

## **AVALIAÇÃO DO EFEITO DO LASER DE BAIXA INTENSIDADE NA EXPRESSÃO DE MOLÉCULAS MARCADORAS DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA NAS CÉLULAS TRONCO DA POLPA DENTAL.**

Elaine Araujo da Rocha<sup>1</sup>, Marcela Maciel Palacio Alvarez, Ivarne Tersariol<sup>3</sup>, Fábio Dupart Nascimento<sup>4</sup>

1. Estudante do curso de Odontologia; e-mail: nani.wil@hotmail.com
2. Estudante do curso de Odontologia; e-mail: mpalvarez.marcela@gmail.com
3. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ivarne.tersariol@gmail.com
4. Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: fdnascimento@gmail.com

Área de conhecimento: **Biologia Molecular**

**Palavras-chave:** Laser; inflamação; células tronco; polpa.

### **INTRODUÇÃO**

A Terapia a laser de baixa intensidade (LLLT), também conhecida como fotobiomodulação (PBM), teve seus primórdios na década de 1960 e utilizaram a luz como um fator estimulante. A NASA, foi a primeira a utilizar a fotobiomodulação com a intenção de acelerar a cicatrização de ferimentos no espaço. No entanto, existem uma variedade de tipos de tratamento em que o laser vem ganhando expressiva importância e participação, incluindo cicatrização de ferimentos, antibióticos, anti-inflamatórios, na imunidade e vitiligo. Vários estudos mostraram que PBM pode diminuir a inflamação, ensaios de PBM mostraram citocinas inflamatórias diminuídas, nos mais variados casos. Diante do exposto, faz-se necessário um estudo aprofundado que avalie molecularmente o possível papel da PBM tanto na diferenciação, quanto no processo inflamatório de células-tronco originadas da polpa dental adulta.

### **OBJETIVO**

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão de moléculas marcadoras de diferenciação celular e inflamação em células-tronco extraídas do tecido pulpar antes e após o tratamento com laser de baixa intensidade.

### **MATERIAIS E METODOS**

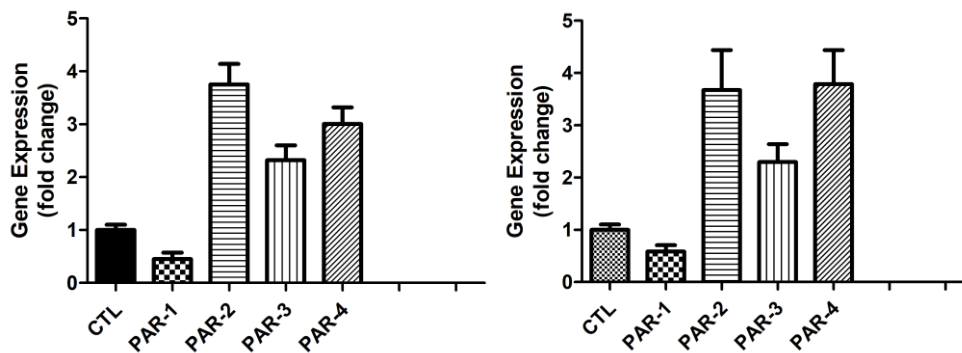
Após autorização do paciente por meio do TCLE, dentes hígidos, adultos com indicação para remoção cirúrgica foram extraídos no curso de cirurgia, na associação paulista de Cirurgiões Dentistas - APCD Em seguida, foram colocados em recipiente estéril contendo soro fisiológico, sendo posteriormente lavados com etanol 70 % e 5 vezes com tampão fosfatado de sódio (PBS) para evitar qualquer tipo de contaminação bacteriana provenientes da cavidade oral. Posteriormente, o elemento dental foi cortado na região da junção esmalte-cemento, a fim de separar a coroa dentária da porção radicular e assim, acessar seu tecido pulpar que foi removido e foi transferido para um recipiente contendo solução ( $\alpha$ -MEM) sem SFB (soro fetal bovino). 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 ( $\alpha$ -MEM), contendo 10% de soro fetal bovino. Esta solução foi, então, centrifugada a 1200 rpm por 10 min, o material precipitado foi ressuspenso em meio de cultura. As células resultantes do protocolo de extração foram semeadas em placas para cultura celular, em presença de meio de cultura  $\alpha$ -MEM. Após o crescimento celular foi adicionado LPS na concentração de 10 $\mu$ g/ml ao meio de cultura com solução  $\alpha$ -MEM não suplementada por 24hs em um total de 6 poços para mimetizar a indução

