

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO DA *LOW-LEVEL LASER THERAPY* NA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRPA1 E
TRPM8 EM RATOS COM HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA**

FERNANDA KABADAYAN DIAS

SÃO PAULO

2017

UNIVERSIDADE PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**EFEITO DA LOW-LEVEL LASER THERAPY NA EXPRESSÃO GÊNICA DE TRPA1 E
TRPM8 EM RATOS COM HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora:
Prof^a Dr^a Cintia Helena Coury Saraceni

FERNANDA KABADAYAN DIAS

SÃO PAULO

2017

RESUMO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi analisar a expressão gênica de TRPA1 e TRPM8 em ratos com hipersensibilidade dentinária (HD), bem como o efeito do tratamento com *Low level laser therapy* (LLLT) sobre a expressão desses genes. O estudo foi dividido em duas partes:

Parte 1: O objetivo desta etapa foi avaliar a relação entre a HD e a expressão de TRPA1 e TRPM8, em ratos, por meio de PCR real time. Foram utilizados 40 ratos, Wistar, machos, adultos (n total = 40), divididos aleatoriamente em dois grupos, que receberam os seguintes tratamentos por 30 dias: GC (água filtrada, n = 20) e GH (bebida ácida, *ad libitum* para indução de HD -n= 20). A superfície vestibular dos molares inferiores direitos foi periodicamente estimulada com água a 15 graus, por 5 segundos nos dias 15, 22, 24, 26, 28 e 30 de tratamento. O grau de dor recebeu os escores de 0 a 3. Após a eutanasia, os elementos dentais do lado direito foram seccionados na altura da junção cimento esmalte e as coroas dentais foram armazenadas em solução estabilizadora de RNA (RNAlater) até o momento de sua manipulação, quando foi realizada a extração de RNA total e a síntese do cDNA. Os *primers* para GAPDH (gene de referência), TRPA1 e TRPM8 foram desenhados e a quantificação dos genes foi realizada por meio de RT-PCR. Para a confirmação da exposição tubular, as porções coronárias dos molares esquerdos dos dois grupos foram preparadas para análise em microscópio eletrônico de varredura. As análises estatísticas foram ($p < 0,05$): Dor ao longo do tempo: teste de Friedman; escore de dor entre os grupos, dentro de cada tempo: teste de Mann-Whitney; comparação da expressão gênica em relação aos diferentes grupos: Teste de Mann-Whitney; relação entre os TRPs A1 e M8: correlação de Pearson; relação grau de dor e expressão gênica nos diferentes grupos: correlação de Spearman. Para a variável dor, os resultados demonstraram que houve um aumento significante no grau de dor para o GH enquanto que não houve diferença ao longo do tempo para o GC. As imagens em MEV apresentaram em GH, exposição de túbulos compatível com o grau de dor, enquanto GC, apresentou camada de *smear layer* e túbulos obliterados. Para a variável TRP, verificou-se um aumento estatisticamente significante na expressão gênica de TRPA1 e TRPM8 em GH quando comparado com GC. A partir dos resultados, pôde-se concluir que a hipersensibilidade dentinária é capaz de alterar a expressão gênica desses receptores.

Parte 2: O objetivo desta etapa foi avaliar o efeito da fotobiomodulação nos genes TRPA1 e TRPM8 em ratos com HD, tratados com LLLT. Foram utilizados 38 ratos, Wistar, machos (n total = 38), divididos aleatoriamente em 4 grupos que receberam por 30 dias os seguintes tratamentos: GC - Grupo Controle (mandíbula direita, n = 19): água filtrada; GL - Grupo Laser (mandíbula esquerda, n = 19): água filtrada + LLLT; GH - Grupo Hipersensibilidade (mandíbula direita, n = 19): bebida ácida, *ad libitum*, para indução de HD; GHL - Grupo hipersensibilidade laser (mandíbula esquerda, n = 19): bebida ácida + LLLT. Os grupos GL e GHL receberam irradiação com Laser de ArGaAl (780-830nm - E = 0.5J; t = 7s; D = 18J/cm²; P = 70mW.), no molar inferior esquerdo, aos dias 24, 26 e 28 de tratamento. A superfície vestibular dos molares inferiores foi periodicamente estimulada com água a 15 graus, por 5 segundos, seguido de teste de dor, realizado nos dias 15, 22, 24, 26, 28 e 30. Nos dias em que houve LLLT (24, 26 e 28), foram realizados testes em baseline e imediato. Após a eutanásia, os elementos dentais foram armazenados em solução estabilizadora de RNA (RNA_{later}) até o momento de sua manipulação, quando foi realizada a extração de RNA total e a síntese do cDNA. Os primers para GAPDH, TRPA1 e TRPM8 foram desenhados e a quantificação dos genes foi realizada por meio de RT-PCR. Análises estatísticas ($p < 0,05$): grau de dor ao longo do tempo: teste de Friedman; comparação intra-grupos, dentro de cada tempo e comparação dos lados (GL e GHL): Wilcoxon; comparação inter-grupos: Mann-Whitney; comparação da expressão gênica em relação aos diferentes grupos (GC e GH): Mann-Whitney. Os animais com HD apresentaram escores elevados de dor em comparação aos grupos água. O lado irradiado (GHL) apresentou menores escores quando comparado ao lado não irradiado (GH) no imediato, tanto no 24º dia ($p=0,014$) quanto no 26º ($p=0,002$). A partir do 28º dia, o GHL apresentou menores valores de dor em ambos os tempos (baseline e imediato). Foram verificados maiores níveis na expressão de ambos os receptores nos grupos com HD (GH e GHL), independente da irradiação. Concluiu-se que o laser foi eficaz na redução da dor, mas não modulou a expressão gênica dos TRP's A1 e M8, não sendo possível estabelecer uma correlação entre a diminuição da dor e a expressão dos TRPs.

