



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

LETÍCIA PITOL PALIN

Reparo periimplantar em ratos diabéticos tipo 2, tratados pela combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana e compostos polifenóis. Caracterização biomecânica, histométrica, microtomográfica e molecular

**Araçatuba – SP
2021**

LETÍCIA PITOL PALIN

Reparo periimplantar em ratos diabéticos tipo 2, tratados pela combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana e compostos polifenóis. Caracterização biomecânica, histométrica, microtomográfica e molecular

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Assoc. Roberta Okamoto

Coorientadora: Prof^ª. Assoc. Letícia Helena Theodoro

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P162r Palin, Letícia Pitol.
Reparo periimplantar em ratos diabéticos tipo 2, tratados pela combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana e compostos polifenóis: caracterização biomecânica, histométrica, microtomográfica e molecular / Letícia Pitol Palin. - Araçatuba, 2021
84 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Roberta Okamoto
Coorientadora: Profa. Letícia Helena Theodoro

1. Diabetes mellitus 2. Dieta hiperlipídica 3. Fotoquimioterapia 4. Polifenóis 5. Implantes dentários I. T.

Black D7
CDD 617.64

Dedicatória

Aos meus pais, Lilian e Sérgio

Por todo apoio e dedicação ao longo de minha vida. Obrigada por sonharem os meus sonhos e me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos, devo cada pequena conquista a vocês. Vos dedico a conclusão de mais uma etapa acadêmica de minha vida e que cada fruto colhido seja compartilhado com vocês.

Aos meus avós, Delcides, Vilma e Matilde

Minhas maiores referências de honestidade, amor e trabalho. Agradeço por cada aconselhamento nos momentos de felicidade assim como nos de dificuldade. Assim como meus pais, são meus maiores incentivadores e devo a vocês a capacidade de vencer os meus objetivos e buscar cada vez mais o meu crescimento pessoal. Que sorte a minha em tê-los para partilhar desta alegria.

A Deus

Pela força nos momentos de dificuldade e pelo amor ao que faço.

“O amor é a força mais sutil do mundo”

Mahatma Gandhi

Agradecimentos
Especiais

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora, Professora Assoc. Roberta Okamoto

Por me despertar o verdadeiro sentido dentro da minha profissão, a pesquisa. A senhora é minha maior e melhor referência profissional, de ética e dedicação ao que faz. Cada dia de convivência é uma oportunidade em adquirir novos conhecimentos científicos, práticos, técnicos e pessoais, sempre com muita humildade e carinho. Agradeço principalmente pelo acolhimento dentro do laboratório e por abrir as portas com novas oportunidades. É uma grande honra poder chama-la de orientadora, e espero que nossa jornada esteja apenas começando.

A Professora Assoc. Letícia Helena Theodoro

Pela coorientação, ajuda e disponibilidade ao longo destes anos, sua participação neste trabalho foi muito especial e estou honrada em poder aprender mais com a senhora que sem dúvidas é um grande exemplo profissional. Obrigada em dispor do seu tempo em nos ajudar e sempre com um sorriso no rosto.

A Professora Tit. Dóris Hissako Matsushita

Agradeço novamente por toda ajuda, ensinamentos e disponibilidade durante a execução dos meus projetos de iniciação científica assim como neste mestrado, sua participação foi sempre de grande importância. Além disso a presença da senhora sempre é muito agradável, proveitosa e faz toda a diferença.

Aos membros da Banca Examinadora

Professor Dr. Francisley Ávila Souza, admiro o senhor pelo seu trabalho assim como pela sua pessoa. Gostaria de agradecer por cada conhecimento passado, principalmente em relação as atividades hospitalares desenvolvidas ao longo da pós-graduação. Obrigada pela paciência em ensinar e pelas conversas sempre muito boas e proveitosas. É uma honra em tê-lo novamente como membro da banca examinadora.

Professor Dr. Paulo Henrique Orlato Rosseti, agradeço pelo aceite em participar deste momento especial de minha vida acadêmica, o senhor é uma grande referência e inspiração profissional pelo trabalho que desenvolve com maestria. Fico honrada pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Aos meus familiares

Agradeço por todo apoio, em especial a minha tia, **Fabrizia**, que é um grande exemplo de dedicação em tudo o que faz.

Ao meu namorado, Rafael

Agradeço pelos anos de muita paciência, companheirismo, amor, amizade e respeito. É com você que estou nos momentos de alegria e também nos de tristeza, sou muito feliz em tê-lo por perto.

A minha grande amiga, Ana Cláudia

Agradeço por todos os anos de amizade. Sem dúvidas é quem partilhou de grandes momentos comigo ao longo de todos estes anos. Obrigada por ser meu ombro amigo, por me ajudar e por ser alguém com quem eu sempre pude contar.

Aos amigos de Pós-Graduação do LSMT

Pedro Henrique Ferreira, Fábio Batista, Gabriel Mulinari, Jaqueline Hassumi, Naara Monteiro e Natália Siqueira agradeço por toda disposição e ajuda durante a execução deste projeto, pude aprender muito com cada um de vocês ao longo destes anos. A presença de vocês é sempre muito agradável e prazerosa, obrigada por cada risada nos momentos de dificuldade.

Aos alunos de Iniciação Científica do LSMT

Paula Frigério, Juliana Moura, Jaqueline Silva, Ana Carolina Passos Tatiany Castro, Odir Nunes e Bruna Namba agradeço por toda ajuda ao longo destes anos, não só de mestrado, mas também de iniciação científica. Agradeço especialmente a aluna **Carolina Wajima**, a qual foi meu braço direito durante a realização deste estudo. Obrigada por cada dia de ajuda e por sempre estar disposta a participar de todas as atividades, fico orgulhosa em ver toda sua evolução.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP**, e em especial à **Faculdade de Odontologia de Araçatuba** na pessoa do diretor **Professor Tit. Glauco Issamu Miyahara** e do vice-diretor **Professor Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem**.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba na pessoa do coordenador **Professor Assoc. André Luiz Fraga Briso** e do vice-coordenador **Professor Assoc. Wirley Gonçalves Assunção**.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão de minhas duas bolsas de Iniciação Científica e suas respectivas renovações (Processos nº: 2014/15396-0 e 2016/25747-0), assim como pela bolsa de mestrado (2019/01634-0).

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)** - Código de Financiamento 001.

Aos meus queridos **professores** ao longo da pós-graduação, pessoas das quais admiro muito e me inspiro profissionalmente. Muito obrigada por ensinar toda a teoria e prática sempre com muita vontade e paciência.

Ao **Departamento de Ciências Básicas** onde realizei os experimentos para o desenvolvimento deste projeto assim como os de iniciação científica. Obrigada aos **professores da Disciplina de Histologia e Embriologia** (Prof. Dr. Edilson Ervolino, Profª Drª. Mariza Akemi Matsumoto, Profª Drª Alaide Gonçalves e Prof. Dr. Cláudio Aparecido Casatti), aos **professores da Disciplina de Anatomia** (Prof. Dr. José Américo de Oliveira, Prof. Dr. Paulo Roberto Botacin e Profª. Drª. Roberta Okamoto), aos **funcionários** e todos os outros **estagiários**. Muito obrigada por toda ajuda e pelo acolhimento durante estes anos de convívio.

Aos professores da **Disciplina de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial** (Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia Junior, Prof. Dr. Osvaldo Magro Filho, Prof. Dr.

Francisley Ávila Souza, Profª. Drª. Alessandra Aranega, Profª Drª Ana Paula Bassi, Profª. Drª Daniela Ponzoni, e Prof. Dr. Leonardo Peres Faverani) pelos ensinamentos práticos e teóricos ao longo destes anos.

Aos **colegas de pós-graduação da equipe de Cirurgia e Traumatologia BucoMaxiloFacial**, agradeço pelos momentos em que pudemos passar juntos onde pude aprender muito com cada um de vocês

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela ajuda e pelo funcionamento dos diversos setores da nossa instituição. Muito obrigada!

Agradeço a todos que torceram por mim, de longe ou de perto e que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste sonho.

Epígrafe

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo da Vinci

Resumo

PALIN, L. P. Reparo periimplantar em ratos diabéticos tipo 2, tratados pela combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana e compostos polifenóis. Caracterização biomecânica, histométrica, microtomográfica e molecular. 2021. 85 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2021.

RESUMO

Caracterizar as respostas reparacionais do tecido ósseo após a instalação de implantes em ratos diabéticos tipo 2 tratados sistemicamente com resveratrol e com o uso local da aPDT, por meio das análises biomecânica e molecular. Foram utilizados 128 ratos divididos em quatro grandes grupos: 1- NG: ratos normoglicêmicos; 2- NGrvt: ratos normoglicêmicos tratados com resveratrol oral; 3- T2D: ratos diabéticos tipo 2; e 4- T2Drvt: ratos diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol oral. Dentro de cada grupo existem quatro subgrupos: ST- Sem terapia local (n=8), a loja cirúrgica não recebeu terapia local adicional; AM- Azul de metileno (n=8), aplicação tópica de azul de metileno por 60 segundos; FBM- fotobiomodulação (n=8), irradiação com laser em baixa intensidade por 60 segundos; aPDT- Terapia fotodinâmica antimicrobiana (n=8), associação da aplicação de azul de metileno com irradiação com laser em baixa intensidade. A indução do T2D foi feita pela associação de dieta de cafeteria com uma única aplicação de Estreptozotocina (35mg.kg). Após a comprovação do diabetes tipo 2, foi dado início ao tratamento com resveratrol e passadas duas semanas os animais foram submetidos à cirurgia de exodontia dos primeiros molares superiores e instalação dos implantes. Neste momento foram realizadas as terapias locais de acordo com os grupos. Passados 28 dias, foi realizada a eutanasiados animais e realizadas as análises biomecânica (torque de remoção) e molecular de RT-PCR (IBSP, OCN, TRAP OPG e RANK-L). Os dados quantitativos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk para confirmar a distribuição normal das amostras. Na sequência, foram aplicados os testes de ANOVA um fator ou dois fatores, seguidos de pós teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os resultados da análise biomecânica revelaram que em animais normoglicêmicos tratados ou não por resveratrol tiveram uma diminuição do torque de remoção dos implantes quando empregado o uso de terapias locais. A presença da interferência sistêmica e o uso de terapias locais auxiliaram no aumento nos valores de contra-torque, especialmente no grupo T2Drvt com o uso da aPDT. A análise molecular de RT-PCT aos 28 dias sugere

que no grupo NG a expressão de IBSP foi semelhante com a presença ou não das terapias locais, entretanto houve uma diminuição dos genes de OCN e um aumento de TRAP com o uso das terapias. Em NGrvt, houve um aumento na expressão de IBSP na ausência de terapias locais, uma diminuição de OCN e TRAP quando utilizadas as terapias e um aumento expressivo de OPG com ausência de RANK-L com o uso sistêmico de resveratrol sem tratamentos locais. O grupo T2D expressou um aumento de IBSP com o uso da terapia de FBM e a terapia com aPDT elevou a expressão de OCN e diminuiu TRAP e RANK-L. O uso de resveratrol em T2Drvt e sua associação com a aPDT aumentaram a expressão de IBSP e OCN, e além disso diminuíram a expressão de TRAP e RANK-L. A análise conjunta dos resultados permite-nos concluir que o uso sistêmico de resveratrol e a sua associação com a aPDT promoveram uma melhora no reparo periimplantar de ratos diabéticos tipo 2, aumentando a expressão de genes relacionados a mineralização da matriz óssea e diminuindo a expressão de genes relacionados a reabsorção óssea que resultaram em uma melhora da biomecânica óssea.

Palavras-chave: Diabetes mellitus. Dieta hiperlipídica. Fotoquimioterapia. Polifenóis. Implantes dentários.

Abstract

PALIN, L. P. Periimplant bone repair in type 2 diabetics rats treated with the combination of antimicrobial photodynamic therapy and polyphenol compounds. Biomechanical, histometric, microtomographic and molecular characterization. 2021. 85 f. Master's Degree (Dissertation in Dentistry) – Dental School, São Paulo State University, Araçatuba, 2021.

ABSTRACT

The aim of this study is to characterize bone tissue repair responses after the installation of implants in type 2 diabetic rats treated systemically with resveratrol and with local use of aPDT, through biomechanical and molecular analysis. One hundred and twenty-eight rats were used, divided into four groups: 1- NG: normoglycemic rats; 2- NGrvt: normoglycemic rats treated with oral resveratrol; 3- T2D: type 2 diabetic rats; and 4- T2Drvt: type 2 diabetic rats treated with oral resveratrol. Within each group, are four subgroups: ST- No local therapy (n=8), the surgical store received no additional local therapy; MB- Methylene blue (n=8), topical application of methylene blue for 60 seconds; FBM- Photobiomodulation (n=8), low intensity laser irradiation for 60 seconds; aPDT- Antimicrobial photodynamic therapy (n=8), association of methylene blue application with low intensity laser irradiation. T2D induction was made by the association of cafeteria diet with a single application of Streptozotocin (35mg.kg). After type 2 diabetes confirmation, resveratrol treatment was started and after two weeks the animals were submitted to upper first molars extraction and implants installation. At this moment the local therapies were performed according to the groups. After 28 days, the animals were euthanized and the biomechanical (removal torque) and molecular analysis of RT-PCR (IBSP, OCN, TRAP OPG and RANK-L) were performed. The quantitative data were submitted to the Shapiro Wilk normality test to confirm the normal distribution of the samples. In the sequence, the ANOVA tests were applied one or two factors, followed by Tukey's post-test, with a significance level of 5%. The results of biomechanical analysis showed that in normoglycemic animals treated or not by resveratrol had a decrease in the implants removal torque when local therapies were applied. The presence of systemic interference and the use of local therapies helped to increase biomechanical values, especially in the T2Drvt group with the use of aPDT. The molecular analysis of RT-PCT at 28 days suggests that in the NG group the expression of IBSP was similar with the presence or not of local therapies, however there was a decrease in OCN genes and an increase in TRAP with

the use of therapies. In NGrvt, there was an increase in IBSP expression in the absence of local therapies, a decrease in OCN and TRAP when using therapies and a significant increase in OPG without RANK-L with the systemic use of resveratrol without local treatments. T2D group expressed an increase of IBSP with the use of PBM therapy, aPDT raised the expression of OCN and decreased TRAP and RANK-L. The use of resveratrol on T2Drvt and its association with aPDT increased the expression of IBSP and OCN, and also decreased TRAP and RANK-L expression. The overall analysis of the results allows us to conclude that the systemic use of resveratrol and its association with aPDT promoted an improvement in periimplant repair of type 2 diabetic rats, increasing the expression of genes related to bone matrix mineralization and decreasing the expression of genes related to bone resorption that resulted in an improvement of bone biomechanics.

Keywords: Diabetes mellitus. Diet, high-fat. Photochemotherapy. Polyphenols. Dental implants.

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Aplicação de estreptozotocina	39
FIGURA 2-	Exodontia dos primeiros molares superiores	40
FIGURA 3-	Aspecto clínico do leito receptor do implante com ausência de terapia local (ST)	42
FIGURA 4-	Aspecto clínico do leito receptor do implante após aplicação tópica de azul de metileno (AM)	42
FIGURA 5-	Aspecto clínico do leito receptor do implante após terapia de fotobiomodulação (FBM)	43
FIGURA 6-	Aspecto clínico do leito receptor do implante após realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	43
FIGURA 7-	Instalação dos implantes de titânio em maxila	44

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Grupos experimentais	37
TABELA 2-	Dieta de cafeteria	38
TABELA 3-	Valores médios de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	49
TABELA 4-	Valores médios de glicose sanguínea dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	54
TABELA 5-	Valores médios de contra-torque obtidos na análise biomecânica	58

Lista de Gráficos

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	Média de peso dos animais ao longo do experimento	48
GRÁFICO 2-	Comparação da média pesos entre os grupos no início do experimento	49
GRÁFICO 3-	Comparação da média pesos entre os grupos anteriormente a aplicação de estreptozotocina	50
GRÁFICO 4-	Comparação da média de pesos entre os grupos no início do tratamento com resveratrol	51
GRÁFICO 5-	Comparação da média de pesos entre os grupos no dia dos procedimentos cirúrgicos	52
GRÁFICO 6-	Comparação da média de pesos entre os grupos no dia da eutanásia	52
GRÁFICO 7-	Média de glicose sanguínea dos animais ao longo do experimento	53
GRÁFICO 8-	Comparação glicêmica dos grupos ao início do experimento	54
GRÁFICO 9-	Comparação glicêmica dos grupos no dia da aplicação de estreptozotocina	55
GRÁFICO 10-	Comparação glicêmica dos grupos no início do tratamento com resveratrol	56
GRÁFICO 11-	Comparação glicêmica dos grupos no dia dos procedimentos cirúrgicos	56
GRÁFICO 12-	Comparação glicêmica dos grupos no dia da eutanásia	57
GRÁFICO 13-	Análise biomecânica dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	58
GRÁFICO 14-	Valores de torque de remoção obtidos no grupo NG	59
GRÁFICO 15-	Valores de torque de remoção obtidos no grupo NGrvt	59
GRÁFICO 16-	Valores de torque de remoção obtidos no grupo T2D	60
GRÁFICO 17-	Valores de torque de remoção obtidos no grupo T2Drvt	61
GRÁFICO 18-	Expressão gênica de IBSP	62
GRÁFICO 19-	Expressão gênica de IBSP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	63
GRÁFICO 20-	Expressão gênica de OCN nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	64

