

EFEITOS DA LEDTERAPIA SOBRE A METILAÇÃO GLOBAL DO DNA E A EXPRESSÃO DO GENE *Dnmt3a* EM MODELO DE CICATRIZAÇÃO EPITELIAL EM RATOS

Marcelo Henrique Ferreira Manfredo (PIBIC/CNPq-UNOPAR), e-mail: marcelomanfredo@gmail.com.

Marcus Vinícius de Matos Gomes (Orientador), e-mail: mvmgomes@gmail.com.

Universidade Norte do Paraná (UNOPAR) / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS

Área do conhecimento: Genética

Introdução

Com o conhecimento de que existe um mecanismo fotobiológico universal da ação da luz sobre as células, mais especificamente em enzimas terminais da cadeia respiratória, na mitocôndria, iniciou-se o desenvolvimento da terapia com lasers de baixa potência (LLLT – *Low-Level Laser Therapy*) (MARQUES, 2004).

O laser possui três características principais: monocromaticidade, coerência e colimação (LOW, 2001), sendo que apenas a monocromaticidade (capacidade de emitir luz com baixa variação no comprimento de onda) apresenta papel vital na LLLT, conforme dados da literatura, onde a utilização de um comprimento de onda não delimitado mostrou-se menos eficiente do que aqueles com comprimento de onda específicos (KARU, 1987). Sabe-se atualmente que, devido à composição dos tecidos, quanto maior o comprimento de onda emitido, mais superficial é sua ação (AHMED *et al.*, 2013). As outras duas características não apresentam papel tão crucial já que são rapidamente degradadas pelo espalhamento do feixe ao penetrar o tecido (NICOLA, 1994). Assim, começou-se o trabalho com fontes emissoras de luz não coerentes, como os diodos emissores de luz (LED – *Light Emitting Diodes*), que são dispositivos mais baratos, de mais fácil manuseio, que operam com correntes elétricas mais baixas e que possuem ação biomédica semelhante aos lasers (PURÓN *et al.*, 2001).

A fotoestimulação causada pela irradiação por LEDs ou lasers de baixa potência causam eventos cruciais para a cicatrização de feridas (VINCKY *et al.*, 2003; BAROLET, 2008). Estudos *in vitro* tem demonstrado que a aplicação da LLLT pode ter influência no processo celular incluindo alteração na síntese de DNA (BYRNES *et al.*, 2005; SAFAVI *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009), produção de proteína (SAYGUN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009) e estimulação da proliferação (WEBB; DYSON, 2003; WU; PERSINGER, 2011; ALEKSIC *et al.*, 2010; ALGHAMDI *et al.*, 2012) e diferenciação (HOU *et al.*, 2008; BOUVET-GERBETTAZ *et al.*, 2009; LI; LEU; WU, 2010) celular, sugerindo a possibilidade de uma inter-relação entre a fotoestimulação e mecanismos epigenéticos de controle da expressão gênica.

Definem-se como epigenéticos os mecanismos capazes de controlar a atividade e a expressão genica nas células, sem que a sequência do DNA seja modificada. Entre as

principais modificações epigenéticas conhecidas, incluem-se a metilação do DNA e as modificações pós-traducionais de histonas (JONES; TAKAI, 2001; JENUWEIN; ALLIS, 2001). A metilação do DNA consiste na adição de um radical metil (CH_3) no carbono 5 de citosinas geralmente seguidas de guaninas (dímeros CpG) por ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs) (JONES; TAKAI, 2001).

Acredita-se que fatores externos possam modular a programação epigenética e atuarem como importantes alternativas terapêuticas (GOMES; PELOSI, 2013), no entanto, ainda não há evidências na literatura no que diz respeito ao potencial da LEDterapia em modular estes padrões epigenéticos.

Sabe-se que a aplicação do LED como recurso terapêutico vem se ampliando na última década e, estudos recentes demonstraram fortes evidências de que a eficiência dos LEDs em processo de fotoestimulação é semelhante à dos lasers de baixa potência – terapia LLLT (CORAZZA, 2005).

Testes clínicos com a aplicação de LEDs em cicatrização de úlceras em seres humanos já foram liberados pela FDA (*Food Drug Administration*) (DIAS et al., 2009), e trabalhos recentes demonstraram a eficiência deste recurso para o tratamento de diversos tipos de úlceras (ANDERS et al., 2008; CORAZZA, 2005). Assim, torna-se importante investigar os meios pelos quais a cicatrização ocorre, especialmente os mecanismos epigenéticos envolvidos, levando à explicação dos efeitos benéficos da LEDterapia.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi de verificar o envolvimento da metilação global do DNA e da expressão do gene *Dnmt3a* com os efeitos induzidos pela LEDterapia em modelo experimental *in vivo* de cicatrização epitelial em ratos.