PALAVRAS-CHAVE: TRPA1, TRPM8, LLLT, HIPERSENSIBILIDADE DENTINÁRIA

INTRODUÇÃO GERAL

A dor é uma condição patológica passível de incapacitar o indivíduo e gerar à sociedade problemas físicos e emocionais [1]. Em razão disso, a literatura busca compreender os mecanismos envolvidos na transmissão do sinal doloroso de forma a desenvolver novas estratégias de tratamento e assim colaborar com a melhor qualidade de vida dos pacientes [2]. Dentro da Odontologia, a hipersensibilidade dentinária (HD) é uma das doenças que acarretam inúmeros prejuízos aos indivíduos e cujo mecanismo de dor é desconhecido.

A HD é definida como uma dor aguda e intensa proveniente de estímulos que podem ser químicos, térmicos ou táteis, em razão da exposição tubular. Essa doença é comumente diagnosticada na Clínica Odontológica. Segundo Yoshizaki *et al.*, 2017, um a cada dois pacientes (51.7%) apresentam esses sintomas e apesar de sua grande prevalência e dos inúmeros tratamentos propostos para este fim, há um alto índice de insucesso na resolução da dor. Lutskaia, Zinovenko e Kovalenko, afirmaram em 2015 que a faixa etária da população mais afetada é a de 25-34 anos e ainda que em 74.1% dos casos, há sinais de lesões cervicais não cariosas associadas a este problema.

Gysi (1900) afirmou que essa dor era resultante do movimento de fluídos nos túbulos dentinários [5]. Sessenta e sete anos mais tarde, Brännström M. propôs a "teoria hidrodinâmica". Segundo ele, os estímulos podem induzir a movimentação do fluido excitando mecanoceptores na periferia da polpa e causando dor. De acordo com esta teoria, se o movimento ocorrer de forma rápida, o deslocamento do conteúdo tubular pode produzir deformação das fibras nervosas na polpa ou pré-dentina ou danificar as células odontoblásticas. Em 1994, Nähri *et al* sugeriram que a percepção da dor estaria diretamente relacionada com a estimulação dos nervos dentro da polpa por meio de corrente elétrica. No entanto, descobriu-se mais tarde que as células odontoblásticas são incapazes de realizar sinapses, sendo assim impossível a transmissão do estímulo por essa via.

Ao longo dos últimos anos, a literatura têm sido unânime em aceitar uma nova hipótese para explicar a transmissão dessa dor, a teoria do odontoblasto transdutor. Chung *et al.*, 2013 afirmaram que os odontoblastos são capazes de responder à dor, levando à liberação de íons K⁺, o que despolarizaria a membrana celular, e assim, geraria a

transmissão dos impulsos nervosos. Apesar das novas considerações, não há na literatura a elucidação do mecanismo da HD, tornando ainda mais difícil a resolução deste problema, Shibukawa *et al.*, 2015 e Tsumura *et al.*, 2012 concordam em afirmar que a dor decorrente da HD não está totalmente esclarecida. Restam dúvidas se, frente às alterações térmicas e/ou mecânicas, que levam à movimentação de fluido dentinário, há uma mecano-transdução direta pelos neurônios ou se células, como os odontoblastos, poderiam contribuir para o processo sensorial.

Em 2003, Magloire *et al.*, sugeriram que os odontoblastos são capazes de expressar canais iônicos comumente encontrados nos neurônios sensoriais. Egbuniwe *et al.*, 2014 identificaram em odontoblastos a super-família dos TRPs (transient receptor potential), canais iônicos que participam do processo de transdução e que se expressam de diferentes formas, como por exemplo pela variação de temperatura. Essa super família se diferencia das demais pela seletividade de íons, modo de ativação e função fisiológica [2]. Yeon *et al.*, 2009 afirmaram que os genes TRPA1 (anquirina) e TRPM8 (melastatina) são expressos em temperaturas abaixo de 17º e 25º, respectivamente.