GRÁFICO 21-	Expressão gênica de OCN nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	64
GRÁFICO 22-	Expressão gênica de TRAP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	65
GRÁFICO 23-	Expressão gênica de TRAP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	66
GRÁFICO 24-	Expressão gênica de OPG nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	67
GRÁFICO 25-	Expressão gênica de OPG nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	68
GRÁFICO 26-	Expressão gênica de RANK-L nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	69
GRÁFICO 27-	Expressão gênica de RANK-L nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt	69
GRÁFICO 28-	Expressão gênica relativa da proporção entre RANK-I e OPG.	70

Lista de Abreviaturas

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
AM	Azul de metileno
aPDT	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
CEUA- FOA	Comitê de ética no uso de animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBM	Fotobiomodulação
FOA	Faculdade de Odontologia de Araçatuba
FS	Fotossensibilizador
g	Gramas
IBSP	Sialoproteína óssea
LSMT	Laboratório para estudo de tecido mineralizado
mg/dL	Miligramas por decilitros
mg/Kg	Miligramas por quilograma
min	minutos
ml	Mililitros
N.cm	Newtons por centímetro
n	Número
NG	Grupo normoglicêmico
NGrvt	Grupo normoglicêmico tratado com resveratrol
OCN	Osteocalcina
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial hidrogeniônico
RANK-L	Ativador de receptores do fator nuclear kappa-B ligante
RT-PCR	PCR em tempo real
ST	Ausência de terapia local
STZ	Estreptozotocina
T2D	Grupo diabetes tipo 2
T2Drvt	Grupo diabetes tipo 2 tratado com resveratrol

TRAP Fosfatase ácida resistente ao ácido tartárico

TRAP Fosfatase ácida resistente ao tartarato

UNESP Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Sumário

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	OBJETIVO	34
3	METODOLOGIA	36
3.1	Grupos Experimentais	36
3.2	Indução do Diabetes Tipo 2	38
3.3	Tratamento Medicamentoso com Resveratrol	39
3.4	Exodontia dos Primeiros Molares Superiores	39
3.5	Terapias Locais	40
3.6	Instalação dos Implantes em Maxila	43
3.7	Controle Glicêmico e de Peso Corporal	44
3.8	Eutanásia	45
3.9	Análise Biomecânica (Torque de Remoção)	45
3.10	PCR em Tempo Real	45
3.11	Análise Estatística	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Peso Corporal	48
4.2	Glicemia	53
4.3	Análise Biomecânica (Torque de Remoção)	57
4.4	PCR em Tempo Real	61
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXOS	85

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes é uma doença crônica que pode ser classificada em Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2 ou Diabetes Gestacional.¹ Em suma, ocorre quando o pâncreas não é capaz de produzir insulina em quantidade suficiente, ou quando o corpo não pode usar a insulina produzida de forma eficaz, levando a uma hiperglicemia.¹ O Diabetes tipo 2 (T2D) afeta de 90% a 95% dos pacientes diabéticos,¹ tendo como fator predisponente um estilo de vida não saudável com alimentos ricos em açúcar, gordura e sódio em combinação com falta de atividade física.^{2,3} A resistência à insulina induzida pela obesidade está geralmente ligada a outros transtornos como inflamação, esteatose hepática e estresse oxidativo,² e frequentemente acompanhada de dislipidemia, hipertensão arterial e disfunção endotelial.⁴

Além dos medicamentos de rotina para o tratamento do diabetes tipo 2, compostos fitoterápicos como o resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxystilbene) têm sido uma escolha amplamente aceita para auxiliar no tratamento da condição, pois previne a intolerância à glicose e tem um poderoso efeito anti-inflamatório.⁵⁻⁷ Este polifenol é tipicamente encontrado em casca de uva roxa, em vinhos e algumas outras plantas.⁷ Como alguns hipoglicemiantes,⁸⁻¹⁰ o resveratrol também é benéfico para o tecido ósseo, prevenindo a perda óssea, ajudando na reparação óssea pós-cirúrgica⁸⁻¹⁰ e promovendo a osteoblastogênese além de potencializar a ação dos receptores de vitamina D, que são diretamente relacionados ao metabolismo do cálcio.⁵⁻⁷

Associado à condição sistêmica, complicações odontológicas como doença periodontal, perda óssea, perda de dentes e outros tipos de infecções que desencadeiam uma série de transtornos para o dentista,¹¹ como a perda de implantes devido à maior tendência de infecções que atrasam a reparação tecidual,^{11,12} proliferação celular^{13,14} e metabolismo de colágeno.^{14,15} O uso de terapias locais associadas ao tratamento reabilitador de pacientes diabéticos vem sendo uma alternativa para melhorar e acelerar o processo pós operatório em diversos procedimentos odontológicos.¹⁶⁻²⁰

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), que consiste na associação de um agente fotossensibilizador (FS) em associação com uma fonte de luz, que pode ser um laser de baixa potência¹⁶⁻¹⁸ tem se mostrado muito promissor para o tratamento de várias complicações dentárias, exercendo efeitos positivos nos níveis molecular,

celular e tecidual.¹⁶⁻¹⁸ O azul de metileno (AM), como PS, exerce efeitos antimicrobianos de amplo espectro, além de ser facilmente absorvido pelos tecidos e absorver a luz no comprimento de onda da faixa do visível vermelho.¹⁹⁻²³ A aPDT pode favorecer a reparação óssea por se tratar de tratamento eficaz para controle de infecções,²⁰ acelerando o processo de reparação tecidual e minimizando sintomas indesejáveis e complicações pós-operatórias que podem estar relacionados também ao efeito da terapia de fotobiomodulação utilizando laser de baixa potência.²⁴⁻²⁷

Estudos anteriores mostraram que o diabetes tipo 2 influencia no aumento da resposta inflamatória pos-exodôntica, resultando em um prejuízo da maturação de fibras colágenas e atrasando o processo de mineralização alveolar¹². Este fato teria grande impacto para processos reabilitadores com implantes dentais, tendo em vista o comprometimento causado no leito receptor destes implantes. Vale ressaltar que neste estudo foi proposto um modelo de instalação de implantes na maxila de ratos, com o intuito de avaliar o efeito do diabetes tipo 2, e qual a possível melhora deste quadro frente a ação do resveratrol e de terapias locais, como a aPDT, sobre os ossos maxilares, tendo em vista que existem poucos estudos relatando suas ações sobre o metabolismo ósseo peri-implantar.

Objetivo

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho consiste em caracterizar as respostas reparacionais do tecido ósseo após a instalação de implantes em ratos diabéticos tipo 2 tratados sistemicamente com resveratrol e com o uso local da aPDT, por meio das análises biomecânica e molecular.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 Grupos Experimentais

O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontológica de Araçatuba, sob o número 00153-2019 (em 15 de fevereiro de 2019), e foram seguidas as diretrizes N3CR de Pesquisa em Animais para a Relação de Experiências In Vivo (ARRIVE).²⁸ Cento e vinte oito ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*) com 3 meses de idade e pesando 250 g foram divididos em quatro grupos (n = 32 por grupo): 1- NG: ratos normoglicêmicos; 2- NGrvt: ratos normoglicêmicos tratados com resveratrol oral; 3- T2D: ratos diabéticos tipo 2; e 4- T2Drvt: ratos diabéticos tipo 2 tratados com resveratrol oral. (Tabela 1)

Cada grupo experimental foi dividido em quatro subgrupos de acordo com a terapia realizada na loja cirúrgica antes da instalação dos implantes: ST- Sem terapia local (n=8), a loja cirúrgica não recebeu terapia local adicional; AM- Azul de metileno (n=8), aplicação tópica de azul de metileno por 60 segundos; FBM- fotobiomodulação (n=8), irradiação com laser em baixa intensidade por 60 segundos; aPDT- Terapia fotodinâmica antimicrobiana (n=8), associação da aplicação de azul de metileno com a irradiação com laser em baixa intensidade. A separação dos animais foi feita de maneira aleatória pelo software Microsoft Office Excel (Microsoft, Redmond, WA, EUA), através de identificações numéricas, respeitando a taxa de alocação 1:1 para cada grupo. (Tabela 1)

TABELA 1 - Grupos Experimentais

<i>GRUPOS</i>	<i>SUBGRUPOS</i>
NG (n = 32)	ST (n = 8)
	AM (n = 8)
	FBM (n = 8)
	aPDT (n = 8)
NGrvt (n = 32)	ST (n = 8)
	AM (n = 8)
	FBM (n = 8)
	aPDT (n = 8)
T2D (n = 32)	ST (n = 8)
	AM (n = 8)
	FBM (n = 8)
	aPDT (n = 8)
T2Drvt (n = 32)	ST (n = 8)
	AM (n = 8)
	FBM (n = 8)
	aPDT (n = 8)
TOTAL = 128 ratos	

Grupos e subgrupos experimentais totalizam um n = 128 ratos.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Os animais foram mantidos em gaiolas em um ambiente de temperatura estável ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, ciclo de controle de luz 12 h claro, 12 h escuro), dieta balanceada (NUVILAB, Paraná, Brasil, 1,4% Ca e 0,8% P + água ad libitum). Após uma semana, os animais dos grupos T2D e T2Drvt foram alimentados por dieta de cafeteria, água com açúcar e água ad libitum. Os animais NG e NGrvt seguiram com a dieta balanceada (NUVILAB, Paraná, Brasil, 1,4% Ca e 0,8% P + água ad libitum). Os animais foram submetidos à eutanásia com 28 dias após a cirurgia de instalação dos implantes.

3.2 Indução do Diabetes Tipo 2

Os animais T2D e T2Drvt foram alimentados por dieta de cafeteria^{2,3,12} contendo alto teor de açúcares, gorduras e sódio promovendo resistência à insulina, obesidade e síndrome metabólica em ratos. Para cada animal foi pesado diariamente uma quantidade de 30 g de alimento, com bolachas recheadas, bolachas de wafer, salgadinho de milho e uma garrafa de água com uma concentração de 12% de sacarose.¹² Os animais NG e NGrvt foram alimentados com ração convencional durante todo o experimento. (Tabela 2)

TABELA 2 - Dieta de cafeteria

<i>ALIMENTOS</i>	<i>QUANTIDADE (POR RATO)</i>
Bolacha Recheada	30 g diariamente
Bolacha Wafer	30 g diariamente
Salgadinho de milho	30 g diariamente
Agua + Açúcar (12%)	50 mL diariamente

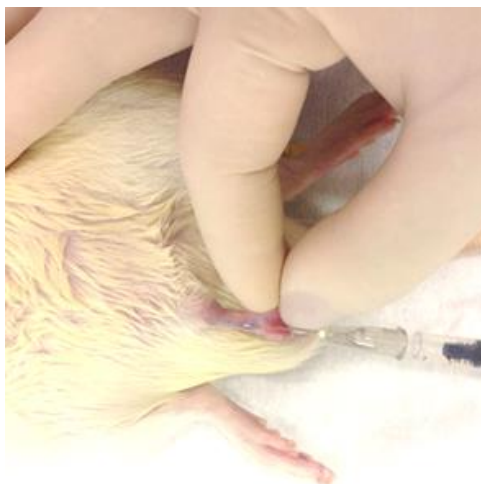
Alimentos que compõe a dieta de cafeteria para os animais T2D e T2Drvt.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Após três semanas de dieta de cafeteria (dia 21), os animais T2D e T2Drvt foram anestesiados por infiltração intramuscular de cloridrato de xilazina (Dopaser®- Laboratórios Calier do Brasil Ltda., Osasco, Brasil) e cloridrato de ketamina (Vetaset®- Fort Dodge Animal Health Ltda., Campinas, Brasil) na dosagem indicada pelo fabricante. Foi realizada antissepsia da região escrotal com álcool 70% e através da veia peniana, foi injetada estreptozotocina (Sigma®, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha e/ou suas afiliadas) em dose baixa (35 mg/kg), dissolvida em solução de citrato de sódio 0,1 M, pH = 4,5¹². Os animais NG e NGrvt receberam somente o citrato de sódio através da veia peniana. (Figura 1)

A STZ tem uma ação tóxica para as células β -pancreática, pois a droga se liga à estas células e as degrada. Por ser aplicada em baixa dose, diferente do que acontece nos modelos experimentais de diabetes tipo 1, ocorre disfunção parcial das

células β , assim, o organismo dos animais ainda terá a capacidade de produzir insulina (mesmo que não de forma ideal).

FIGURA 1 - Aplicação de estreptozotocina



Aplicação única de STZ (35 mg/kg) através da veia peniana dos animais T2D e T2Drvt.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

A confirmação do diabetes foi feita uma semana após a indução do diabetes tipo 2 (dia 28), seguindo o critério de concentração de glicose maior que 198 mg/dL após 120 min de ingestão oral de solução com concentração de 12% de sacarose.¹²

3.3 Tratamento Medicamentoso com Resveratrol

Após a confirmação do diabetes tipo 2 seguindo os critérios citados anteriormente, foi dado início ao tratamento com resveratrol aos animais dos grupos NGrvt e T2Drvt. Os animais receberam por meio de gavagem oral resveratrol (100 mg/kg/dia) dissolvido em DMSO.²⁹ Os animais pertencentes aos grupos NG e T2D receberam apenas o veículo para passarem pelo mesmo stress.

3.4 Exodontia dos Primeiros Molares Superiores

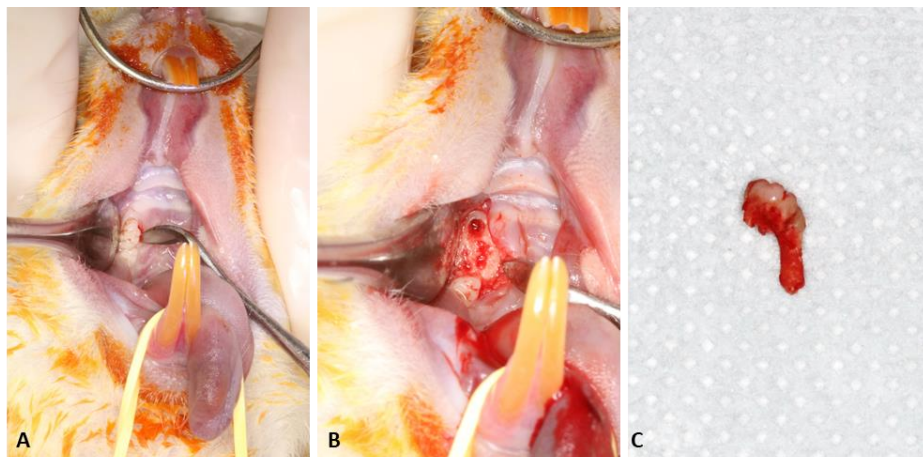
Os animais foram mantidos em jejum durante oito horas prévias ao procedimento cirúrgico, sedados e receberam cloridrato de mepivacaína (0.3 ml/Kg,

Scandicaíne 2% com adrenalina 1:100.000, Septodont, França) como anestesia local e para hemostasia do campo operatório.

Após a sedação, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica confeccionada especialmente para procedimentos cirúrgicos em roedores, favorecendo a manutenção da cavidade bucal aberta e proporcionando um posicionamento adequado para o procedimento de exodontia. A antisepsia extraoral foi feita com Polivinilpirrolidona Iodo Tópico (PVPI 10%, Riodeine Tópico, Rioquímica, São José do Rio Preto) e a intraoral com Periogard® (Colgate-Palmolive Company, Nova Iorque, Nova York, EUA).

A exodontia dos primeiros molares superiores foi realizada com o auxílio de um esculpador Hollenbeck nº 3S (Quinelato, Rio Claro – SP), para a realização da diérese, sindesmotomia, em seguida a luxação do primeiro molar superior utilizando o princípio de uso em forma de cunha e alavanca, para em seguida realizar a elevação do elemento dentário e sua exodontia. (Figura 2)

FIGURA 2 - Exodontia dos primeiros molares superiores



A: Luxação do primeiro molar para realização da exodontia; B: Aspecto clínico do alvéolo dental após remoção do dente; C: Primeiro molar superior.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

3.5 Terapias Locais

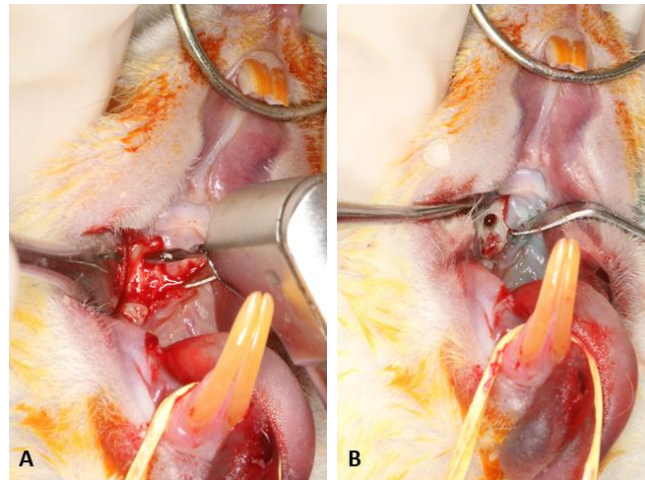
Após a exodontia, com uma lâmina de bisturi número 15 (Feather Industries Ltda, Tokyo, Japão) foi realizada uma incisão linear de aproximadamente 0,5 cm de

comprimento na região do rebordo alveolar pós exodôntico e a seguir, o tecido mole foi descolado em espessura total e afastado com o auxílio de um esculpidor Hollenbeck, expondo o tecido ósseo para a instalação do implante.

