0.95 ^a	N x N-LIV, p = 0.986; D x D-LIV, p = 0.334
	30 days	2.64 $\pm$ 1.06 ^a	2.49 $\pm$ 0.34 ^a	2.61 $\pm$ 0.47 ^a	2.94 $\pm$ 0.89 ^a	N x N-LIV, p = 0.722; D x D-LIV, p = 0.417
TIMP-1 (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	7.18 $\pm$ 1.39 ^a	6.87 $\pm$ 1.14 ^a	6.82 $\pm$ 1.88 ^a	6.78 $\pm$ 0.27 ^a	N x N-LIV, p = 0.663; D x D-LIV, p = 0.955
	2 days	7.11 $\pm$ 1.32 ^a	7.36 $\pm$ 1.42 ^a	7.19 $\pm$ 1.02 ^a	7.26 $\pm$ 1.03 ^a	N x N-LIV, p = 0.702; D x D-LIV, p = 0.911
	7 days	6.08 $\pm$ 1.26 ^a	7.04 $\pm$ 1.41 ^a	6.52 $\pm$ 1.27 ^a	6.15 $\pm$ 1.35 ^a	N x N-LIV, p = 0.185; D x D-LIV, p = 0.604
	15 days	7.01 $\pm$ 1.54 ^a	6.73 $\pm$ 1.69 ^a	6.23 $\pm$ 1.30 ^a	6.46 $\pm$ 1.10 ^a	N x N-LIV, p = 0.719; D x D-LIV, p = 0.760
	30 days	6.97 $\pm$ 1.26 ^a	6.28 $\pm$ 1.34 ^a	6.32 $\pm$ 1.16 ^a	6.17 $\pm$ 1.08 ^a	N x N-LIV, p = 0.304; D x D-LIV, p = 0.821
TIMP-2 (percentage of optical density unit (mean $\pm$ standard deviation))	0h	6.22 $\pm$ 1.05 ^a	6.46 $\pm$ 1.02 ^a	6.53 $\pm$ 1.01 ^a	6.33 $\pm$ 0.90 ^a	N x N-LIV, p = 0.649; D x D-LIV, p = 0.711
	2 days	5.82 $\pm$ 0.78 ^a	6.59 $\pm$ 1.12 ^a	6.32 $\pm$ 1.50 ^a	6.59 $\pm$ 1.58 ^a	N x N-LIV, p = 0.276; D x D-LIV, p = 0.694
	7 days	5.91 $\pm$ 1.50 ^a	6.03 $\pm$ 1.55 ^a	6.67 $\pm$ 1.66 ^a	6.29 $\pm$ 1.60 ^a	N x N-LIV, p = 0.889; D x D-LIV, p = 0.657
	15 days	5.89 $\pm$ 1.32 ^a	6.42 $\pm$ 1.42 ^a	6.09 $\pm$ 1.76 ^a	6.81 $\pm$ 1.31 ^a	N x N-LIV, p = 0.507; D x D-LIV, p = 0.367
	30 days	6.37 $\pm$ 1.34 ^a	6.06 $\pm$ 1.59 ^a	7.00 $\pm$ 1.88 ^a	7.11 $\pm$ 0.88 ^a	N x N-LIV, p = 0.700; D x D-LIV, p = 0.894

*Different superscript letters represent statistically significant differences in lines (p < 0.05)

Discussão

O presente estudo avaliou *in vivo* a influência da FBM, utilizando o laser infravermelho em tecido pulpar normoglicêmico e hiperglicêmico. Por meio análise histopatológica e análise imunoistiquímica para IL-6, IL-10, TGF- β , FGF-2, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2. Observou-se ausência de concentração de células inflamatórias no tecido pulpar de todos os grupos. Foi observado aumento na imunomarcagem para IL-10, TGF- β e de FGF-2 nos grupos que receberam a FBM. Porém, a FBM não influenciou na imunomarcagem de IL-6, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 tanto nos grupos hiperglicêmicos como nos normoglicêmicos, rejeitando a hipótese nula de que FBM não influencia na imunomarcagem de IL-10, IL-10, TGF- β , FGF-2, e a hipótese nula de que a FBM não influencia na imunomarcagem de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 foi aceita.

Estudos anteriores relataram efeitos da FBM no tecido pulpar em diferentes casos. Terayama e colaboradores (2020) comparou a ação do laser vermelho e do laser infravermelho no tecido pulpar de molares de ratos clareados, e observaram efeitos na redução do infiltrado inflamatório com uma aplicação do laser infravermelho, bem como com três aplicações do laser vermelho (Terayama *et al* 2020). Outro estudo mostra que a FBM, foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório, além de também atuar na redução da necrose pulpar após a clareação dentária (Silva *et al* 2022). A FBM através do uso do laser de baixa intensidade, com comprimento de onda de luz invisível, como o laser infravermelho, tem baixa absorção de água e maior profundidade de penetração, podendo atingir entre 3 a 15 mm de penetração em tecidos moles ou duros (Hosseinpour *et al* 2019). Considerando que o tecido pulpar está protegido por esmalte e dentina, a terapia da FBM utilizando o laser infravermelho parece exercer uma ação mais significativa.

Estudos demonstraram que a terapia com a FBM apresenta efeitos como anti-inflamatório e analgésico, cicatrizador de feridas e melhoria na qualidade do tecido cicatricial, regeneração, estimulação da proliferação celular, diferenciação de células odontoblásticas e diminuição dos osteoclastos (Pandeshwar *et al* 2016, Barez *et al* 2017, Ninomiya *et al* 2003). Os efeitos benéficos da FBM estão relacionados a sua capacidade de promover a biomodulação de uma ampla variedade celular (Tuby *et al* 2007, Wu *et al* 2012). Após pulpotomia, a FBM estimulou o reparo, promoveu a cicatrização do tecido pulpar (Marques *et al* 2015) e apresentou potencial anti-inflamatório (Golpayegani *et al* 2010).

Por outro lado, a FBM com fluência elevada (10 e 15 J/cm²) e utilizando tempo de exposição elevado (300 a 1200 segundos) não apresentou efeitos benéficos no metabolismo de células pulpares (Lima *et al* 2014, Zaccara *et al* 2015). Porém, um aumento na atividade

enzimática foi observado com o uso de laser de menor intensidade (4 J/cm^2) (Lima *et al* 2014). Altas taxas de fluência são relacionadas aos efeitos inibitórios sobre fibroblastos, justificando a indicação clínica do uso de laser de baixa fluência (Almeida-Lopes *et al* 2001). Especialmente, neste estudo foi observado sua ação em tecido pulpar de ratos hiperglicêmicos.

