



**UNIVERSIDADE CHRISTUS**

**CURSO DE ODONTOLOGIA**

**NAYRA LORENA DANTAS FERREIRA**

**INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO CICATRICIAL DO  
SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS INDUZIDAS A  
DIABETES MELLITUS**

**FORTALEZA**

**2026**

NAYRA LORENA DANTAS FERREIRA

INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO CICATRICIAL DO SÍTIO  
DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS INDUZIDAS A DIABETES  
MELLITUS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado ao curso de Odontologia da  
Universidade Christus, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dayrine Silveira  
de Paula.

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo  
Goberlânio de Barros Silva.

FORTALEZA  
2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Centro Universitário Christus - Unichristus  
Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do  
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F383i Ferreira, Nayra Lorena Dantas.  
INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO  
CICATRICIAL DO SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO  
GENGIVAL LIVRE EM RATAS INDUZIDAS A DIABETES  
MELLITUS / Nayra Lorena Dantas Ferreira. - 2026.  
37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro  
Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia,  
Fortaleza, 2026.  
Orientação: Profa. Dra. Dayrine Silveira de Paula.  
Coorientação: Profa. Dra. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Terapia com luz de baixa intensidade. 2. Cicatrização. 3.  
Diabetes mellitus. I. Título.

CDD 617.632

NAYRA LORENA DANTAS FERREIRA

INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO CICATRICIAL DO SÍTIO  
DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS INDUZIDAS A DIABETES  
MELLITUS

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)  
apresentado ao curso de Odontologia do  
Universidade Christus, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
bacharel em Odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dayrine Silveira  
de Paula.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Dayrine Silveira de Paula  
(Orientador)  
Universidade Christus

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva  
Universidade Christus

---

Profa. Ms. Joyce Ohana de Lima Martins  
Universidade Christus

Dedico este trabalho a Deus, pelas bênçãos, coragem e sabedoria concedidas ao longo dessa caminhada. Aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado e foram os meus maiores incentivadores.

## RESUMO

A técnica cirúrgica de enxerto gengival livre é uma das técnicas padrão ouro para o recobrimento radicular em pacientes com recessão gengival. Pacientes com diabetes apresentam alterações que prejudicam o processo de cicatrização. Este estudo tem o objetivo de avaliar a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus. Trata-se de um estudo experimental laboratorial quantitativo, onde foram realizadas diversas análises. Um total de 144 ratas Wistar com 3 a 5 semanas de vida, pesando  $\pm 200$  g, foram mantidas em gaiolas e divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: Grupo Salina, Grupo Laser, Grupo Diabetes (DM) e Grupo DM + Laser. Os grupos experimentais foram distribuídos por dias de eutanásia: 3, 7, 14 e 28. A diabetes foi induzida por injeção via intraperitoneal de aloxana (60 mg / kg) diluída em soro fisiológico. A remoção do tecido gengival no palato duro foi realizada em uma dimensão de 10X4mm até a profundidade do periósteo. Os animais que receberam laser foram submetidos ao protocolo de irradiação com laser vermelho (630nm) da DCM therapy XT ® com dose de 0,3J. A eutanásia foi feita por sobredose anestésica. O sangue dos animais foi coletado e as amostras colhidas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas, e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina. Todas as lâminas microscópicas foram analisadas e uma área circunferencial representativa cada amostra foi demarcada para a técnica Tissue Micro Array. Os resultados foram expressos como os valores médios  $\pm$  SE (erro padrão) e submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. No dia 28 os grupos que receberam laser tiveram um aumento significativo na sua massa ( $p < 0,001$ ). No dia 3 o grupo laser teve redução na contagem de polimorfonucleares, comparado ao grupo salina e o grupo DM + laser apresentou redução quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). No dia 3 houve um aumento de fibroblastos nos grupos que receberam laser, quando comparado aos demais grupos ( $p < 0,001$ ). No dia 3 houve redução de TNF- $\alpha$  nos grupos que receberam laser ( $p = 0,004$ ). Na análise da IL-1 $\beta$ , no dia 7 os grupos laser, DM e DM + laser apresentaram valores menores que o grupo salina ( $p = 0,001$ ). O uso da fotobiomodulação foi eficaz no processo cicatricial, em todos os animais submetidos a fotobiomodulação, tendo resultados benéficos, como ganho de peso, redução de células inflamatórias, aumento de fibroblastos e redução de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

**Palavras-chave:** terapia com luz de baixa intensidade; cicatrização; diabetes mellitus.

## ABSTRACT

The free gingival graft surgical technique is one of the gold standard techniques for root coverage in patients with gingival recession. Patients with diabetes present alterations that impair the healing process. This study aims to evaluate the influence of photobiomodulation on the healing process of the donor site for free gingival grafts in rats induced to diabetes mellitus. This is a quantitative experimental laboratory study, where several analyses were performed. A total of 144 Wistar rats, 3 to 5 weeks old, weighing  $\pm 200$  g, were kept in cages and randomly divided into four experimental groups: Saline Group, Laser Group, Diabetes (DM) Group, and DM + Laser Group. The experimental groups were distributed by euthanasia days: 3, 7, 14, and 28. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of alloxan (60 mg/kg) diluted in physiological saline. Gingival tissue removal on the hard palate was performed in a 10x4mm area down to the periosteal depth. Animals that received laser treatment underwent irradiation with a red laser (630nm) from DCM therapy XT® at a dose of 0.3J. Euthanasia was performed by anesthetic overdose. Blood was collected from the animals, and the collected samples were fixed in 10% formalin for 24 hours and subsequently stained with hematoxylin and eosin. All microscopic slides were analyzed, and a representative circumferential area from each sample was demarcated for the Tissue Micro Array technique. Results were expressed as mean values  $\pm$  SE (standard error) and subjected to the Shapiro-Wilk normality test. On day 28, the groups that received laser treatment showed a significant increase in their mass ( $p < 0.001$ ). On day 3, the laser group showed a reduction in polymorphonuclear cell count compared to the saline group, and the DM + laser group showed a reduction when compared to the other groups ( $p < 0.001$ ). On day 3, there was an increase in fibroblasts in the groups that received laser, when compared to the other groups ( $p < 0.001$ ). On day 3, there was a reduction in TNF- $\alpha$  in the groups that received laser ( $p = 0.004$ ). In the IL-1 $\beta$  analysis, on day 7, the laser, DM, and DM + laser groups showed lower values than the saline group ( $p = 0.001$ ). The use of photobiomodulation was effective in the healing process, even in animals with diabetes, with beneficial results such as weight gain, reduction of inflammatory cells, increase in fibroblasts, and reduction of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ .

**Keywords:** low-level light therapy; wound healing; diabetes mellitus.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	16
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>3.1 Recessão gengival</b> .....	17
<b>3.2 Enxerto gengival livre</b> .....	17
<b>3.3 Diabetes mellitus</b> .....	18
<b>3.4 Laser de baixa potência</b> .....	19
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
<b>4.1 Animais e desenho de estudo</b> .....	20
<b>4.2 Cálculo amostral</b> .....	20
<b>4.3 Grupos experimentais</b> .....	20
<b>4.4 Análise do peso corporal</b> .....	21
<b>4.5 Técnica de indução da Diabetes Mellitus</b> .....	21
<b>4.6 Técnica cirúrgica do sítio doador</b> .....	21
<b>4.7 Protocolo de laserterapia</b> .....	21
<b>4.8 Eutanásia</b> .....	22
<b>4.9 Análise Sanguínea</b> .....	22
<b>4.10 Confeção de lâminas e análise histomorfométrica</b> .....	22
<b>4.11 Técnica de micro array de tecidos e ensaio imuno-histoquímico</b> .....	23
<b>4.12 Análise Estatística</b> .....	23
<b>5 RESULTADOS</b> .....	25
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	38
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
<b>ANEXOS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A recessão gengival (RG) está associada a exposição da raiz dentária, ocasionada pelo deslocamento em direção apical da margem gengival em relação a junção cimento-esmalte. Pode ser encontrada tanto em pacientes mais jovens ou que estão na meia idade, tendo uma prevalência de até 70% em indivíduos com idade superior aos 50 anos. Dentre as opções para a correção das recessões gengivais, a cirurgia de enxerto gengival livre tem sido popularmente utilizado. As indicações para realização desse procedimento vão desde a melhoria estética até a redução da hipersensibilidade (Carcuac, Trullenque-Eriksson, Derks, 2023).

Na técnica do enxerto gengival livre, remove-se uma porção de tecido queratinizado da região doadora, que comumente é o palato duro. Esse tecido é preparado e acoplado por meio de suturas na região receptora, que é a área da recessão gengival. Algumas características são bastante mencionadas tanto no trans, como no pós-operatório pelos pacientes, dentre elas podemos citar sangramento excessivo, dor e desconforto. Além disso, a cicatrização da área doadora ocorre por segunda intenção, o que torna o processo mais lento e dependente de processos biológicos e celulares (Spin, 2018).

Por sua vez, a diabetes mellitus (DM) é caracterizada por uma síndrome metabólica multifatorial em que promove a hiperglicemia, pois a insulina presente no corpo é incapaz de fazer a quebra da glicose no sangue, promovendo um colapso no funcionamento do organismo. Uma vez que, as condições imunológicas e bioquímicas apresentam-se alteradas, a DM pode ser subdividida em tipo I e tipo II (Barbosa, 2013). Em cavidade oral, o diabetes é um fator de risco conhecido para doença periodontal exacerbada e cicatrização de feridas se torna retardada (Ko, Sculean, Graves, 2021).