Para a instalação dos implantes, foi realizada uma fresagem de profundidade de 2,0 mm com fresa espiral de 1,2 mm de diâmetro montada em motor elétrico (BLM 600®; Driller, São Paulo, SP, Brasil) a uma velocidade de 1000 rpm, sob irrigação com solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Fisiológico®, Laboratórios Biosintética Ltda®, Ribeirão Preto, SP, Brasil), e contra-ângulo com redução 20:1 (Peça angular 3624N 1:4, Cabeça 67RIC 1:4, KaVo®, Kaltenbach & Voigt GmbH & Co., Biberach, Germany). Os animais do grupo ST não receberam nenhum tipo de terapia local, apenas irrigação com soro fisiológico antes da instalação dos implantes (Figura 3). Na loja cirúrgica dos animais do grupo AM foi depositado 0,3 mL de azul de metileno (100 µg/mL, Aphoticario Farmacia de manipulação Ltda, Araçatuba, SP, Brasil) por 60 segundos previamente à instalação dos implantes (Figura 4). Para os animais do grupo FBM, foi realizada irradiação com laser de baixa potência durante 60 segundos na loja cirúrgica antes da instalação dos implantes (Figura 5). Por fim, os animais dos grupos aPDT receberam na loja cirúrgica a associação do AM por 60 segundos (tempo de pré-irradiação) com a irradiação do laser de baixa potência por 60 segundos (Figura 6).

Nos grupos aPDT e FBM foi utilizado o laser de diodo de Índio-Gálio-Alumínio-Fóforo (InGaAlP; 660 nm; Thera Lase®, DMC Equipamentos Ltda®, SP, Brasil) com 0,0283 cm² de área de saída do spot, com os seguintes parâmetros²³: potência de 35 mW; modo de operação contínua; energia de 2,1 J/ponto por 60 s, densidade de energia de 74,2 J/cm²; intensidade de potência de 1,23 W/cm². A fibra óptica do laser foi posicionada em um único ponto no central, paralelamente ao longo eixo e em contato com a loja cirúrgica previamente à instalação dos implantes.³⁰

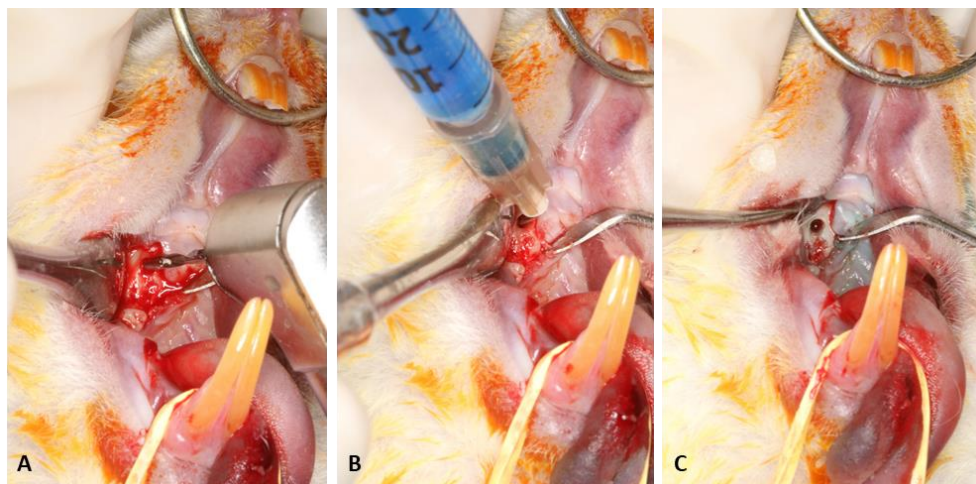
FIGURA 3 - Aspecto clínico do leito receptor do implante com ausência de terapia local (ST)



A: Fresagem com fresa espiral sob irrigação de soro fisiológico; B: Leito cirúrgico preparado para instalação do implante.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

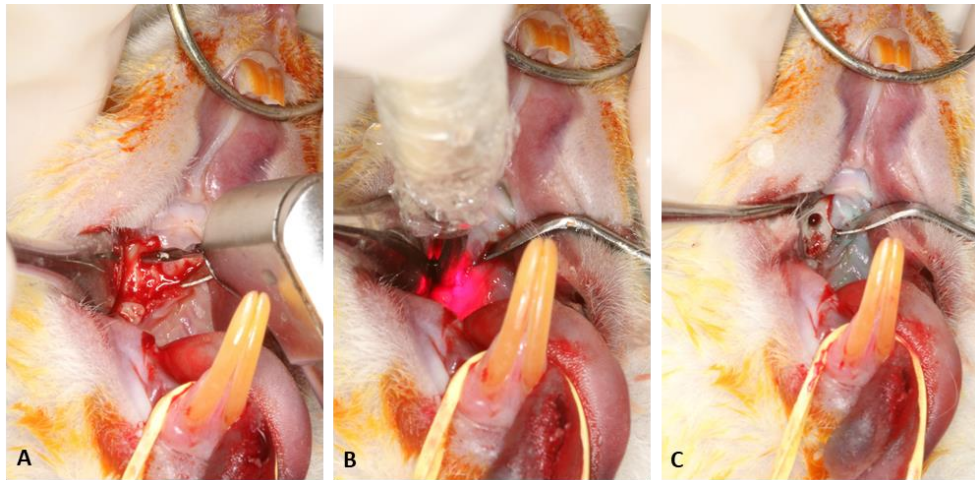
FIGURA 4 - Aspecto clínico do leito receptor do implante após aplicação tópica de azul de metileno (AM)



A: Fresagem com fresa espiral sob irrigação de soro fisiológico; B: Aplicação do azul de metileno por 60 segundos na loja cirúrgica; C: Leito cirúrgico preparado para instalação do implante.

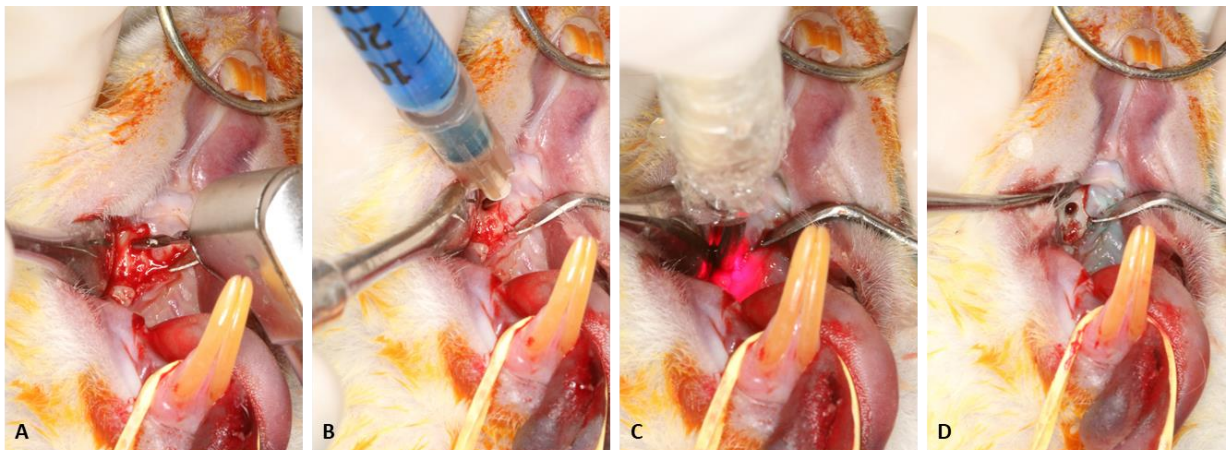
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

FIGURA 5 - Aspecto clínico do leito receptor do implante após terapia de FBM com laser de baixa potência (FBM)



A: Fresagem com fresa espiral sob irrigação de soro fisiológico; B: Irradiação com laser de baixa potência por 60 segundos na loja cirúrgica; C: Leito cirúrgico preparado para instalação do implante.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

FIGURA 6 - Aspecto clínico do leito receptor do implante após realização da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)



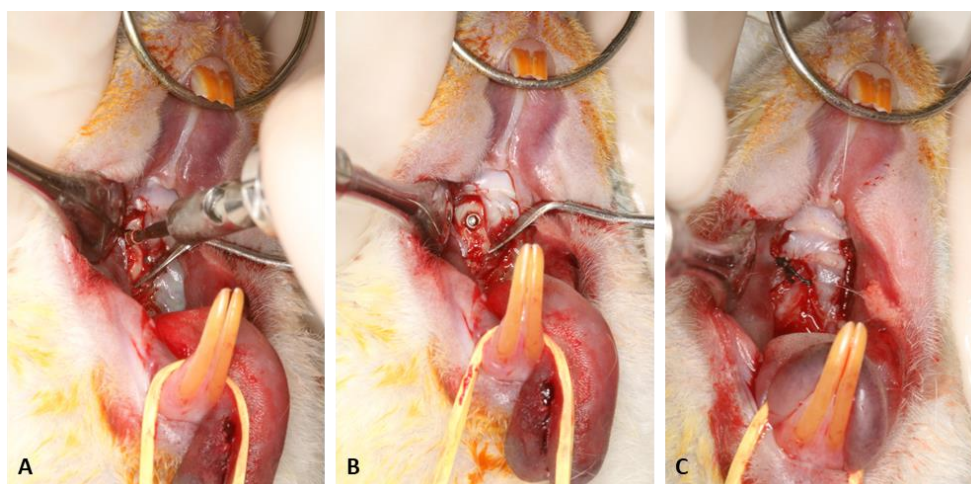
A: Fresagem com fresa espiral sob irrigação de soro fisiológico; B: Aplicação do azul de metileno por 60 segundos na loja cirúrgica; C: Irradiação com laser de baixa potência por 60 segundos na loja cirúrgica; D: Leito cirúrgico preparado para instalação do implante
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

3.6 Instalação dos Implantes em Maxila

Após a realização das terapias na loja cirúrgica, foram instalados 256 implantes de titânio comercialmente puro grau IV baseado no conceito de duplo ataque ácido (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil), com diâmetro de

1,4 mm e altura de 2,7 mm, esterilizados por raios gama (Figura 7). Cada animal recebeu 2 implantes, sendo 1 em cada região de primeiro molar superior do lado direito e esquerdo. Para o fechamento dos tecidos (síntese), foi utilizado o fio monofilamentar (Nylon 5.0, Ethicon, Johnson, São José dos Campos, Brasil) com pontos interrompidos.

FIGURA 7 - Instalação dos implantes de titânio em maxila



A: Instalação dos implantes de titânio com auxílio de chave digital; B: Aspecto clínico do implante instalado em região de primeiro molar superior; C: Fechamento dos tecidos moles por pontos interrompidos com fio de Nylon.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

3.7 Controle Glicêmico e de Peso Corporal

Ao início do experimento, a glicemia dos animais e o peso corporal foram avaliados semanalmente com um glicosímetro Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) e uma balança digital.¹² Os períodos analisados neste estudo foram: início da dieta (dia 0), final de três semanas de dieta (dia 21), confirmação de diabetes/início do tratamento com resveratrol (dia 28), procedimentos cirurgicos (da 42) e eutanásia (dia 70).¹²

Para realizar a avaliação glicêmica, os animais foram mantidos em jejum durante 2 h após o consumo da solução oral contendo glicose (12% de glicose) e uma pequena amostra de sangue foi retirada da veia caudal dos animais através de uma pequena perfuração, com uma lâmina de bisturi número 11.¹² A amostra de sangue

foi de uma gota compatível para a leitura do glicosímetro. Os resultados apresentados são a média obtida em cada grupo nos períodos avaliados. Vale destacar que os animais que não estivessem apresentando o padrão de glicose sanguínea do grupo eram descartados do trabalho.

3.8 Eutanásia

Os animais foram submetidos à eutanásia aos 28 dias após a cirurgia de instalação dos implantes. Com as maxilas direitas, foram realizadas as análises de RT-PCR e biomecânica/contra-torque.

3.9 Análise Biomecânica (Torque de Remoção)

Para a análise biomecânica, os animais foram sedados e as maxilas foram acessadas para exposição dos implantes e realização do torque reverso. Um monta-implante (Emfils Comércio Produtos Odontológicos, Itu, São Paulo, Brasil) foi adaptado ao hexágono do implante e o torquímetro digital acoplado ao monta-implante. Foi aplicado um movimento anti-horário aumentando-se o torque reverso até a rotação do implante no interior do tecido ósseo, rompendo completamente a interface osso/implante. No momento em que o torquímetro registrou o pico máximo de torque para esse rompimento, foi anotado o valor em Newton por centímetro (N.cm).³¹

3.10 PCR em Tempo Real

Após a realização do torque reverso, imediatamente foi removido o fragmento da porção óssea em contato com os implantes com auxílio de uma pinça goiva preservando este osso que estava em contato com as espiras dos implantes.³²

A reação de cadeia de polimerase em tempo real (PCR) foi realizada com o objetivo de avaliar a expressão gênica de marcadores relacionados ao processo de reparo ósseo ao redor dos implantes. Cada fragmento ósseo foi cuidadosamente lavado em PBS e posteriormente congelado em nitrogênio líquido para que o RNA

total fosse extraído com o reagente Trizol (Life Technologies: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e mantidos em freezer em temperatura de -80°C até o momento da análise. Após a análise da integridade, pureza e concentração do RNA, foi confeccionado o cDNA utilizando $1\mu\text{g}$ de RNA através da reação de transcriptase reversa (M-MLV transcriptase reversa: Promega Corporation, Madison, WI, USA). Os cDNAs das amostras foram pipetados juntamente com o Taqman Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems) na placa para PCR (96 well fast thermal cycling, Life Biotechnologies) para detecção de genes envolvidos no processo de reparo ósseo (Taqman Gene Expression Assays). Os genes avaliados foram os que codificam Osteopontina, Osteocalcina, TRAP, Osteoprotegerina e RANK-L.

O PCR em tempo real foi realizado num sistema de detecção para PCR em tempo real Step One Plus (Applied Biosystems) sob as seguintes condições: 50°C (2 minutos), 95°C (10 minutos) e 40 ciclos de 95°C (15 segundos), 60°C (1 minuto), seguido pela curva de desnaturação padrão. A expressão gênica relativa foi calculada em referência à expressão das proteínas ribossômicas mitocondriais e normalizada pela expressão gênica dos fragmentos ósseos do reparo periimplantar (método $\Delta\Delta\text{CT}$).³² O ensaio foi feito em quadruplicata.

3.11 Análise Estatística

Os dados de peso corporal, glicêmicos, biomecânicos e moleculares obtidos a partir das análises foram submetidos a análise estatística pelo software GraphPad Prism 7.01. Após a aplicação do teste de homocedasticidade Shapiro Wilk, confirmada a distribuição normal dos dados, estes foram submetidos ao teste paramétrico de Análise de Variância Um Fator ou Dois Fatores, seguido do Pós teste de Tukey para definir as diferenças observadas entre os grupos avaliados, sendo estabelecido o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

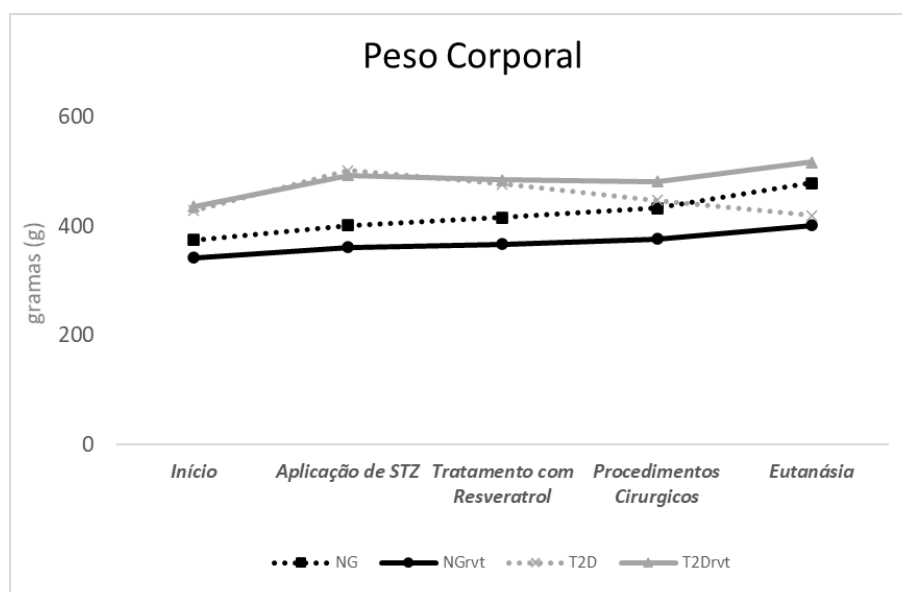
Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Peso Corporal

Com o decorrer do experimento, os animais NG ganharam em média 100g enquanto os animais NGrvt obtiveram um ganho médio de 60g. Este fato sugere que o uso contínuo do resveratrol é um bom aliado para a manutenção do peso corporal, evitando o aumento de peso. Os animais T2D tiveram um ganho inicial de peso devido a dieta de cafeteria, contudo após a indução do diabetes houve perda média de 80g devido a sua debilitação sistêmica até o final do experimento. Em contrapartida, o uso sistêmico de resveratrol para T2Drvt manteve o peso dos animais mesmo com a presença da interferência sistêmica. O teste estatístico ANOVA Two-Way, comprovou que houve diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) nos pesos ao comparar a interação da condição sistêmica com os períodos. (Gráfico 1 e Tabela 3)