Anteriormente, observou-se que o metabolismo dos ratos hiperglicêmicos induzidos por estreptozotocina é muito semelhante ao de pacientes humanos diabéticos (Kohsaka *et al* 1996), ainda, foi observado que pacientes com DM possuem uma pré-disposição maior para complicações orais (Bender *et al* 2003, Foaund *et al* 2003), dentre elas, alterações que afetam diretamente a integridade da polpa (Catanzaro *et al* 2006), bem como, processo inflamatório severo (Ferreira *et al* 2018). A hiperglicemia está associada ao aumento dos níveis de marcadores de inflamação e à elevada susceptibilidade a infecções (Azuma *et al* 2017, Gomes-Filho *et al* 2016).

Estudos anteriores mostram que pacientes hiperglicêmicos apresentam alterações microbianas e imunológicas, estando essas alterações associadas à gravidade da doença periodontal (El-akaky & Shalaby 2020). A DM foi relacionada com a degeneração, mineralização e com a redução da capacidade de proliferação do tecido pulpar (Pimenta *et al* 2022). Observa-se em estudos anteriores *in vivo* que o DM, pode aumentar a inflamação e induzir a formação de áreas de degeneração e mineralização na polpa dentária (Pimenta *et al* 2022). Em normoglicêmicos, o sistema de defesa é ativado após uma injúria e libera enzimas antioxidantes, que previnem maiores danos ao tecido pulpar (Cintra *et al* 2017). Em hiperglicêmicos, esse comprometimento no reparo, pode ser explicado pelo comprometimento da vasculatura e pelas áreas de apoptose (Nagy *et al* 2001, Cintra *et al* 2017). Já a ação da FBM no tecido pulpar de hiperglicêmicos, ainda é pouco estudada, o que reafirma a importância do presente estudo.

Em estudos anteriores o TGF- β foi visto como regulador na proliferação e diferenciação celular (Widbiller *et al* 2018), corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, que observou-se o aumento na expressão de TGF- β após aplicação da FBM no tecido pulpar diabético. Também foi visto que a FBM eleva a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 no tecido pulpar diabético.

A citocina anti-inflamatória IL-10 é uma interleucina chave que pode limitar a ativação de células imunológicas e a produção de citocinas em tipos de células imunes inatas e adaptativas (York *et al* 2024). A sinalização de IL-10, tem um papel importante na modulação da inflamação (York *et al* 2024). Anteriormente, observou-se que, a expressão aumentada de citocina anti-inflamatória foi observada no tecido pulpar, evitando inflamações desnecessárias

e reduzindo a expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias (Farges et al 2015, LI et al 2008, Moreira et al 2009). A citocina IL-10 está relacionada a uma potente mediadora anti-inflamatória, responsável por regular e minimizar a resposta imune mediada por células e a resposta inflamatória (Ng et al 2013). Assim, o aumento da imunomarcção desta citocina é um indicador benéfico da ação anti-inflamatória do LIV no tecido pulpar [10]. Neste estudo foi demonstrado que a FBM aumentou significativamente a imunomarcção para IL-10 no tecido pulpar, independente da hiperglicemia. A aumentada presença de um fator regulador da proliferação de fibroblastos e uma citocina inibidora do processo inflamatório no tecido pulpar diabético indicam o efeito benéfico da FBM.

Anteriormente, uma expressão de citocinas pró-inflamatórias foram observadas no tecido pulpar em casos de pulpite avançada (Ginsburg 2002). A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, que pode ser encontrada em tecido pulpar lesionado e estimula a diferenciação de odontoblastos (Kaplan et al 2023). Assim, a redução da imunomarcção desta citocina seria um efeito benéfico para a terapia da FBM. O presente estudo não mostrou imunomarcção para IL-6 em nenhum dos grupos estudados, mesmo no grupo em que o laser estava associado. Assim, não podemos afirmar que a FBM poderia reduzir a expressão de IL-6, mas poderia sugerir este efeito pelo aumento da citocina anti-inflamatória IL-10.

Em estudos anteriores, o TGF- β é uma citocina secretada por vários tipos de células, incluindo macrófagos, e atua no crescimento celular, diferenciação celular, apoptose e homeostase (Marit et al 1992), TGF- β foi visto como um importante regulador com potentes efeitos imunossupressores (Marciel et al 2014), ainda, foi visto como um regulador de respostas inflamatórias assim como IL-10 (Marciel et al 2014). A expressão aumentada desse marcador, é vista como um importante fator. No presente estudo observamos um aumento na expressão do TGF- β no grupo D e no grupo D-LIV após o primeiro período de aplicação.

Um estudo anterior, mostra que a dentinogênese é regulada por odontoblastos altamente diferenciados, originados de células derivadas da crista neural da papila dentária (Linde et al 1993). Esses odontoblastos podem morrer caso a injúria dentária seja grave (Shao et al 2011). Entretanto, as células tronco do tecido pulpar podem ser recrutadas durante o processo de reparo, migrando para o local da lesão e diferenciar-se em odontoblastos ou células semelhantes (Shao et al 2011). O FGF-2 é responsável pelo crescimento de fibroblastos, e anteriormente, foi observado *in vitro*, sua capacidade de diferenciar de células pulpares em odontoblastos (Hao et al 1999). No presente estudo, foi observado que o FGF-2 tem maior imunomarcção nos grupos em que receberam a aplicação da FBM, porém, no grupo hiperglicêmico, é possível observar a maior imunomarcção apenas nos períodos iniciais. Estes achados em conjunto

indicam que a FBM estimula a produção de FGF-2 no tecido pulpar, entretanto, na presença da diabetes, o estímulo ocorre durante um período de tempo menor.

Estudos anteriores, mostram que as MMPs e seus inibidores (TIMPs) são considerados importantes mediadores da resposta imune em casos de infecção periapical (Wan *et al* 2021), ainda, foi confirmada a expressão das MMPs nas lesões periapicais, as MMP-2 e MMP-9 foram observadas em lesões periapicais e em tecido pulpar inflamado (Wan *et al* 2021). Especialmente a MMP-2 e MMP-9, estão envolvidas na degradação do tecido pulpar (Gusman *et al* 2002, Shin *et al* 2002, Tsai *et al* 2005). Sabe-se que os níveis de MMP-9 é essencial para promover a absorção dos odontoclastos, removendo o colágeno da superfície óssea antes do início da desmineralização (Delaisse *et al* 2000), ainda, observou-se que estão aumentados em polpas inflamadas em comparação com as polpas saudáveis (Gusman *et al* 2002), em contrapartida, os níveis de MMP-2 estão reduzidos em polpa inflamada (Gusman *et al* 2002). Já outros tipos de MMPs foram pouco identificados no tecido pulpar (Gusman *et al* 2002).