A cicatrização de feridas é processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular com o objetivo de reparar o tecido. Por sua vez, o tratamento de feridas busca o fechamento rápido da lesão de forma a se obter cicatriz funcional e esteticamente satisfatória. Com o rompimento tecidual nos animais vertebrados, logo se inicia o processo de reparo, que compreende uma sequência de eventos moleculares objetivando a restauração do tecido lesado (Mendonça, R. J *et al.*, 2009)

A terapia com laser de baixa intensidade (LLLT, na sigla em inglês) vem sendo amplamente utilizada para fotobiomodulação e cicatrização de feridas. Os efeitos de bioestimulação e biomodulação ocasionados pela LLLT são observados pelo aumento da vascularização, proliferação, maturação e adesão de fibroblastos, além de seus efeitos anti-inflamatórios, como inibição de algumas citocinas, como IL-6 e TNF- $\gamma$  e também de analgesia (Yildiz; Gunpinar, 2019).

A análise sobre o tempo necessário para cicatrização de feridas e quais células e citocinas são envolvidas no processo são de extrema importância para o conhecimento sobre a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus. Além disso, uma dificuldade clínica é a cicatrização desse sítio em pacientes com diabetes, tendo em vista que possuem comprometimento da quimiotaxia de leucócitos para o sítio inflamado. Por esse motivo, a análise realizada nesse estudo acerca da cicatrização do sítio doador em ratas com diabetes e o uso adjuvante da fotobiomodulação pode auxiliar de forma significativa em futuros ensaios clínicos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Analisar a massa corpórea dos animais e alterações hematológicas sob a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus.

Avaliar histologicamente a quantidade de células polimorfonucleares, mononucleares, fibroblastos e vasos sob a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus.

Investigar a imunexpressão de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF sob a influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Recessão gengival

A recessão gengival (RG) é uma condição clínica associada a perda de inserção dos tecidos periodontais e exposição da superfície radicular. Na maioria dos casos, a perda de inserção e recessão dos tecidos ocorre na superfície vestibular dos dentes e tendem a evoluir, caso o tratamento correto não seja realizado. Mesmo com a alta prevalência de 90% de RG em adultos, apenas 12% destes são afetados por recessões localizadas com tecido interdental intacto, do tipo RT1, de acordo com a classificação de Cairo e 3,1% por múltiplas recessões RT1 adjacentes (González-Febles *et al.*, 2023).

A etiologia da RG é considerada multifatorial, podendo estar associada a fatores fisiológicos, anatômicos e patológicos. Estudos demonstram que há uma associação entre a recessão e o envelhecimento bucal, e além disso, outros fatores potenciais são o aparelho e forças ortodônticas, periodontite, fenótipo gengival e a escovação traumática (Francetti *et al.*, 2018; Sutor *et al.*, 2025).

Os pacientes que são acometidos pelas recessões gengivais geralmente mencionam queixas com a estética, desconforto e hipersensibilidade dentária, por conta da exposição da superfície radicular, além do risco de cárie e lesões cervicais não. As formas de tratamento para a RG tem o objetivo de recobrir a superfície radicular que está exposta e reestruturar os tecidos moles perdidos. Atualmente, diversas técnicas cirúrgicas são propostas, desde diferentes tipos de desenho cirúrgico, como os retalhos e a tunelização, até a utilização de enxertos, podendo estes serem xenogênicos, alogênicos e autólogos (González-Febles *et al.*, 2023).

#### 3.2 Enxerto gengival livre

A técnica de enxerto gengival livre pode ser considerada como padrão ouro entre os procedimentos que são realizados para recobrimento radicular. Essa técnica possui uma alta taxa de sucesso, devidos as vantagens, como a sua natureza autógena e a chance de aumentar tecido queratinizado, além do resultado cirúrgico previsível. No entanto, algumas limitações também podem ser mencionadas, como a retração do enxerto, que ocorre na fase de cicatrização, perda de dimensão, diferença de coloração dos tecidos adjacentes e morbidade pós-operatória, ocasionada pela dor, principalmente na região doadora do enxerto, como o palato duro, mas também no local de destino, que é a região da recessão (Almeida *et al.*, 2023; Shakiliyeva *et al.*, 2025).

Após a remoção do enxerto, uma ferida fica aberta na região do sítio doador. A ferida

cicatrização por segunda intenção em um período de duas a quatro semanas. No entanto, como já mencionado, esse período é marcado por desconforto e dor pós-operatória. Atualmente, medidas para minimizar essa morbidade e acelerar o processo cicatricial já estão sendo amplamente utilizadas, como uma forma de aumentar a aceitação a realização do procedimento (Morshedzadeh, Aslroosta, Vafaei, 2022).

### 3.3 Diabetes mellitus

A diabetes mellitus do tipo 1 (DM 1) é de etiologia autoimune e está associada a perda ou dano nas células  $\beta$  no pâncreas, ocasionando uma síntese insuficiente de insulina. Já a diabetes do tipo 2 (DM 2) é ocasionada pela resistência a insulina, produto de uma redução da atividade das células  $\beta$  em produzir insulina e resposta celular inadequada a sinalização da insulina. A cicatrização de feridas em animais induzidos a diabetes ocorre de forma mais lenta, quando comparado a animais com níveis normais de glicemia, tanto nos modelos realizados com DM 1 e DM 2 (Ko, Sculean, Graves, 2021).

Na DM 1 os linfócitos T, células de defesa da imunidade adquirida, destroem as ilhotas de *Langerhans*. Estruturas essas, que são responsáveis pela regulação do metabolismo do açúcar, a partir da produção de insulina e glucagon. Destaca-se também o envolvimento de citocinas como:  $\text{INF-}\gamma$ , fator de necrose tumoral e IL-1. A DM 2 é classificada como doença que apresenta a redução na habilidade dos tecidos periféricos na resposta com a insulina, bem como a disfunção das células  $\beta$  pancreáticas, acarretando uma produção instável e inadequada de insulina (Barbosa, 2013). Pacientes diagnosticados com diabetes apresentam grandes alterações no periodonto e na cicatrização. Devido a uma resposta imune deficiente, esses pacientes apresentam uma cicatrização prejudicada, pois afetam negativamente na resposta dos neutrófilos, na migração e proliferação dos fibroblastos e na formação de novos vasos sanguíneos (Jardim, Cortelli, 2019).

O diabetes atrasa os estágios iniciais e finais da cicatrização de feridas orais. Feridas diabéticas têm aumento da inflamação, como observado por um maior número de neutrófilos. A reepitelização das feridas gengivais é reforçada por inibidores do TNF em animais diabéticos, mas não em animais normais, indicando que o aumento dos níveis de TNF nas feridas orais diabéticas é problemático, enquanto o nível normal de TNF não inibe o processo de cicatrização. Em feridas cutâneas, o diabetes reduz a conversão de um fenótipo de macrófago M1 para um fenótipo de macrófago M2, o que pode contribuir para a inflamação prolongada. Além disso, camundongos idosos têm um aumento semelhante no fenótipo SASP como ratos diabéticos, sugerindo que pode haver mecanismos semelhantes que atrasam a cicatrização com

o envelhecimento e o diabetes (Ko, Sculean, Graves, 2021).

### **3.4 Laser de baixa potência**

O uso da terapia a laser de baixa intensidade (LLLT) utiliza o mecanismo da fotobiomodulação e tem o objetivo de bioestimular e auxiliar o processo de cicatrização de feridas pós-operatórias, diminuir a síntese de mediadores inflamatórios e aliviar a dor. A fotobiomodulação atua no processo cicatricial promovendo a angiogênese e coagulação, amplificando os fibroblastos e proliferação celular, que auxiliam na estimulação da epitelização primária. Os fatores de crescimento e citocinas também estão presentes e ajudam a regular o processo de cicatrização de feridas (Yoon *et al.*, 2021; Morshedzadeh, Aslroosta, Vafaei, 2022).

A reconstituição do tecido é formada a partir de uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares. Esse processo é constituído por fenômenos bioquímicos e fisiológicos de forma harmoniosa com o propósito de reconstruir a arquitetura de um tecido danificado (Mandelbaum, Di santis, Mandelbaum, 2003). A diabetes se caracteriza como uma síndrome metabólica multifatorial, no qual promove uma resposta imune deficiente e consequentemente promove uma cicatrização prejudicada. Dessa forma, com o uso da fotobiomodulação poderá proporcionar uma resposta tecidual favorável à cicatrização (Yoon *et al.*, 2021).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais e desenho de estudo

Trata-se de um estudo experimental laboratorial de caráter quantitativo, visando realizar análise macroscópica e histológica acerca da influência da fotobiomodulação no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em ratas induzidas a diabetes mellitus. Para isso, este projeto foi submetido à Comissão Ética no Uso de Animais da Universidade Christus e aprovado sob número de parecer 004/23, de acordo com todas as condutas para diminuição de dor, estresse, bem como sofrimento desnecessário foram conduzidas.

Todos os procedimentos foram realizados por um operador devidamente preparado e calibrado de acordo com as normas preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, conforme o guia de Princípios Internacionais de Pesquisas Biomédicas Envolvendo Animais.

### 4.2 Cálculo amostral

A fim de estimar a amostra necessária, nos baseamos no estudo de Amalya *et al.*, (2019) que observou o processo de cicatrização do sítio doador de enxerto gengival livre em ratos. Após aplicação de extrato de ervas, quando comparado ao grupo controle não tratado (Média±DP = 20±2 versus 24±3). Uma vez que o modelo experimental proposto apresenta perda possível perda de animais, acrescer-se-á 20% sobre esta amostra totalizando nove animais por grupo de estudo (teste t de Student).