Material e Métodos

Foram utilizados 15 ratos Wistar, com peso médio de 250 g, divididos em três grupos: grupo 1: animais submetidos à excisão e expostos à irradiação de 4J ($0,8\text{J}/\text{cm}^2$) de LED; grupo 2: animais submetidos à excisão e expostos à irradiação de 8J ($1,6\text{J}/\text{cm}^2$) de LED e; grupo controle (CTL): animais submetidos apenas à excisão, sem qualquer ou intervenção pós-cirúrgica. Para a realização da excisão, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 0,25 g/kg. Após prévia depilação na região dorsal, foi demarcada uma área circular com dois centímetros de diâmetro e excisado, com o auxílio de um bisturi, até a exposição da fáscia muscular.

Foi utilizado um aparelho com LEDs com emissão na faixa do vermelho (604 nanômetros), com spot de 5 cm de diâmetro, de luz contínua, posicionado a uma distância de um centímetro da lesão e mantido por tempo suficiente para a obtenção da dose correspondente para cada grupo: 170 segundos para o grupo 1 e 340 segundos para o grupo 2. As irradiações ocorreram todos os dias, durante 7 dias.

Com os animais anestesiados, foram obtidas fotografias das lesões com máquina digital, considerando como norteador de tamanho um fragmento de papel de 1cm^2 , o qual foi

colocado ao lado da lesão no momento da fotografia. A mensuração da área da lesão ocorreu no primeiro e último dia do experimento.

As imagens foram avaliadas com auxílio do software Image J 1.49, sendo a área expressa em cm^2 .

As células epiteliais contidas na superfície da lesão foram removidas, com auxílio de um bisturi, no oitavo dia de experimento (um dia após o término do período das irradiações com LED) para a obtenção de DNA e RNA para as análises moleculares.

O DNA foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e a análise da metilação global do DNA realizada a partir do *Imprinting Methylated DNA Quantification kit* (Sigma Aldrich®). O RNA foi obtido pelo método do Trizol (*Invitrogen*®) e a síntese de cDNA realizada com o *High Capacity kit* (*Applied Biosystems*®).

A expressão quantitativa do gene *Dnmt3a* foi avaliada por PCR em tempo real, utilizando o sistema de detecção Taqman (*Applied Biosystems*®) e o gene *Gapdh* como controle endógeno.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software *GraphPadPrism* 5.0, sendo empregados os testes *T-student* e *Kruskal-Wallis* (pós-teste de Dunn), considerando-se um nível de significância de 95% para todos os testes empregados.

Resultados e Discussão

Uma diferença estatisticamente significativa da área da lesão foi observada quando comparados os grupos CTL ($p=0,003$), 1 ($p=0,0083$) e 2 ($p<0,001$) confirmando que a diminuição da área da lesão está ocorrendo normalmente no processo de cicatrização tecidual do modelo experimental em ratos. Quando considerado o delta da variação da área da lesão entre os grupos, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos CTL *versus* 2 ($p=0,0181$). Esses dados demonstram que a dose de $1,6 \text{ J/cm}^2$ apresenta maior eficiência que a de $0,8 \text{ J/cm}^2$ no que diz respeito à potencialização da velocidade de cicatrização.

Trabalhos recentes têm demonstrado a eficiência do LED, em diferentes doses, no aumento da velocidade de cicatrização epitelial em ratos (NOGUEIRA *et al.*, 2014; MIN; GOO, 2013).

Uma diminuição estatisticamente significativa da metilação global do DNA foi observada nas células epiteliais adjacentes à lesão nos grupos CTL ($p=0,002$), 1 ($p=0,0012$) e 2 ($p=0,0003$) confirmando a participação dos mecanismos de metilação do DNA no processo natural de cicatrização. Quando interrogado o perfil de metilação global do DNA nas amostras submetidas à ledterapia, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os deltas de variações dos grupos CTL, 1 e 2 ($p=0,3095$). Essa evidencia sugere que as irradiações com $0,8 \text{ J/cm}^2$ ou $1,6 \text{ J/cm}^2$ de LED não afeta a metilação global do DNA nas células.

Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene *Dnmt3a* no primeiro ($p=0,0571$) e oitavo dia de experimento ($p=0,6677$).

Conclusão

Nossos dados demonstram que a diminuição da metilação global do DNA é um processo que está relacionado à cicatrização epitelial em ratos. Além disso, nossas evidências sugerem que, embora a irradiação de 1,6 J/cm² de ledterapia tenha um efeito significativo na velocidade de cicatrização epitelial, esse efeito não altera o perfil global de metilação do DNA nem a expressão do gene *Dnmt3a*.