Anteriormente, em casos de periodontite apical, a imunomarcagem de MMP-2 e MMP-9 aumentou, indicando que ambas as enzimas, provavelmente, estão envolvidas na degradação da matriz extracelular durante a fase inicial do desenvolvimento da lesão (Corotti *et al* 2009). Além disso, observou-se anteriormente que a MMP-9 tem a ação de proteger contra a inflamação (Wan *et al* 2021). No presente estudo, na metodologia em que foi utilizado a FBM não foi capaz de influenciar os níveis de MMP-2 e MMP-9, demonstrando que o protocolo de aplicação utilizado não tem capacidade de degradar a matriz colágena.

Estudo anterior mostram que os TIMPs, agem especificamente sobre as MMPs, porém, eles tem diferentes atividades inibitórias contra diferentes tipos de MMPs (Wan *et al* 2021). No presente estudo, a FBM também não foi capaz de modificar os inibidores de metaloproteinases, TIMP-1 e TIMP-2. A partir dos resultados encontrados no presente estudo, observa-se que a FBM pode antecipar um processo inflamatório. Estudos *in vivo* são necessários para reafirmar os resultados encontrados no presente estudo. É possível observar que, a FBM não influenciou as MMP-2 e MMP-9, e assim, não haveria necessidade das células produzirem os TIMPs. Adicionalmente, como as metaloproteinases estão envolvidas no processo de degradação do colágeno (Tsai *et al* 2005) e as TIMPs na regulação das MMPs (Kim *et al* 2012), os resultados obtidos demonstraram que a FBM não tem capacidade de causar danos à matriz extracelular nas condições estudadas.

Considerando os dados observados neste e em estudos anteriores (Terayama *et al* 2020, Silva *et al* 2021) podemos sugerir que a terapia com FBM com o uso de luz de baixa intensidade,

representa resultados satisfatórios no aumento da imunomarcção de enzimas anti-inflamatórias, mesmo em casos de hiperglicemia, sugerindo que a FBM tenha a capacidade de agir na prevenção de quadros inflamatórios em pacientes diabéticos.

Conclusão

Conclui-se que a FBM exerce ação de proteção, prevenindo a ocorrência de inflamação e estimulando a produção de IL-10, TGF- β e FGF-2 no tecido pulpar de ratos, independente da hiperglicemia.

REFERENCIAS

1. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Medical Science*, 27(1), 237-49, 2012. doi: [10.1007/s10103-011-0885-2](https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2)
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2010;33:S62-S69. [PubMed] [Cited in This Article: 19]
3. Arany, P. R. (2016). *Craniofacial Wound Healing with Photobiomodulation Therapy: New Insights and Current Challenges*. *Journal of Dental Research*, (), 0022034516648939–. doi:10.1177/0022034516648939
4. Avadanei R et al. High variability in MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP1 expression in secondary liver tumors. *Romanian Journal Morphology and Embryology* 54(3), 479-85, 2013. doi: 10.24068394
5. Barbosa JG, Benetti F, de Oliveira Gallinari M, Carminatti M, da Silva ABD, Lopes INI, Briso ALF, Cintra LTA (2020) Bleaching gel mixed with MI Paste Plus reduces penetration of H2O2 and damage to pulp tissue and maintains bleaching effectiveness. *Clin Oral Investig* 24:1299–1309
6. Barbosa JG, Benetti F, de Oliveira Gallinari M, Carminatti M, da Silva ABD, Lopes INI, Briso ALF, Cintra LTA (2020) Bleaching gel mixed with MI Paste Plus reduces penetration of H2O2 and damage to pulp tissue and maintains bleaching effectiveness. *Clin Oral Investig* 24:1299–1309
7. Barez MM, Tajziehchi M, Heidari MH, et al. Stimulation effect of low level laser therapy on sciatic nerve regeneration in rat. *J Lasers Med Sci* 2017;8(Suppl 1): S32.
8. Bjordal, J. M., C. Couppe, R. T. Chow, J. Tuner, and E. A. Ljunggren. A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic
9. Buchalla W, Attin T (2007) External bleaching therapy with activation by heat, light or laser-a systematic review. *Dent Mater* 23:586–596
10. Chow, R. T., M. I. Johnson, R. A. Lopes-Martins, and J. M. Bjordal. Efficacy of low-level laser therapy in the management of neck pain: a systematic review and meta-analysis of randomised placebo or active-treatment controlled trials. *Lancet* 374:1897–1908, 2009.
11. Christie, A., G. Jamtvedt, K. T. Dahm, R. H. Moe, E. Haavardsholm, and K. B. Hagen. Effectiveness of nonpharmacological and nonsurgical interventions for patients with

- rheumatoid arthritis: an overview of systematic reviews. *Phys. Ther.* 87:1697–1715, 2007
12. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009;54:764–71
 13. Delaisse JM, Engsig MT, Everts V, et al. Proteinases in bone resorption: obvious and less obvious roles. *Clin Chim Acta* 2000;291:223–34
 14. Farges JC et al. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, **11**, 1-16, 2015. doi: [10.1155/2015/230251](https://doi.org/10.1155/2015/230251)
 15. Farges JC et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*, **216**(4), 5013-7, 2011. doi: [10.1016/j.imbio.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.08.006)
 16. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, **37**(11), 1536-41, 2011. doi: [10.1016/j.joen.2011.08.027](https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.027)
 17. Gigo-Benato, D., S. Geuna, and S. Rochkind. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle Nerve*. 31:694–701, 2005.
 18. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *European Journal of Oral Sciences*, **110**(5), 353-7, 2002. doi: [10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x)
 19. Hao J, Wang P, Shi J. The effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and differentiation of human dental pulp cells *in vitro*. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, **34**, 239-41, 1999. doi: 10.11776917
 20. Herman WH. Diabetes epidemiology: guiding clinical and public health practice: the Kelly West Award Lecture, 2006. *Diabetes Care*. 2007;30:1912-1919. [PubMed] [DOI] [Cited in This Article: 4] [Cited by in Crossref: 37] [Cited by in F6Publishing: 40] [Article Influence: 2.4] [Reference Citation Analysis (0)]
 21. Hoon Chung; Tianhong Dai; Sulbha K. Sharma; Ying-Ying Huang; James D. Carroll; Michael R. Hamblin (2012). *The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy*. , **40**(2), 516–533. doi:10.1007/s10439-011-0454-7
 22. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, **40**(10), 726–733, 2008. doi: [10.1002/lsm.20709](https://doi.org/10.1002/lsm.20709)