de processo inflamatório em todas as culturas celulares. Logo após foi incidido o laser de baixa potência em três poços contendo a cultura celular inflamada, em modo contínuo utilizando potência de 100mW, comprimento de onda de 808nm e doses de 6J (100mW x 60 segs.) E as células foram colocadas em estufa de dióxido de carbono durante 4 horas. Logo após, foi realizado a extração do RNA por meio do kit RNeasy Mini Kit, e sua quantificação por espectrofotometria. Dessa forma, com uma concentração adequada de RNA puro, foi possível obter o cDNA por transcrição reversa usando RT2 First Strand kit, onde foi obedecido um protocolo, e entcom cDNA foi feito uma análise da expressão de genes marcadores da inflamação por meio do kit O RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR array.

**RESULTADOS**

- **Expressão gênica dos receptores PARs**

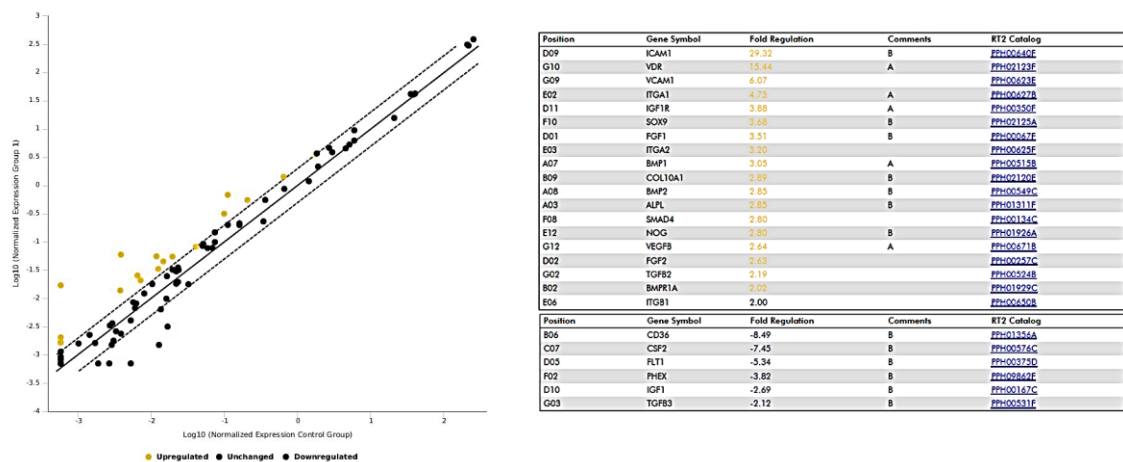
As variações na expressão gênica dos PARs-1, 2, 3 e 4 foi avaliada após o tratamento das células induzidas por LPS quanto aos efeitos da fotobioestimulação com laser nas potências de 1 e 3J, respectivamente (Figuras 3 e 4).



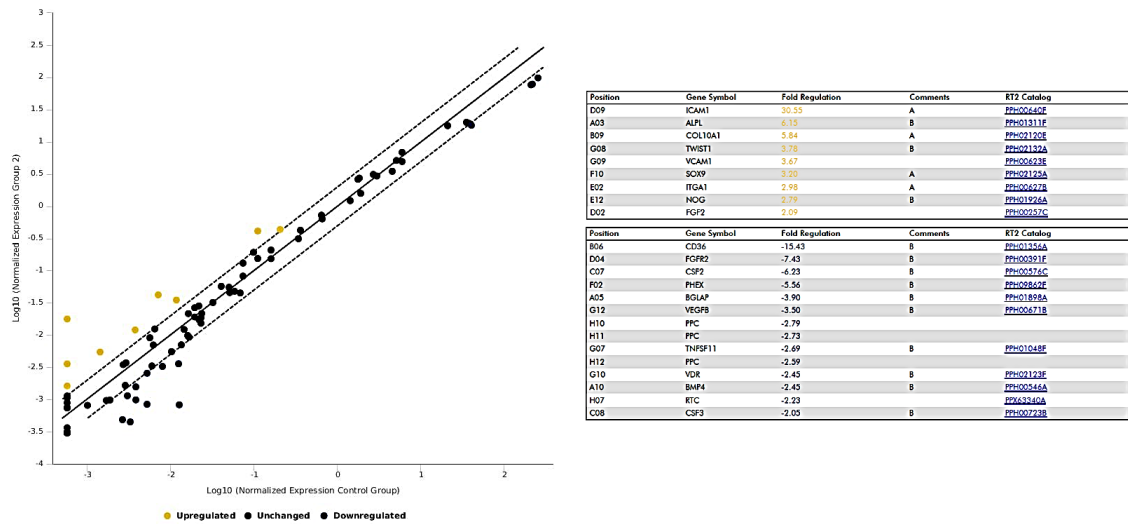
**Figura 1.** Expressão gênica dos receptores PARs após tratamento com laser 1J e 3J de potência em comparação com o controle, não tratado.