### 4.3 Grupos experimentais

Um total de 144 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*), com 3 a 5 semanas de vida, pesando ± 200 g, provenientes do biotério da Universidade Christus, foram mantidos em gaiolas, na hospedaria para animais do biotério. Durante o procedimento experimental, os animais permaneceram em macroambiente controlado (fotoperíodo de 12h claro/escuro, temperatura 25 ± 2°C e umidade 55±10%) com fornecimento de água e ração específica à vontade.

Assim, ratas Wistar fêmeas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais:

- Grupo Salina: tratado com solução salina estéril (0,1 ml / kg) por via intraperitoneal e submetido a remoção do tecido gengival do palato duro.

- Grupo Laser: tratado com solução salina estéril (0,1 ml / kg) por via intraperitoneal e submetido a remoção do tecido gengival do palato duro e aplicação do laser no sítio doador.
- Grupo Diabetes (DM): tratado com aloxana (60 mg / kg) por via intraperitoneal para indução da diabetes e submetido a remoção do tecido gengival do palato duro.
- Grupo DM + Laser: tratado com aloxana (60 mg / kg) por via intraperitoneal para indução da diabetes, e submetido a remoção do tecido gengival do palato duro e aplicação do laser no sítio doador.

#### **4.4 Análise do peso corporal**

Os animais foram pesados semanalmente, de acordo com os dias de eutanásia, para avaliação da variação da massa corpórea em balança de 10g de precisão.

#### **4.5 Técnica de indução da Diabetes Mellitus**

A diabetes foi induzida por injeção via intraperitoneal de aloxana (60 mg / kg) diluída em soro fisiológico. Os animais do grupo controle receberam solução salina estéril. Após a indução, os animais foram colocados em uma dieta rica em sacarose com o objetivo de reduzir a perda animal por hiperglicemia, fato que pode ocorrer nas primeiras 24h após a indução. Posteriormente, 48h depois da indução os animais são deixado em jejum, apenas com água a vontade. Dois mililitros de sangue foram coletados via caudal, 72h após a indução do diabetes para determinação dos níveis de glicose. Os animais foram considerados diabéticos quando apresentavam glicemia  $\geq 200$  mg/dL. No dia da eutanásia uma nova coleta de sangue foi realizada para verificar se os animais permaneciam diabéticos. Os níveis de glicemia foram verificados com o glicosímetro da marca *Accu-Chek Active* (Baragob *et al.*, 2014).

#### **4.6 Técnica cirúrgica do sítio doador**

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de cetamina a 10% e xilazina 80%. A remoção do tecido gengival no palato duro foi realizada em uma dimensão de 10mmX4mm até a profundidade do perióstio usando uma lâmina 15c de aço inoxidável projetada para enxerto gengival e cirurgias periodontais. A gengiva foi separada por elevador periosteal (Amaliya *et al.*, 2019).

#### **4.7 Protocolo de laserterapia**

Os animais do grupo laser e do grupo DM + laser, foram submetidos ao protocolo de irradiação com laser vermelho (630nm) da DCM therapy XT ® com ponteira de área de 0,098 cm<sup>2</sup> e densidade de energia 0,3J/0,098 cm<sup>2</sup>. Ambos os grupos receberam o feixe de laser de radiação contínua, sendo realizado um protocolo de 0,3J por ponto, realizando apenas um ponto, que cobriu toda a área da ferida, incluindo as bordas. Os animais receberam o laser após a cirurgia do sítio doador e posteriormente a irradiação ocorreu três vezes por semana, até o dia da eutanásia dos animais (Firat *et al.*, 2014).

#### **4.8 Eutanásia**

Os animais foram eutanasiados, após os tempos descritos acima, por sobredose anestésica. As maxilas foram excisadas cirurgicamente, armazenadas em formol neutro a 10% para posterior confecção das lâminas histológicas (hematoxilina-eosina). O sangue dos animais foi coletado, tanto para verificar se os animais permaneceram diabéticos, quanto para posterior contagem total e diferenciada de leucócitos.

#### **4.9 Análise Sanguínea**

Após anestesia com xilazina (10mg/kg) e quetamina (800mg/kg), foi coletado 2mL de sangue pelo plexo retro-orbital para análise hematológica e imediatamente armazenado em eppendorfs, contendo 0,2mL de solução 1% de ácido etileno-dimamino tetraacético (EDTA) dissolvido em solução salina estéril 0,9%. Posteriormente, sobredose de xilazina (30mg/kg) e quetamina (240mg/kg) foi adicionalmente administrada para eutanásia. Uma gota de sangue foi disposta sobre uma lâmina de vidro para coloração por panótico rápido e análise hematológica. A leitura se deu em movimento de zigue-zague transversal ao tamanho da lâmina em direção da parte mais espessa para a parte menos espessa. Foram contados os números de cada um dos elementos sanguíneos celulares (neutrófilos, monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos) até um total de 100 células contadas, obtendo-se, assim, a contagem diferencial de leucócitos sanguíneos.

Para contagem total de leucócitos foi manipulado individualmente de cada animal, 20µl de sangue juntamente com 380µl da solução de Turk, colocados em eppendorfs e submetidos ao vórtex. Posteriormente, a diluição foi colocado em uma câmara de Neubauer e contabilizado os leucócitos totais presentes nos quadrantes das extremidades da câmara (Goes *et al.*, 2014).

#### **4.10 Confecção de lâminas e análise histomorfométrica**

As amostras colhidas foram fixadas em formol a 10% por 24 horas e posteriormente armazenadas em EDTA 10% para descalcificação por 60 dias. Após esse processo, foram desidratadas em banhos de etanol graduados (100 e 70%), limpos em xileno, embebidos em parafina e seccionados em série a 5  $\mu\text{m}$ . Duas secções de cada ferida foram selecionadas aleatoriamente e coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para avaliação em microscopia de luz. As lâminas foram analisadas no microscópio Olympus BX43 com aumento de 400 $\times$ , e cinco fotomicrografias foram obtidas para contagem no software QuPath. Os parâmetros analisados foram: quantidade de células mononucleares e polimorfonucleares, proliferação de fibroblastos e de vasos sanguíneos (Firat *et al.*, 2014).

#### **4.10 Técnica de micro array de tecidos e ensaio imuno-histoquímico**

Todas as lâminas microscópicas foram analisadas e uma área circunferencial representativa de 2 mm de diâmetro cada (3,14 mm<sup>2</sup>) de cada amostra e foi demarcada para a técnica Tissue Micro Array. Os blocos de parafina foram perfurados na área demarcada utilizando um Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®) e foram transferidos para um bloco receptor de parafina contendo 70 cavidades circulares do mesmo diâmetro (2mm). Os blocos de receptores de parafina contendo as áreas de interesse das hemimaxilas foram cortados em secções de 3  $\mu\text{m}$  de espessura para serem colocadas em lâminas silanizadas. As amostras foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas a recuperação de antígeno usando um tampão de citrato (pH 6,0). Para inativar a peroxidase endógena, as amostras foram incubadas (30 min) com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em solução tampão de fosfato (PBS), lavadas em PBS e incubadas durante a noite com anticorpos primários direcionados contra IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF.

Após lavagens em PBS, as amostras foram incubadas em Envision Plus HRP anti-IgG-coelho / camundongo por 45 min (pronto para uso; monoclonal; Dako® K4065), lavadas novamente em PBS e aplicado o cromogênio diaminobenzidina (Dako® K3469) por 5 min. A hematoxilina de Harris foi usada como contra-coloração (10s), e as amostras foram desidratadas (usando etanol e xilol) e montadas usando um meio de montagem permanente (Enthelam®). Secções paralelas de controle negativo serão tratadas com diluente de anticorpo em vez de um Ab primário. As lâminas foram scaneadas por meio de um scanner de lâminas (Motic DSAssistant (Motic VM V1 Viewer 2.0®) e as fotomicrografias foram exportadas para o software QuPath® para contagem do número de células imuno-positivas.

#### **4.11 Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como os valores médios  $\pm$  SE (erro padrão) e submetidos

ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparações de dados paramétricos foi realizado o teste 1-way-ANOVA/Bonferroni e para comparação dos dados não paramétricos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis/Dunn. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software GraphPad Prism 5.0.

## 5 RESULTADOS

Em relação a massa corpórea dos animais, o período de acompanhamento de 3 dias, não houve diferença estatística entre os quatro grupos ( $p=0,489$ ). No período de 7 dias, os animais que foram induzidos a diabetes tiveram massa corpórea estatisticamente menor ( $p=0,001$ ). O grupo DM demonstrou significativa redução na massa corpórea no dia 14 ( $p<0,001$ ). No dia 28 os grupos com animais que receberam laser tiveram um aumento estatisticamente significativo na sua massa ( $p<0,001$ ), quando comparado aos demais grupos. Observou-se que nos grupos salina, laser e DM + laser houve diferença estatística no aumento da massa corporal ( $p<0,001$ ) ao decorrer dos dias pós cirúrgicos (3, 7, 14 e 28 dias). Apenas o grupo DM não apresentou diferença estatística nesse quesito ( $p=0,1207$ ) (Tabela 1).