Agradecimentos

PIBIC/CNPq; FUNADESP; CNPq.

Referências

AHMED, E.M. *et al.* Maxwell's equations-based dynamic laser-tissue interaction model. *Comput. Biol. Med.*, v.43, n.12, p.2278-86, 2013.

ALEKSIC, V. *et al.* Low-level Er: YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med. Sci.*, v.25, n.4, p.559-569, 2010.

ALGHAMDI, K.M. *et al.* Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers Med. Sci.*, v.27, n.1, p.237-249, 2012.

ANDERS, J.J. *et al.* Light supports neurite outgrowth of human neural progenitor cells in vitro: the role of P2Y receptors. *J. Selected Top. Quantum Electronics*, v.14, n.1, p.118-125, 2008.

BAROLET, D. Light-emitting diodes (LEDs) in dermatology. *Sem. Cutan. Med. Surg.*, v.27, n.4, p.227-38, 2008.

BOUVET-GERBETTAZ, S. *et al.* Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts. *Lasers Surg. Med.*, v.41, n.4, p.291-297, 2009.

BYRNES, K. *et al.* Low power laser irradiation alters gene expression of olfactory ensheathing cells in vitro. *Lasers Surg. Med.*, v.37, n.2, p.161-171, 2005.

CHEN, C.H. *et al.* Low level laser irradiation promotes cell proliferation and mRNA expression of type I collagen and decorin in porcine achilles tendon fibroblasts *in vitro*. *J. Orthop. Res.*, v.27, n.5, p.646-650, 2009.

CHEN, C.H. *et al.* Low energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg. Med.*, v.40, n.1, p.46-54, 2008.

CORAZZA, A.V. *Fotobiomodulação comparativa entre o LASER e o LED de baixa intensidade na angiogênese de feridas cutâneas de ratos*. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia) Universidade de São Carlos. São Carlos, 2005.

GOMES M.V.; PELOSI G.G. Epigenetic Vulnerability and the Environmental Influence on Health. *Exp. Biol. Med.*, v.1, n.238, p.859-65, 2013.

HOU, J. *et al.* In vitro effects of low level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: Proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.* v.40, n.10, p.726-733, 2008.

KARU, T.I. Photobiological fundamentals of low-power therapy. *J. Quantum Electronics*, v.23, n.10, p.1703-1717, 1987.

LI, W.T.; LEU, Y.C.; WU, J.L. Red-light light-emitting diode irradiation increases the proliferation and osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Photomed. Laser Surg.*, v.28, n.S1, p.S-157-S-165, 2010.

LOW, J.; REED, A. *eletroterapia explicada princípios e prática*. São Paulo: Manole, 2001.

MARQUES, C.R.S. *Análise evolutiva da cicatrização em úlceras: LEDterapia e oxigenoterapia hiperbárica*. 2004. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – UNIVAP. São José dos Campos, 2004.

MIN, P.K.; GOO, B.L. 830 nm light emitting diode low-level light therapy (LED-LLLT) enhances wound healing: a preliminary study. *Laser Ther.*, v.22, n.1, p.43-49, 2013.

NOGUEIRA, V.C. *et al.* Biomodulation effects of LED and therapeutic ultrasound combined with semipermeable dressing in the repair process of cutaneous lesions in rats. *Acta Cir. Bras.*, v.29, n.9, p.588-95, 2014.

PURÓN, E. *et al.* Equipo de terapia en base a diodos emisores de luz infrarrojos. II CONGRESO LATINOAMERICANO DE INGENIERIE BIOMÉDICA, 2. 2001. Habana, Cuba. 2001.

SAFAVI, S.M. *et al.* Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1beta, TNFalpha, IFN-gamma, TGF-beta, bFGF, and PDGF in rat's gingiva. *Lasers Med. Science*, v.23, n.3, p.331-335, 2008.

SAYGUN, I. *et al.* Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med. Sci.*, v. 23, n. 2, p. 211-215, 2008.

VINCK, E. *et al.* Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiations. *Lasers Med. Sci.*, v. 18, n. 95, 2003.

WEBB, C.; DYSON, M. The effect of 880 nm low-level laser energy on human fibroblast cell numbers: a possible role in hypertrophic wound healing. *J. Photochem. Photobiol.*, v.70, n.1, p.39-44, 2003.

WU, H.P.P.; PERSINGER, M.A. Increased mobility and stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* induced by 880 nm light emitting diode. *J. Photochem. Photobiol.*, v.102, n.2, p.156-160, 2011.