- **Análise de dispersão da expressão dos genes**

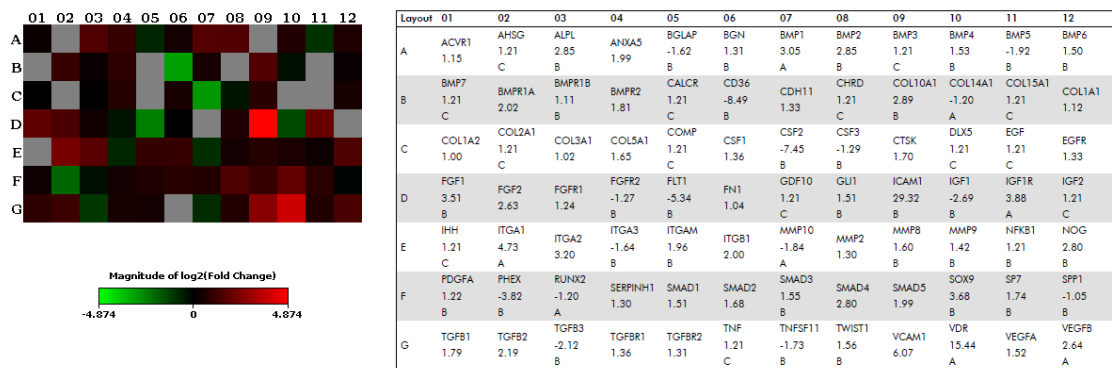
O gráfico de dispersão compara a expressão normalizada de cada gene no *array* entre os dois grupos selecionados. A linha central indica o gene inalterado e, as linhas pontilhadas indicam o limite de regulação.



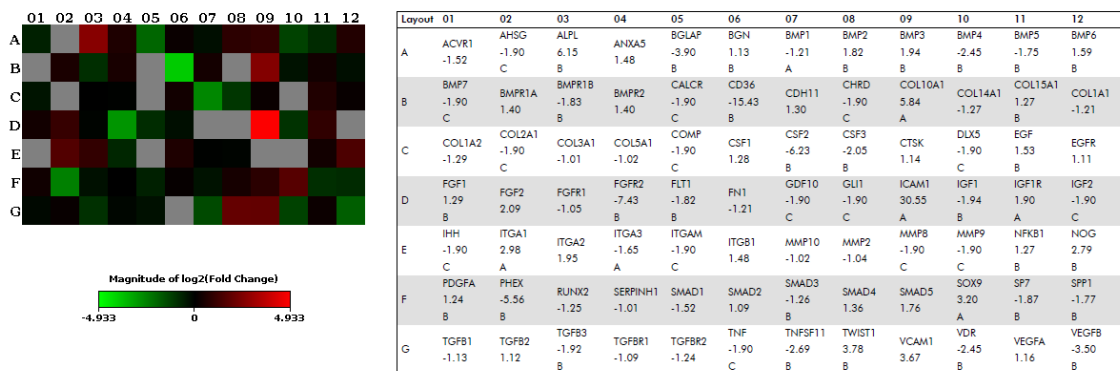
**Figura 2: Análise da expressão gênica após ativação com LPS.** Gráfico de dispersão (esquerda) e Tabela (direita) com os respectivos valores de variação da expressão dos genes envolvidos na inflamação. Variações positivas estão apresentadas em amarelo e negativas em azul. Genes que não modularam estão representados apenas no gráfico e em preto.