Com base na análise histológica, foi possível observar que os polimorfonucleares apresentaram diferença estatística entre os dias pós cirúrgicos e entre os grupos. No dia 3 de acompanhamento o grupo laser demonstrou uma redução significativa nessa contagem, comparado ao grupo salina, o grupo DM apresentou menor contagem dessas células, quando comparado ao salina e laser e o grupo DM+laser apresentou redução nessa análise quando comparado aos demais grupos ( $p<0,001$ ). Houve um aumento estatisticamente significativo nessas células no dia 7 ( $p<0,001$ ), 14 ( $p<0,001$ ) e 28 ( $p<0,001$ ) no grupo salina em relação aos grupos laser, DM e DM + laser. Já na análise entre os dias de acompanhamento, todos os grupos tiveram redução estatisticamente significativa ao longo dos dias 3, 7, 14 e 28 dias ( $p<0,001$ ) (Tabela 1).

Na análise do perfil de células mononucleares, no dia 3 houve um aumento significativo no grupo laser, quando comparados aos demais grupos. O grupo laser no dia 7 demonstrou um aumento significativo ao compararmos ao grupo salina, no entanto, seu resultado foi estatisticamente menor que os grupos DM e DM + laser ( $p<0,001$ ). Foi observado que nos dias 14 ( $p<0,001$ ) e 28 ( $p<0,001$ ) de acompanhamento, houve um aumento estatisticamente significativo dessas células nos grupos DM e DM + laser. Ao observamos entre os dias de acompanhamento de cada grupo, nos dias 7, 14 e 28 os grupos salina ( $p<0,001$ ), laser ( $p<0,001$ ), DM ( $p=0,005$ ) e DM + laser ( $p=0,014$ ) tiveram redução nessa análise (Tabela 1).

Um aumento significativo na formação de vasos sanguíneos no dia 3 ( $p=0,017$ ), foi observado no grupo tratado com laser, em comparação ao grupo salina, DM e DM + laser. Houve um aumento estatisticamente significativo na contagem de vasos no grupo salina no período de 7 dias ( $p<0,001$ ). Na análise dos dias de acompanhamento de cada grupo, o grupo salina apresentou aumento significativo no número de vasos nos dias 7 e 14 quando comparados

aos dias 3 e 28 ( $p<0,001$ ). Houve um aumento significativo de vasos no dia 3 do grupo laser ( $p=0,005$ ) e DM ( $p=0,002$ ). O grupo DM + laser apresentou uma redução no número de vasos quando comparado aos demais grupos em todos os períodos de acompanhamento, não havendo diferença estatística entre eles ( $p=0,070$ ) (Tabela 1).

Ainda com base na análise histológica, é possível observar um crescimento exponencial no número de fibroblastos em todos os grupos ao longo do tempo. No dia 3 houve um aumento significativo na quantidade de fibroblastos nos grupos que receberam laser, quando comparado aos demais grupos ( $p<0,001$ ). Nos períodos pós cirúrgicos de 7 ( $p<0,001$ ), 14 ( $p<0,001$ ) e 28 dias ( $p=0,015$ ), observamos uma redução significativa dessas células no grupo DM, quando comparado aos demais grupos. Na análise dos grupos entre os dias de acompanhamento, observamos que os grupos salina, laser e DM + laser tiveram um aumento estatisticamente significativo nos dias 7, 14 e 28 dias ( $p<0,001$ ). O grupo DM apresentou aumento significativo apenas no dia 28 ( $p<0,001$ ) (Tabela 1).

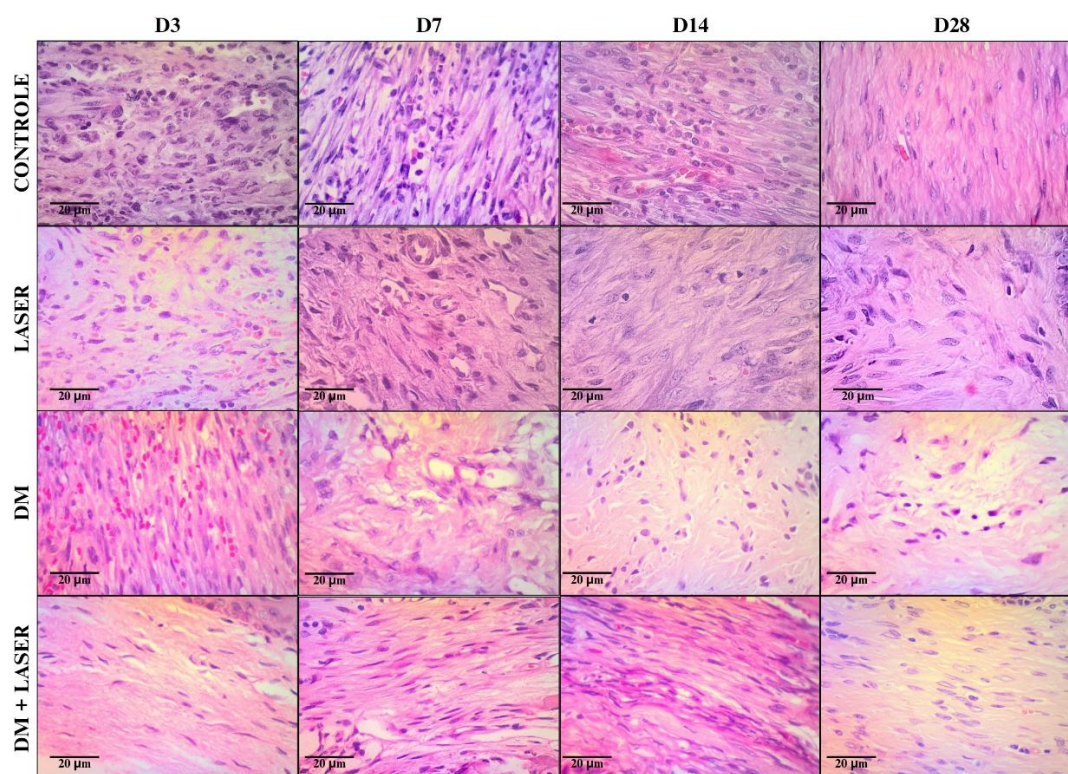
**Tabela 1:** Análise da massa corpórea, do perfil de células polimorfonucleares, de células mononucleares, do perfil de vasos sanguíneos e fibroblastos de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato, induzidas a diabetes mellitus e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.

	Tempo (dias)				p-Valor
	D3	D7	D14	D28	
<b>Peso</b>					
Sal	93.71±2.79Aa	103.30±1.54Ab	103.30±1.54Ab	114.40±0.99Ac	<0,001
Laser	97.40±0.66Aa	102.70±1.19Aa	110.10±1.44Ab	126.70±2.65Bc	<0,001
DM	92.31±3.21Aa	93.96±1.88Ba	92.05±3.85Ba	101.80±2.91Ca	0,1207
DM+Laser	95.25±2.48Aa	98.84±1.39Ba	120.80±5.46Ab	126.30±1.67Bb	<0,001
<b>p-Valor</b>	0,489	0,001	<0,001	<0,001	
<b>PMN</b>					
Sal	266.00±30.63Aa	124.80±16.38Ab	111.80±15.51Ab	70.40±8.99Ab	<0,001
Laser	181.40±13.95Ba	58.44±10.06Bb	9.33±3.27Bc	3.33±1.86Bc	<0,001
DM	46.44±7.73Ca	38.33±7.46Ba	7.86±2.28Bb	3.00±1.20Bb	<0,001
DM+Laser	23.00±7.38Da	13.00±1.84Ba	2.17±1.22Bb	2.86±1.16Bb	0,001
<b>p-Valor</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	
<b>MN</b>					
Sal	29.00±4.81Aa	12.88±2.38Ab	10.88±2.26Ab	9.60±2.05Ab	<0,001
Laser	158.70±29.23Ba	31.78±5.68Bb	16.89±4.18Ab	5.11±2.06Ab	<0,001
DM	78.75±6.97Ca	75.50±3.94Ca	55.14±10.68Ba	42.29±5.76Bb	0,005
DM+Laser	56.00±8.48Ca	62.17±7.92Ca	40.50±3.66Ba	32.00±5.73Bb	0,014
<b>p-Valor</b>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	

<b>Vasos</b>					
Sal	4.67±0.88Aa	9.25±1.82Ab	8.13±1.03Ab	2.20±0.51Aa	<0,001
Laser	23.22±7.95Ba	6.56±2.28Ab	2.44±0.67Bb	4.33±1.21Ab	0,005
DM	10.00±1.52Aa	3.17±0.83Ab	0.71±0.57Bb	2.71±1.43Ab	0,002
DM+Laser	3.50±1.23Aa	3.00±0.82Aa	1.83±0.95Ba	0.43±0.20Aa	0,070
<b>p-Valor</b>	<b>0,017</b>	0,073	<0,001	0,061	
<b>Fibroblastos</b>					
Sal	5.22±2.75Aa	271.50±22.00Ab	280.90±11.40Ab	262.00±33.07Ab	<0,001
Laser	54.00±8.19Ba	311.00±24.16Ab	248.90±21.60Ab	240.90±17.20Ab	<0,001
DM	18.75±1.51Aa	31.83±2.99Ba	83.57±12.81Ba	188.40±28.97Bb	<0,001
DM+Laser	168.70±12.21Ca	270.30±20.53Ab	285.70±20.55Ab	333.00±23.09Ab	<0,001
<b>p-Valor</b>	<0,001	<0,001	<0,001	0,015	

\*p<0,05, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM).

**Figura 1:** Fotomicrografias do sítio doador de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato, induzidas a diabetes mellitus e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.



Controle: Grupo controle; Laser: Grupo submetido a fotobiomodulação; DM: Grupo induzido a diabetes mellitus; DM + laser: Grupo induzido a diabetes mellitus submetido a fotobiomodulação (400x, Hematoxilina-Eosina).