23. IDF. Diabetes. International Diabetes Foundation. 2022. Retrieved November 30, 2022. Available from: <https://idf.org/>. [Cited in This Article: 4]
24. Ilić J, Radović K, Roganović J, Brković B, Stojić D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *Journal of Endodontics*. **38**(6), 764-8, 2012. doi: [10.1016/j.joen.2012.03.016](https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.016)
25. Jain A & Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, **5**(3), 212-8, 2015. doi: [10.1016/j.jobcr.2015.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.06.015)
26. Jamtvedt, G., K. T. Dahm, A. Christie, R. H. Moe, E. Haavardsholm, I. Holm, and K. B. Hagen. Physical therapy interventions for patients with osteoarthritis of the knee: an overview of systematic reviews. *Phys. Ther.* **88**:123–136, 2008.
27. joint disorders. *Aust. J. Physiother.* **49**:107–116, 2003
28. Karu, T. I. Photobiological fundamentals of low-power laser therapy. *IEEE J. Quantum Electron.* **23**:1703–1717, 1987.
29. Kim Y et al. The MMP-9/ TIMP-1 axis controls the status of differentiation and function of myelin-forming Schwann cells in nerve regeneration. *PLoS One*, **7**(3), e33664, 2012. doi: [10.1371/journal.pone.0033664](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033664)
30. Li MO & Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*, **28**(4), 468-76, 2008. doi: [10.1016/j.immuni.2008.03.003](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.003)
31. Linde A & Goldberg M. Dentinogenesis. *Reviews in Oral Biology & Medicine*, **4**(5), 679–728, 1993. doi: [10.1177/10454411930040050301](https://doi.org/10.1177/10454411930040050301)
32. Lubart R, Friedmann H, Sinyakov M, Cohen N, Breibart H (1997) Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. *Lasers Surg Med* **21**:493–499
33. Maciel KF et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*, **45**(4), 354-62, 2012. doi: [10.1111/j.1365-2591.2011.01983.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01983.x)
34. Marit NH, Richard TH, Lynn MM. TGF-beta and related proteins in development, an MCDB/ISU symposium. Ames, Iowa, September 20–23, 1991. *Mol Reprod Dev.* **1992**;32(2):89–184.
35. Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp

regeneration. *Journal Endodontic*, **39**(2), 228-35, 2013. doi: [10.1016/j.joen.2012.11.007](https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.007)

36. May LG, Salvia AC, Souza RO, Michida SM, Valera MC, Takahashi FE, Bottino MA (2010) Effect of sodium ascorbate and the time lapse before cementation after internal bleaching on bond strength between dentin and ceramic. *J Prosthodont* 19:374– 380
37. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation- stimulated cell proliferation *in vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine*, **36**(1), 8–12, 2005. doi: [10.1002/lsm.20117](https://doi.org/10.1002/lsm.20117)
38. Moosavi H, Arjmand N, Ahrari F, Zakeri M, Maleknejad F (2016) Effect of low-level laser therapy on tooth sensitivity induced by in office bleaching. *Lasers Med Sci* 31:713–719
39. Moosavi H, Arjmand N, Ahrari F, Zakeri M, Maleknejad F. Effect of low-level laser therapy on tooth sensitivity induced by in-office bleaching. *Lasers in Medical Science*, **31**(4), 713-9, 2016. doi: [10.1007/s10103-016-1913-z](https://doi.org/10.1007/s10103-016-1913-z)
40. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *Open Dentistry Journal*, 7(3), 184-90, 2009. doi: [10.2174/1874210600903010184](https://doi.org/10.2174/1874210600903010184)
41. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low-level laser irradiation on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers in Medical Science*, **23**(3), 277–282, 2008. doi: [10.1007/s10103-007-0479-1](https://doi.org/10.1007/s10103-007-0479-1)
42. Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka T. High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in metaphyseal trabecular bone in rat femur. *J Bone Miner Metab* 2003;21:67–73.
43. Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastry SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review. *J Invest Clin Dent* 2016;7:114–126.
44. Passarella, S., E. Casamassima, S. Molinari, D. Pastore, E. Quagliariello, I. M. Catalano, and A. Cingolani. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett.* 175:95–99, 1984.
45. Posten, W., D. A. Wrone, J. S. Dover, K. A. Arndt, S. Silapunt, and M. Alam. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficiency. *Dermatol. Surg.* 31:334–340, 2005.

46. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of lowintensity lasers in biology and medicine. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, **22**(2), 141-50, 2004. doi: [10.1089/104454704774076208](https://doi.org/10.1089/104454704774076208)
47. Referências Bibliográficas
48. Shao MY, Cheng RW, Feng-Ming, Yang H, Cheng L, Hu T. β -Catenin and Rho GTPases as downstream targets of TGF- β 1 during pulp repair. *Cell Biology International*, **35**, 105–109, 2011. doi: [10.1177/10454411930040050301](https://doi.org/10.1177/10454411930040050301)
49. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *Journal Endodontic*, **28**(4), 313–5, 2002. doi: [10.1097/00004770-200204000-00013](https://doi.org/10.1097/00004770-200204000-00013)
50. Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues. *Oral Diseases*, **10**(2), 63-74, 2004. doi: [10.1111/j.1601-0825.2004.00992.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.00992.x)
51. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal Endodontic* **42**(1), 47-56, 2016. doi: [10.1016/j.joen.2015.10.019](https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.10.019)
52. Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers in Medical Science*, **30**(3), 1171-4, 2013. doi: [10.1007/s10103-013-1436-9](https://doi.org/10.1007/s10103-013-1436-9)
53. Sutton GA; Ertzman-Ginsburg R; Steinman A; Milgram J. Initial investigation of mortality rates and prognostic indicators in horses with colic in Israel: A retrospective study. *Equine Veterinary Journal*, **41**(5), 482–486, 2009. doi: [10.2746/042516409x391060](https://doi.org/10.2746/042516409x391060)
54. Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *Journal Endodontic*, **31**(12), 860-2, 2005. doi: [10.1097/01.don.0000164851.55389.4e](https://doi.org/10.1097/01.don.0000164851.55389.4e)
55. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers in Surgery Medicine*, **39**(4), 373–378, 2007. doi: [10.1002/lsm.20492](https://doi.org/10.1002/lsm.20492)
56. Unda FJ, Martín A, Hernandez C, Pérez-Nanclares G, Hilario E, Aréchaga J. FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating *in vitro* odontoblast differentiation. *Advances Dental Research*, **15**, 34-7, 2001. doi: [10.1177/08959374010150010801](https://doi.org/10.1177/08959374010150010801)