**Figura 3: Análise da expressão gênica após ativação com LPS e tratamento com laser de baixa intensidade.** Gráfico de dispersão (esquerda) e Tabela (direita) com os respectivos valores de variação da expressão dos genes envolvidos na inflamação. Variações positivas estão apresentadas em amarelo e negativas em azul. Genes que não modularam estão representados apenas no gráfico e em preto.



**Figura 4: Heat Map do grupo LPS e tabela com os valores da expressão de cada gene.**



**Figura 5: Heat Map do grupo LPS+Laser (6J) e tabela com os valores da expressão de cada gene.**

## CONCLUSÕES

A fotobiomodulação é uma área de pesquisa nova em nosso grupo e os resultados obtidos até o momento são altamente promissores. Esta é a primeira vez que se estuda um possível papel modulador do laser na expressão dos receptores da família PAR. Os PARs, sabidamente, participam como receptores mediadores de respostas inflamatórias, seja ele ativando ou inibindo tal processo. Os resultados apresentados nas figuras 8 e 9 mostram claramente um aumento da expressão do PAR-2, que é um receptor, canonicamente, ativado por tripsina. Diferentemente do esperado, o PAR-1 parece não ser afetado pela incidência do laser, mesmo sendo o receptor mais expressivo quantitativamente de toda a família. A terapia com laser de baixa potência, indiscutivelmente, foi capaz de modular a expressão de vários genes que se alteraram durante o estímulo inflamatório, como o colágeno 10A1, que teve sua expressão aumentada em 100% após o tratamento com o laser. Uma vez que o colágeno é uma molécula chave na remodelação tecidual, bem como no reparo, podemos concluir que o laser, além de inibir o processo inflamatório, também induz uma neoformação tecidual, altamente desejada. Ainda, no grupo dos FGFs todos os genes avaliados sofreram modulações após a laserterapia: O FGF1 teve sua expressão diminuída em 2,72 vezes, o FGF2 diminuição de 1,26 vezes, o FGFR1 passou de 1,24 para -1,05, uma diminuição de mais de 100% na expressão, enquanto o FGFR2 foi de -1,27 para -7,34, quedas consideráveis na expressão de moléculas importantes no processo inflamatório que foram moduladas negativamente após o tratamento com o laser. Os mesmos resultados podem ser observados para o grupo dos genes SMAD. As SMAD compreendem uma família de proteínas estruturalmente semelhantes que são os principais transdutores de sinal para receptores da superfamília do TGF- $\beta$ , que são moléculas importantes na regulação do desenvolvimento e crescimento celular. Nossos experimentos mostram que as SMADs 1 a 5 tiveram, todas, as suas expressões reguladas negativamente.

## REFERÊNCIAS

- BJORDAL, JM; COUPPE, C; CHOW, RT; TUNER, J; Ljunggren, EA. **A systematic review of low level laser therapy with location-specific doses for pain from chronic joint disorders.** Aust J Physiother. v.49, n.2, p.107–116. 2003. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12775206>. Acesso em: 12 de maio 2019.
- CONLAN, MJ; RAPLEY, JW; COBB, CM. **Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review.** J Clin Periodontol. v.23, n.5, p.492–496.1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1996.tb00580.x>. Acesso em: 12 de maio 2019.
- GHANAAT, M. **Types of hair loss and treatment options, including the novel low-level light therapy and its proposed mechanism.** South Med J. v.103, n.9, p.917–921. Sep. 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20689478>. Acesso em: 12 maio 2019.
- TURRIONI, AP; MONTORO, LA; BASSO, FG; ALMEIDA, LDE F; COSTA, CA; HEBLING, J. **Dose –responses of stem cells from human exfoliated teeth to infrared LED irradiation.** Braz Dent J. v.26, n.4, p.409-415. 2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-64402015000400409&script=sci\\_abstract&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-64402015000400409&script=sci_abstract&tlng=en) Acesso em: 6 maio 2019.
- YU, HS; WU, CS; YU, CL; KAO, YH; CHIOU, MH. **Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo.** J Invest Dermatol. v.120, n.1,p. 56–64. 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12011.x>. Acesso em: 12 março 2019.