Ao avaliarmos os parâmetros hematológicos, quanto a contagem total de leucócitos, houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,001$ ) no grupo DM, quando comparado aos demais grupos no período de 3 dias. Já no período de 28 dias, houve uma diminuição nessas células nos grupos em que os animais foram induzidos a diabetes ( $p = 0,001$ ), quando comparados aos demais grupos. Quando observamos os dias de acompanhamento, o grupo salina evidenciou que houve um aumento significativamente estatístico no dia 7 ( $p = 0,008$ ). O grupo laser apresentou uma diminuição significativa de leucócitos no dia 14 ( $p = 0,013$ ). Houve uma diminuição significativa no grupo DM nos dias 7, 14 e 28 ( $p < 0,001$ ). No grupo DM + laser observamos um aumento significativo nos dias 7, 14 e 28 ( $p = 0,003$ ) (Tabela 2).

Na análise de linfócitos circulantes, houve um aumento significativo no dia 3 de acompanhamento do grupo DM ( $p < 0,001$ ). No dia 14, os grupos DM e DM+laser apresentaram um aumento significativo nessa análise ( $p < 0,001$ ), quando comparados aos demais grupos. Ao observar os dias de acompanhamento, o grupo salina demonstrou diferença significativa em que o dia 14 apresentou uma redução significativa na contagem de linfócitos ( $p = 0,019$ ). Houve diferença estatisticamente significativa na redução de linfócitos nos dias 7, 14 e 28 no grupo DM ( $p < 0,001$ ). No grupo DM + laser houve um aumento significativo nos dias 7, 14 e 28 nessa contagem ( $p = 0,001$ ) (Tabela 2).

Já em relação aos não linfócitos, o grupo DM teve uma contagem significativamente maior no período de 3 dias ( $p < 0,001$ ). No dia 14, houve um aumento significativo ( $p < 0,001$ ) desta contagem nos grupos em que os animais foram induzidos a diabetes. Quando observamos os dias de acompanhamento de cada um dos grupos, observamos que o grupo salina apresentou redução significativa no dia 14 ( $p = 0,030$ ). Os grupos laser e DM apresentaram redução significativa na contagem dessas células nos dias 7, 14 e 28 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2:** Análise do perfil de perfil de leucócitos, linfócitos e não linfócitos de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato, induzidas a diabetes mellitus e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.

	Tempo (dias)				p-Valor
	D3	D7	D14	D28	
<b>Leucócitos</b>					
Sal	6921±756Aa	8250±526Ab	4988±410Aa	7750±868Aa	<b>0,008</b>
Laser	7975±514Aa	6019±631Aa	5761±550Ab	7333±188Aa	<b>0,013</b>
DM	12629±490Ba	5420±535Ab	5821±555Ab	5240±534Bb	<b>&lt;0,001</b>
DM+Laser	3650±508Aa	6950±1020Ab	5740±372Ab	5150±203Bb	<b>0,003</b>
<b>p-Valor</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,053	0,594	<b>0,001</b>	

<b>Linfócitos</b>					
Sal	7295±812Aa	7777±515Aa	4824±378Ab	7344±710Aa	<b>0,019</b>
Laser	7468±528Aa	6463±822Aa	5855±546Aa	6905±162Aa	0,293
DM	11580±468Ba	4869±526Ab	5418±557Ab	4670±474Bb	<b>&lt;0,001</b>
DM+Laser	3328±451Aa	6746±792Ab	5209±370Ab	4623±226Bb	<b>0,001</b>
<b>p-Valor</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,145	0,472	<b>0,000</b>	
<b>Não linfócitos</b>					
Sal	613±92Aa	546±107Aa	228±60Ab	691±99Aa	<b>0,030</b>
Laser	787±103Aa	274±99Ab	234±41Ab	429±64Ab	<b>&lt;0,001</b>
DM	1205±150Ba	500±134Ab	404±32Bb	570±115Ab	<b>&lt;0,001</b>
DM+Laser	322±75Aa	399±78Aa	531±36Ba	528±106Aa	0,203
<b>p-Valor</b>	<b>&lt;0,001</b>	0,350	<b>&lt;0,001</b>	0,209	

\* $p < 0,05$ , teste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM).

Em relação ao TNF- $\alpha$ , foi possível observar que no período de 3 dias houve diferença estatisticamente significativa na redução desse marcador nos grupos que receberam laser ( $p=0,004$ ). Quanto aos dias de acompanhamento, o grupo laser demonstrou uma redução significativa da expressão dessa citocina no dia 14 e 28 ( $p=0,020$ ). O grupo DM também apresentou valores estatisticamente significativos na redução desse marcador nos dias 7, 14 e 28, quando comparados ao dia 3 ( $p=0,004$ ). Na análise da IL-1 $\beta$ , no dia 7 houve um pico de produção dessa citocina, quando comparada aos demais dias, no entanto, os grupos laser e DM apresentaram valores estatisticamente menores que o grupo salina e o grupo DM + laser apresentou resultados menores que todos os grupos ( $p=0,001$ ). O grupo salina foi o único que apresentou diferença estatística entre os dias de acompanhamento ( $p < 0,001$ ), onde o dia 7 houve um aumento na expressão dessa citocina, quando comparado aos demais dias (Tabela 3).

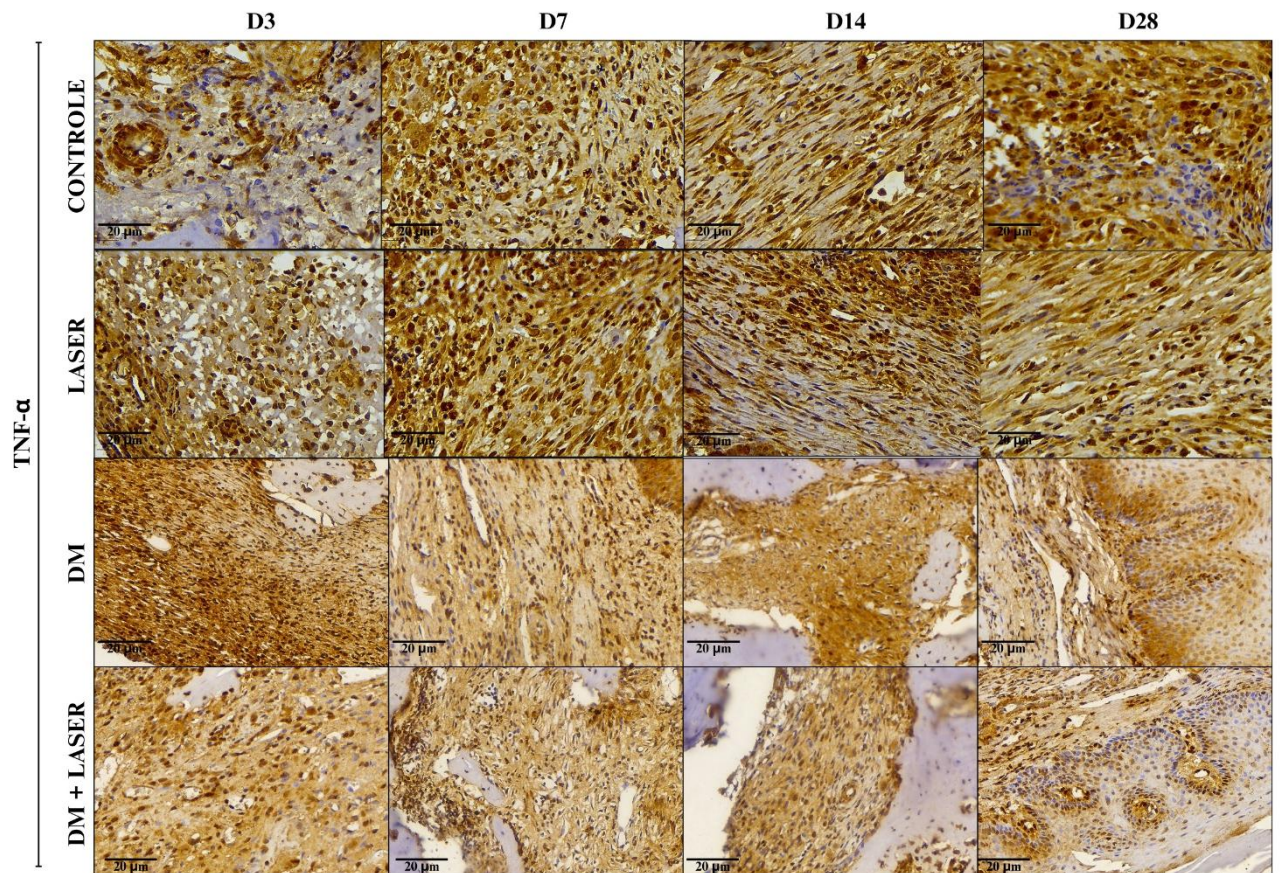
Na expressão de VEGF observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos e em todos os dias de acompanhamento. Houve uma redução significativa deste marcador no grupo DM + laser nos dias 3, 7, 14 e 28 dias ( $p=0,001$ ) e ao comparar com os demais grupos, também houve diferença estatisticamente significativa em todos os dias de acompanhamento ( $p < 0,001$ ). Os demais grupos, como salina, laser e DM demonstraram diferença estatisticamente significativa na redução dessa citocina nos dias 14 e 28 ( $p < 0,001$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3:** Análise da imunoe expressão de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e VEGF de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato, induzidas a diabetes mellitus e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.