GRÁFICO 1 - Média de pesos dos animais ao longo do experimento



Média de peso dos animais por período analisado. Início do experimento: dia 0; Aplicação de STZ: dia 21; Início do tratamento com resveratrol: dia 28; Procedimentos cirúrgicos: dia 42; Eutanásia: dia 70.
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

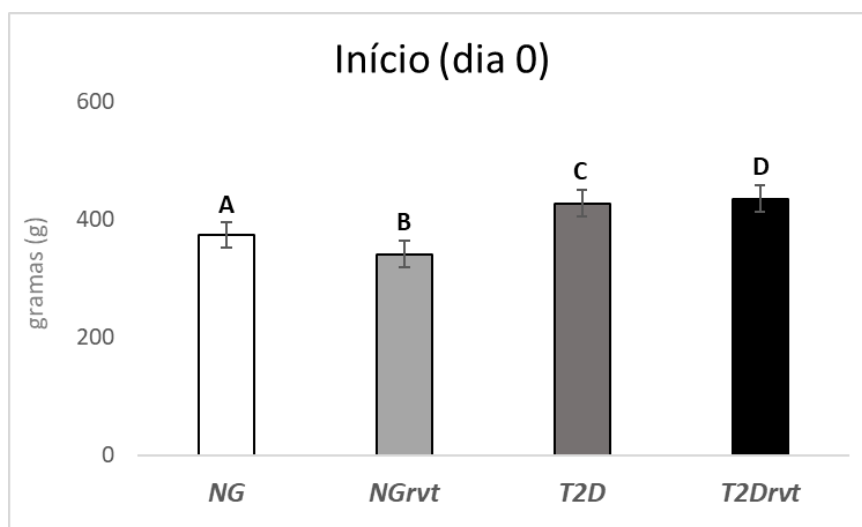
TABELA 3 - Valores médios de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

	<i>Início do Experimento</i>	<i>Aplicação de STZ</i>	<i>Início do tratamento com resveratrol</i>	<i>Procedimentos Cirúrgicos</i>	<i>Eutanásia</i>
NG	374,5	401,5	415,4	432,3	478,9
NGrvt	341,7	360,5	366,7	376,5	401,2
T2D	427,7	501	476,3	447,3	419,5
T2Drvt	435,5	493,1	483,9	481,4	517

Pesos dos animais NG, NGrvt, T2D e T2Drvt ao longo do experimento. Valores em gramas.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Início da Dieta (dia 0): Houve diferença estatisticamente ($p < 0,05$) significativa quando comparada a média de peso entre todos os grupos experimentais. (Tabela 3 e Gráfico 2)

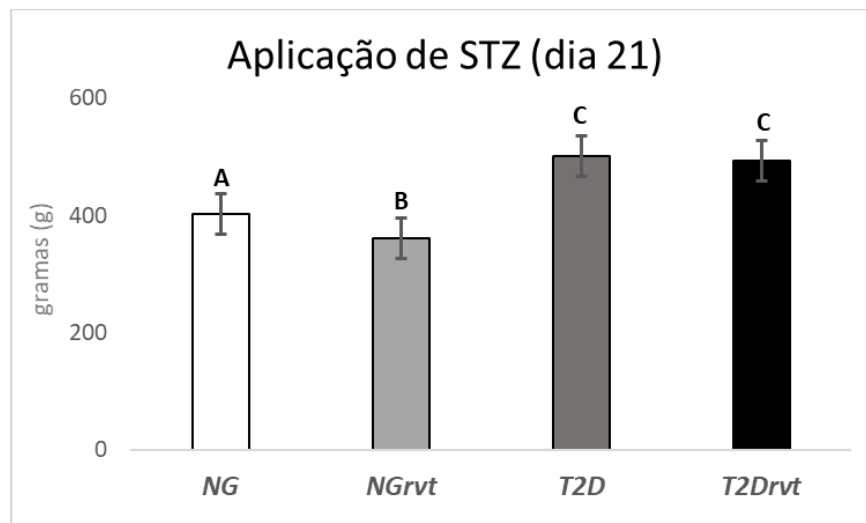
GRÁFICO 2 - Comparação da média de pesos entre os grupos no início do experimento

Média de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no início do experimento. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Aplicação de STZ (dia 21): Os grupos T2D e T2Drvt tiveram um ganho de peso maior quando comparado aos animais NG e NGrvt, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos. Os animais T2D e T2Drvt não apresentaram diferença estatística entre a média de pesos. (Tabela 3 e Gráfico 3)

GRÁFICO 3 - Comparação da média pesos entre os grupos anteriormente a aplicação de estreptozotocina

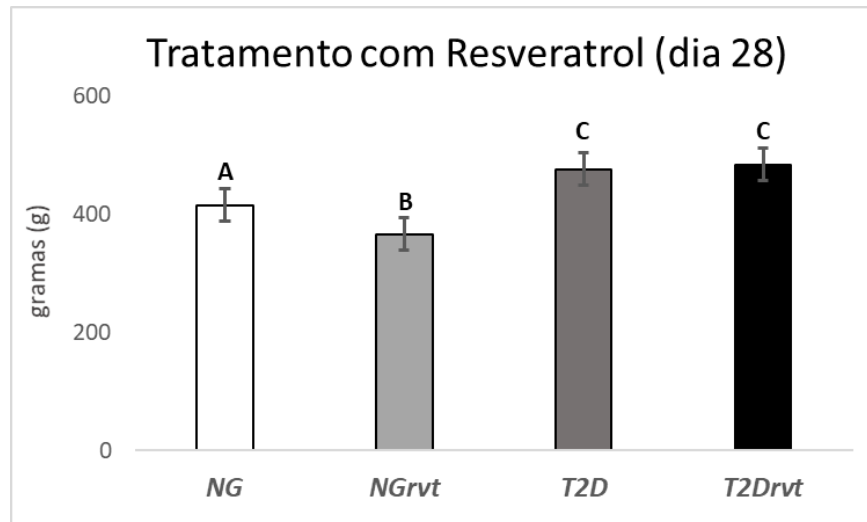


Média de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt após três semanas de dieta de cafeteria. Letras diferentes correspondem com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Confirmação do T2D e Início do tratamento sistêmico (dia 28): Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os valores de massa corporal entre todos os grupos experimentais. (Tabela 3 e Gráfico 4)

GRÁFICO 4 - Comparação da média de peso entre os grupos no início do tratamento com resveratrol

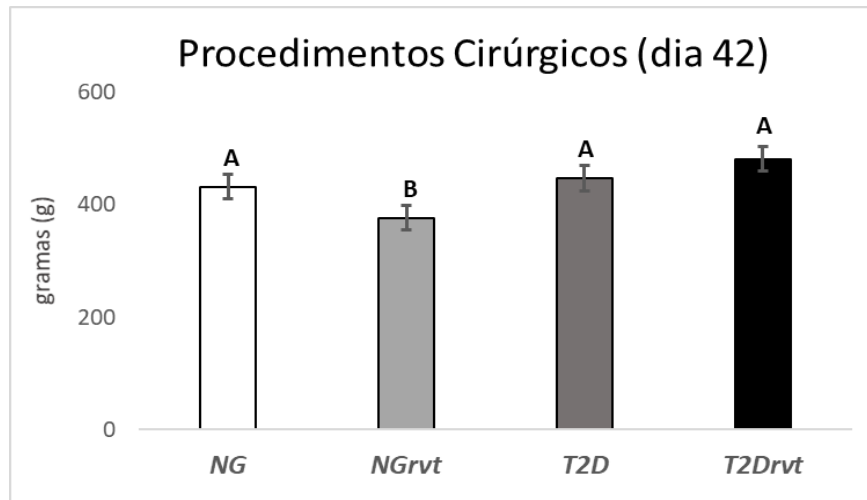


Média de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no início do tratamento medicamentoso com resveratrol. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Procedimentos Cirúrgicos (dia 42): Os animais NGrvt apresentaram valores de peso com diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado aos animais NG, T2D e T2Drvt. (Tabela 3 e Gráfico 5)

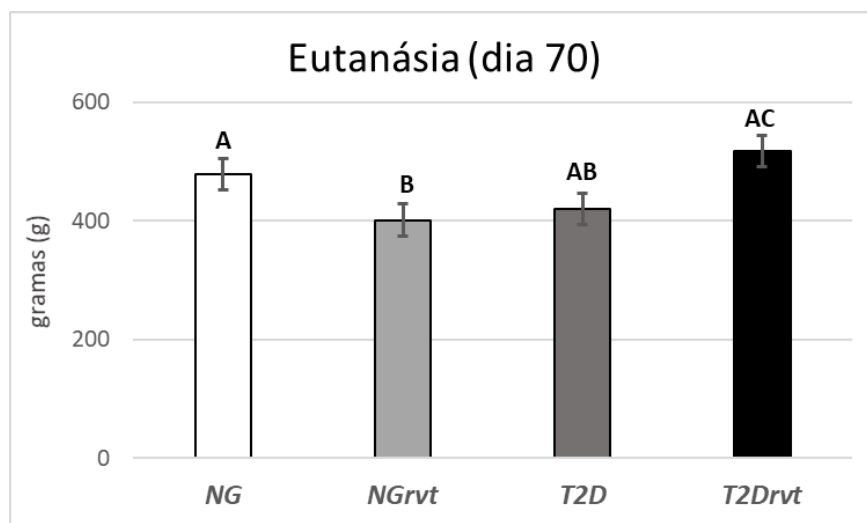
GRÁFICO 5 - Comparação da média de pesos entre os grupos no dia dos procedimentos cirúrgicos



Média de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no dia dos procedimentos cirúrgicos. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Eutanásia (dia 70): Ao final do experimento, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar o peso dos animais NGrvt com NG e T2Drvt, e ao comparar T2D com T2Drvt. (Tabela 3 e Gráfico 6)

GRÁFICO 6 - Comparação da média de pesos entre os grupos no dia da eutanásia

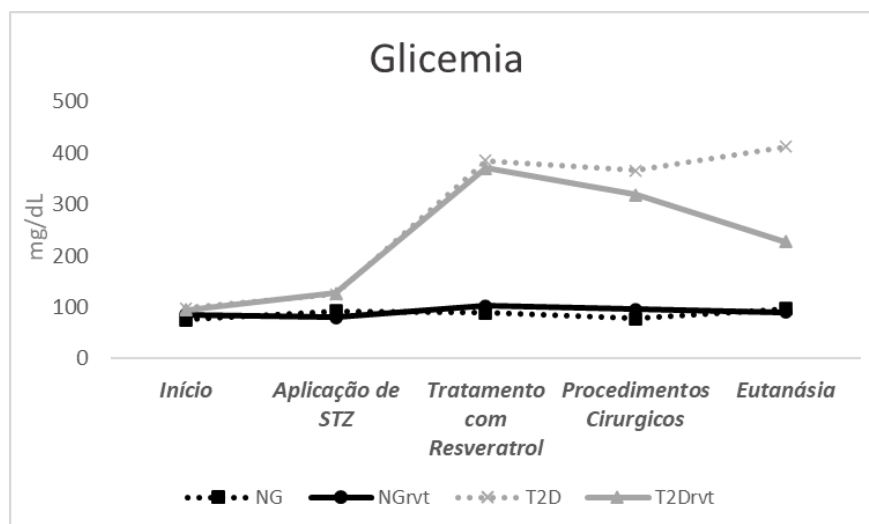


Média de peso dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no dia da eutanásia. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

4.2 Glicemia

Na comparação entre os grupos, observou-se que a dieta de cafeteria eleva os níveis de glicose circulante superiores a 100 mg/dL nas semanas iniciais do experimento, levando a um quadro de resistência insulínica dos animais T2D e T2Drvt. A associação da aplicação de STZ leva a progressão no quadro de diabetes tipo 2, resultando no aumento dos valores de glicose que possibilita o diagnóstico de diabetes nos animais. Além disso, o uso do resveratrol sistêmico se mostrou eficaz em auxiliar no tratamento do diabetes tipo 2, diminuindo os níveis de glicose sanguínea e realizando a manutenção glicêmica em ratos normoglicêmicos. A análise estatística com o teste ANOVA Two-Way mostrou que houve interação entre a condição sistêmica dos animais com os períodos analisados, apresentando diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) entre a glicemia dos animais com o decorrer do experimento. (Tabela 4 e Gráfico 7)

GRÁFICO 7 - Média de glicose sanguínea dos animais ao longo do experimento



Média de glicose sanguínea dos animais por período analisado. Início do experimento: dia 0; Aplicação de STZ: dia 21; Início do tratamento com resveratrol: dia 28; Procedimentos cirúrgicos: dia 42; Eutanásia: dia 70.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

TABELA 4 - Valores médios de glicose sanguínea dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

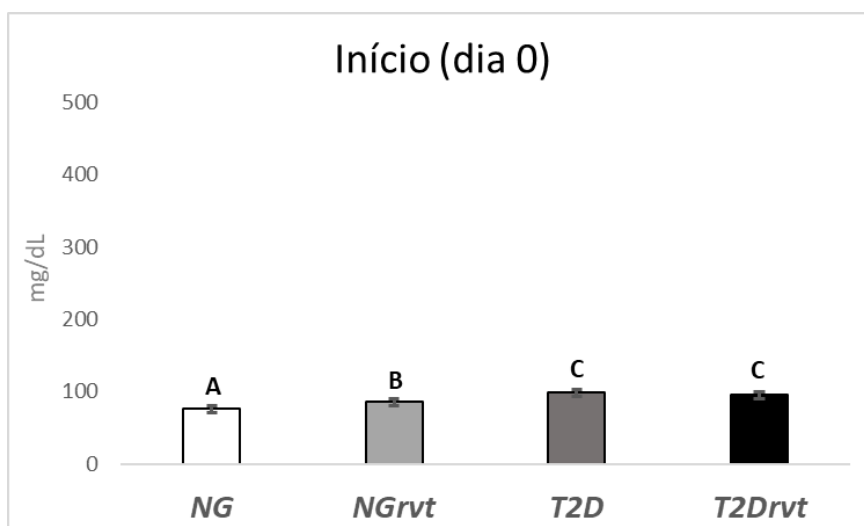
	<i>Início do Experimento</i>	<i>Aplicação de STZ</i>	<i>Início do tratamento com resveratrol</i>	<i>Procedimentos Cirúrgicos</i>	<i>Eutanásia</i>
NG	75,7	92,7	88,5	77,7	97,3
NGrvt	85,5	79,75	102,8	95,75	90,25
T2D	98,3	125,5	384,8	366,6	412,2
T2Drvt	95,25	127,9	370,9	318,8	227,9

Glicemia dos animais NG, NGrvt, T2D e T2Drvt ao longo do experimento. Valores em mg/dL.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Início da Dieta (dia 0): No período inicial do experimento, todos os animais apresentavam-se normoglicêmicos com valores de glicose circulante menores que 100 mg/dL. Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparados. (Tabela 4 e Gráfico 8)

GRÁFICO 8 - Comparação glicêmica dos grupos ao início do experimento

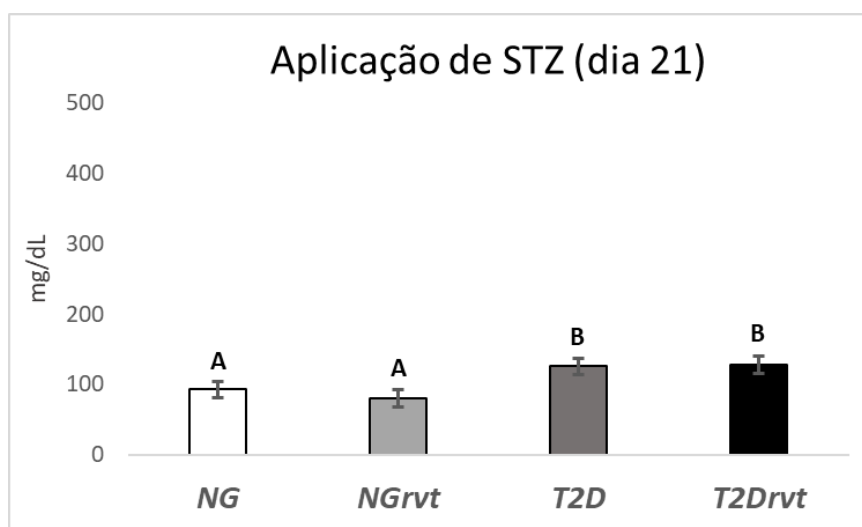


Glicemia dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no início do experimento. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Aplicação de STZ (dia 21): Os animais NG e NGrvt mantiveram as médias de glicose circulante comparado ao período inicial. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na comparação glicêmica de T2D e T2Drvt aos grupos NG e NGrvt. (Tabela 4 e Gráfico 9)

GRÁFICO 9 - Comparação glicêmica dos grupos no dia da aplicação de estreptozotocina

