



EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA SINALIZAÇÃO CELULAR MEDIADA PELO RECEPTOR DE VITAMINA D (VDR) EM CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL ADULTA

Gabriela Saraiva Santos Pereira¹, Elaine Araujo da Rocha², Fabio Dupart Nascimento³

1. Estudante – curso de Odontologia; e-mail: Gabsaraiva14@gmail.com;
2. Mestranda em Engenharia Biomédica - UMC; e-mail: dra.elainearaujo@outlook.com;
3. Professor – UMC; e-mail: fdnascimento@gmail.com.

Área de conhecimento: Odontologia/Biologia Molecular.

Palavras-chave: polpa, célula-tronco, vitamina D.

INTRODUÇÃO

O objetivo da engenharia de tecidos e da medicina regenerativa é o desenvolvimento de substituições biológicas que permitam o restabelecimento da forma e função de órgãos específicos. No entanto, a complexidade morfológica e funcional de alguns tecidos oferece um desafio substancial ao processo de substituição. Deste modo, o uso de células-tronco tem uma importância considerável em tais estratégias terapêuticas quando utilizadas com ou sem a presença de adjuvantes biológicos^{1,2}. A fotobiomodulação (PBM), muitas vezes referida como terapia a laser de baixa intensidade (LLLT), teve suas origens na década de 1960 e utiliza como fator estimulador a luz. O LLLT foi utilizado pela primeira vez pela NASA para acelerar a cicatrização de feridas no espaço³. No entanto, os lasers agora estão sendo utilizados para uma variedade de tratamentos, incluindo cicatrização de feridas, antibióticos, anti-inflamatórios, na imunidade e vitiligo^{4,5,6}. O mecanismo de ação de LLLT nas suas mais diversas abordagens, mostram que o LLLT pode acelerar a mitose gerando espécies reativas de oxigênio e antioxidantes⁷. Ainda, o LLLT pode inibir o óxido nítrico da oxidação do citocromo C, causando aumento da produção de ATP e conseqüentemente aumento do metabolismo celular. Vários estudos mostraram que LLLT pode diminuir a inflamação, ensaios de LLLT mostraram citocinas inflamatórias diminuídas^{8,9,10}, nos mais variados casos. A polpa dental está equipada para expressar numerosos mediadores de inflamação, que podem combater fatores irritantes^{11,12}. A sua resposta mecanicista começa com alterações vasculares mediadas por receptores de tipo Toll (TLR) 4 / 2- células positivas e inclui libertação de mediadores inflamatórios mensuráveis, tais como IL-8, IL-6, IL-1 e outros^{13,14}. Sob condições fisiológicas normais, a vasculatura consiste de vasos centrais que se ramificam para dentro de um plexo em direção à periferia e, especificamente, os cornos pulpaes. Uma diferença importante em relação às porções de tecido mole do corpo é que os tecidos duros dentários anexam a polpa criando um ambiente de baixa conformidade. Os vasos sanguíneos dentários estão principalmente sob controle por metabolitos locais e menos por inervação simpática. Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que a BPM é capaz de modular a expressão gênica de várias moléculas mediadoras inflamatórias, bem como moléculas envolvidas no processo osteogênico. Dentre essas moléculas nos chamou a atenção o aumento significativo da expressão do gene do receptor de Vitamina D (VDR), que, aparentemente, possui íntima relação entre o estímulo provocado pela radiação do laser e a resposta metabólica do tecido ósseo mediada pela Vitamina D. Diante do exposto, faz-se necessário um estudo aprofundado que avalie molecularmente o possível papel da PBM na sinalização celular no modelo *in vitro* de células-tronco originadas da polpa dental adulta.



OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo avaliar a modulação da via VDR-RXR em células-tronco extraídas do tecido pulpar adulto em estado normal e inflamado promovida pelo tratamento com laser de baixa intensidade (PBM).