	<b>Tempo (dias)</b>				<b>p-Valor</b>
	<b>D3</b>	<b>D7</b>	<b>D14</b>	<b>D21</b>	
<b>TNF</b>					
Sal	176.00±15.04Aa	143.70±10.17Ab	142.70±7.21Ab	139.30±10.77Ab	0,104
Laser	145.50±5.14Ba	196.20±21.74Aa	142.30±19.81Aa	123.20±7.87Ab	<b>0,020</b>
DM	190.50±11.75Aa	154.30±12.00Ab	134.20±8.06Ab	158.00±4.67Ab	<b>0,004</b>
DM + Laser	146.60±4.52Ba	151.30±5.33Aa	129.20±15.77Aa	145.20±5.58Aa	0,399
<b>p-Valor</b>	<b>0,004</b>	0,100	0,898	0,063	
<b>IL-1</b>					
Sal	43.00±9.00Aa	103.20±8.51Ab	36.33±7.37Aa	38.75±9.74Aa	<b>&lt;0,001</b>
Laser	23.50±6.97Aa	55.44±9.84Ba	31.79±6.28Aa	29.13±9.23Aa	0,053
DM	21.29±11.67Aa	52.20±11.80Ba	20.29±7.30Aa	46.40±10.22Aa	0,088
DM + Laser	20.33±12.55Aa	17.33±16.34Ca	22.00±2.52Aa	33.83±14.38	0,827
<b>p-Valor</b>	0,754	<b>0,001</b>	0,334	0,780	
<b>VEGF</b>					
Sal	153.00±4.44Aa	138.60±8.26Aa	86.14±9.70Ab	75.33±7.31Ab	<b>&lt;0,001</b>
Laser	173.40±9.79Aa	132.60±13.16Aa	99.22±10.06Ab	79.47±5.30Aa	<b>&lt;0,001</b>
DM	104.70±8.24Aa	123.00±5.74Aa	93.00±1.46Ab	68.25±2.85Ab	<b>&lt;0,001</b>
DM + Laser	78.43±9.37Ba	64.33±0.42Ba	50.96±1.82Bb	47.14±1.35Bb	<b>0,001</b>
<b>p-Valor</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>	

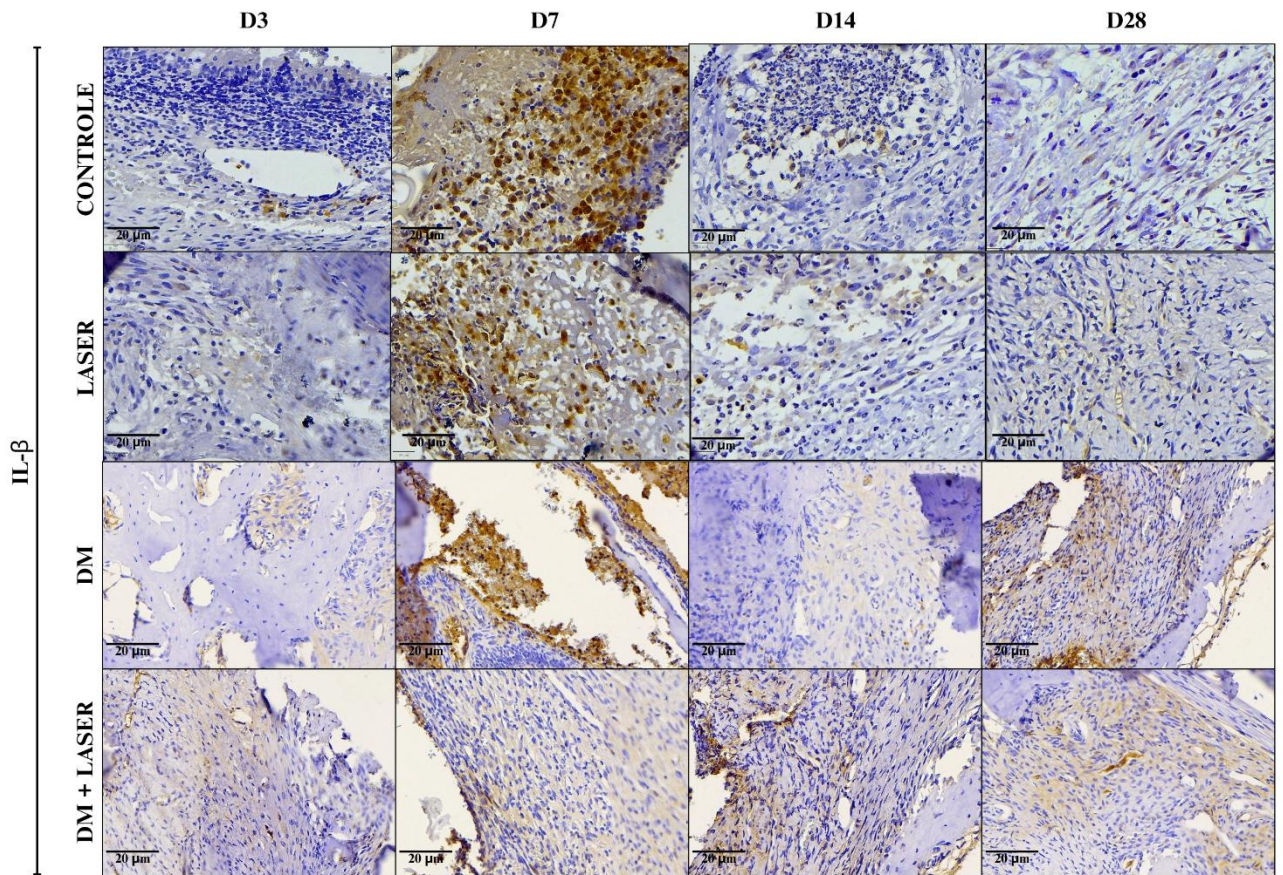
\*p<0,05, teste ANOVA-2-way/Bonferroni (média±EPM).

**Figura 2:** Fotomicrografias do imunomarcador TNF- $\alpha$  analisados no sítio doador de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.



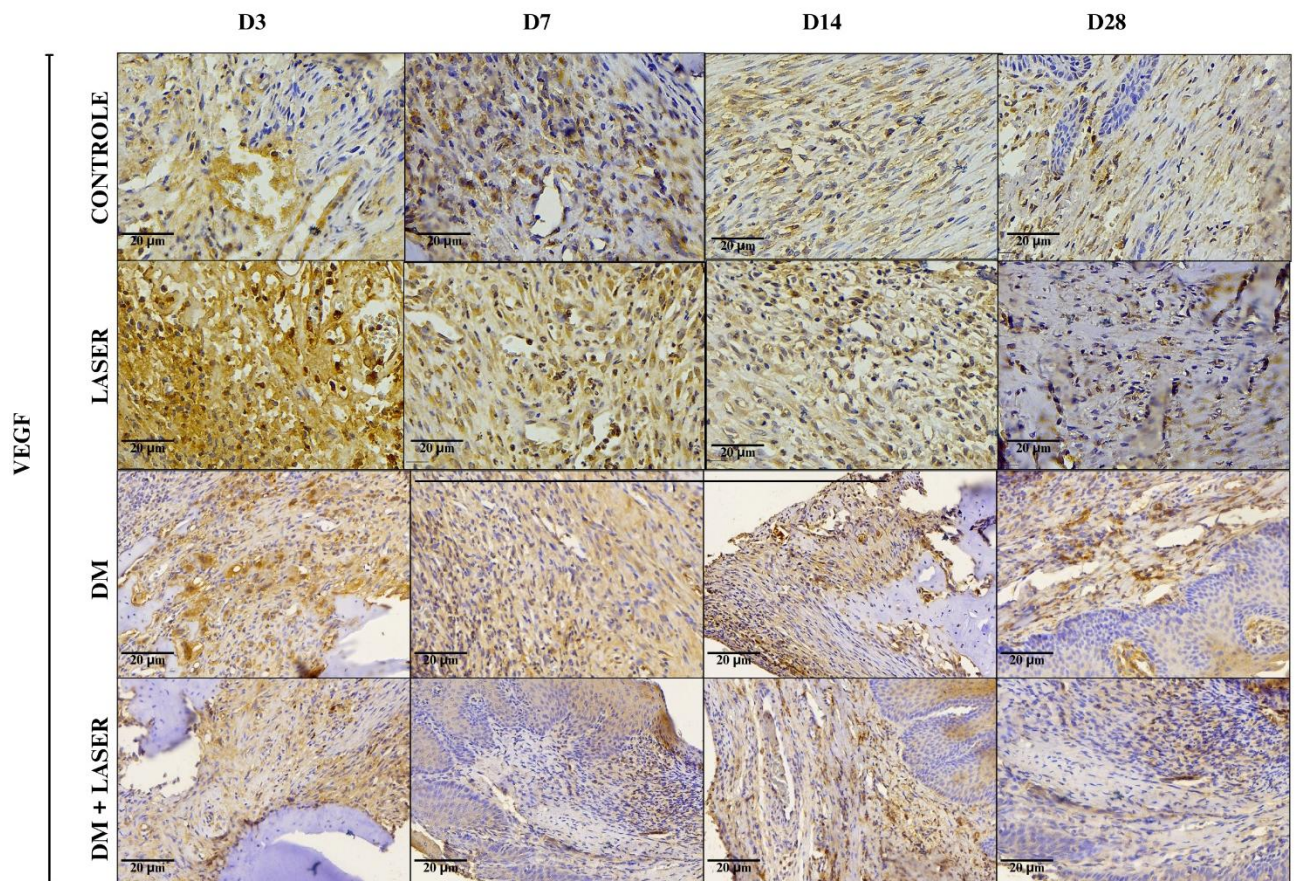
Controle: Grupo controle; Laser: Grupo submetido a fotobiomodulação; DM: Grupo induzido a diabetes mellitus; DM + laser: Grupo induzido a diabetes mellitus submetido a fotobiomodulação (400x, TNF- $\alpha$ ).