57. Van den Brink GR et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nature Genetics*, 36(3), 277–82, 2004. doi: [10.1038/ng1304](https://doi.org/10.1038/ng1304)
58. Wan, C.-Y., Li, L., Liu, L.-S., Jiang, C.-M., Zhang, H.-Z., & Wang, J.-X. (2021). *Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases during Apical Periodontitis Development*. *Journal of Endodontics*, 47(7), 1118–1125.
59. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;94:311-321. [PubMed] [DOI] [Cited in This Article: 11] [Cited by in Crossref: 2650] [Cited by in F6Publishing: 2577] [Article Influence: 198.2] [Reference Citation Analysis (0)]
60. WHO. Diabetes prevention, care challenges in Africa. World Health Organization. 2021. Retrieved November 30, 2022. Available from: <https://www.afro.who.int/news/diabetes-prevention-care-challenges-africa>.
61. Sanyaolu A, Marinkovic A, Prakash S, Williams M, Dixon Y, Okorie C, Orish VN, Izurieta R. Diabetes mellitus: An overview of the types, prevalence, comorbidity, complication, genetics, economic implication, and treatment. *World J Meta-Anal* 2023; 11(5): 134-143 [DOI: [10.13105/wjma.v11.i5.134](https://doi.org/10.13105/wjma.v11.i5.134)]
62. Sanyaolu A, Marinkovic A, Prakash S, Williams M, Dixon Y, Okorie C, Orish VN, Izurieta R. Diabetes mellitus: An overview of the types, prevalence, comorbidity, complication, genetics, economic implication, and treatment. *World J Meta-Anal* 2023; 11(5): 134-143 [DOI: [10.13105/wjma.v11.i5.134](https://doi.org/10.13105/wjma.v11.i5.134)]
63. Sanyaolu A, Marinkovic A, Prakash S, Williams M, Dixon Y, Okorie C, Orish VN, Izurieta R. Diabetes mellitus: An overview of the types, prevalence, comorbidity, complication, genetics, economic implication, and treatment. *World J Meta-Anal* 2023; 11(5): 134-143 [DOI: [10.13105/wjma.v11.i5.134](https://doi.org/10.13105/wjma.v11.i5.134)]
64. Sanyaolu A, Marinkovic A, Prakash S, Williams M, Dixon Y, Okorie C, Orish VN, Izurieta R. Diabetes mellitus: An overview of the types, prevalence, comorbidity, complication, genetics, economic implication, and treatment. *World J Meta-*

65. Sanyaolu A, Marinkovic A, Prakash S, Williams M, Dixon Y, Okorie C, Orish VN, Izurieta R. Diabetes mellitus: An overview of the types, prevalence, comorbidity, complication, genetics, economic implication, and treatment. *World J Meta-Anal* 2023; 11(5): 134-143 [DOI: [10.13105/wjma.v11.i5.134](https://doi.org/10.13105/wjma.v11.i5.134)]
66. Widbiller M et al. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *International Endodontic Journal*, **51**(4), e278-e290, 2018. doi: [10.1111/iej.12754](https://doi.org/10.1111/iej.12754)
67. Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 alpha alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. *Journal Endodontic* **32**(3), 186-92, 2006. doi: [10.1016/j.joen.2005.10.055](https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.055)
68. Wu Y, Wang J, Gong D, Gu H, Hu S, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Laser in Medical Science*, **27**(2), 509–519, 2012. doi: [10.1007/s10103-011-0995-x](https://doi.org/10.1007/s10103-011-0995-x)
69. Yu HS, Chang KL, Yu CL, Chen JW, Chen GS (1996) Low-energy helium-neon lasers irradiation stimulates interleukin-1 alpha and interleukin-8 release from cultured human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 107:593–596

III. Referências

1. Reddy GK. Photobiological basis and clinical role of lowintensity lasers in biology and medicine. *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, **22**(2), 141-50, 2004. doi: [10.1089/104454704774076208](https://doi.org/10.1089/104454704774076208)
2. Moosavi H, Arjmand N, Ahrari F, Zakeri M, Maleknejad F. Effect of low-level laser therapy on tooth sensitivity induced by in-office bleaching. *Lasers in Medical Science*, **31**(4), 713-9, 2016. doi: [10.1007/s10103-016-1913-z](https://doi.org/10.1007/s10103-016-1913-z)
3. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers in Surgery Medicine*, **39**(4), 373–378, 2007. doi: [10.1002/lsm.20492](https://doi.org/10.1002/lsm.20492)
4. Wu Y, Wang J, Gong D, Gu H, Hu S, Zhang H. Effects of low-level laser irradiation on mesenchymal stem cell proliferation: a microarray analysis. *Laser in Medical Science*, **27**(2), 509–519, 2012. doi: [10.1007/s10103-011-0995-x](https://doi.org/10.1007/s10103-011-0995-x)
5. Hou JF, Zhang H, Yuan X, Li J, Wei YJ, Hu SS. In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, **40**(10), 726–733, 2008. doi: [10.1002/lsm.20709](https://doi.org/10.1002/lsm.20709)
6. Mvula B, Mathope T, Moore T, Abrahamse H. The effect of low-level laser irradiation on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers in Medical Science*, **23**(3), 277–282, 2008. doi: [10.1007/s10103-007-0479-1](https://doi.org/10.1007/s10103-007-0479-1)
7. Soares DM, Ginani F, Henriques AG, Barboza CA. Effects of laser therapy on the proliferation of human periodontal ligament stem cells. *Lasers in Medical Science*, **30**(3), 1171-4, 2013. doi: [10.1007/s10103-013-1436-9](https://doi.org/10.1007/s10103-013-1436-9)
8. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation- stimulated cell proliferation *in vitro*. *Lasers in Surgery and Medicine*, **36**(1), 8–12, 2005. doi: [10.1002/lsm.20117](https://doi.org/10.1002/lsm.20117)
9. AlGhamdi KM, Kumar A, Moussa NA. Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Medical Science*, **27**(1), 237-49, 2012. doi: [10.1007/s10103-011-0885-2](https://doi.org/10.1007/s10103-011-0885-2)
10. Farges JC et al. (2015). Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of Inflammation*, **11**, 1-16, 2015. doi: [10.1155/2015/230251](https://doi.org/10.1155/2015/230251)
11. Li MO & Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity*, **28**(4), 468-76, 2008. doi: [10.1016/j.immuni.2008.03.003](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.003)

12. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra WO. TNFA and IL10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *Open Dentistry Journal*, 7(3), 184-90, 2009. doi: [10.2174/1874210600903010184](https://doi.org/10.2174/1874210600903010184)
13. Farges JC et al. Cytokine production by human odontoblast-like cells upon Toll-like receptor-2 engagement. *Immunobiology*, 216(4), 5013-7, 2011. doi: [10.1016/j.imbio.2010.08.006](https://doi.org/10.1016/j.imbio.2010.08.006)
14. Maciel KF et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*, 45(4), 354-62, 2012. doi: [10.1111/j.1365-2591.2011.01983.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01983.x)
15. Sutton GA; Ertzman-Ginsburg R; Steinman A; Milgram J. Initial investigation of mortality rates and prognostic indicators in horses with colic in Israel: A retrospective study. *Equine Veterinary Journal*, 41(5), 482–486, 2009. doi: [10.2746/042516409x391060](https://doi.org/10.2746/042516409x391060)
16. Widbiller M et al. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *International Endodontic Journal*, 51(4), e278-e290, 2018. doi: [10.1111/iej.12754](https://doi.org/10.1111/iej.12754)
17. Silva TA, Rosa AL, Lara VS. Dentin matrix proteins and soluble factors: intrinsic regulatory signals for healing and resorption of dental and periodontal tissues. *Oral Diseases*, 10(2), 63-74, 2004. doi: [10.1111/j.1601-0825.2004.00992.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.00992.x)
18. Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal Endodontic* 42(1), 47-56, 2016. doi: [10.1016/j.joen.2015.10.019](https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.10.019)
19. Linde A & Goldberg M. Dentinogenesis. *Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(5), 679–728, 1993. doi: [10.1177/10454411930040050301](https://doi.org/10.1177/10454411930040050301)
20. Shao MY, Cheng RW, Feng-Ming, Yang H, Cheng L, Hu T. β -Catenin and Rho GTPases as downstream targets of TGF- β 1 during pulp repair. *Cell Biology International*, 35, 105–109, 2011. doi: [10.1177/10454411930040050301](https://doi.org/10.1177/10454411930040050301)
21. Van den Brink GR et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. *Nature Genetics*, 36(3), 277–82, 2004. doi: [10.1038/ng1304](https://doi.org/10.1038/ng1304)
22. Hao J, Wang P, Shi J. The effects of basic fibroblast growth factor on proliferation and differentiation of human dental pulp cells *in vitro*. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 34, 239-41, 1999. doi: 10.11776917
23. Unda FJ, Martín A, Hernandez C, Pérez-Nanclares G, Hilario E, Aréchaga J. FGFs-1 and -2, and TGF beta 1 as inductive signals modulating *in vitro* odontoblast differentiation. *Advances Dental Research*, 15, 34-7, 2001. doi: [10.1177/08959374010150010801](https://doi.org/10.1177/08959374010150010801)

24. Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I. Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *Journal Endodontic*, **39**(2), 228-35, 2013. doi: [10.1016/j.joen.2012.11.007](https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.007)
25. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, **37**(11), 1536-41, 2011. doi: [10.1016/j.joen.2011.08.027](https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.027)
26. Ilić J, Radović K, Roganović J, Brković B, Stojić D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *Journal of Endodontics*. **38**(6), 764-8, 2012. doi: [10.1016/j.joen.2012.03.016](https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.03.016)
27. Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. *European Journal of Oral Sciences*, **110**(5), 353-7, 2002. doi: [10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2002.21347.x)
28. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *Journal Endodontic*, **28**(4), 313-5, 2002. doi: [10.1097/00004770-200204000-00013](https://doi.org/10.1097/00004770-200204000-00013)
29. Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *Journal Endodontic*, **31**(12), 860-2, 2005. doi: [10.1097/01.don.0000164851.55389.4e](https://doi.org/10.1097/01.don.0000164851.55389.4e)
30. Jain A & Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, **5**(3), 212-8, 2015. doi: [10.1016/j.jobcr.2015.06.015](https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.06.015)
31. Kim Y et al. The MMP-9/ TIMP-1 axis controls the status of differentiation and function of myelin-forming Schwann cells in nerve regeneration. *PLoS One*, **7**(3), e33664, 2012. doi: [10.1371/journal.pone.0033664](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033664)
32. Avadanei R et al. High variability in MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP1 expression in secondary liver tumors. *Romanian Journal Morphology and Embryology* **54**(3), 479-85, 2013. doi: 10.24068394
33. Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 alpha alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. *Journal Endodontic* **32**(3), 186-92, 2006. doi: [10.1016/j.joen.2005.10.055](https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.055)
34. Benetti F, Briso AL, Carminatti M, Araújo-Lopes JM, Barbosa JG, Ervolino E, et al. Presence of osteocalcin, osteopontin, and reactive oxygen species-positive cells in pulp