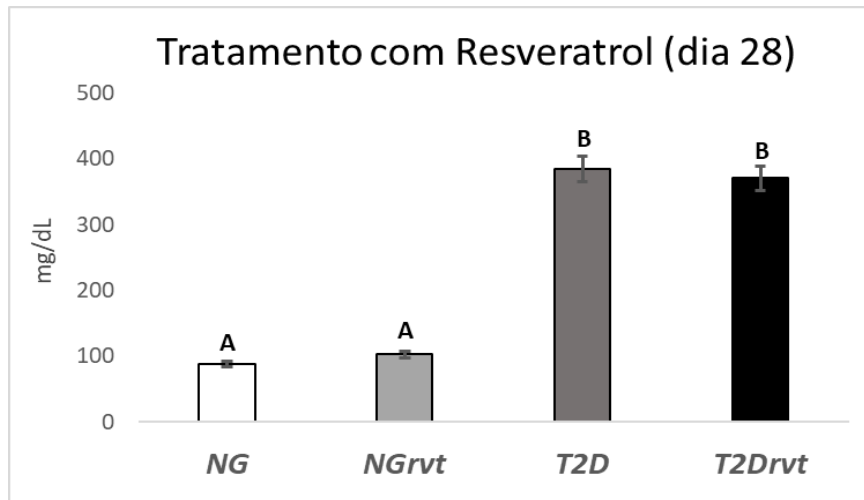


Glicemia dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no dia da indução do diabetes tipo 2. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Confirmação do T2D e Início do tratamento sistêmico (dia 28): Foi possível observar que novamente os animais NG e NGrvt mantiveram o padrão de nível de glicose circulante, sem diferença estatisticamente significativa. Os animais T2D e T2Drvt apresentaram um aumento significativo de seus valores glicêmicos, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) aos grupos NG e NGrvt. (Tabela 4 e Gráfico 10)

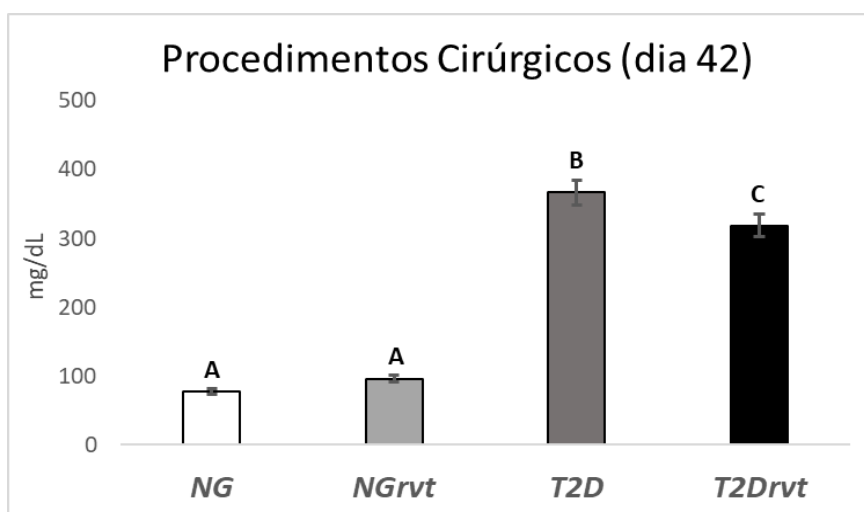
GRÁFICO 10 - Comparação glicêmica dos grupos no início do tratamento com resveratrol



Glicemia dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no início do tratamento com resveratrol. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Procedimentos Cirúrgicos (dia 42): O grupo T2Drvt apresentou diminuição dos níveis de glicose, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) aos grupos T2D, NG e NGrvt. Novamente os animais normoglicêmicos não apresentaram diferença estatística entre seus valores de glicemia. (Tabela 4 e Gráfico 11)

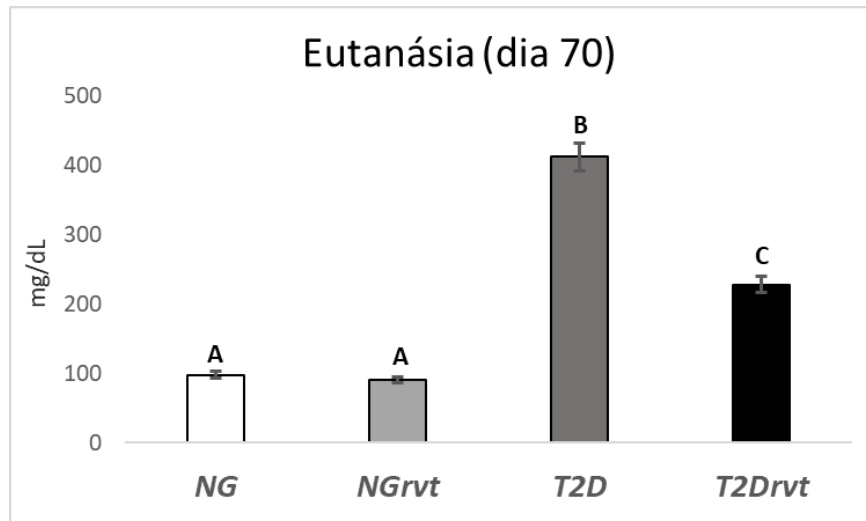
GRÁFICO 11 - Comparação glicêmica dos grupos no dia dos procedimentos cirúrgicos



Glicemia dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no dia dos procedimentos cirúrgicos. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Eutanásia (dia 70): Ao final do experimento, o uso diário de resveratrol continuou diminuindo os padrões de glicemia do grupo tratado com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) aos grupos T2D, NG e NGrvt. Os animais normoglicêmicos não apresentaram aumento dos níveis de glicemia. (Tabela 4 e Gráfico 12)

GRÁFICO 12 - Comparação glicêmica dos grupos no dia da eutanásia



Glicemia dos animais dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt no dia da eutanásia. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

4.3 Análise Biomecânica (Torque de Remoção)

A análise biomecânica mostrou que houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) na interação entre a condição sistêmica com o uso de terapias locais pelo teste ANOVA Two-Way. O uso sistêmico de resveratrol nos grupos NGrvt e T2Drvt não provocou aumento na força de remoção dos implantes ($p > 0,05$). Além disso, a associação entre o uso de resveratrol sistêmico com a aplicação local da aPDT provocou uma melhora na biomecânica óssea dos animais T2Drvt. Os resultados estão apresentados no gráfico 13 e tabela 5.

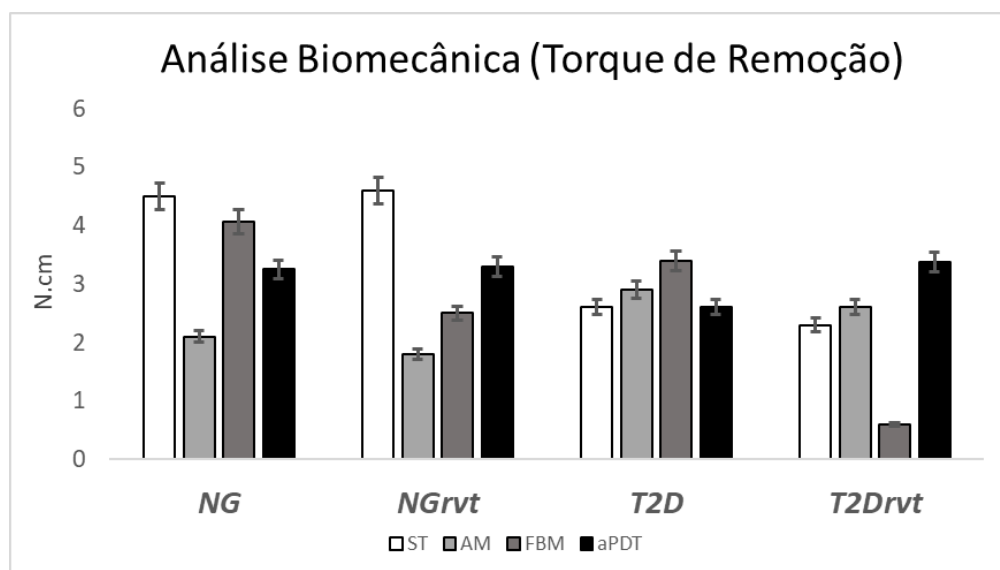
GRÁFICO 13 - Análise biomecânica dos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Gráfico com os valores de contra-torque obtidos nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

TABELA 5 - Valores médios de contra-torque obtidos na análise biomecânica

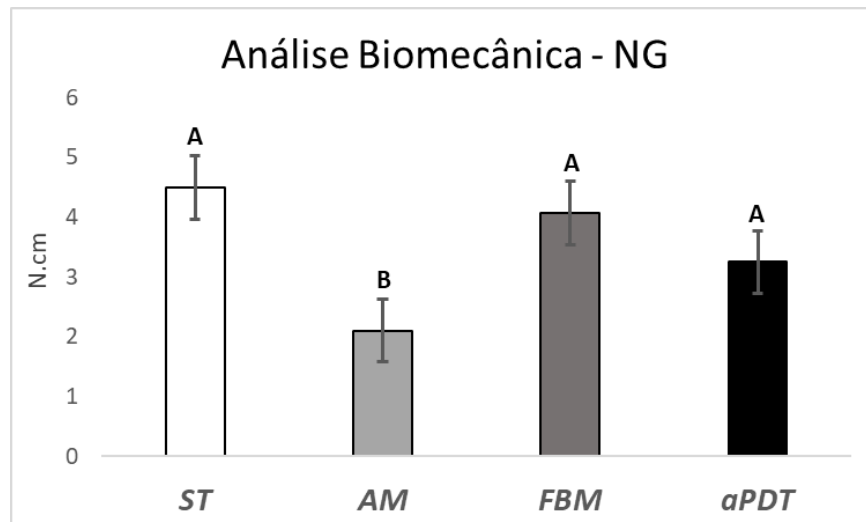
	<i>ST</i>	<i>AM</i>	<i>FBM</i>	<i>aPDT</i>
NG	4,5	2,1	4,07	3,25
NGrvt	4,6	1,8	2,5	3,3
T2D	2,6	2,9	3,4	2,6
T2Drvt	2,3	2,6	0,6	3,37

Valores de torque de remoção obtidos nos grupos NG, NGrvt, T2D, T2Drvt e seus respectivos subgrupos (ST, MB, FBM e aPDT). Valores em N.cm.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Para facilitar o entendimento, apresentaremos os resultados nos grupos relacionados a condição sistêmica e dentro destes, os subgrupos relacionados ao tratamento local.

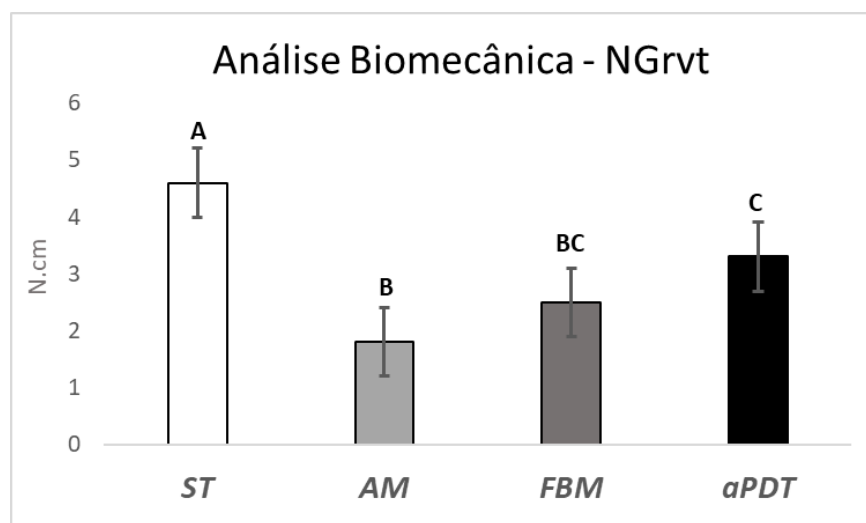
Grupo NG: Os animais normoglicêmicos apresentaram diferença estatisticamente significativa ao comparar AM com ST e FBM ($p > 0,05$). Este fato sugere que a ausência de interferências sistêmicas não necessitaria de auxílio de terapias locais para o reparo periimplantar. (Tabela 5 e Gráfico 14)

GRÁFICO 14 - Valores de torque de remoção obtidos no grupo NG

Comparação entre o uso de terapias locais no grupo NG. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Grupo NGrvt: O uso sistêmico de resveratrol sugere que a ausência de terapias locais apresenta maiores valores de torque de remoção, apresentando diferença estatisticamente significativa entre ST com AM e FBM, e entre AM e aPDT. ($p < 0,05$; Tabela 5 e Gráfico 15)

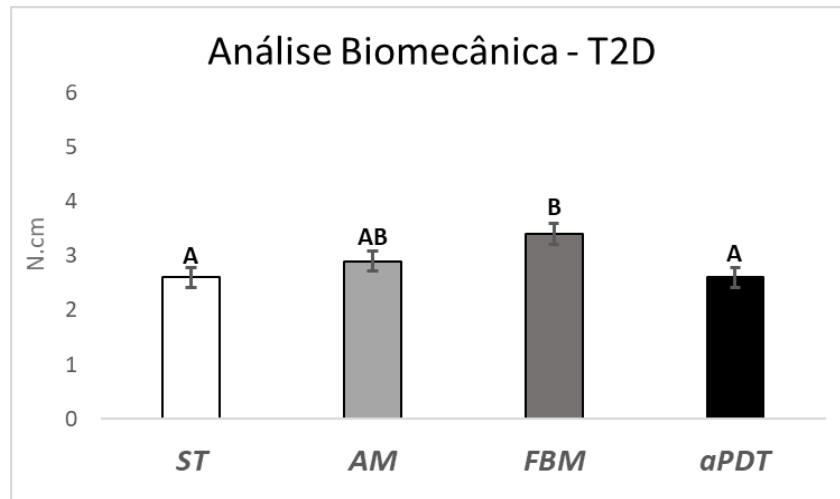
GRÁFICO 15 - Valores de torque de remoção obtidos no grupo NGrvt

Comparação entre o uso de terapias locais no grupo NGrvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Grupo T2D: Para os animais diabéticos sem tratamento a terapia de FBM aumentou os valores de torque de remoção, com diferença estatisticamente significativa com os subgrupos ST e aPDT. ($p < 0,05$; Tabela 5 e Gráfico 16)

GRÁFICO 16 - Valores de torque de remoção obtidos no grupo T2D

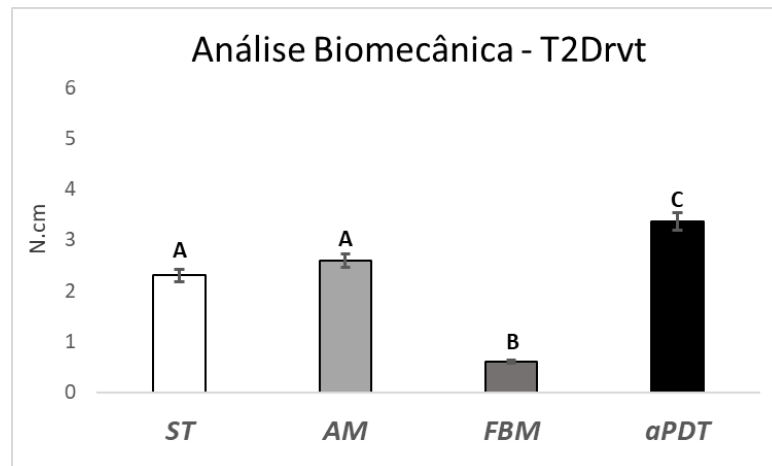


Comparação entre o uso de terapias locais no grupo T2D. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Grupo T2D_{rvt}: A aPDT em associação ao tratamento sistêmico de resveratrol nos ratos diabéticos tipo 2 provocou um aumento nos valores de força de remoção dos implantes, com diferença estatisticamente significativa quando comparada aos subgrupos ST, FBM e AM ($p < 0,05$; Tabela 5 e Gráfico 17).

GRÁFICO 17 - Valores de torque de remoção obtidos no grupo T2Drvt

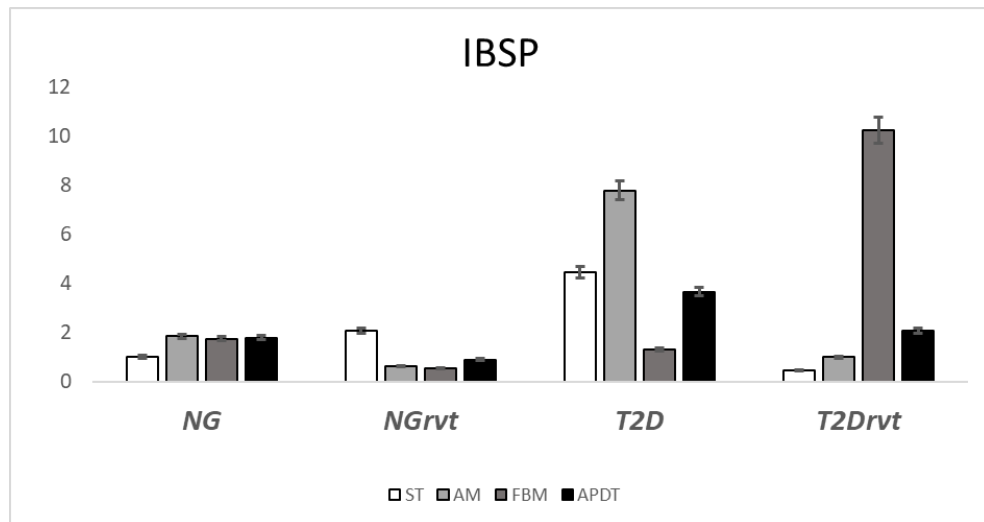


Comparação entre o uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

4.4 PCR em Tempo Real

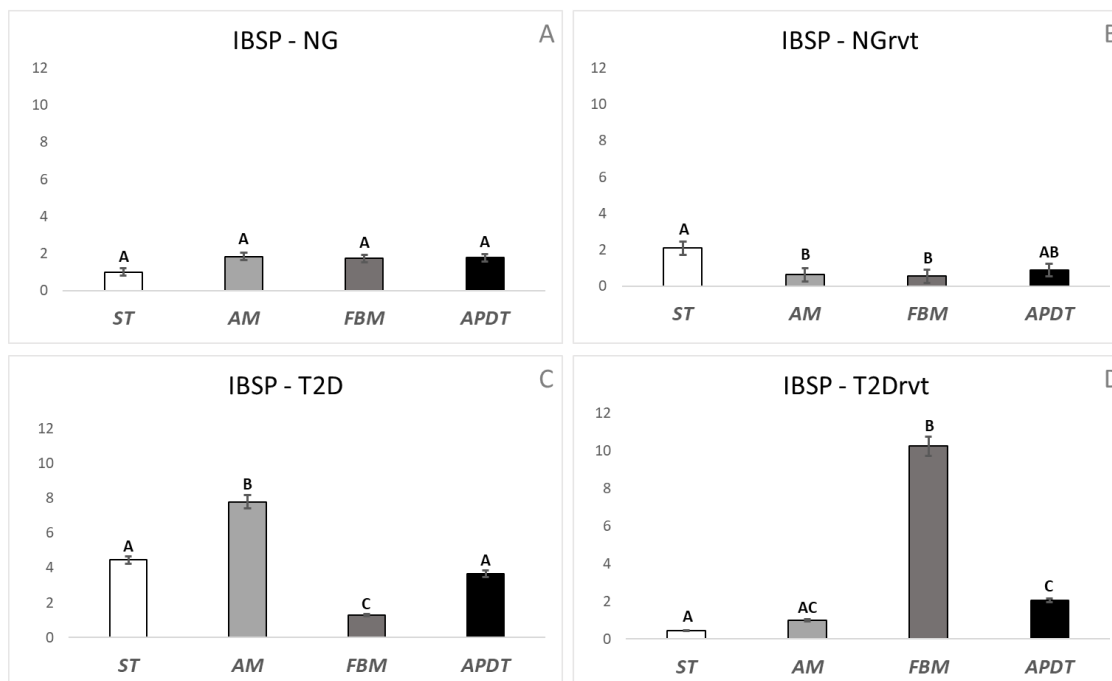
IBSP: O teste estatístico apontou que houve interação entre a condição sistêmica dos animais com a terapia local aplicada na loja cirúrgica ($p < 0,05$) para a expressão do gene IBSP. Todos os grupos apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a expressão do gene. Quanto ao uso de terapias locais, o uso de aPDT não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na expressão da sialoproteína óssea quando comparado à ausência de terapias locais (ST). (Gráfico 18)

GRÁFICO 18 - Expressão gênica de IBSP

Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT) para a expressão gênica da Sialoproteína Óssea aos 28 dias após a instalação de implantes em maxila.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

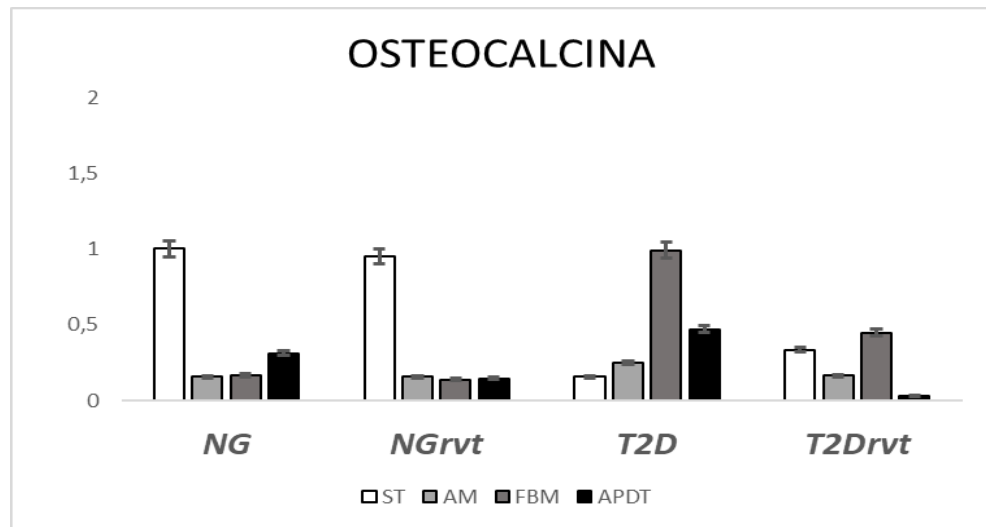
O grupo NG não apresentou diferença estatisticamente significativa na expressão de IBSP entre os subgrupos analisados. Para o grupo NGrvt, a ausência de terapia manteve a expressão da sialoproteína, que foi diminuída significativamente com uso do AM e terapia de FBM ($p < 0,05$). O uso de terapias em T2D e T2Drvt aumentou a expressão de IBSP, com diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos ($p < 0,05$). (Gráficos 18 e 19)

GRÁFICO 19 - Expressão gênica de IBSP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

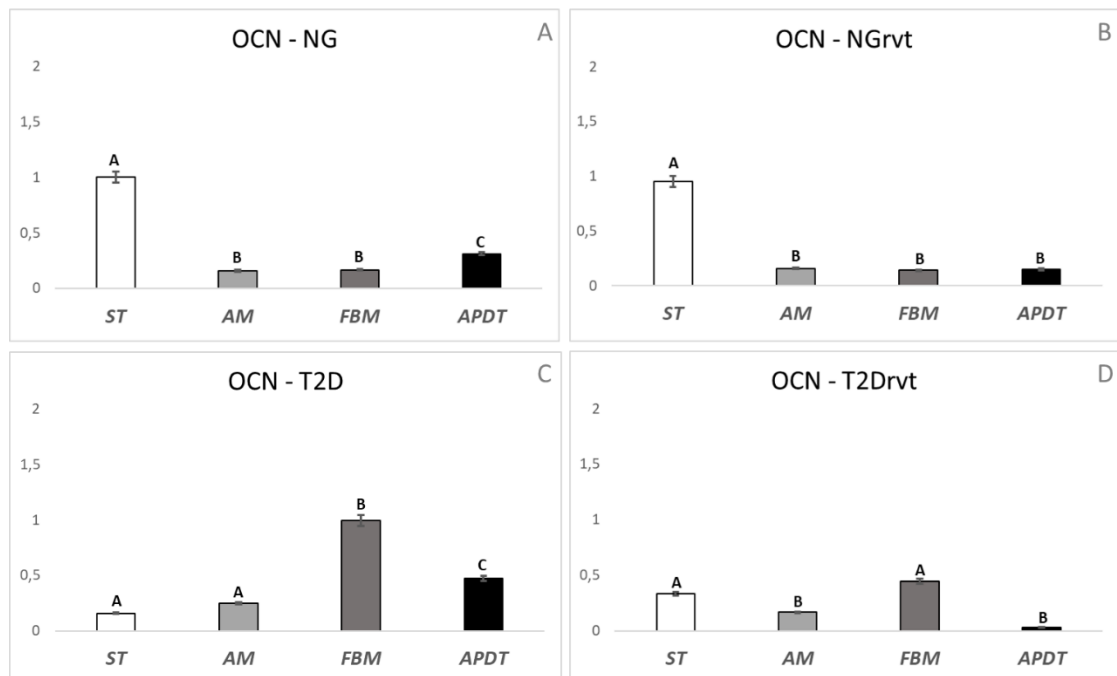
Expressão gênica relativa de Sialoproteína óssea aos 28 dias. A: Comparação do uso de terapias locais no grupo NG; B: Comparação do uso de terapias locais no grupo NGrvt; C: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2D; D: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

OCN: A expressão de osteocalcina apresentou diferença estatisticamente significativa (ANOVA Two-Way, $p < 0,05$) na interação entre todas as condições sistêmicas, assim como todas as terapias locais. Aos 28 dias, a expressão gênica da osteocalcina foi maior nos grupos NG-ST, NGrvt-ST e T2D-FBM (Gráfico 19). Nos grupos NG e NGrvt, os tratamentos locais diminuíram a expressão de osteocalcina com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). Em contrapartida, o grupo T2D aumentou a expressão de OCN com a presença das terapias locais em T2D-FBM e T2D-aPDT, com diferença estatisticamente significativa com o grupo T2D-ST ($p < 0,05$). O resveratrol no grupo T2Drvt-ST aumentou a expressão de OCN, quando comparado ao grupo T2D-ST, entretanto, a presença da aPDT diminuiu sua expressão, com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,05$). (Gráficos 20 e 21)

GRÁFICO 20 - Expressão gênica de OCN nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT) para a expressão gênica da Osteocalcina aos 28 dias após a instalação de implantes em maxila.
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

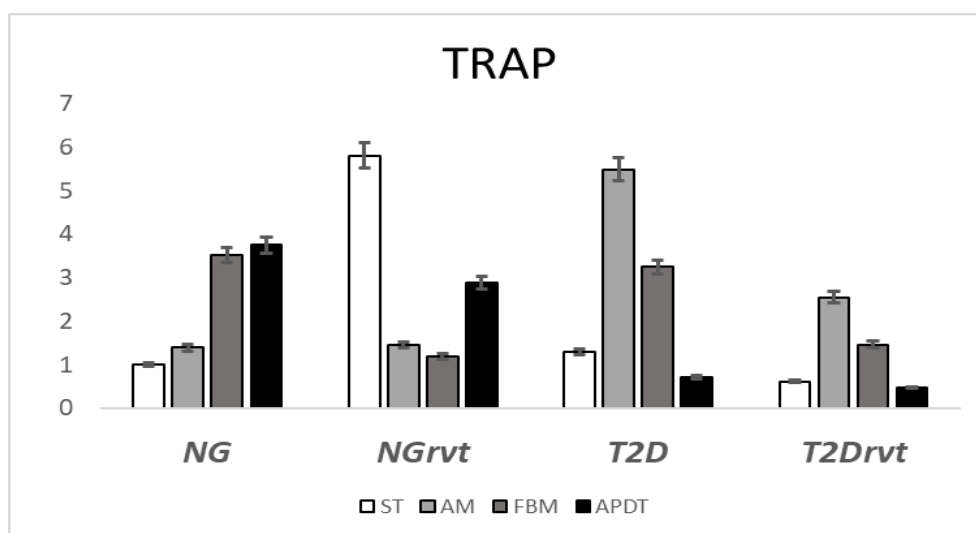
GRÁFICO 21 - Expressão gênica de OCN nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Expressão gênica relativa de Osteocalcina aos 28 dias. A: Comparação do uso de terapias locais no grupo NG; B: Comparação do uso de terapias locais no grupo NGrvt; C: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2D; D: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

TRAP: A expressão de TRAP apresentou diferença estatisticamente significativa (ANOVA Two-Way; $p < 0,05$) na interação entre a condição sistêmica dos animais assim como entre as terapias locais realizadas. O grupo T2Drvt apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) com os demais grupos. Além disso, houve diferença ao comparar AM com ST e aPDT ($p < 0,05$). (Gráfico 22)

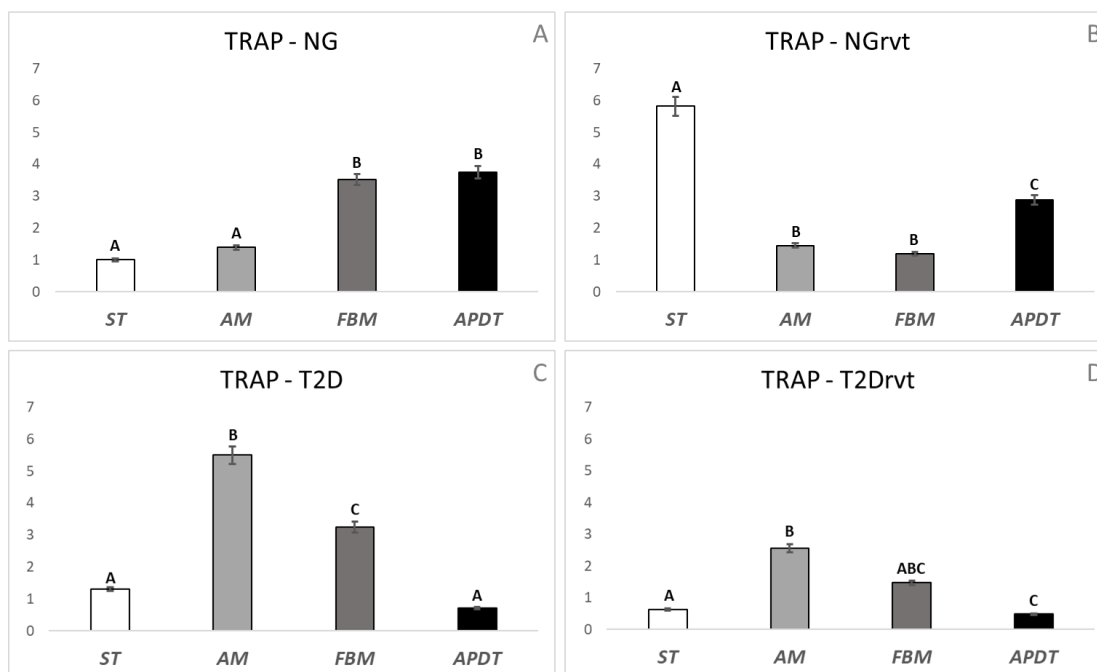
GRÁFICO 22 - Expressão gênica de TRAP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt



Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT) para a expressão gênica da TRAP aos 28 dias após a instalação de implantes em maxila. As diferenças estatísticas estão presentes na tabela 6.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

O grupo NG apresentou um aumento na atividade osteoclástica relacionada a expressão gênica de TRAP nos grupos NG-FBM e NG-aPDT, com diferença estatisticamente significativa ao grupo NG-ST ($p < 0,05$). O grupo NGrvt apresentou diferença estatisticamente significativa na expressão de TRAP na comparação entre os grupos, e o uso local de aPDT, AM e terapia de FBM provocaram uma diminuição da expressão do gene. T2Drvt teve diminuição da expressão de TRAP quando comparado ao T2D sem tratamento. Na análise intergrupo, a presença de TRAP apresentou-se menor em T2D-aPDT e T2Drvt-aPDT com diferença estatisticamente significativa com as demais terapias locais ($p < 0,05$). (Gráficos 22 e 23)

GRÁFICO 23 - Expressão gênica de TRAP nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Expressão gênica relativa de TRAP aos 28 dias. A: Comparação do uso de terapias locais no grupo NG; B: Comparação do uso de terapias locais no grupo NGrvt; C: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2D; D: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

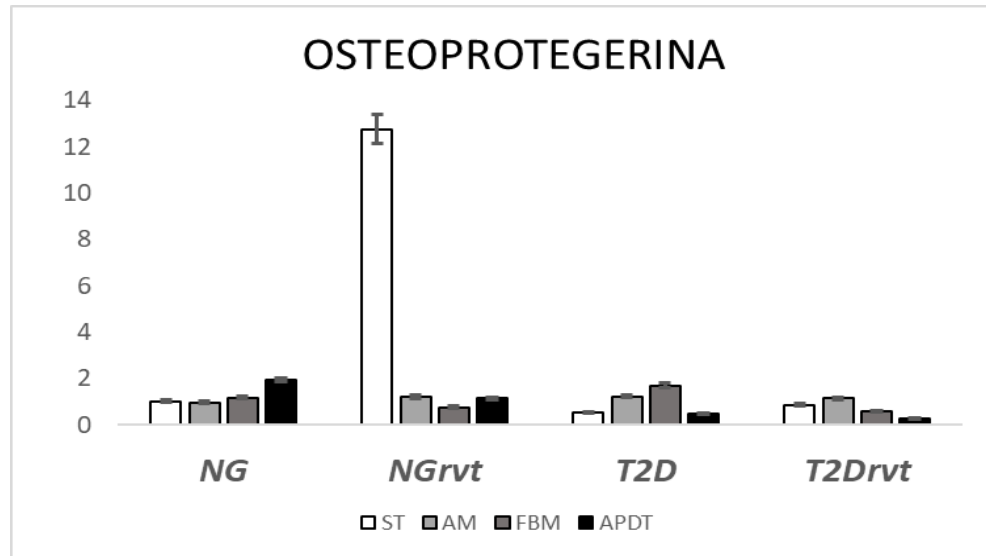
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

OPG: A expressão de osteoprotegerina apresentou diferença estatisticamente significativa (ANOVA Two-Way; $p < 0,05$) na interação entre as condições sistêmica dos animais assim como entre as terapias locais realizadas. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na expressão de OPG na comparação de todas os grupos experimentais. Com relação às terapias locais, houve diferença na comparação de ST com AM, FBM e aPDT ($p < 0,05$). (Gráfico 24)

Aos 28 dias a expressão genica de osteoprotegerina se mostrou semelhante entre os grupos, exceto no grupo NGrvt-ST. O grupo NG-ST não apresentou diferença estatisticamente significativa na expressão de OPG em comparação aos grupos com tratamento local. No grupo NGrvt, a expressão de osteoprotegerina foi aumentada em NGrvt-ST em comparação aos demais grupos, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A expressão de OPG em T2D foi aumentada em T2D-AM e T2D-FBM, com diferença estatística com T2D-ST e T2D-aPDT ($p < 0,05$). O grupo T2Drvt

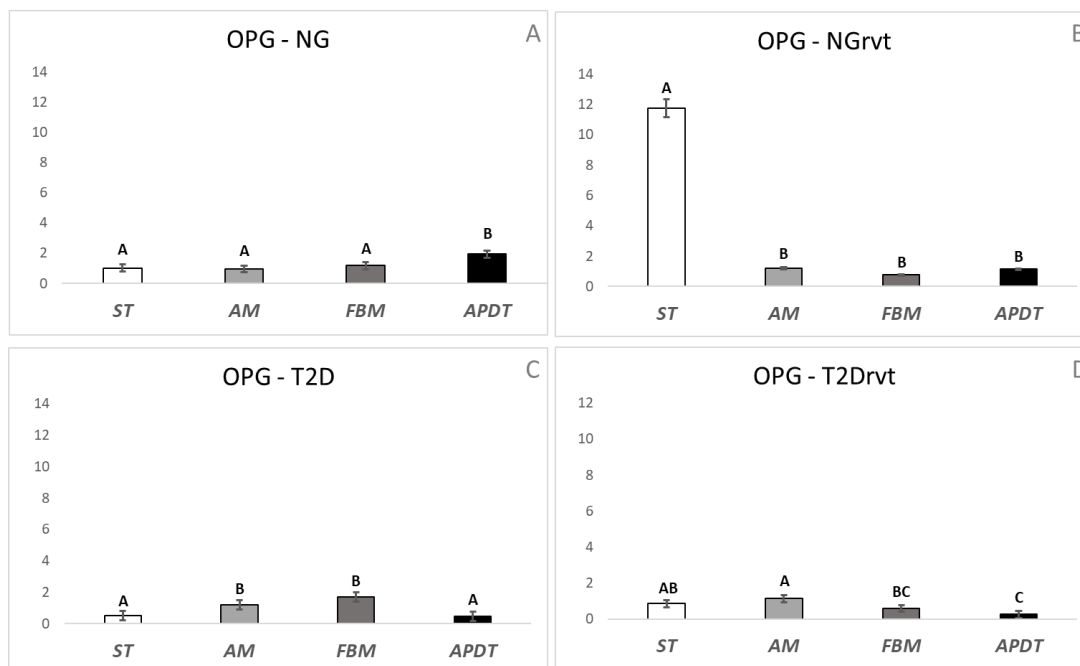
apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0.05$), com menores valores em T2Drvt-aPDT. (Gráficos 24 e 25)

GRÁFICO 24 - Expressão gênica de OPG nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt



Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT) para a expressão gênica relativa de Osteoprotegerina aos 28 dias após a instalação de implantes em maxila.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

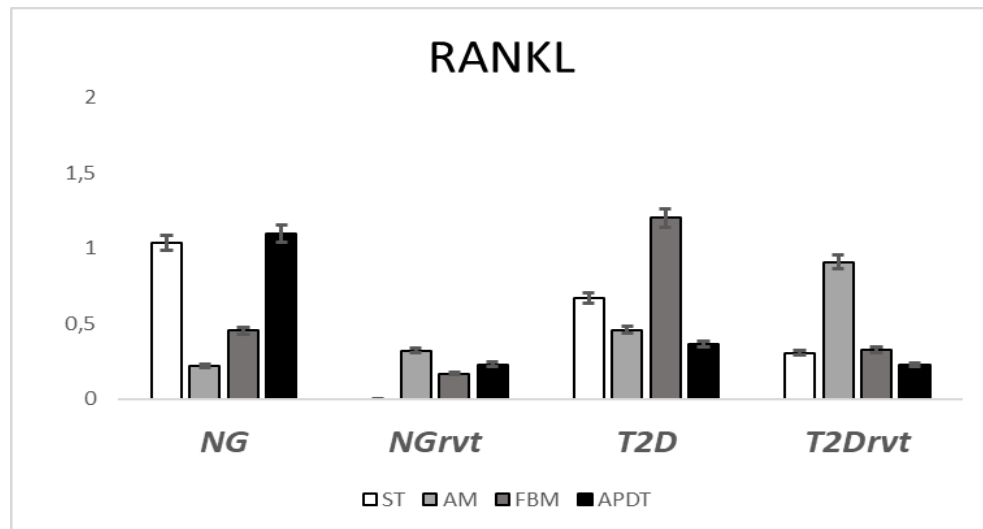
GRÁFICO 25 - Expressão gênica de OPG nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Expressão gênica relativa de osteoprotegerina aos 28 dias. A: Comparação do uso de terapias locais no grupo NG; B: Comparação do uso de terapias locais no grupo NGrvt; C: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2D; D: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

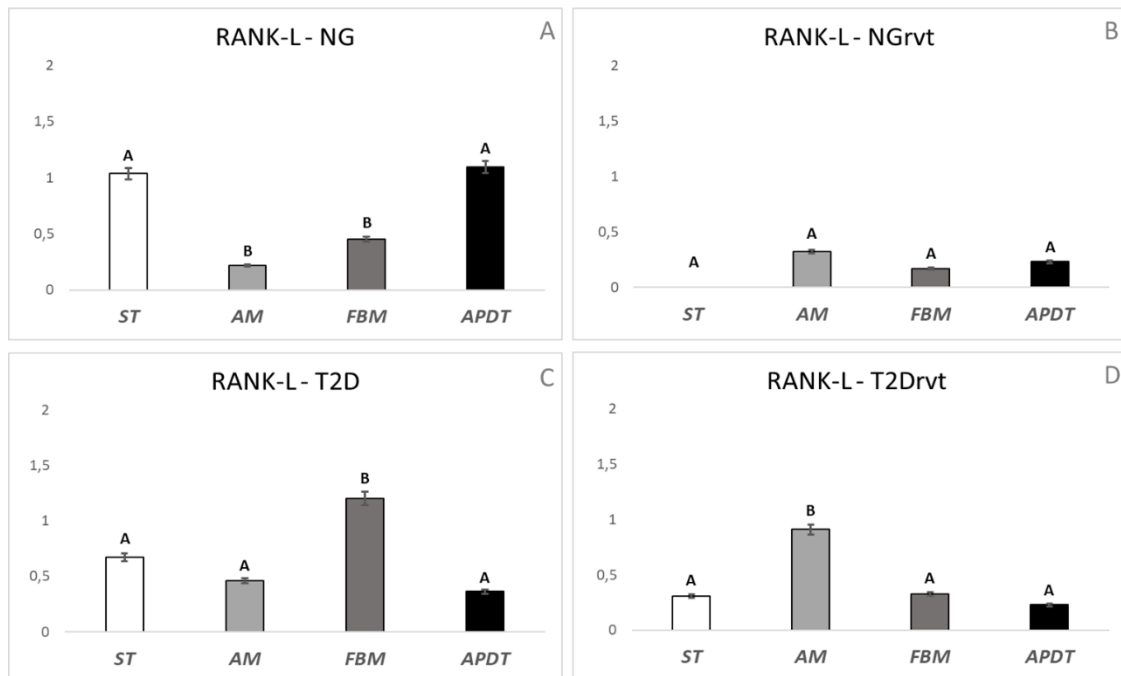
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

RANK-L: A análise estatística de ANOVA Two-Way, mostrou que a expressão de RANK-L possuiu interações ($p < 0,05$) apenas ao comparar as condições sistêmicas dos animais. (Gráfico 26)

A expressão gênica de RANK-ligante se mostrou diminuída nos grupos tratados com resveratrol, especialmente em NGrvt-ST onde não houve expressão da proteína. O grupo NG apresentou diferença estatisticamente significativa ao comparar NG-ST e NG-aPDT com NG-AM e NG-FBM ($p < 0,05$). Em NGrvt-ST não houve expressão de RANK-L, porém não houve diferença estatisticamente significativa na comparação com o uso de terapias locais. A expressão de RANK-L foi aumentada em T2D-FBM com diferença estatisticamente significativa com os demais subgrupos ($p < 0,05$). O tratamento com resveratrol em T2Drvt diminuiu a expressão de RANK-L em T2Drvt-ST, T2Drvt-FBM e T2Drvt-aPDT, com diferença estatisticamente com T2Drvt-AM ($p < 0,05$). (Gráficos 26 e 27)

GRÁFICO 26 - Expressão gênica de RANK-L nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT) para a expressão gênica relativa de RANK-L aos 28 dias após a instalação de implantes em maxila.
 Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

GRÁFICO 27 - Expressão gênica de RANK-L nos grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt

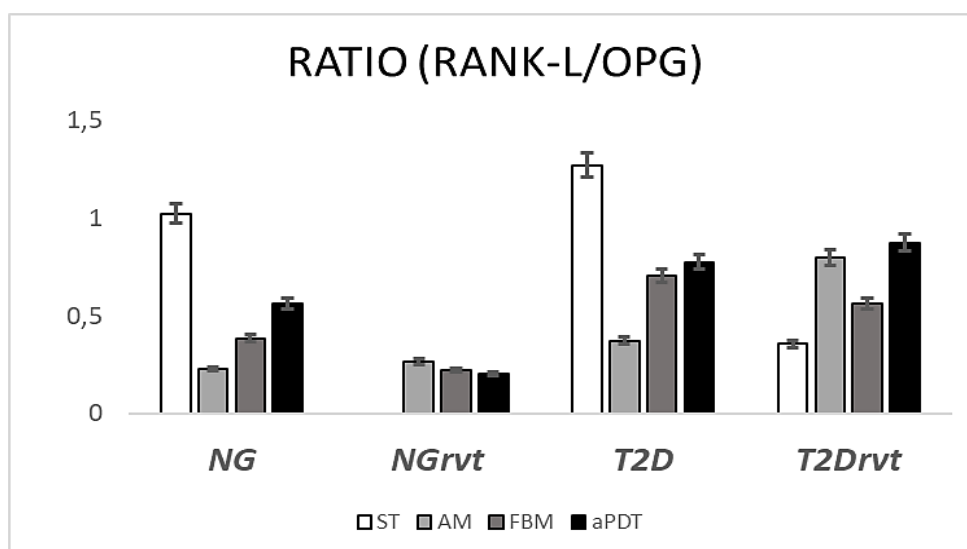
Expressão gênica relativa de RANK-L aos 28 dias. A: Comparação do uso de terapias locais no grupo NG; B: Comparação do uso de terapias locais no grupo NGrvt; C: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2D; D: Comparação do uso de terapias locais no grupo T2Drvt. Letras diferentes correspondem a diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

RANK-L/OPG: A proporção entre OPG e RANK-L expressa a relação de tais proteínas para o processo de reabsorção, que quando em equilíbrio, apresenta valores de expressão gênica relativa próximo a 1,0. O teste estatístico ANOVA Two-Way apontou interações ($p < 0,05$) entre as condições sistêmicas dos animais, exceto ao comparar NG com T2Drvt ($p > 0,05$). Ao comparar o uso de terapias locais, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) ao comparar ST a AM. (Gráfico 28)

Desta forma, é possível observar que o grupo NG-ST apresenta um equilíbrio na ativação do processo de reabsorção, e quando aplicadas terapias locais neste grupo há uma diminuição da ativação do processo reabsortivo. No grupo NGrvt-ST, não houve expressão de RANK-L, o que significa que não houve ativação da via osteoclástica. Em T2D-ST, os animais obtiveram um aumento da expressão relativa de RANK-L em comparação a OPG, indicando um aumento da atividade de reabsorção, porém com o uso de terapias locais a proporção de RANK-L diminuída. O tratamento sistêmico com resveratrol em T2Drvt-ST diminuiu a expressão gênica relativa de RANK-L em comparação a T2D-ST, e as terapias locais utilizadas reestabeleceram o equilíbrio do processo de ativação da atividade reabsortiva.

GRÁFICO 28 – Expressão gênica relativa da proporção entre RANK-L e OPG.



Expressão gênica relativa da proporção entre RANK-L e OPG aos 28 dias. Comparação entre os grupos NG, NGrvt, T2D e T2Drvt e seus subgrupos (ST, AM, FBM e aPDT).

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

Discussão

5 DISCUSSÃO

Estudo¹² anterior de nosso grupo de pesquisa sobre reparo alveolar em ratos T2D comprovou o aumento de proteínas pró-inflamatórias no início do reparo alveolar, que desencadeia uma cascata de eventos comprometedores ao tecido ósseo. Partindo deste ponto, fez-se necessário um estudo para avaliar o reparo periimplantar de animais diabéticos tipo 2 utilizando terapias alternativas que pudessem auxiliar na diminuição do processo inflamatório, desencadeando uma melhora na qualidade e biomecânica óssea periimplantar.

O resveratrol apresenta efeitos benéficos em termos de homeostase de glicose e lipídios e redução do acúmulo de gordura corporal^{33,34}. Sistemicamente, o seu uso diário foi satisfatório para a redução dos níveis glicêmicos em ratos diabéticos tipo 2, mas não substitui os efeitos dos medicamentos hipoglicemiantes assim como apresentado em outros estudos^{6,33}. Para os animais NGrvt, o uso diário do fitoterápico funcionou prevenindo o aumento da glicemia ao longo do experimento.

Após a indução do diabetes, um efeito colateral presente nos animais é a perda de peso e novamente o resveratrol se mostrou um forte aliado para a condição sistêmica. O resveratrol preveniu a perda de peso assim como reestabeleceu as condições clínicas de ratos T2Drvt, fato diretamente relacionado à diminuição da hiperglicemia deste grupo de animais^{33,34}. O inverso aconteceu aos animais NGrvt, onde o uso contínuo do resveratrol provocou uma diminuição do ganho de peso promovendo uma manutenção da massa corporal e adiposa. Outros estudos³⁵⁻³⁸ in vitro e em modelos roedores apontam que o resveratrol pode modular as funções de adipogênese, lipogênese, lipólise, termogênese e oxidação de ácidos graxos, fator que pode ser relacionado ao ocorrido nos animais NGrvt e T2Drvt.

A hiperglicemia e a presença do T2D são fatores que devem ser levados em consideração durante a reabilitação com implantes dentários^{34,39}, devido à alta taxa de falhas no tratamento desses tipos de pacientes^{34,39,40}. Para o sucesso na osseointegração alguns fatores devem ser levados em consideração: a migração de células inflamatórias, a proliferação celular com a criação de uma nova matriz extracelular e finalmente a formação e remodelação desta matriz recém-formada.³⁹

Nos grupos onde as terapias locais não foram utilizadas, observou-se que o T2D influenciou negativamente no reparo ósseo periimplantar quando comparado ao

grupo NG-ST, tendo um impacto na força de remoção dos implantes, corroborando os achados de outros estudos.^{11,30,40,41}

O uso contínuo do resveratrol nos grupos NGrvt-ST e T2Drvt-ST não afetou a biomecânica óssea dos animais em comparação aos animais sem tratamento sistêmico, mesmo estudos apontando seus efeitos positivos no tecido ósseo.^{5,6} Vale ressaltar que não há estudos na literatura, até o presente momento, onde a administração de resveratrol foi avaliada num modelo de instalação de implantes em maxila, considerando ser este um meio em que há exposição a bactérias, sem controle de placa bacteriana ou condição periodontal. A realização de terapias locais nos grupos NG e NGrvt não promoveu efeitos favoráveis na biomecânica óssea dos animais, diminuindo o torque de remoção dos implantes, fato que poderia ser explicado pelo período de avaliação deste trabalho. Em contrapartida, para os animais diabéticos as terapias locais melhoraram a condição da biomecânica óssea dos implantes especialmente em T2D-FBM e T2Drvt-aPDT.

Estes resultados sugerem que o organismo saudável tem condições de reparo ósseo que não dependem de um suporte local para auxiliá-lo, diferente do ocorrido em animais com diabetes tipo 2. Em T2D, o uso de terapias locais auxiliou no reparo periimplantar, confirmando os resultados de outros estudos que utilizaram a aPDT^{23,40} e a terapia de FBM²³⁻²⁷. Contudo, a terapia local sem o auxílio de um tratamento sistêmico não é capaz de reverter o prejuízo nos eventos celulares que ocorrem ao longo do processo periimplantar frente a condição sistêmica avaliada. Neste sentido, a associação da aPDT em animais T2Drvt sugere que o sinergismo entre o tratamento sistêmico com o local é fundamental para melhorar o reparo ósseo de animais diabéticos tipo 2.

A análise molecular de RT-PCR foi realizada com a amostra do tecido ósseo que estava em contato com o implante removido no contra-torque, assim os eventos celulares e biomecânicos apresentados estão diretamente relacionados.³² Desta forma, aos 28 dias o uso das terapias locais no grupo NG promoveu diminuição dos genes relacionados a mineralização (IBSP e OCN) e um aumento dos genes relacionados a atividade osteoclástica e reabsorção óssea (TRAP, OPG e RANK-L), quando comparado aos animais que não receberam nenhum tratamento local, comprovando que os eventos moleculares foram prejudicados, o que teria impactado negativamente no torque de remoção dos implantes.

O tratamento com resveratrol em NGrvt-ST provocou um aumento na expressão de IBSP, OCN e principalmente TRAP, entretanto não houve expressão de RANK-L e uma alta expressão de OPG, fato que sugere uma supressão da via RANK-L/RANK, como consequência diminuindo a atividade osteoclástica e aumentando a resposta de mineralização óssea.

Os animais T2D-ST apresentaram uma expressão dos genes IBSP aumentada e OCN diminuída na ausência de terapias locais, indicando um atraso no processo de reparo ósseo que aos 28 dias deveria estar finalizado. Este fato confirma que o diabetes influencia negativamente nas respostas celulares frente ao reparo ósseo periimplantar aumentando a expressão de genes relacionados a atividade osteoclástica, assim como durante o processo reparacional em alvéolos pos-exodônticos¹². Com o uso da aPDT como terapia local coadjuvante em animais T2D, houve um aumento na expressão de OCN e uma diminuição de TRAP, indicando que as terapias estariam exercendo adequadamente o seu papel auxiliando nos danos causados pela condição sistêmica.

O tratamento com resveratrol em T2Drvt provoca um aumento de IBSP e uma diminuição de TRAP e RANK-L com o uso das terapias locais, o que indicaria uma diminuição da atividade osteoclástica e um aumento de sialoproteína óssea, o que indicaria que mesmo em atraso o reparo ósseo estaria acontecendo de maneira adequada em comparação a T2D. Estudos afirmam que o resveratrol exerce seu efeito osteoprotetor através diferenciação osteoblástica pela via de sinalização SIRT1-NF- κ B.⁴²⁻⁴⁵ O ativador de tal via é o RANK-L⁴³, que promove a diferenciação e ativação de osteoclastos e sua regulação é feita pela OPG (modulada pela expressão de proteínas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-11, e TNF- α). Este fato foi comprovado em NGrvt-ST e T2Drvt-ST que elevaram a expressão de OPG, assim como em T2Drvt associado a terapias locais onde observou-se a redução da expressão de RANK-L.

Estudos na literatura mostraram que a ação anti-infecciosa, anti-inflamatória e reparadora¹⁸⁻²³ da aPDT contribuem para o processo de osseointegração⁴⁰. A aPDT assim como a FMB possui diversos estudos para o tratamento da periimplantite e de doenças periodontais comprovando sua eficácia frente a complicações odontológicas já instaladas¹⁷⁻²⁷. No presente estudo ambas as terapias foram utilizadas em sessão única, previamente a instalação do implante, como uma tentativa de evitar as complicações no reparo ósseo¹² provocadas pelo T2D por promoverem

efeitos fotobiomodulares ou de redução microbiana. O uso da aPDT cria espécies reativas de oxigênio (ROS) após a excitação do oxigênio em seu estado singlete que podem causar danos estruturais e apoptose em células microbianas, fato que tem grande importância quando instalado um processo inflamatório como a periimplantite⁴⁶.

Vale ressaltar, que este é um estudo inicial em nosso grupo de pesquisa e o protocolo profilático do uso da aPDT ou da terapia de FBM no momento da instalação de implantes tem sido pouco explorado na literatura⁴⁰. Variações neste protocolo único, levando a várias sessões de terapia local ou ainda um maior tempo de administração do resveratrol possivelmente teriam desencadeado resultados diferentes. No entanto, destacamos que este foi o primeiro estudo a utilizar estas terapias associadas junto ao desafio da instalação de implantes imediatos em maxila de ratos. Outro aspecto a ser considerado é que os animais eram sistemicamente descompensados, fato que levou à uma grande perda de implantes em T2D-ST, e quando utilizadas as terapias locais/resveratrol a taxa de sucesso pós-operatória foi elevada. Desta forma, as terapias utilizadas neste estudo trouxeram resultados promissores para a prevenção de doenças da cavidade bucal, aumentando a taxa de o sucesso da reabilitação com implantes de titânio. Contudo, novos estudos devem ser realizados, com intuito de desenvolver novos protocolos para tais terapias fotônicas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

O uso sistêmico de resveratrol e a sua associação com a aPDT promoveram uma melhora no reparo periimplantar de ratos diabéticos tipo 2, aumentando a expressão de genes relacionados a mineralização da matriz óssea e diminuindo a expressão de genes relacionados a reabsorção óssea que resultaram em uma melhora da biomecânica óssea. Além disso, os resultados do estudo sugerem que o sinergismo do tratamento fototerápico com as terapias locais no leito receptor dos implantes pode agir como fator preventivo de complicações periimplantares comumente encontradas no tratamento reabilitador de pacientes diabéticos não compensados.

Referências

REFERÊNCIAS

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. 7th ed. Brussels: International Diabetes Federation; 2019.
2. Gomez-Smith M, Karthikeyan S, Jeffers MS, Janik R, Thomason LA, Stefanovic B, Corbett D. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. *Physiol Behav.* 2016;167:382-91. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029
3. Pereira AG, Chiba FY, de Lima Coutinho Mattera MS, Pereira RF, de Cássia Alves Nunes R, Tsosura TVS, Okamoto R, Sumida DH. Effects of fluoride on insulin signaling and bone metabolism in ovariectomized rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2017;39:140-6. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.09.007
4. Carillon J, Romain C, Bardy G, Fouret G, Feillet-Coudray C, Gaillet S, Lacan D, Cristol JP, Rouanet JM. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:254-61. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022
5. Miotto PM, Frendo-Cumbo S, Sacco SM, Wright DC, Ward WE, Holloway GP. Combined high-fat-resveratrol diet and RIP140 knockout mice reveal a novel relationship between elevated bone mitochondrial content and compromised bone microarchitecture, bone mineral mass, and bone strength in the tibia. *Mol Nutr Food Res.* 2016;60(9):1994-2007. doi: 10.1002/mnfr.201500870
6. Bo S, Gambino R, Ponzo V, Cioffi I, Goitre I, Evangelista A, Ciccone G, Cassader M, Procopio M. Effects of resveratrol on bone health in type 2 diabetic patients. A double-blind randomized-controlled trial. *Nutr Diabetes.* 2018;8(1):51. doi: 10.1038/s41387-018-0059-4
7. Caldarelli I, Speranza MC, Bencivenga D, Tramontano A, Borgia A, Pirozzi AV, Perrotta S, Oliva A, Della Ragione F, Borriello A. Resveratrol mimics insulin activity in the adipogenic commitment of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;60:60-72. doi: 10.1016/j.biocel.2014.12.011

8. Meier C, Schwartz AV, Egger A, Lecka-Czernik B. Effects of diabetes drugs on the skeleton. *Bone*. 2016;82:93-100. doi: 10.1016/j.bone.2015.04.026
9. Oliveira JEP, Montenegro Junior RM, Vencio S, organizadores. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo: Clannad; 2017.
10. Paschou SA, Dede AD, Anagnostis PG, Vryonidou A, Morganstein D, Goulis DG. Type 2 diabetes and osteoporosis: a guide to optimal management. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(10):3621-34. doi: 10.1210/jc.2017-00042
11. Serrão CR, Bastos MF, Cruz DF, de Souza Malta F, Vallim PC, Duarte PM. Role of metformin in reversing the negative impact of hyperglycemia on bone healing around implants inserted in type 2 diabetic rats. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2017;32(3):547-54. doi: 10.11607/jomi.5754
12. Pitol-Palin L, de Souza Batista FR, Gomes-Ferreira PHS, Mulinari-Santos G, Ervolino E, Souza FÁ, Matsushita DH, Okamoto R. Different stages of alveolar bone repair process are compromised in the type 2 diabetes condition: an experimental study in rats. *Biology*. 2020;9(12):471. doi: 10.3390/biology9120471
13. Cutler CW, Eke P, Arnold RR, Van Dyke TE. Defective neutrophil function in na insulin-dependent diabetes mellitus patient: a case report. *J Periodontol* 1991;62:394-401.
14. Younis WH, Al-Rawi NH, Mohamed MA, Yaseen NY. Molecular events on tooth socket healing in diabetic rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2013;51(8):932-6. doi: 10.1016/j.bjoms.2013.08.014
15. Schneir M, Bowersox J, Ramamurthy N, Yavelow J, Murray J, Edlin-Folz E, Golub L. Response of rat connective tissues to streptozotocin-diabetes: tissue specific effects on collagen metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1979;583(1):95-102.
16. Longo M, Gouveia Garcia V, Ervolino E, Ferro Alves ML, Duque C, Wainwright M, Theodoro LH. Multiple aPDT sessions on periodontitis in rats treated with chemotherapy: histomorphometrical, immunohistochemical, immunological and microbiological analyses. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;25:92-102. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.11.014

17. Theodoro LH, Rocha GS, Ribeiro Junior VL, Sakakura CE, de Mello Neto JM, Garcia VG, Ervolino E, Marcantonio Junior E. Bone formed after maxillary sinus floor augmentation by bone autografting with hydroxyapatite and low-level laser therapy: a randomized controlled trial with histomorphometrical and immunohistochemical analyses. *Implant Dent*. 2018;27(5):547-54. doi: 10.1097/ID.0000000000000801
18. Garcia VG, Gualberto EC Júnior, Ervolino E, Nagata MJH, de Almeida JM, Theodoro LH. aPDT for periodontitis treatment in ovariectomized rats under systemic nicotine. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2018;22:70-8. doi: 10.1016/j.pdpdt.2018.02.017
19. Theodoro LH, Pires JR, Fernandes LA, Gualberto Júnior EC, Longo M, de Almeida JM, Garcia VG. Effect of antimicrobial photodynamic therapy on periodontally infected tooth sockets in rats. *Lasers Med Sci*. 2015;30(2):677-83. doi: 10.1007/s10103-013-1400-8
20. Batinjan G, Zore Z, Čelebić A, Papić M, Gabrić Pandurić D, Filipović Zore I. Thermographic monitoring of wound healing and oral health-related quality of life in patients treated with laser (aPDT) after impacted mandibular third molar removal. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014;43(12):1503-8. doi: 10.1016/j.ijom.2014.09.003
21. Batinjan G, Filipović Zore I, Rupić I, Bago Jurič I, Zore Z, Gabrić Pandurić D. Assessing health-related quality of life with Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) and Low Level Laser Therapy (LLLT) after third molar removal. *J Lasers Med Sci*. 2013;4(3):120-6.
22. Neugebauer J, Jozsa M, Kübler A. Antimicrobial photodynamic therapy for prevention of alveolar osteitis and post-extraction pain. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2004;8(6):350-5.
23. Ervolino E, Statkiewicz C, Toro LF, de Mello-Neto JM, Cavazana TP, Issa JPM, Dornelles RCM, de Almeida JM, Nagata MJH, Okamoto R, Casatti CA, Garcia VG, Theodoro LH. Antimicrobial photodynamic therapy improves the alveolar repair process and prevents the occurrence of osteonecrosis of the jaws after tooth extraction in senile rats treated with zoledronate. *Bone*. 2018;120:101-13. doi: 10.1016/j.bone.2018.10.014

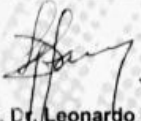
24. Theodoro LH, Longo M, Novaes VCN, Miessi DMJ, Ferro-Alves ML, Ervolino E, de Almeida JM, Garcia VG. Low-level laser and antimicrobial photodynamic therapy on experimental periodontitis in rats submitted to chemotherapy by 5-fluorouracil. *Support Care Cancer*. 2017;25(10):3261-71. doi: 10.1007/s00520-017-3738-0
25. de Almeida JM, de Moraes RO, Gusman DJ, Faleiros PL, Nagata MJ, Garcia VG, Theodoro LH, Bosco AF. Influence of low-level laser therapy on the healing process of autogenous bone block grafts in the jaws of systemically nicotine-modified rats: A histomorphometric study. *Arch Oral Biol*. 2017;75:21-30. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.12.003
26. Gualberto EC Jr, Theodoro LH, Longo M, Novaes VC, Nagata MJ, Ervolino E, Garcia VG. Antimicrobial photodynamic therapy minimizes the deleterious effect of nicotine in female rats with induced periodontitis. *Lasers Med Sci*. 2016;31(1):83-94. doi: 10.1007/s10103-015-1820-8
27. de Almeida JM, Theodoro LH, Bosco AF, Nagata MJ, Bonfante S, Garcia VG. Treatment of experimental periodontal disease by photodynamic therapy in rats with diabetes. *J Periodontol*. 2008;79(11):2156-65. doi: 10.1902/jop.2008.080103
28. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):94-9. doi: 10.4103/0976-500X.72351
29. Frendo-Cumbo S, MacPherson RE, Wright DC. Beneficial effects of combined resveratrol and metformin therapy in treating diet-induced insulin resistance. *Physiol Rep*. 2016;4(15):e12877. doi: 10.14814/phy2.12877
30. Boldrini C, de Almeida JM, Fernandes LA, Ribeiro FS, Garcia VG, Theodoro LH, Pontes AE. Biomechanical effect of one session of low-level laser on the bone-titanium implant interface. *Lasers Med Sci*. 2013;28(1):349-52. doi: 10.1007/s10103-012-1167-3
31. Mulinari-Santos G, de Souza Batista FR, Kirchweiger F, Tangl S, Gruber R, Okamoto R. Losartan reverses impaired osseointegration in spontaneously hypertensive rats. *Clin Oral Implants Res*. 2018;29(11):1126-34. doi: 10.1111/clr.13376

32. Hassumi JS, Mulinari-Santos G, Fabris ALDS, Jacob RGM, Gonçalves A, Rossi AC, Freire AR, Faverani LP, Okamoto R. Alveolar bone healing in rats: micro-CT, immunohistochemical and molecular analysis. *J Appl Oral Sci.* 2018;26:e20170326. doi: 10.1590/1678-7757-2017-0326
33. Bo S, Togliatto G, Gambino R, Ponzo V, Lombardo G, Rosato R, Cassader M, Brizzi MF. Impact of sirtuin-1 expression on H3K56 acetylation and oxidative stress: a double-blind randomized controlled trial with resveratrol supplementation. *Acta Diabetol.* 2018;55(4):331-40. doi: 10.1007/s00592-017-1097-4
34. Shahen VA, Gerbaix M, Koeppenkastrup S, Lim SF, McFarlane KE, Nguyen ANL, Peng XY, Weiss NB, Brennan-Speranza TC. Multifactorial effects of hyperglycaemia, hyperinsulinemia and inflammation on bone remodelling in type 2 diabetes mellitus. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020;55:109-18. doi: 10.1016/j.cytogfr.2020.04.001
35. Springer M, Moco S. Resveratrol and its human metabolites-effects on metabolic health and obesity. *Nutrients.* 2019;11(1):143. doi: 10.3390/nu11010143
36. Aguirre L, Fernández-Quintela A, Arias N, Portillo MP. Resveratrol: anti-obesity mechanisms of action. *Molecules.* 2014;19(11):18632-55. doi: 10.3390/molecules191118632
37. Pannu N, Bhatnagar A. Resveratrol: from enhanced biosynthesis and bioavailability to multitargeting chronic diseases. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:2237-51. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.075
38. Milton-Laskibar I, Gómez-Zorita S, Aguirre L, Fernández-Quintela A, González M, Portillo MP. Resveratrol-induced effects on body fat differ depending on feeding conditions. *Molecules.* 2017;22(12):2091. doi: 10.3390/molecules22122091
39. de Oliveira PGFP, Bonfante EA, Bergamo ETP, de Souza SLS, Riella L, Torroni A, Benalcazar Jalkh EB, Witek L, Lopez CD, Zambuzzi WF, Coelho PG. Obesity/metabolic syndrome and diabetes mellitus on peri-implantitis. *Trends Endocrinol Metab.* 2020;31(8):596-610. doi: 10.1016/j.tem.2020.05.005
40. King S, Klineberg I, Levinger I, Brennan-Speranza TC. The effect of hyperglycaemia on osseointegration: a review of animal models of diabetes mellitus and titanium implant placement. *Arch Osteoporos.* 2016;11(1):29. doi: 10.1007/s11657-016-0284-1

41. Novaes AB Jr, Ramos UD, Scombatti de Souza SL, Muglia VA, Gonçalves de Almeida AL, de Moraes Rego Mandetta C. The effect of antimicrobial photodynamic therapy in the osseointegration of immediately placed implants in sites with ligature-induced periodontitis in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2020;40(6):917-23. doi: 10.11607/prd.4507
42. Feng J, Liu S, Ma S, Zhao J, Zhang W, Qi W, Cao P, Wang Z, Lei W. Protective effects of resveratrol on postmenopausal osteoporosis: regulation of SIRT1-NF- κ B signaling pathway. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014;46(12):1024-33. doi: 10.1093/abbs/gmu103
43. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5. doi: 10.1210/endo.142.12.8536
44. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*. 2000;21(10):495-502. doi: 10.1016/s0167-5699(00)01718-7
45. Khera A, Kanta P, Kalra J, Dumir D, Thungapathra M. Resveratrol restores the level of key inflammatory cytokines and RANKL/OPG ratio in the femur of rat osteoporosis model. *J Women Aging*. 2019;31(6):540-52. doi: 10.1080/08952841.2018.1522126
46. Garcia, Valdir Golveia. Lasers na odontologia: uma visão clínica baseada em evidências científicas / Valdir Gouveia Garcia, Letícia Helena Theodoro. São Paulo: Santos Publicações, 2021.

ANEXOS

ANEXO A - Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FOA UNESP (nº 00153-2019)

	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 Projeto de Pesquisa intitulado "Reparo perimplantar em ratos diabéticos tipo 2, tratados pela combinação da terapia fotodinâmica antimicrobiana e compostos polifenóis. Caracterização biomecânica, histométrica, microtomográfica e molecular", Processo FOA nº 00153-2019, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 15 de Fevereiro de 2019.		
VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 31 de Março de 2021.		
DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Abril de 2021.		
CERTIFICATE		
We certify that the study entitled "Perimplantar repair in rats type 2 diabetics treated with the combination of antimicrobial photodynamic therapy and polyphenol compounds. Biochemical, histometric, microtomographic and molecular characterization", Protocol FOA nº 00153-2019, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on February 15, 2019.		
VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: March 31, 2021.		
DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: April 30, 2021.		
		
Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani Coordenador da CEUA CEUA Coordinator		
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Odontologia de Araçatuba Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br		