Esses receptores estariam diretamente ligados às fibras sensoriais responsáveis pela transmissão de substâncias relacionadas à dor, como as fibras C e A δ , e transformação de estímulos provenientes de outras origens como o térmico, em elétrico, estando, dessa forma, diretamente relacionados à transmissão do sinal doloroso [2]. A partir dessa descoberta, seria de grande importância avaliar a relação desses genes com a HD, uma vez que estes poderiam vir a ser um dos receptores responsáveis pela transmissão da dor e, assim sugerir uma proposta de tratamento para HD que se baseasse na modulação da expressão desses mesmos genes. Todas as propostas de tratamento sugeridas na literatura consistem na obliteração total ou parcial dos túbulos, com excessão ao laser de baixa potência (Low Level Laser Therapy).

Dentre os lasers de baixa potência, um dos mais indicados na literatura para o tratamento da HD é o laser de diodo de Arseneto de Gálio-Alumínio (780-830nm) [13]. Apesar da sua ampla utilização, não há consenso com relação aos parâmetros ideais de aplicação, assim como quanto ao mecanismo de resolução da dor, ou ainda se há alguma interação com canais iônicos. A laserterapia pode resultar em ação analgésica, anti-inflamatória e biomoduladora [14], podendo alterar, de alguma forma, a expressão dos genes receptores. Se a hipótese de uma correlação entre o laser e a resposta

gênica for comprovada, será possível afirmar que a melhora da dor pode estar relacionada com a biomodulação dos receptores em questão.

Uma vez que a expressão dos genes TRPA1 e TRPM8 pode estar associada ao mecanismo e/ou à transmissão da HD, objetivamos nessa pesquisa analisar esta correlação e também avaliar a ação do LLLT na modulação da expressão gênica desses receptores.

CONCLUSÃO GERAL

1. Houve aumento na expressão gênica de TRPA1 e TRPM8 nos ratos com HD, concluindo-se que a hipersensibilidade dentinária é capaz de alterar a expressão gênica desses receptores.
2. O laser foi eficaz na redução da dor, mas não modulou a expressão gênica dos TRP's A1 e M8 nos grupos com HD não sendo possível estabelecer uma correlação entre a diminuição da dor e a expressão dos TRPs.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

1. Basbaum AL, Bautista DM, Scherrer G e Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell.* 2009;139:267-82.
2. Costa DSM. Envolvimento do receptor de potencial transitório A1 (TRPA1) na manutenção da hiperalgesia mecânica e térmica (frio) na inflamação persistente. Florianópolis, 2010.
3. Yoshizaki KT, Franscisconi-Dos-Rios LF, Sobral MAP, Aranha ACC, Mendes FM e Scaramucci T. Clinical features and factors associated with non carious cervical lesions and dentin hypersensitivity. *Journal of Oral Rehabilitation.* 2017;44:112-8.
4. Lutskaia IK, Zinovenko OG e Kovalenko IP. Epidemiology of teeth hypersensitivity. *Stomatologiiia.* 2015;94(3):12-5.
5. Brännström M. Etiology of dentin hypersensitivity. *Proc Fin Dent Soc.* 1992;88(1):7-13.
6. Närhi M, Yamamoto H, Ngassapa D, Hirvonen T. The neurophysiological basis and the role of inflammatory reactions in dentine hypersensitivity. *Arch Oral Biol.* 1994;39:23S-30S.
7. Chung G, Jung SJ e Oh SB. Cellular and Molecular Mechanisms of Dental Nociception. *J Dent Res.* 2013; 92(11):948-55.
8. Shibukawa Y, Stao M, Kimura M, Sobhan U, Shimada M, Nishiyama A *et al.* Odontoblasts as sensory receptors: transient receptor potential channels, pannexin-1, and ionotropic ATP receptors mediate intercellular odontoblast-neuron signal transduction. *Pfluger Arch.* 2015;467(4):843-63.
9. Tsumura M, Sobhan U, Sato M, Shimada M, Nishiyama A, Kawaguchi A *et al.* Functional Expression of TRPM8 and TRPA1 Channels in Rat Odontoblasts. *Plos one.* 2013;8(12):e82233.

10. Magloire H, Lesage F, Couble ML, Lazdunski M, Bleicher F. Expression and localization of TREK-1 K⁺ channels in human odontoblasts. *J Dent Res.* 2003; 82(7):542-5.
11. Egbuniwe O, Grover S, Duggal AK, Mavroudis A, Yazdi M, Renton T *et al.* TRPA1 and TRPV4 Activation in Human Odontoblasts Stimulates ATP Release. *J Dent Res.* 2014; 93(9):911-7.
12. Yeon KY, Chung G, Shin MS, Jung SJ, Kim JS e Oh SB. Adult Rat Odontoblasts Lack Noxious Thermal Sensitivity. *J Dent Res.* 2009; 88(4):328-32.
13. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R e Monaco A. Lasers for the Treatment of Dentin Hypersensitivity: A Meta-analysis. *J Dent Res.* 2013; 92(6):492-9.
14. de-Melo MAS, Passos VF, Alves JJ, Barros EB, Santiago SL, Rodrigues KA. The effect of diode laser irradiation on dentin as a preventive measure against dental erosion: an in vitro study. *Lasers in Medical Science.* 2011; 26:615.