METODOLOGIA

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Institucional (CEP-protocolo 98511618.8.0000.5497). Dentes hígidos e/ou com a polpa inflada, adultos com indicação para remoção cirúrgica foram colocados em recipiente estéril contendo solução salina. Terceiros molares e pré-molares são os elementos dentais mais comuns para o isolamento de células-tronco originadas do tecido pulpar, devido à relativa facilidade de obtenção, ou devido a indicações ortodônticas, no caso dos pré-molares, ou em cirurgias de terceiros molares impactados. Porém, os terceiros molares são os últimos dentes a desenvolverem-se nos humanos e se encontra, na maioria das vezes, em estágios iniciais de desenvolvimento, tornando-se capaz de produzir quantidades satisfatórias de tecido pulpar para isolamento de células-tronco. O elemento dental foi posteriormente lavado com solução de iodina e etanol, 70%, no intuito de se evitar contaminações relacionadas à presença de bactérias de origem bucal. Em seguida, os elementos dentais foram lavados 5 vezes com tampão fosfato de sódio (PBS), para remoção da iodina e do etanol. Posteriormente, o elemento dental foi cortado, com broca estéril em aparelho de alta rotação na região da junção esmalte-cimento, a fim de separar a coroa dentária da porção radicular, e assim acessar a câmara pulpar e conseqüentemente o tecido pulpar. Em seguida, o tecido pulpar foi removido da câmara pulpar com lima endodôntica estéril, em condições de umidade (α -MEM). Em seguida, o tecido pulpar excisado foi digerido em solução contendo colagenase tipo I (3 mg/mL) e dispase (4 mg/mL) por 45 min a 37°C. Após a digestão foram adicionados 5 volumes de meio de cultura de células (α -MEM), contendo 10% de soro fetal bovino. Esta solução foi, então, centrifugada a 1200 rpm por 10 min, o material precipitado será ressuspenso em meio de cultura e filtrado em filtros com poros de 70 μ M. Este procedimento resultou em uma suspensão celular pronta para a cultivo *in vitro*. As culturas celulares foram irradiadas com laser diodo InGaAlP (KondortechBioWave LLLT Dual, Brasil) em modo contínuo utilizando potência de 30mW, comprimento de onda de 660nm e doses de 0,5 e 1,0J/cm². Cada poço tratado foi irradiado por 16 e 33 segundos, respectivamente, às zero e 48 horas. Para a irradiação a laser, a sonda foi direcionada perpendicularmente a cada placa, com distância de 0,5cm das células. As células foram plaqueadas de modo que um poço, entre os semeados, seja deixado vazio, para prevenir a dispersão intencional de luz entre os poços durante a irradiação. A via VDR-RXR, formando o complexo VDRE é reconhecida pela sua importância na participação de vários proto-oncogênes. No entanto, o seu papel na modelação óssea ainda é pouco estudado. As reações de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) em um equipamento ABI Prism 5700 SequenceDetection System (Applied Biosystems). Os "primers" específicos para cada proteína a ser analisada foram desenhados de acordo com a literatura e a sequência CAC CCC AAC CCT TGG AAA CT (D), foi utilizada como normalizador da reação.



RESULTADOS

A Figura abaixo mostra claramente o potencial de modulação do gene do receptor de Vitamina D em DPSCs que foram submetidas ao tratamento com LPS – um forte ativador de resposta inflamatória – e posteriormente tratadas com terapia fotodinâmica de baixa potência (PBM).