- tissue after dental bleaching. *International Endodontic Journal*, **52**(5), 665-75, 2019. doi: 10.1111/iej.13049
35. Terayama AM et al. Influence of low-level laser therapy on inflammation in dental pulp, maturation of collagen fibers, and tertiary dentin deposition in bleached teeth. *Clinical Oral Investigations*, **24**(11), 3911-21, 2020. doi:10.1007/s00784-020-03258-9.
 36. Statkiewicz C et al. Photomodulation multiple sessions as a promising preventive therapy for medication-related osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*, **184**, 7-17, 2018. doi: [10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.05.004)
 37. Buchalla W & Attin T. External bleaching therapy with activation by heat, light or laser-a systematic review. *Dental Materials*, **23**(5), 586-96, 2007. doi: [10.1016/j.dental.2006.03.018](https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.03.018)
 38. Golpayegani MV, Ansari G, Tadayon N. Clinical and radiographic success of low level laser therapy (LLLTh) on primary molars pulpotomy. *Research Journal of Biological Sciences*, **5**(1), 51-5, 2010. doi: 10.3923/rjbsci.2010.51.55
 39. Lima AF et al. Effect of low-level laser therapy on odontoblast-like cells exposed to bleaching agent. *Lasers in Medical Science*, **29**(5), 1533-1538, 2014b. doi: [10.1007/s10103-013-1309-2](https://doi.org/10.1007/s10103-013-1309-2)
 40. Zaccara IM, Ginani F, Mota-Filho HG, Henriques ACG, Braboza CAG. Effect of low-level laser irradiation on proliferation and viability of human dental pulp stem cells. *Lasers Medical Science*, **30**(9), 2259-64, 2015. doi: [10.1007/s10103-015-1803-9](https://doi.org/10.1007/s10103-015-1803-9)
 41. Lima AF et al. Effects of Laser Irradiation on Pulp Cells Exposed to Bleaching Agents. *Photochemistry and Photobiology*, **90**(1), 201-6, 2014^a. doi: [10.1111/php.12155](https://doi.org/10.1111/php.12155)
 42. Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers Surgery Medicine*, **29**(2), 179-84, 2001. doi: [10.1002/lsm.1107](https://doi.org/10.1002/lsm.1107)
 43. Bender IB, Bender AB. Diabetes mellitus and the dental pulp. *Journal Endodontic*, **29**(6), 383-9, 2003. doi: [10.1097/00004770-200306000-00001](https://doi.org/10.1097/00004770-200306000-00001)
 44. Fouad AF, Burleson J. The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record. *Journal of American Dental Association*, **134**(1), 43-51, 2003. doi: [10.14219/jada.archive.2003.0016](https://doi.org/10.14219/jada.archive.2003.0016)

45. Catanzaro O, Dziubecki D, Lauria LC, Ceron CM, Rodrigues R. Diabetes and its effects on dental pulp. *Journal Oral Science*, **48**(4), 195-9, 2006. doi: [10.2334/josnusd.48.195](https://doi.org/10.2334/josnusd.48.195)
46. Pimenta RMN et al. Effects of diabetes mellitus on dental pulp: A systematic review of in vivo and in vitro studies. *Oral Diseases*, odi.14267, 2022. doi: [10.1111/odi.14267](https://doi.org/10.1111/odi.14267)
47. NG THS, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Frontiers in immunology*, **31**(4), 129, 2013. doi: [10.3389/fimmu.2013.00129](https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00129)
48. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infectious Diseases*, **2**(3), 171–9, 2002. doi: [10.1016/s1473-3099\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00226-8)
49. Kaplan SS, Ovecoglu HS, Genc D, Akkoc T. TNF- α , IL-1B and IL-6 affect the differentiation ability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health* **23**(1), 555, 2023 doi: [10.1186/s12903-023-03288-1](https://doi.org/10.1186/s12903-023-03288-1)

IV. Anexos

- Guidelines for Publishing Papers in
the Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology
- Comitê de Ética do Uso de Animais

Your	Paper	Your	Way
-------------	--------------	-------------	------------

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

Introduction

The *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* (JPPB) welcomes Invited review articles and original papers not previously published

The journal provides a forum for the publication of papers relating to the various aspects of photobiology, as well as a means for communication in this multidisciplinary field. The scope includes:

- bioluminescence
- chronobiology
- DNA repair
- environmental photobiology
- nanotechnology in photobiology
- photocarcinogenesis
- photochemistry of biomolecules
- photomedicine
- photomorphogenesis
- photomovement
- photoreception
- photosensitization
- photosynthesis
- phototechnology
- spectroscopy of biological systems
- UV and visible radiation effects
- vision

This journal is cited by the following Abstracting Services: BIOSIS, Cambridge Scientific Abstracts, Chemical Abstracts, Current Contents, Elsevier BIOBASE/Current Awareness in Biological Sciences, EMBASE/Excerpta Medica, Embiology, Engineering Index, Medlar's System, Metals Abstracts, PASCAL/CNRS, Physics Abstracts, Physikalische Berichte, Polymer Contents, Research Alert™, Science Citation Index, Scopus.

Contact Details for Submission

Authors are requested to submit their article to the Editor responsible for the topic involved:
Dr. Laszlo Matyus: Biophysics, Biomolecular spectroscopy, Photodynamic Therapy, Dermatology, Photomedicine.

Dr. Robert Carpentier: Photosynthesis, Environmental photobiology, Photosensitisers,

Oxygen radicals, DNA repair, UV/VIS effects.

Dr. Ramaiah: Photochemistry of biomolecules, Photodynamic therapy, Photosensitization, Molecular probes, Phototechnology, Nanotechnology in photobiology.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Before you begin

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of competing interest

Corresponding authors, on behalf of all the authors of a submission, must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent

applications/registrations, and grants or other funding. All authors, including those *without* competing interests to declare, should provide the relevant information to the corresponding author (which, where relevant, may specify they have nothing to declare). Corresponding authors should then use [this tool](#) to create a shared statement and upload to the submission system at the Attach Files step. **Please do not convert the .docx template to another file type. Author signatures are not required.**

Declaration of generative AI in scientific writing

The below guidance only refers to the writing process, and not to the use of AI tools to analyse and draw insights from data as part of the research process.

Where authors use generative artificial intelligence (AI) and AI-assisted technologies in the writing process, authors should only use these technologies to improve readability and language. Applying the technology should be done with human oversight and control, and authors should carefully review and edit the result, as AI can generate authoritative-sounding output that can be incorrect, incomplete or biased. AI and AI-assisted technologies should not be listed as an author or co-author, or be cited as an author. Authorship implies responsibilities and tasks that can only be attributed to and performed by humans, as outlined in Elsevier's [AI policy for authors](#).

Authors should disclose in their manuscript the use of AI and AI-assisted technologies in the writing process by following the instructions below. A statement will appear in the published work. Please note that authors are ultimately responsible and accountable for the contents of the work.

Disclosure instructions

Authors must disclose the use of generative AI and AI-assisted technologies in the writing process by adding a statement at the end of their manuscript in the core manuscript file, before the References list. The statement should be placed in a new section entitled 'Declaration of Generative AI and AI-assisted technologies in the writing process'.

Statement: During the preparation of this work the author(s) used [NAME TOOL / SERVICE] in order to [REASON]. After using this tool/service, the author(s) reviewed and edited the content as needed and take(s) full responsibility for the content of the publication.

This declaration does not apply to the use of basic tools for checking grammar, spelling, references etc. If there is nothing to disclose, there is no need to add a statement.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your

article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Preprint posting on SSRN

In support of [Open Science](#), this journal offers its authors a free preprint posting service. Preprints provide early registration and dissemination of your research, which facilitates early citations and collaboration.