**Figura 3:** Fotomicrografias do imunomarcador IL-1 $\beta$  analisados no sítio doador de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.



Controle: Grupo controle; Laser: Grupo submetido a fotobiomodulação; DM: Grupo induzido a diabetes mellitus; DM + laser: Grupo induzido a diabetes mellitus submetido a fotobiomodulação (400x, IL-1 $\beta$ ).

**Figura 4:** Fotomicrografias do imunomarcador VEGF analisados no sítio doador de ratas Wistar submetidas ao modelo de remoção do enxerto gengival livre do palato e tratadas com fotobiomodulação por diferentes períodos.



Controle: Grupo controle; Laser: Grupo submetido a fotobiomodulação; DM: Grupo induzido a diabetes mellitus; DM + laser: Grupo induzido a diabetes mellitus submetido a fotobiomodulação (400x, VEGF).

## 6 DISCUSSÃO

Ao observarmos os resultados relacionados a massa corpórea, fica evidente que os animais em que a diabetes mellitus foi induzida tiveram um menor ganho de peso no período de 7 dias, quando comparado aos demais grupos. No entanto, após o dia 14, apenas o grupo DM permaneceu com menores valores corporais, enquanto o grupo salina, laser e DM + laser tiveram um aumento em sua massa. Além disso, a utilização da fotobiomodulação teve um papel de extrema importância, tendo em vista que no período de 28 dias, os animais de ambos os grupos que receberam laser tiveram valores de massa corporal superiores aos dos grupos salina e DM.

O estudo de Pandolfo *et al.*, (2023) tinha o objetivo de avaliar alguns parâmetros locais e sistêmicos de animais induzidos a diabetes e os efeitos da fotobiomodulação. Seus resultados corroboraram com os nossos, onde os animais diabéticos que receberam laser tiveram maior valor de massa corporal quando comparado aos animais diabéticos que não receberam a fotobiomodulação. A diminuição da massa corpórea é algo esperado nesse modelo experimental, no entanto, o efeito positivo do laser em ambos os estudos reforçam a sua capacidade anti-oxidante e anti-inflamatório sistêmica.

Ná análise histomorfométrica de células polimorfonucleares houve uma redução desse parâmetro nos grupos laser, DM e DM + laser quando comparados ao grupos salina em todos os períodos de acompanhamento. Bagheri *et al.*, (2020) avaliou o impacto da fotobiomodulação e da administração de metformina, isoladamente e em combinação, a fim de estudar as etapas da cicatrização em ratos com DM 2. De forma semelhante ao nosso estudo, o grupo em que o laser foi utilizado de forma isolada demonstrou redução significativa na contagem de neutrófilos, além do aumento no número de células basais e fibroblastos.

Já em relação a análise do perfil de células mononucleares, houve um aumento dessas células no grupo laser no período de 3 dias, quando comparado aos demais grupos e no período de 7 dias quando comparado apenas ao grupo salina. Infere-se que a maior parte dessas células sejam monócitos, que se diferenciaram em macrófagos do tipo M2. O estudo de Souza *et al.*, (2018) buscou avaliar o efeito da fotobiomodulação em ambos os comprimentos de onda no processo de reparo muscular após uma lesão aguda e correlacionar os achados com o perfil de células e citocinas e o reparo tecidual entre os dias de experimento. Os seus resultados demonstraram de forma semelhante ao presente estudo que a utilização do comprimento de onda vermelha reduziu o infiltrado inflamatório após 2 dias e após 7 dias aumentou a quantidade de macrófagos CD163, este sendo um dos fenótipos do macrófago, identificado como M2, o qual possui ação anti-inflamatória por meio de citonas, proliferação de fibroblastos e formação

de novos vasos, acelerando esse processo de reparo inicial.

Ainda na análise do perfil de células mononucleares, os grupos DM e DM + laser tiveram um aumento dessas células nos períodos de 7, 14 e 28 dias quando comparados ao salina e laser. Segundo De Loura Santana *et al.*, (2016), em feridas de camundongos diabéticos há uma maior dificuldade na transição do perfil de macrófagos M1, da fase pró-inflamatória para um perfil que favoreça a cicatrização, através dos macrófagos M2.

Em relação aos fibroblastos, houve um crescimento exponencial na quantidade dessas células em todos os grupos ao longo dos tempos pós cirurgicos. No período de 3 dias os grupos laser e DM + laser tiveram resultados superiores aos demais grupos e o grupo DM, em todos os dias de acompanhamento que apresentou menores quantidades dessas células. Afim de estudar a cicatrização de um enxerto de pele irradiado com terapia a laser de baixa intensidade em ratos, Moreira *et al.*, (2020) realizaram a aplicação de varias doses. Foi observado que o grupo que aplicou 6J/cm<sup>2</sup> a cada 5 dias em um protocolo de 15 dias teve um aumento estatisticamente maior na contagem de fibroblastos e colágeno do tipo III, quando comparado aos demais grupos, demonstrando uma maior atividade celular e reparo tecidual, assim como em nosso estudo.

Bem como no estudo de Đorđević *et al.*, (2025) em que o objetivo foi avaliar os efeitos do laser na cicatrização de feridas da mucosa oral em ratos com DM. Esses animais com diabetes que foram tratados com laser tiveram uma cicatrização satisfatória, evidenciando que o laser atua de forma eficaz, trazendo benefícios ao reparo tecidual mesmo em condições de estresse metabólico. Esse estudo também reforça que a hiperglicemia possui influência no atraso da cicatrização, tendo em vista o aumento dos produtos finais da glicação avançada (AGEs). O aumento dos AGEs está associado ao atraso dessa cicatrização na mucosa oral, decorrente da menor deposição de colágeno, resultado da produção deficiente de fibroblastos.

A contagem de vasos sanguíneos demonstrou um aumento significativo no grupo laser no período de 3 dias em comparação aos demais grupos, o que também foi observado no estudo de Santinoni *et al.*, (2021). Eles observaram o efeito da fotobiomodulação na cicatrização óssea em ratos, tendo como resultado, um aumento na expressão de vasos e de VEGF no grupo em que o laser foi utilizado, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, reforça os nossos achados de que a atuação da fotobiomodulação tem potencial de promover respostas celulares positivas para potencializar o processo de cicatrização.

No que se refere aos parâmetros hematológicos de todos os grupos em um contexto geral, verificamos que os animais que foram induzidos a diabetes apresentam um aumento nas células da imunidade inata, enquanto, há uma menor quantidade de células da imunidade

adaptativa, como os linfócitos. Essas alterações também foram observadas no estudo de Alzoubi, Joseph, Andersson., (2017) onde eles buscavam analisar as alterações que a diabetes mellitus poderia ocasionar em um modelo de úlcera em ratos. Seus resultados indicaram uma cicatrização tardia nos animais diabéticos, corroborando com os nossos achados. Tendo em vista que, os animais do grupo controle apresentaram completa reepitelização da ferida e menores indícios de inflamação. Diferentemente, foi visto atraso no reparo tecidual dos animais diabéticos esteja associado ao retardo da fase inflamatória, diminuição na migração e proliferação de fibroblastos e diminuição da angiogênese.

Na imuno-histoquímica do TNF- $\alpha$  houve redução desse marcador no período de 3 dias nos animais que receberam a fotobiomodulação, o que vai de encontro com os achados de Taheri *et al.*, (2025). Ao investigar o potencial terapêutico da fotobiomodulação durante a fase inflamatória da lesão medular em ratos, observou que houve uma redução de TNF- $\alpha$  nos animais que estavam sendo tratados com laser, quando comparado aos demais grupos. Sugerindo então que a fotobiomodulação ocasiona um efeito de modulação, possuindo capacidade na regulação das citocinas anti e pró-inflamatórias e favorecendo a um maior reparo tecidual.

Ao analisarmos os resultados da imuno-histoquímica da IL-1 $\beta$  observamos que no dia 7 os grupos laser, DM e DM + laser tiveram uma redução nesse marcador, quando comparado ao grupo salina. Resultado semelhante ao que Lemos *et al.*, (2020) reproduziram em um modelo experimental de artrite da articulação temporomandibular (ATM), onde avaliavam os efeitos anti-inflamatórios de diferentes dosagens de fotobiomodulação. Eles tiveram como resultado que todos os grupos que receberam laser tiveram menores concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , quando comparado ao grupo controle. Por ser um método não invasivo, essa terapia tem potencial de ser amplamente utilizada, tendo em vista sua capacidade de estimular o crescimento, proliferação e diferenciação celular. Após a absorção da luz por meio das células e tecidos, os processos celulares ocorrem, causando alterações biológicas, ocasionando os efeitos de redução dos mediadores pró-inflamatórios anteriormente mencionados.

Em relação a expressão de VEGF em nosso estudo, observamos que houve redução desse marcador no grupo DM + laser nos dias 3, 7, 14 e 28 e ao comparar com os demais grupos em todos os dias de acompanhamento. Segundo Ebrahimpour-Malekshah *et al.*, (2023) afirma em seu estudo, que ratos induzidos a diabetes apresentaram uma redução da angiogênese na etapa de proliferação e redução vascular. Em consonância com nosso estudo, mesmo com o uso da fotobiomodulação nos animais diabéticos, a dose e comprimento de onda utilizados não

trouxeram benefícios nos parâmetros de formação de novos vasos e expressão de VEGF nesses animais.

