

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/09/2024.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

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	<p>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.</p> <p>Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba Orientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra</p> <p>1. Diabetes mellitus 2. Inibidores Teciduais de metaloproteinasas 3. Terapia com luz de baixa intensidade 4. Metaloproteinasas da matriz I. T.</p> <p>Black D24 CDD 617.67</p>
-------	---

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 imunomarcagem (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, Whitinh 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