Figura 1

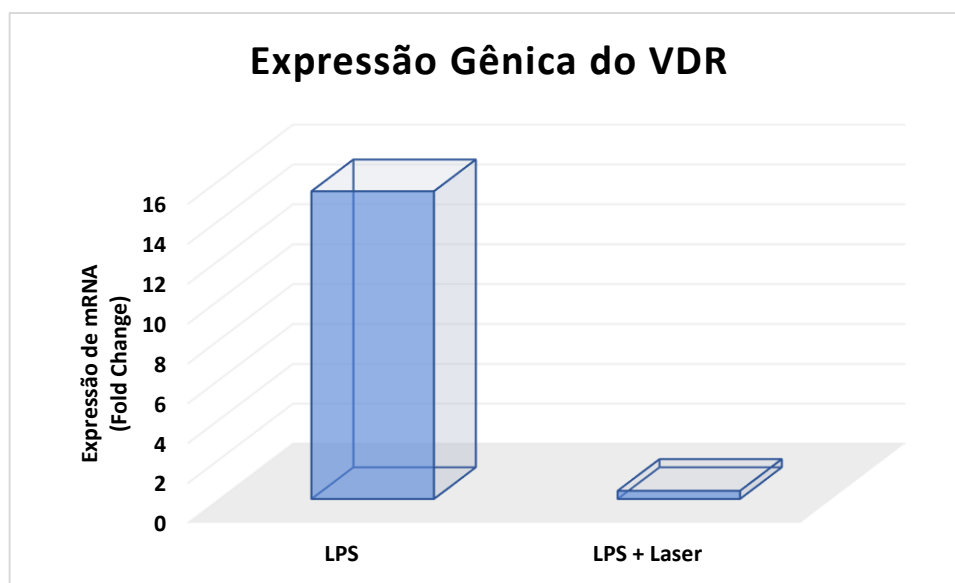


Figura 1. Análise da expressão gênica do receptor de Vitamina D (VDR), após o estímulo de células DPSCs com LPS (15,44) e após o tratamento com terapia fotodinâmica (0,41).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente momento a literatura não diz nada sobre um possível papel modulatório do laser de baixa potência sobre o gene do receptor de Vitamina D em células-tronco originadas na polpa adulta. Obviamente que esse é um resultado preliminar, mas uma modulação de 37,66x, em qualquer gene, provocada por um tratamento fotodinâmico deve, certamente, ser levado a diante. Ainda, uma vez que o VDR é responsável por todo o metabolismo intracelular da Vitamina D é de se esperar mudanças significativas em toda a cascata de Vitamina D mediadas por essa significativa redução da expressão dos genes do VDR.

REFERÊNCIAS

ARANY PR, NAYAK RS, HALLIKERIMATH S, LIMAYE AM, KALE AD, KONDAIAH P (2007) Activation of latent TGF-beta1 by low-power laser in vitro correlates with increased TGF-beta1 levels in laser enhanced oral wound healing. *Wound Repair Regen* 15(6):866– 874. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00306.x>.

BJORDAL JM, COUPPE C, CHOW RT, TUNER J, Ljunggren EA (2003) A systematic review of low-level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders. *Aust J Physiother* 49(2): 107–116.



CONLAN MJ, RAPLEY JW, COBB CM (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review. *J Clin Periodontol* 23(5):492–496. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1996.tb00580.x>.

DE LIMA FM, VILLAVERDE AB, ALBERTINI R, CORREA JC, CARVALHO RL, MUNIN E, ARAUJO T, SILVA JA, AIMBIRE F (2011) Dual effect of lowlevel laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: action on anti- and proinflammatory cytokines. *Lasers Surg Med* 43(5):410–420. <https://doi.org/10.1002/lsm.2105>.

FENG R, LENGNER C, Application of stem cell technology in dental regenerative medicine. *Adv*.

GHANAAT M (2010) Types of hair loss and treatment options, including the novel low-level light therapy and its proposed mechanism. *South Med J* 103(9):917–921.

GRAVES DT, OATES T, GARLET GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011; 3.

JIANG W, NI L, SLOA A, SONG B, Tissue engineering and regenerative medicine, from and beyond the dentistry. *Dentistry* 2005;5;306.

KARAPANOU V, KEMPURAJ D, THEOHARIDES TC. Interleukin-8 is increased in gingival crevicular fluid from patients with acute pulpitis. *J Endod*. 2008; 34: 148–151. doi: 10.1016/j.joen.2007.10.022 PMID: 18215670.

KELLER JF, CARROUEL F, STAQUET MJ, KUFER TA, BAUDOUIN C, MSIKA P, et al. Expression of NOD2 is increased in inflamed human dental pulps and lipoteichoic acid-stimulated odontoblast-like cells. *Innate Immun*. 2011; 17: 29–34. doi: 10.1177/1753425909348527 PMID: 19880660.

LUBART R, EICHLER M, LAVI R, FRIEDMAN H, SHAINBERG A (2005) Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg* 23(1):3–9. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.3>.

SAKURAI Y, YAMAGUCHI M, ABIKO Y (2000) Inhibitory effect of lowlevel laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci* 108(1):29–34.

STAQUET MJ, CARROUEL F, KELLER JF, BAUDOUIN C, MSIKA P, BLEICHER F, et al. Pattern-recognition receptors in pulp defense. *Adv Dent Res*. 2011; 23: 296–301. doi: 10.1177/0022034511405390 PMID: 21677082.

YU HS, WU CS, YU CL, KAO YH, CHIOU MH (2003) Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J Invest Dermatol* 120(1):56–64. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12011.x>.