## **7 CONCLUSÃO**

O uso da fotobiomodulação se mostrou eficaz no processo cicatricial do sítio doador para enxerto gengival livre em todos os animais que receberam a fotobiomodulação, uma vez que, houve ganho de peso, redução de células inflamatórias, aumento na proliferação de fibroblastos e redução de marcadores pró-inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Vanessa Camillo de et al. Conventional versus flap-protected free gingival graft: a multicenter randomized clinical trial. **Brazilian Oral Research**, v. 37, p. e001, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2023.vol37.0001>. Acesso em: 11 de fevereiro de 2026.
- ALZOUBI, Fawaz; JOSEPH, Bobby; ANDERSSON, Lars. Healing of soft tissue lacerations in diabetic-induced rats. **Dental Traumatology**, v. 33, n. 6, p. 438-443, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/edt.12372>. Acesso em: 07 de maio de 2026.
- BAGHERI, Mohammad et al. Combined effects of metformin and photobiomodulation improve the proliferation phase of wound healing in type 2 diabetic rats. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 123, p. 109776, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109776>. Acesso em: 07 de maio de 2026.
- BARAGOB, Abdella Emam Abdella et al. The hypoglycemic effect of the aqueous extract of the fruits of *Balanites aegyptica* in Alloxan-induced diabetic rats. **Pharmacognosy research**, v. 6, n. 1, p. 1, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.122909>. Acesso em: 15 de março de 2026.
- BARBOSA, Kevan Guilherme Nóbrega. A complexa relação entre diabetes mellitus e doenças periodontais. **Clínica e Pesquisa em Odontologia-UNITAU**, v. 5, n. 1, p. 65-71, 2013. Disponível em: <https://periodicos.unitau.br/clipecodonto/article/view/1434>. Acesso em: 12 de janeiro de 2024.
- CARCUAC, Olivier; TRULLENQUE-ERIKSSON, Anna; DERKS, Jan. Modified free gingival graft technique for treatment of gingival recession defects at mandibular incisors: A randomized clinical trial. **Journal of Periodontology**, v. 94, n. 6, p. 722-730, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jper.22-0581>. Acesso em: 10 de março de 2026.
- DE LOURA SANTANA, Cristiano et al. Effect of laser therapy on immune cells infiltrate after excisional wounds in diabetic rats. **Lasers in surgery and medicine**, v. 48, n. 1, p. 45-51, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/lsm.22445>. Acesso em: 08 de maio de 2026.
- DORĐEVIĆ, Nadica S. et al. Effects of Low-Level Laser Therapy on Oral Mucosal Wound Healing and Systemic Oxidative Stress in Diabetic Rats: An In Vivo Experimental Study. **Medicina**, v. 61, n. 9, p. 1651, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/medicina61091651>. Acesso em: 08 de maio de 2026.
- EBRAHIMPOUR-MALEKSHAH, Roohollah et al. The stereological, immunohistological, and gene expression studies in an infected ischemic wound in diabetic rats treated by human adipose-derived stem cells and photobiomodulation. **Archives of Dermatological Research**, v. 315, n. 6, p. 1717-1734, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00403-023-02563-z>. Acesso em: 07 de maio de 2026.
- FRANCETTI, Luca et al. Coronally Advanced Flap With or Without Subepithelial Connective Tissue Graft for the Treatment of Single Recession: 5-Year Outcomes from a Comparative Study. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 38, n. 6, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11607/prd.3036>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

GOES, P. et al. Low-dose combination of alendronate and atorvastatin reduces ligature-induced alveolar bone loss in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 49, n. 1, p. 45–54, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jre.12077>. Acesso em: 25 de maio de 2026.

GONZÁLEZ-FEBLES, Jerián et al. Tunnel vs. coronally advanced flap in combination with a connective tissue graft for the treatment of multiple gingival recessions: a multi-center randomized clinical trial. **Clinical Oral Investigations**, v. 27, n. 7, p. 3627-3638, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00784-023-04975-7>. Acesso em: 07 de maio de 2026.

JARDIM, João Carlos Moreira; CORTELLI, José Roberto. Avaliação dos mecanismos de cicatrização de feridas periodontais em pacientes diabéticos e não diabéticos. **Periodontia**, p. 35-41, 2019. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1023261>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

KO, Kang I.; SCULEAN, Anton; GRAVES, Dana T. Diabetic wound healing in soft and hard oral tissues. **Translational Research**, v. 236, p. 72-86, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2021.05.001>. Acesso em: 10 de janeiro de 2024.

LEMOS, George Azevedo et al. Photobiostimulation activity of different low-level laser dosage on masticatory muscles and temporomandibular joint in an induced arthritis rat model. **Lasers in medical science**, v. 35, n. 5, p. 1129-1139, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02933-y>. Acesso em: 08 de maio de 2026.

MANDELBAUM, Samuel Henrique; DI SANTIS, Érico Pampado; MANDELBAUM, Maria Helena Sant'Ana. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, p. 393-408, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962003000400002>. Acesso em: 12 de janeiro de 2024.

MOREIRA, Stella H. et al. Evaluation of angiogenesis, inflammation, and healing on irradiated skin graft with low-level laser therapy in rats (*Rattus norvegicus albinus wistar*). **Lasers in medical science**, v. 35, n. 5, p. 1103-1109, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02917-y>. Acesso em: 10 de maio de 2026.

MORSHEDZADEH, Ghazal; ASLROOSTA, Hoori; VAFAEI, Mahsa. Effect of GaAlAs 940 nm Photobiomodulation on palatal wound healing after free gingival graft surgery: a split mouth randomized controlled clinical trial. **BMC oral health**, v. 22, n. 1, p. 202, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12903-022-02229-8>. Acesso em: 22 de fevereiro de 2024.

PANDOLFO, Isabella Liba et al. Photobiomodulation in diabetic rats: Effects on morphological, pancreatic parameters, and glucose homeostasis. **Journal of Biophotonics**, v. 16, n. 11, p. e202300182, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbio.202300182>. Acesso em: 10 de maio de 2026.

SANTINONI, Carolina S. et al. Bone marrow coagulated and low-level laser therapy accelerate bone healing by enhancing angiogenesis, cell proliferation, osteoblast differentiation, and mineralization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 109, n. 6, p. 849-858, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37076>. Acesso em: 10 de maio de 2026.

SHAKILIYEVA, Sanubar et al. Comparison of conventional and modified sling suture techniques in free gingival graft operations-a randomized controlled clinical trial. **BMC Oral Health**, v. 25, n. 1, p. 279, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12903-025-05456-x>. Acesso em: 07 de maio de 2026.

SOUZA, Nadhia HC et al. Photobiomodulation and different macrophages phenotypes during muscle tissue repair. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 22, n. 10, p. 4922-4934, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jcmm.13757>. Acesso em: 08 de maio de 2026.


SUTOR, Simone et al. Effect of a powered and a manual toothbrush in subjects susceptible to gingival recession: A 36-month randomized controlled clinical study. **International Journal of Dental Hygiene**, v. 23, n. 1, p. 26-36, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/idh.12834>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2026.

TAHERI, Hadise et al. Therapeutic Effects of Low-Level Laser Therapy on Rat Spinal Cord Injury: Analysis of Inflammatory Markers and Testicular Function. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 16, p. e6, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.34172/jlms.2025.06>. Acesso em: 08 de maio de 2026.

YILDIZ, Mehmet Selim; GUNPINAR, Sadiye. Free gingival graft adjunct with low-level laser therapy: a randomized placebo-controlled parallel group study. **Clinical oral investigations**, v. 23, n. 4, p. 1845-1854, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2608-6>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2024.

YOON, Jisun et al. Optimal Fluence and Duration of Low-Level Laser Therapy for Efficient Wound Healing in Mice. **Annals of Dermatology**, v. 33, n. 4, p. 318, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5021/ad.2021.33.4.318>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2024.

## ANEXO A

<b>CEUA INSTITUTO PARA DESENVOLVIMENTO DA EDUCAÇÃO LTDA IPADE</b> <b>CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS</b>				
				
Of. No. 004/23				
Protocolo da CEUA: 004/23				
Pesquisador Responsável: DAYRINE SILVEIRA DE PAULA				
Título do Projeto: INFLUÊNCIA DA FOTOBIMODULAÇÃO NO PROCESSO CICATRICIAL DO SÍTIO DOADOR PARA ENXERTO GENGIVAL LIVRE EM RATAS INDUZIDAS A DIABETES MELLITUS.				
Levamos ao conhecimento de V. Sa que a Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA – IPADE considerou <b>APROVADO</b> o projeto supracitado na reunião do dia 28 (vinte e oito) de março de 2023.				
Descrição do animal utilizado:				
Espécie:	<table border="1"><tr><td>Rattus norvegicus Fêmeas</td><td>Número Amostral:</td><td><b>144</b></td></tr></table>	Rattus norvegicus Fêmeas	Número Amostral:	<b>144</b>
Rattus norvegicus Fêmeas	Número Amostral:	<b>144</b>		
Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE ao término do estudo, excepcionalmente, o presente projeto terá o período máximo vigente estendido até 28/03/2025.				

Fortaleza, 24 de maio de 2024.

  
\_\_\_\_\_  
Olga Vale Oliveira Machado  
Coordenadora  
CEUA/Instituto para Desenvolvimento da Educação LTDA - IPADE