During submission to Editorial Manager, you can choose to release your manuscript publicly as a preprint on the preprint server [SSRN](#) once it enters peer-review with the journal. Your choice will have no effect on the editorial process or outcome with the journal. Please note that the corresponding author is expected to seek approval from all co-authors before agreeing to release the manuscript publicly on SSRN.

You will be notified via email when your preprint is posted online and a Digital Object Identifier (DOI) is assigned. Your preprint will remain globally available free to read whether the journal accepts or rejects your manuscript.

For more information about posting to [SSRN](#), please consult the [SSRN Terms of Use](#) and [FAQs](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Reporting sex- and gender-based analyses

Reporting

guidance

For research involving or pertaining to humans, animals or eukaryotic cells, investigators should integrate sex and gender-based analyses (SGBA) into their research design according to funder/sponsor requirements and best practices within a field. Authors should address the sex and/or gender dimensions of their research in their article. In cases where they cannot, they should discuss this as a limitation to their research's generalizability. Importantly, authors should explicitly state what definitions of sex and/or gender they are applying to enhance the precision, rigor and reproducibility of their research and to avoid ambiguity or conflation of terms and the constructs to which they refer (see Definitions section below). Authors can refer to the [Sex and Gender Equity in Research \(SAGER\) guidelines](#) and the [SAGER guidelines checklist](#). These offer systematic approaches to the use and editorial review of sex and gender information in study design, data analysis, outcome reporting and research interpretation - however, please note there is no single, universally agreed-upon set of guidelines for defining sex and gender.

Definitions

Sex generally refers to a set of biological attributes that are associated with physical and physiological features (e.g., chromosomal genotype, hormonal levels, internal and external anatomy). A binary sex categorization (male/female) is usually designated at birth ("sex assigned at birth"), most often based solely on the visible external anatomy of a newborn. Gender generally refers to socially constructed roles, behaviors, and identities of women, men and gender-diverse people that occur in a historical and cultural context and may vary across societies and over time. Gender influences how people view themselves and each other, how they behave and interact and how power is distributed in society. Sex and gender are often incorrectly portrayed as binary (female/male or woman/man) and unchanging whereas these constructs actually exist along a spectrum and include additional sex categorizations and gender identities such as people who are intersex/have differences of sex development (DSD) or identify as non-binary. Moreover, the terms "sex" and "gender" can be ambiguous—thus it is important for authors to define the manner in which they are used. In addition to this definition guidance and the SAGER guidelines, the [resources on this page](#) offer further insight around sex and gender in research studies.

Author

contributions

For transparency, we require corresponding authors to provide co-author contributions to the manuscript using the relevant CRediT roles. The [CRediT taxonomy](#) includes 14 different roles describing each contributor's specific contribution to the scholarly output. The roles are: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; and Writing - review & editing. Note that not all roles may apply to every manuscript, and authors may have contributed through multiple roles. [More details and an example](#).

Changes

to

authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any

addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article **transfer** **service**

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated [Scientific Managing Editor](#), a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author **rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier **supports** **responsible** **sharing**

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information about open access publishing in this journal.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [Language Editing service](#) available from Elsevier's Language Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

For submitting your manuscript to JPPB please go to our Editorial Manager website at: <https://www.editorialmanager.com/JPHOTOBIOL/default.aspx> For technical support during the submission process, please visit the [Elsevier Support Center](#). For general questions, contact Dr. Robert Carpentier (Robert.Carpentier@uqtr.ca), Dr. Laszlo Matyus (lmatyus@med.unideb.hu), or Dr. Dominic Robinson (d.robinson@erasmusmc.nl).

Referees

Please submit, with the manuscript, the names and addresses of 5 potential referees. The

referees should not be editorial board members or from the same institute or geographical region as the authors.

Preparation

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

NEW

SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting

requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer

review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically

sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class [elsarticle.cls](#) to prepare your manuscript and [BibTeX](#) to generate your bibliography. Our [LaTeX site](#) has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential	title	page	information
-----------	-------	------	-------------

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon

abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical

abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units. Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). The only exception is the use of min, h, d and a as units for elapsed time, though never when combined algebraically with other units. If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. Consult the IUPAC "Glossary of Terms Used in Photochemistry" for the correct terminology (source: The Spectrum, Bowling Green, Vol.16, 1, 2003, p 16), (online: www.bgsu.edu/departments/photochem), (cited link: http://www.aspjourn.com/auth_instruct.html)

UV ranges. The official UV ranges as defined by the CIE must be used:

UV-A: 400-315nm

UV-B: 315-280nm

UV-C: 280-100nm

Math

formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image

manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic

artwork

General

points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within

a single file at the revision stage.

- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available. **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation**in****text**

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference**links**

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web**references**

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data**references**

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint**references**

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

Reference

management

software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference

formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference

Style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual Authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: "..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result...."

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] B.K. Armstrong, A. Krickler, The epidemiology of UV induced skin cancer, J. Photochem. Photobiol. B 63 (2001) 8-18.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, The Elements of Style, third ed., Macmillan, New York, 1979.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), Introduction to the Electronic Age, E-Publishing, Inc., New York, 1994, pp. 281-304.

[4] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article

are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data

visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary

material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research

data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings, which may also include software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data

linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data

statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

After acceptance

Online

proof

correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

Author inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Relatório Final do trabalho intitulado **"Influência da laserterapia de baixa intensidade na expressão de interleucina anti-inflamatória, de fatores de crescimento e de metaloproteinases da matriz no tecido pulpar de ratos diabéticos"**, Processo FOA nº 2018-0603, sob responsabilidade de Luciano Tavares Angelo Cintra e colaboração de Francine Benetti, Marina Carminatti, João Eduardo Gomes Filho, André Luiz Fraga Briso, Edilson Ervolino, Isabela Joane Prado Silva e Juliana Goto foi aprovado pela CEUA em 30 de Novembro de 2022.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Influence of low-intensity laser therapy on the expression of anti-inflammatory interleukin, growth factors and matrix metalloproteinases in the pulp tissue of diabetic rats after dental bleaching"**, Process FOA nº 2018-0603, under the supervision of Luciano Tavares Angelo Cintra and collaboration of Francine Benetti, Marina Carminatti, João Eduardo Gomes Filho, André Luiz Fraga Briso, Edilson Ervolino, Isabela Joane Prado Silva and Juliana Goto had its the Final Report approved by the CEUA on November 30, 2022.

Prof. Associado Fellippo Ramos Verri
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator