



MARCELA EMÍLIO DE ARAÚJO

**EFEITO DO DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) DE
ALTA POTÊNCIA SOBRE A RETINA DE RATOS**

**NATAL/RN
2018**

MARCELA EMÍLIO DE ARAÚJO

EFEITO DO DIODO EMISSOR DE LUZ (LED) DE ALTA POTÊNCIA SOBRE A RETINA DE RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva.

Orientador: Prof. Dr. Sergei Godeiro Fernandes Rabelo Caldas
Coorientador: Prof. Dr. Ruthnaldo Rodrigues Melo de Lima

Natal/RN
2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN
Sistema de Bibliotecas - SISBI
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Alberto Moreira Campos -
Departamento de Odontologia

Araújo, Marcela Emílio de.

Efeito do diodo emissor de luz (LED) de alta potência sobre a retina de ratos / Marcela Emílio de Araújo. - Natal, 2019.
52 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Sergei Godeiro Fernandes Rabelo Caldas.
Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós - Graduação em Saúde Coletiva, Natal, 2019.

1. Luzes de cura dentária - Dissertação. 2. Altas potências - Dissertação. 3. Retina - Dissertação. I. Caldas, Sergei Godeiro Fernandes Rabelo. II. Título.

RN/UF/BSO

BLACK D4

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que estiveram ao meu lado, apoiando, torcendo e contribuindo em busca de mais uma etapa de um sonho. Em especial, aos meus pais, Marcelo Emílio e Adelma Soares pelo apoio constante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao nosso **Pai todo poderoso**, por tudo o que tenho e tudo que sou. O nosso mestre da vida, razão de tudo.

Agradeço aos meus queridos pais **Marcelo Emílio** e **Adelma Soares** pelo alicerce e por nunca medirem esforços para minha educação e me apoiarem em tudo que sonhei.

Ao meu amado irmão **Arthur Emílio**, por ser minha inspiração diária e por sempre me fazer acreditar na realização dos sonhos.

Ao meu noivo **Rafael Mariz**, meu companheiro, obrigada por todo amor, carinho e incentivo.

A todos os meus amigos, presentes de vida, por todo apoio e amizade. Em especial, agradeço a minha amiga **Ariane Gonzaga** por todo apoio e disponibilidade; a minha amiga **Rafaela Monteiro** por todo o companheirismo diário durante essa trajetória; a **Marina Paies** e **Ana Beatriz** por assumirem e compartilhar comigo essa pesquisa de forma tão doce e entusiasta.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sergei Rabelo**, toda a minha gratidão. Obrigada pela confiança, amizade e por sempre me fazer acreditar que somos capazes. Obrigada por todos os conselhos e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de trabalhar ao seu lado. É inspirador.

Ao meu coorientador, **Prof. Dr. Ruthnaldo Lima**, obrigada por acrescentar e contribuir de forma grandiosa para o aperfeiçoamento e realização dessa pesquisa. Agradeço toda a disponibilidade e todo o conhecimento que me foi passado.

Ao **Departamento de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte** e todos os seus funcionários. Tenho orgulho de fazer parte dessa instituição.

Ao **Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte** e seus funcionários, que também contribuíram para a execução desta pesquisa.

E a todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram na realização dessa pesquisa.

*"A razão é o passo, o aumento da ciência é o caminho,
e o benefício para a humanidade é o fim."*

(Thomas Hobbes)

RESUMO

Introdução: A evolução dos fotopolimerizadores quanto à sua potência e consequente redução do tempo clínico tem se mostrado de grande valia para a otimização da rotina de colagem de bráquetes ortodônticos. Contudo, existe uma carência na literatura do efeito desses aparelhos sobre a retina do profissional e/ou do paciente, uma vez que ambos podem receber indiretamente parte da luz refletida durante os procedimentos clínicos. **Objetivo:** Avaliar os efeitos do uso de um aparelho fotopolimerizador LED de alta potência nas retinas de ratos *Wistar*. **Material e métodos:** Seis ratos *Wistar* foram utilizados na pesquisa e suas estruturas oculares foram os objetos de estudo. Durante a fotoestimulação de cada animal, o olho direito do animal, considerado a amostra controle, foi coberto com um tampão removível em PVC, enquanto que o olho contralateral, a amostra experimental, foi exposto à luz do LED de alta potência, 3200mW/cm² (Valo Ortho - Ultradent), por 144 segundos à distância de 30cm. Os animais foram expostos ao LED três vezes durante um dia, com o objetivo de induzir possíveis alterações inflamatórias agudas na retina. Decorrido o período de sete dias após a fotoestimulação, os animais foram anestesiados, procedido à eutanásia, removidos os olhos e processados histologicamente. Em seguida, as lâminas foram digitalizadas utilizando-se uma câmera acoplada a um microscópio óptico e suas imagens analisadas estereologicamente e histomorfometricamente para aferição de parâmetros estudados da retina. **Resultados:** Houve um aumento estatisticamente significativo no volume total da retina e no volume das camadas de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear externa (CNE) e os prolongamentos de cones e bastonetes (PCB) no grupo experimental. Em relação à densidade, não houve diferença estatisticamente significativa. Entretanto, observou-se um aumento estatisticamente significativo da área nuclear das células em todas as camadas estudadas no grupo exposto à luz LED de alta potência. Além disso, observou-se células hiper Cromadas que são sugestivas de picnose. **Conclusões:** Mesmo com um protocolo agudo e curto de exposição do olho à luz LED de alta potência, houve uma alteração nas estruturas retinianas, especialmente da atividade metabólica das células fotossensíveis e neuronais, o que ressalta a necessidade de proteção durante a utilização desses aparelhos fotoativadores.

Palavras-chave: Luzes de cura dentária; Altas potências; Retina; Ratos

ABSTRACT

Introduction: The evolution of light curing units (LCU) in terms of potency and consequent reduction of clinical time have been shown to be of great value to orthodontists, regarding the routine of brackets bonding. However, there is a lack in the literature regarding the effect of these devices on the operator and/or patient retina, as both may receive indirect reflected light during procedures. **Aims:** Evaluate the effect of the use of a high potency light emitting diode-based device (LED) in the retina of *Wistar* rats. **Material and Methods:** Six *Wistar* rats were used and their ocular structures considered objects of the study. During the photostimulation of each animal, the right eye, established as the control sample, was covered with a removable PVC tampon, as the contralateral eye - experimental sample - was exposed to high potency LED light, 3200mW/cm² (Valo Ortho - Ultradent) for 144 seconds, at the distance of 30cm. Animals were exposed to LED light three times per day, aiming to induce possible acute inflammatory alterations in retina. Seven days after the first photostimulation, all rats were anesthetized and then euthanized for posterior eye removal and histological processing. The histological slides were scanned using a camera connected to an optical microscope and their images analyzed for the measurement of histomorphological and stereological parameters of the retina. **Results:** A statistically significant raise was found in the total volume of retina and in the following layers: ganglion cells layer (GCL), outer nuclear layer (ONL), inner nuclear layer (INL) and extension of cone and rods (ECR) in the experimental group. Regarding density, no statistically significant difference was observed. However, the nuclear area of the cells raised significantly in all layers analyzed after high potency LED exposure. Besides that, hyperchromic cells suggestive of pyknosis were found. **Conclusions:** Despite the short and acute protocol of eye exposure to high potency LED, a significant alteration was found, especially in the metabolic activity of photosensitive and neuronal cells. These results emphasize the importance of using eye protection during the use of these devices.

Palavras chave em Inglês: Curing Lights, High Potencies, Retina, Rats

LISTA DE FIGURAS E QUADROS

Figura 1. Estrutura interna da retina humana (Modificado de Dowling & Boycott, 1966).

Figura 2. Constituição histológica da retina.

Figura 3. Alojamento e alimentação dos animais. A) Animais mantidos em caixas de polipropileno (na proporção de 3 animais por caixa); B) Ração padrão extrusada (*ad libitum*) e água mineral natural.

Figura 4. Fotopolimerizador de luz LED (VALO[®], Ultradent).

Figura 5. Luxímetro digital. (MLM-1010, Minipa[®]).

Figura 6. Exposição a luz LED. A) Tampão de PCV, opaco, 3cm²; B) Posição do animal durante o experimento, a mão do operador mantendo o tampão em posição no olho controle e a abertura do olho experimental; C) Olho esquerdo exposto a luz.

Figura 7. Suporte de acrílico confeccionado para acoplar o aparelho de LED. A) Aparelho LED em posição; B) Distância estabelecida durante todo o experimento.

Figura 8. Eutanásia dos animais. A) Dose de Cetamina associado a Xilasina; B) Anestesia por via intraperitoneal.

Figura 9. Preparo da lâmina histológica. A) Espécimes emblocados em parafina; B) Cortes em microtomia manual; C) Fita de cortes sucessivos transferidos para o banho-maria; D) Fitas em lâminas de vidro previamente etiquetadas; E) e F) Etapas da coloração com HE.

Figura 10. Secções axiais da retina de rato do grupo controle demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume total da retina. Coloração: HE. Escala de barra: 1000 µm.

Figura 11. Secções axiais da retina de rato do grupo controle demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume total de cada camada da retina. Coloração: HE. Escala de barra: 100 µm.

Figura 12. Secções axiais da retina de rato do grupo controle demonstrando a aplicação do *grid* para a estimativa da densidade e da área nuclear. Coloração: HE. Escala de barra: 50 µm

Figura 13. Gráfico representativo dos volumes total da retina e dos volumes de suas camadas nos diferentes grupos.

Figura 14. Gráfico representativo da densidade numérica das camadas estudadas nos diferentes grupos.

Figura 15. Gráfico representativo da área nuclear das células nas camadas estudadas nos diferentes grupos.

Figura 16. Secções histológicas da retina do rato A (Controle) e B (Experimental).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Volume total da retina por grupo, expresso em valores médios (mm^3) e respectivos desvios padrão.

Tabela 2. Volume por camada da retina, expresso em valores médios (mm^3) e respectivos desvios padrão.

Tabela 3. Densidade numérica por camada, expressas em valores médios (células por $500 \mu\text{m}^2$) e respectivos desvios padrão.

Tabela 4. Área nuclear das células, expressas em valores médios (μm^2) e respectivos desvios padrão.

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 14 |
| 3 | OBJETIVOS | 21 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL | 21 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 21 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 22 |
| 4.1 | NATUREZA DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS | 22 |
| 4.2 | AMOSTRA..... | 22 |
| 4.3 | DESENHO EXPERIMENTAL | 23 |
| 4.4 | EUTANÁSIA DOS ANIMAIS..... | 25 |
| 4.4.1 | Anestesia | 25 |
| 4.4.2 | Perfusão | 25 |
| 4.4.3 | Descarte da carcaça..... | 26 |
| 4.5 | DISSECAÇÃO DA ESTRUTURA OCULAR E PREPARO DO MATERIAL | 26 |
| 4.6 | PREPARO DA LÂMINA HISTOLÓGICA | 26 |
| 4.7 | ANÁLISE DOS RESULTADOS..... | 28 |
| 4.7.1 | Estereologia | 28 |
| 4.7.2 | Histomorfometria..... | 30 |
| 4.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 31 |
| 5 | RESULTADOS | 33 |
| 5.1 | Estereologia | 33 |
| 5.2 | Histomorfometria..... | 34 |
| 6 | DISCUSSÃO | 38 |
| 7 | CONCLUSÕES..... | 42 |
| | REFERÊNCIAS | 43 |
| | ANEXOS | 49 |

1 INTRODUÇÃO

A fixação dos bráquetes na superfície do esmalte dentário é feito por meio da aplicação de resina composta polimerizável em sua base, com ou sem o uso de sistemas adesivos, e pode ter o auxílio de aparelhos fotoativadores. A fotoativação, preconizada por TAVAS e WATTS (1979), é a etapa primordial da colagem quando utilizada a resina fotopolimerizável e faz-se necessária para poder converter os monômeros do composto resinoso em cadeias poliméricas, processo esse descrito como grau de conversão e que garante a manutenção das propriedades físicas, químicas, biológicas e estéticas das resinas (SANTINI et al., 2012; AMATO et al., 2014). Uma adequada polimerização das resinas compostas é um dos aspectos que contribuem para o sucesso da adesão do acessório ao esmalte dentário, o que depende diretamente dos aparelhos fotopolimerizadores (ACCETTA et al., 2008).

As fontes de luz utilizadas nessa fase podem ser advindas da luz ultravioleta, luz halógena de quartzo-tungstênio, luz de arco de plasma de xenônio, laser de argônio ou do diodo emissor de luz, também conhecido pela sigla LED (Light Emitting Diode) (RAHIOTIS et al., 2010).

Dentre esses aparelhos fotoativadores à base de LED, há uma grande variação quanto à forma de apresentação e, principalmente, com relação à potência da luz emitida. Para atingir um nível adequado de polimerização, já foi comprovado que a intensidade da luz, o seu comprimento de onda e o tempo de exposição são fatores essenciais, evitando futuras falhas que ocasionariam propriedades físicas ineficientes (LEONARD et al., 2002). Com o intuito de otimizar o tempo clínico e manter o grau de conversão das resinas dentro dos padrões adequados, alguns autores propuseram lançar novos aparelhos apresentando maior potência e com tempos menores de fotoativação, denominados de LEDs de alta potência (YOON et al., 2002; STAUDT, KREJCI e MAVROPOULOS, 2006; RUEGGEBERG, 2011).

Atualmente, as fontes de luz mais utilizadas clinicamente são a luz halógena e os LEDs (GUPTA et al., 2018). Na prática ortodôntica, os resultados das pesquisas mostram que não há diferença no risco de falha de colagens entre luz halógena e LEDs (FLEMING et al., 2013). Entretanto, quanto à profundidade da polimerização e o grau de conversão de monômeros, o LED apresentou melhores resultados. (JANDT et al., 2000; CEREKJA, CAKIRER, 2011; GUPTA, SHRESTHA, 2018).

Além disso, nos testes de resistência ao cisalhamento de bráquetes fotopolimerizados com luz LED de alta intensidade também se mostrou tão adequada quanto a dos bráquetes

colados com luz halógena, inclusive em tempos de exposição reduzido (PALOMARES et al., 2008). Foi observado que mesmo com um tempo de exposição reduzido (3 segundos), há uma pequena diminuição da conversão de monômeros, porém essa redução de tempo tem um efeito positivo com relação à melhora da microdureza de superfície (AMATO et al., 2014).

Neste contexto, é importante ressaltar que a otimização do tempo clínico é o fator mais impactante em relação ao uso de LED de alta potência, visto que há uma redução de 85% do tempo de fotopolimerização (em média) durante uma colagem completa, de primeiros molares à primeiros molares de ambos os arcos (GUPTA et al, 2018).

Apesar das vantagens já afirmadas cientificamente, existem estudos que comprovam um potencial dano ocular proveniente de aparelhos de LED de alta potência (PANDIS et al., 2007; UEDA et al., 2009; LABRIE et al., 2011). As alterações oculares, como as maculopatias, apresentam-se dentre os problemas ocupacionais que afetam o cirurgião dentista e que, na maioria dos estudos, são causadas pela luz azul emitida por fotopolimerizadores, sendo tóxica para estruturas celulares quando transmitida pelos meios oculares até ser absorvida pela retina, principalmente quando a luz LED não está associada à filtros de proteção (PANDIS et al., 2007; UEDA et al., 2009; LABRIE et al., 2011).

A visão direta da luz LED é comparável com a retinite solar, que é a formação de ponto cego no centro do campo visual temporário ou permanente, dependendo à intensidade de exposição (NAKAMURA et al., 2018). Além disso, a exposição à luz azul amplifica o envelhecimento e processos degenerativos no olho (ROLL et al., 2004).

Estudos acerca das injúrias oculares causadas por LEDs de alta intensidade ainda são limitados, mas acredita-se que a ocorrência desses danos depende principalmente da dose total do comprimento de onda que o olho recebe (STAMATACOS; HARRISON, 2012). No que se refere aos estudos experimentais que simulem de forma mais fiel a situação clínica vivida pelos cirurgiões-dentistas, especificamente os ortodontistas, há uma limitação dos estudos com resultados palpáveis (BASHA et al., 2014, SHANG et al., 2014; JAADANE et al., 2015; NAKAMURA et al., 2018).

Diante da hipótese que a exposição da luz LEDs de alta potência pode induzir alterações nas estruturas retinianas, torna-se relevante a realização de um estudo que simule o atendimento do ortodontista e avalie os efeitos da luz LED de alta potência nas estruturas oculares, visando avaliar a capacidade de gerar ou não lesão, e identificar alterações nos aspectos morfométricos após a exposição da luz.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O sistema de ativação de resinas compostas passou por diversas transformações durante as últimas décadas, graças aos avanços tecnológicos, até chegar a mais recente fotoativação à base de LED (REIS e LOGUERCIO, 2007). Apesar das unidades fotoativadoras LED terem sido inventadas há mais de 50 anos, somente na década de 90 que essas foram devidamente consideradas para o uso na polimerização dos materiais odontológicos (JANDT et al., 2013).

O uso de luz como iniciadora da fotopolimerização para colagem de bráquetes ortodônticos vem ganhando notoriedade e, com isso, novos modelos destes aparelhos, com intensidades cada vez maiores vêm sendo lançados no mercado odontológico. Devido a essa grande variedade de novos aparelhos, é possível encontrar diversos trabalhos que comparam e avaliam formas consideradas mais antigas de fotoativação - como o caso das luzes halógenas - com os LEDs, quanto a seus efeitos e propriedades dos materiais (FLEMING et al., 2013; USUAMEZ et al., 2004; SWANSON et al., 2004). Para a Ortodontia, as inovações referentes aos aparelhos fotoativadores são de grande interesse principalmente quanto ao aspecto da diminuição do tempo clínico durante a colagem dos bráquetes (OESTERLE et al., 2002), mas também visando manter propriedades físicas e mecânicas dos materiais (GUPTA et al., 2018).

As fontes de polimerização de luz halógenas têm efetividade comprovada, boa intensidade de potência, emitem luz num amplo espectro e são de custo relativamente baixo. No entanto, esses aparelhos podem apresentar aspectos negativos, tais como, o pouco tempo de vida útil dos aparelhos devido ao calor gerado, (MACHADO et al., 2007), o que acaba aumentando a temperatura pulpar (MILLEN et al., 2007) diminuindo a emissão de luz com o tempo e conseqüentemente, diminuição do grau de conversão dos monômeros (STAHL et al., 2000; JANDT et al., 2013).

Ao contrário da luz halógena, que gera luz por filamentos incandescentes, os LEDs convertem energia elétrica diretamente em luz por semicondutores, o que proporciona um mínimo aquecimento. Esses aparelhos apresentam muitas vantagens, dentre elas: não emitem radiação infravermelha para resina composta e para o dente (PEREIRA et al., 2010), pouco calor é produzido (PANDIS et al., 2007), reduzindo a possibilidade de degradação dos componentes internos ao longo do tempo, possuindo assim sua vida útil relativamente longa e pequena degradação com o seu uso através do tempo, em média, 10 mil horas (KURACHI et al., 2001).

Dentre esses aparelhos fotoativadores à base de LED, há uma grande variação quanto à forma de apresentação e, principalmente, com relação à potência da luz emitida, que é o resultado da multiplicação do tempo de irradiação versus a intensidade de luz (mW/cm^2). Para atingir um nível adequado de polimerização, já foi comprovado que a intensidade da luz, o seu comprimento onda e o tempo de exposição são fatores essenciais, evitando futuras falhas que ocasionariam propriedades físicas ineficientes (LEONARD et al., 2002). Com o intuito de otimizar o tempo clínico e manter o grau de conversão das resinas dentro dos padrões adequados, a indústria lançou novos aparelhos apresentando maior potência com tempos menores de fotoativação, são os LEDs de alta potência que permitem uma rápida polimerização e maior estabilidade na emissão de luz (YOON et al., 2002; STAUDT, KREJCI e MAVROPOULOS, 2006; RUEGGERBERG, 2011).

Os LEDs de alta potência têm sido alvo de diversos estudos comparativos com as fontes de luz mais antigas, como a luz halógena. Os resultados dessas pesquisas mostram que a força de adesão do compósito resinoso ao substrato dentário quando polimerizado com LEDs de alta potência, se apresenta tão satisfatória quanto a polimerização realizada com luz halógena. (PALOMARES et al., 2008; AMATO et al., 2014). Em relação à profundidade de polimerização e força à compressão, demonstraram desempenho similar e satisfatório, tendo como benefício adicional a redução do tempo de polimerização (JANDT et al., 2000; MILLS et al., 2002).

Assim como as preocupações anteriores referentes à capacidade dos LEDs de alta potência em manter a qualidade das propriedades físicas dos materiais, há também uma gama de estudos que relatam a questão do aumento de temperatura da câmara pulpar decorrente do uso de aparelhos de alta potência e a capacidade de gerar ou não danos à polpa dentária. Sabe-se que a temperatura normal da polpa se encontra em torno de 37°C e que traumas biológicos, como a necrose pulpar, já podem ocorrer com aumentos de temperatura por volta de 5.5°C (ZACH e COHEN, 1965; HANNING e BOTT, 1999). Os resultados quanto à esse fator foram bem distintos, dependendo da proximidade com a polpa – profundidade das cavidades - , falta de regulamentação para a fabricação e manutenção, tempo de exposição, a marca dos aparelhos de LED, potência da radiação e a fase do preparo da superfície, variando o aumento de temperatura em casos de fotoativação do adesivo ou da resina (HANNING; BOTT, 1999; LEPRINCE et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; RUNNACLES et al., 2015). Entretanto, de acordo com o estudo de MILLEN (2007), a luz halógena demonstrou um aumento de temperatura significativamente maior quando comparado à luz LED de baixa potência. Por isso,

aconselha-se que se use uma luz LED de menor intensidade para a etapa adesiva e de maior intensidade para a etapa seguinte de polimerização da resina.

A densidade de energia irradiada mostrou-se um fator importante também para a probabilidade de ocorrência de danos oculares, onde quanto maior a intensidade, maior o risco de injúrias graves, principalmente quando os LEDs não são associados a filtros de luz azul (UEDA et al., 2009). Além disso, estudos acerca das injúrias oculares causadas por LEDs de alta intensidade ainda são limitados, mas acredita-se que a ocorrência desses danos depende principalmente da dose total de comprimento de onda que o olho recebe (STAMATACOS e HARRISON, 2012).

Para entendermos como os mamíferos processam as informações fóticas, precisamos compreender o mecanismo da visão que foi resumido por TOVÉE em 2008. Segundo ele, a luz possui natureza dual e ora se comporta como onda (que varia em frequência e comprimento), ora como partícula (fóton). Ambas são usadas para explicar como o sistema visual responde à luz: para determinar a sensibilidade fótica do sistema visual (limiar mínimo de detecção de luz) é usual falarmos em fóton. No entanto, quando se discute a percepção da cor, nos referimos a luz em termos de comprimento de onda situados nas regiões entre 380 a 760 nm são visíveis ao olho humano, e essa sensibilidade é determinada pelos fotopigmentos presentes nos fotorreceptores da retina de cada espécie (DIAS, 2016). Conforme BAILES e LUCAS (2010), a sensibilidade espectral relaciona-se à resposta à luz de diferentes comprimentos de onda, e depende da faixa de absorção de cada fotopigmento.

Após ser focada pela retina, alvo final do olho, a informação luminosa é codificada em impulsos elétricos, desencadeando a atividade neural que representará a imagem para o cérebro (Figura 1). Esse processo é denominado transdução, e é realizado pelos fotorreceptores da retina, cones e bastonetes. A luz mais intensa estimula as opsinas, os fotopigmentos dos cones, responsáveis pela visão diurna ou fotópica, de alta acuidade visual e em cores. Já os bastonetes (cujo pigmento é a rodopsina) são os responsáveis pela visão noturna ou escotópica, fornecendo uma imagem monocromática (em gradações de cinza) e com menor acuidade visual (MOLLON e BOWMAKER, 1992).

A partir dos terminais sinápticos dos cones e bastonetes, os sinais elétricos são enviados para as células bipolares, horizontais e amácrinas da retina, e destas para as células ganglionares, cujos axônios constituem o nervo óptico, via responsável pelo tráfego das informações da retina para o córtex visual (TOVÉE, 2008).

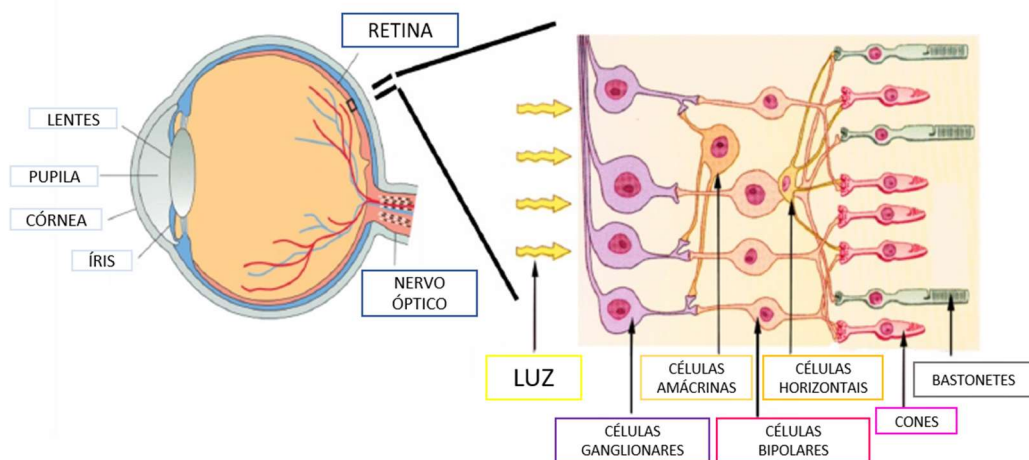


Figura 1. Estrutura interna da retina humana (Modificado de Dowling e Boycott, 1966).

A retina possui uma camada de células fotossensíveis (fotorreceptores) e a capacidade de reconhecimento espectral destas células proporciona a absorção seletiva da energia luminosa local, transformando-a em outra forma de energia e construindo assim múltiplas representações que codificarão as qualidades visuais de luminosidade e contraste de cores (MARGALIT e SADDA, 2003).

Por ser uma estrutura de fácil acesso e por apresentar uma estrutura laminar, fina e relativamente transparente, permite a visualização de suas células com o tecido ainda íntegro ou em cortes histológicos (CEPKO et al., 1996). A sua estrutura laminar apresenta-se com camadas de diferentes tipos celulares intercaladas por camadas de conexões neurais. A partir da superfície externa, são organizadas da seguinte forma (Figura 2):

(1) Epitélio pigmentar (EP), que é constituído por uma fina camada, uniestratificada de células com pigmento melânico em abundância (SCHELLINI, 1992). Este pigmento tem a função de impedir a reflexão da luz por todo o globo ocular, sendo de extrema importância para a nitidez da visão. A camada pigmentar também armazena grandes quantidades de vitamina A, precursora importante das substâncias fotossensíveis dos bastonetes e cones. Esta camada também é responsável pela adesão retiniana e pelas trocas metabólicas entre a retina sensorial e a coroide (GUYTON e HALL, 2011);

(2) Camada dos fotorreceptores, que contém os prolongamentos dos cones e bastonetes (PCB) que se projeta para a camada pigmentar. Os cones são responsáveis pela visão em cores devido sua substância fotossensível “coloridas”, geralmente chamadas de pigmentos coloridos. Os bastonetes, são responsáveis principalmente pela visão em preto-e-branco em condições de

baixa luminosidade, sendo sua substância fotoquímica a rodopsina que se descora ao ser atingido pela luz e se cora novamente em uma etapa posterior. Quando bastonetes e cones são excitados, os sinais são transmitidos pelas sucessivas camadas de neurônios na própria retina e, finalmente, propagam-se pelas fibras do nervo óptico, e para o córtex cerebral (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1982);

(3) Camada nuclear externa (CNE) que contém os corpos celulares dos cones e bastonetes, que estão dispostos em pseudocamadas. Os cones possuem núcleos maiores que os bastonetes (SCHELLINI, 1992; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1982);

(4) Camada plexiforme externa (CPE), que contém os terminais axônicos dos cones e bastonetes e os dendritos das células horizontais e bipolares que são vistas ao microscópio óptico como uma faixa eosinofílica rendilhada. É o local onde ocorre a primeira sinapse entre cones e bastonetes com as células bipolares ganglionares (SCHELLINI, 1992);

(5) Camada nuclear interna (CNI), que contém os corpos das células horizontais, cujos prolongamentos colocados horizontalmente estabelecem contato entre vários fotorreceptores; células bipolares, que possuem morfologia variável, que podem estabelecer sinapse com dois até seis fotorreceptores, ou que possuem contato apenas com o axônio de uma célula cone em uma extremidade e com uma célula ganglionar em outra extremidade, enviando seus impulsos por um trajeto simplificado; contém também as células amácrinas que estabelecem contato com as células ganglionares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1982);

(6) Camada plexiforme interna (CPI) que contém os terminais axônicos das células amácrinas e bipolares e dendritos das células ganglionares. É o local onde ocorre a segunda sinapse, processando informação de movimento. Ao microscópio óptico mostrou-se semelhante a CPE, entretanto maior em espessura (SCHELLINI, 1992);

(7) Camada de células ganglionares (CG), que contém os corpos das células ganglionares, identificadas em microscópio óptico por seu núcleo grande com cromatina frouxa (SCHELLINI, 1992), são responsáveis por transmitir sinais eferentes da retina através do nervo óptico para o cérebro (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1982). Pode ainda estar presentes nesta camada algumas células amácrinas deslocadas;

(8) Camada de fibras ópticas (CFO), representada pelos axônios das células ganglionares apresentando-se com aspecto fibrilar eosinofílico, constituindo o nervo óptico (SCHELLINI, 1992);

(9) Membrana limitante interna, membrana tênue que delimita o final da retina e o início da cavidade vítrea (SCHELLINI, 1992).

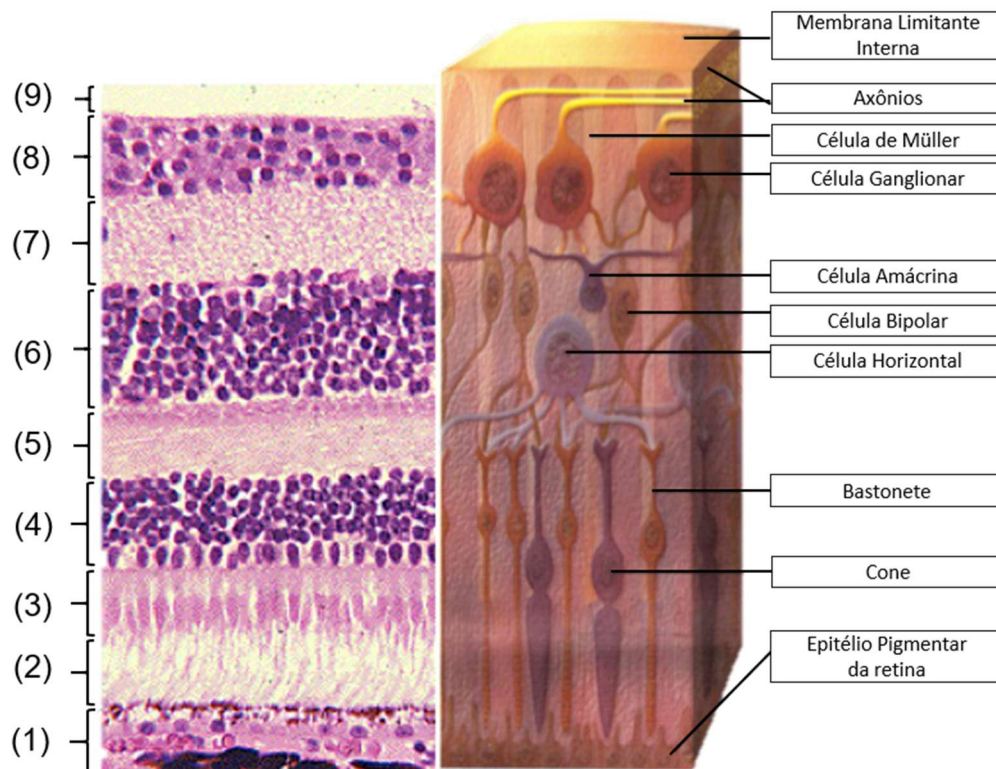


Figura 2. Constituição histológica da retina.

Adaptado: ARTHUR, A.M.; IANO, Y.; TURUDA, P.D.; LARICO, R.F.; ARTHUR, R. *Técnicas de análise da retina humana: revisão breve sobre os recursos e as renovações propedêuticas disponíveis à prevenção e o diagnóstico precoce das complicações vasculares da retina associadas às doenças sistêmicas.* Ensaios e Ciência, Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde. Vol.15, n. 4. 2011.

A fisiologia da retina pode ser alterada se for exposta a luz. Especificamente, a exposição à luz artificial durante a noite causa maior quantidade de danos quando comparada à luz diurna. Além de alterar a fisiologia da retina, gera efeitos locais cumulativos, como o aumento da incidência de doenças oculares (WALLS et al., 2011), provoca alterações sistêmicas, como: alteração na secreção de hormônios, perturbação do sono e enxaqueca (NOSEDA et al., 2010). Com o advento dos LEDs, que são luzes de longa duração, baixa geração de calor e exigem pouca eletricidade, seu uso vem se tornando constante, inclusive em *displays* eletrônicos, e, por isso, a preocupação com efeitos nocivos à retina vem aumentando (NAKAMURA et al., 2017).

As luzes utilizadas na Odontologia oriundos aparelhos de fotopolimerização, emitem uma intensidade de luz muito maior que os dispositivos eletrônicos. Os LEDs convencionais fornecem uma faixa de luz azul visível relativamente estreita, entre 420 e 500 nm. No entanto, os LEDs de alta intensidade contêm luzes adicionais que aumentam a luz violeta emitida por estes aparelhos. O uso frequente destes equipamentos que fornecem uma luz muito brilhante nos comprimentos de onda entre 380 e 500 nm, o que significa que profissionais da odontologia

podem ser expostos diariamente a quantidades perigosas de luz azul e violeta (SOARES et al., 2017). Estudos que comprovem os possíveis efeitos danosos à exposição aos LEDs de alta potência, simulando a realidade do consultório odontológico são inexistentes, apesar de extremamente importantes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do uso de um aparelho fotopolimerizador LED de alta potência nas retinas de ratos *Wistar*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar os efeitos da exposição aguda ao LED sobre a morfologia da retina de ratos:
 - a. Estimar o volume total da retina;
 - b. Estimar a densidade das camadas da retina;
 - c. Estimar o volume das camadas da retina.
- b) Identificar as possíveis alterações de parâmetros morfométricos da retina em geral e seus elementos constituintes:
 - a. Densidade numérica;
 - b. Área nuclear das células.

4 METODOLOGIA

4.1 - NATUREZA DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo, experimental, controlado, prospectivo, com base descritiva e inferencial, teve como unidade de experimento as retinas de ratos da linhagem *Wistar (Rattus norvegicus albinus)*. O protocolo experimental empregado neste estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (CEUA-UFRN), sob o protocolo nº 007012/2017 (anexo 1) e foi executado seguindo as recomendações apresentadas no *Animal Research: Reporting In Vivo Experiments (ARRIVE) guidelines* (anexo 2) para uso de animais experimentais (KILKENNY et al., 2010).

4.2 - AMOSTRA

Foram utilizados 06 animais adultos jovens, machos, com massa corpórea aproximadamente de 300 gramas de peso, com 8 semanas de vida. Os animais foram oriundos do biotério de experimentação do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e transferidos para o biotério experimental do Departamento de Morfologia da UFRN (DMOR-UFRN), lotado no Museu de Ciências Morfológicas, onde foram mantidos em caixas de polipropileno com as dimensões (41x34x16cm) na proporção de 03 (três) animais por caixa (Figura 3A).

Os animais receberam ração padrão extrusada (*ad libitum*) e água mineral natural (Figura 3B) conforme a Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Permaneceram em regime de claro-escuro 12/12h em ciclo invertido em relação ao ambiente natural, com intensidade luminosa no interior da gaiola de 60 lux e temperatura ambiente média de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante todo o experimento.

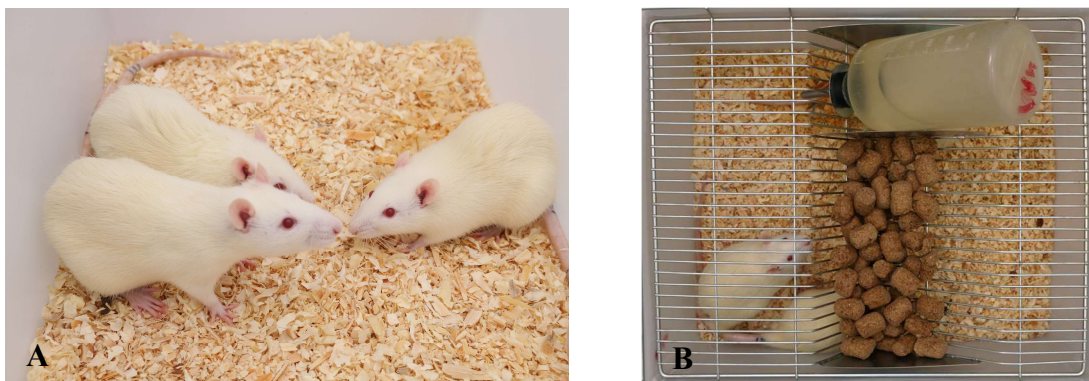


Figura 3. Alojamento e alimentação dos animais. A) Animais mantidos em caixas de polipropileno (na proporção de 3 animais por caixa); B) Ração padrão extrusada (*ad libitum*) e água mineral natural.

4.3 – DESENHO EXPERIMENTAL

A amostra foi composta por 12 olhos, sendo 06 esquerdos e 06 direitos. Como forma de padronização do estudo, o olho esquerdo de cada animal foi considerado como experimental e o direito como controle.

Os animais utilizados no estudo foram avaliados após uma exposição aguda ao LED, consistindo de 3 aplicações durante 01 (um) dia, com intervalos de 04 (quatro) horas entre elas, simulando um protocolo clínico de colagem de bráquetes em cada um dos turnos do dia.

O tempo de exposição à luz LED foi de um total de 144s por aplicação. Esse tempo simula o procedimento clínico da colagem de 24 bráquetes ortodônticos, de primeiro molar a primeiro molar, inferior e superior, considerando um tempo total de fotoativação de 6 segundos (3 segundos na face mesial e 3 segundos na face distal) por elemento dentário.

Para fotoestimulação, foi utilizado um fotopolimerizador de luz LED (VALO[®], Ortho, Ultradent, South Jordan, Utah, Estados Unidos) (Figura 4) no modo de alta potência (Xtra 3200mW/cm²). Esse aparelho foi calibrado ao início do experimento, garantindo uma intensidade de luz padrão. A iluminância do fotopolimerizador foi aferida com o uso de um luxímetro digital (Minipa[®] MLM-1010, Houston, USA) (Figura 5), atingindo aproximadamente 3500lux.



Figura 4. Fotopolimerizador de luz LED.
(VALO[®], Ultradent)



Figura 5. Luxímetro digital.
(MLM-1010, Minipa[®])

Para a realização do experimento os animais foram contidos e anestesiados por via inalatória contendo uma mistura de isoflurano (4-5%) e oxigênio 100% (1l/min) como dose de indução e para manutenção a concentração foi de 1,5-3% durante 11 minutos. Em seguida, o olho direito (amostra controle) foi fechado e coberto com um tampão opaco circular removível (3cm²) de PVC na cor preta (Figura 6A) com o intuito de proteger a estrutura ocular durante todo o tempo de aplicação. O outro olho (amostra experimental) foi exposto à luz (Figura 6B e

6C), respeitando uma distância pré-definida de 30 cm entre a ponta do aparelho e o olho do animal.

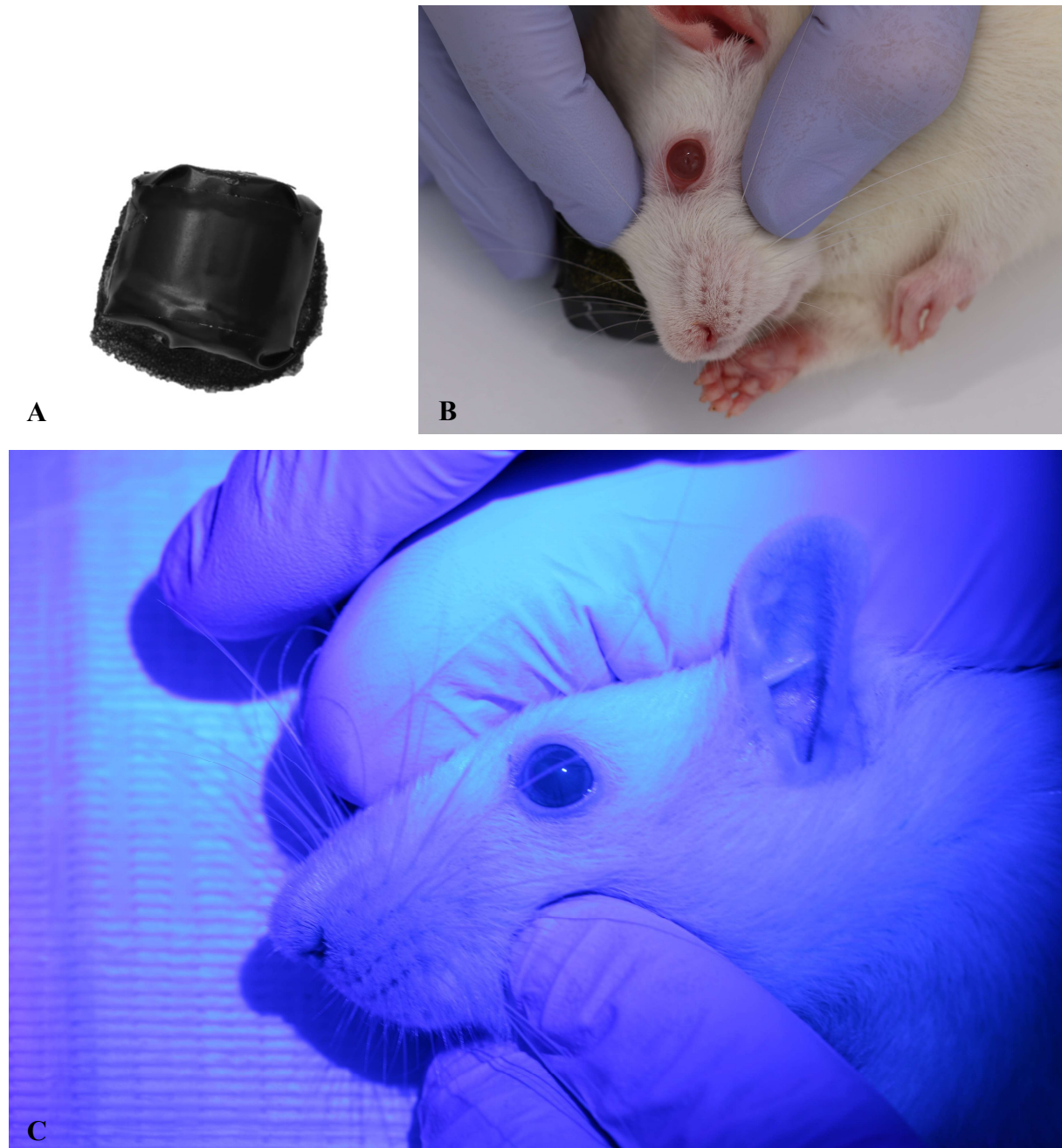


Figura 6. Exposição a luz LED. A) Tampão de PCV, opaco, 3cm²; B) Posição do animal durante o experimento, a mão do operador mantendo o tampão em posição no olho controle e a abertura do olho experimental; C) Olho esquerdo exposto a luz.

A distância de 30 cm foi determinada considerando a distância do olho do dentista operador até a ponta da fonte de luz durante um procedimento (LABRIE et al., 2011,

MCCUSKER et al., 2013). Um suporte de acrílico foi confeccionado para acoplar e fixar o aparelho de luz LED com a altura estabelecida durante todo o experimento (Figura 7).

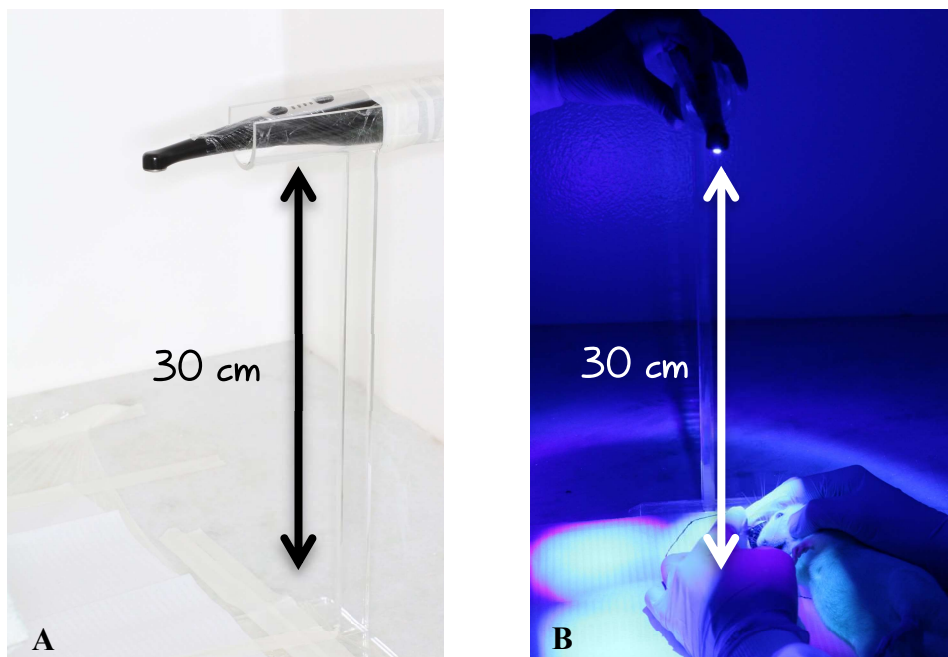


Figura 7. Suporte de acrílico confeccionado para acoplar o aparelho de LED. A) Aparelho LED em posição; B) Distância estabelecida durante todo o experimento.

Os animais foram numerados de 01 a 06 aleatoriamente e seguiram a sequência ordinal para serem expostos a fotoestimulação. Decorridos 07 (sete) dias da exposição ao LED, foi realizada então a eutanásia dos animais, seguida da perfusão, dissecação e enucleação das estruturas oculares que foram submetidas ao processamento histológico.

4.4 – EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

4.4.1 Anestesia

Os animais receberam anestesia inalatória de isoflurano. A dose inicial para indução anestésica foi de 4-5% e de manutenção 1-1.5%, com oxigênio 100% em fluxo de 0.5 – 1.0 por 1 min.

4.4.2 Perfusão

Os animais foram eutanasiados por via intraperitoneal com uma dose de Ketamina (300 mg/kg) associado a Xilazina (30 mg/kg) (Figura 8). Em seguida, perfundidos via transcardíaca em uma capela própria, a partir da introdução de uma agulha de 20 x 1,5 mm, previamente conectada a uma bomba peristáltica (Masterflex, Cole-Parmer, Niles, IL), no ápice do coração atingindo o ventrículo esquerdo, e, seguida, foi seccionado o átrio direito para o

escoamento do sangue. Inicialmente, 350 ml de solução salina a 0,9%, pH de 7,4, com heparina (Hipolabor, 5000 UI/ml) na concentração de 2 ml/L, à temperatura ambiente, foi impulsionado pelo leito vascular durante 4 minutos (100 ml/min), seguindo-se 700 ml de solução fixadora (paraformaldeído a 4%, Vetec Química Fina) em tampão fosfato (PB) 0,1 M, a um pH de 7,4, a temperatura de 4°C. Metade da solução fixadora foi infundida em fluxo rápido (35 ml/min), e a outra metade em fluxo lento (17,5 ml/min), totalizando 30 min de perfusão.

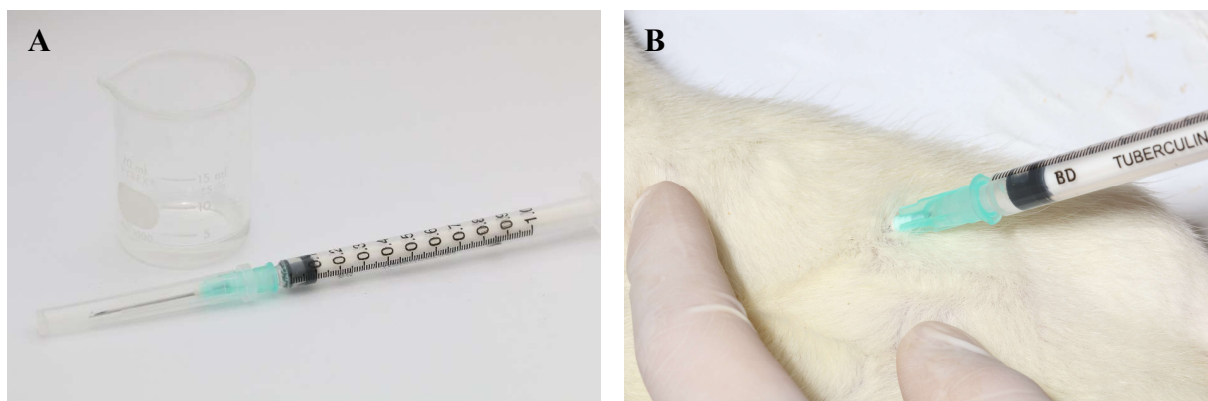


Figura 8. Eutanásia dos animais. A) Dose de Cetamina associado a Xilasina; B) Anestesia por via intraperitoneal.

4.4.3 Descarte da carcaça

Realizado em sacos plásticos brancos para riscos biológicos compatíveis com o peso da carcaça e armazenados em freezer (-18°C) até serem encaminhados à empresa de coleta especializada (Ecoblending Ambiental LTDA.) para incineração das carcaças.

4.5 – DISSECAÇÃO DA ESTRUTURA OCULAR E PREPARO DO MATERIAL

As estruturas oculares foram cuidadosamente dissecadas utilizando-se instrumentais cirúrgicos (tesouras, pinças, espátulas e bisturi) adequados. Os tecidos extra-oculares (músculos e conjuntivo) foram retirados com o máximo de cuidado sem comprometer a túnica externa ocular (córnea e esclera). Após a dissecação das estruturas oculares, o protocolo de processamento do material, foi realizado de acordo com o artigo de Bermer et al, (1976), protocolo descrito no anexo 3.

4.6 – PREPARO DA LÂMINA HISTOLÓGICA

Os espécimes foram emblocados em parafina e orientados à microtomia manual, sendo seccionados no sentido axial, padronizados com 3 µm de espessura. Os cortes foram coletados

em lâminas histológicas e postos em banho maria para remoção da parafina. Em seguida, foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, deslipidificados em xilol, corados com hematoxilina e eosina (HE), de acordo com a anexo 4, e coberto com lamínulas utilizando um meio específico de montagem (Figura 9).

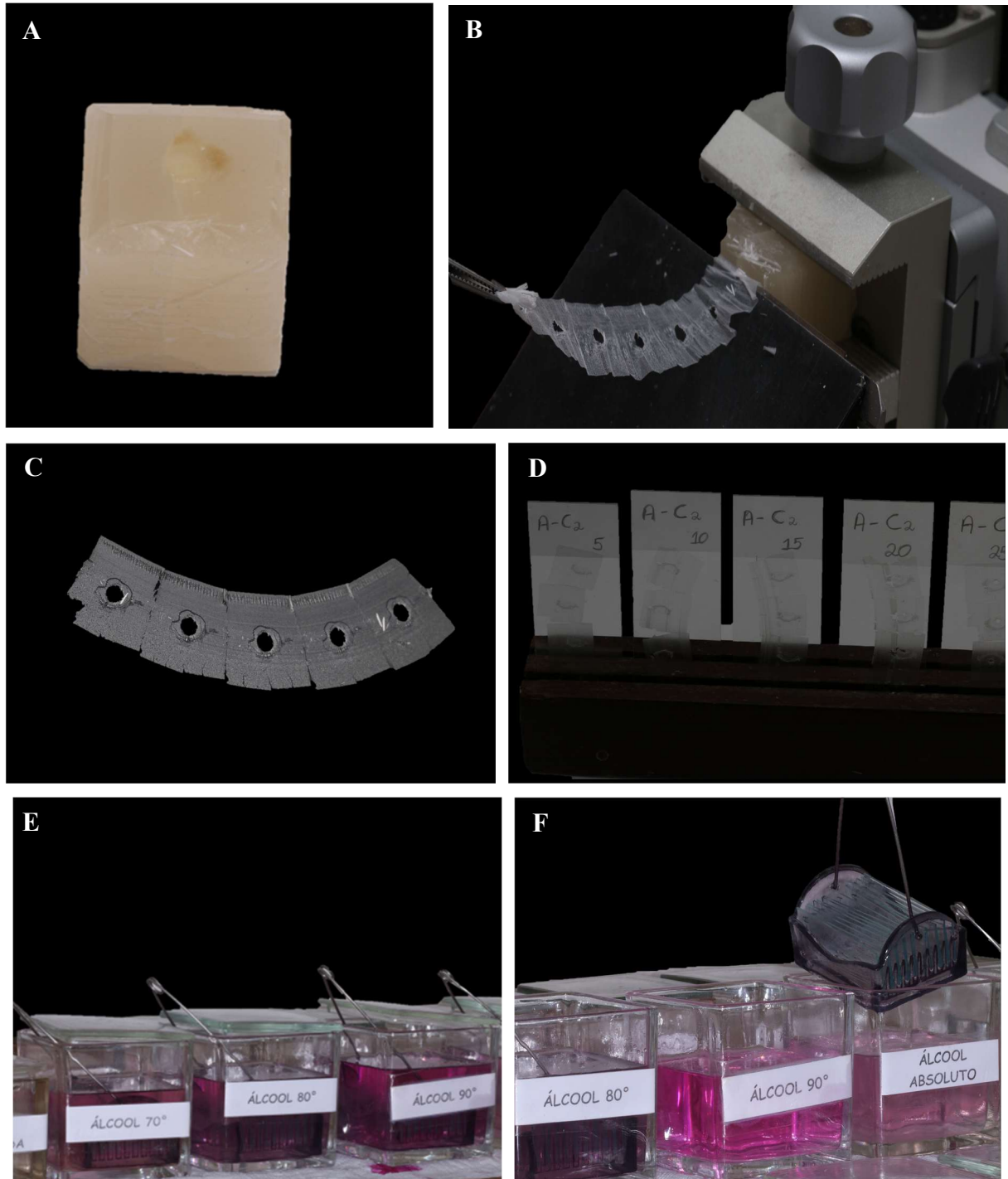


Figura 9. Preparo da lâmina histológica. A) Espécimes emblocados em parafina; B) Cortes em microtomia manual; C) Fita de cortes sucessivos transferidos para o banho-maria; D) Fitas em lâminas de vidro previamente etiquetadas; E) e F) Etapas da coloração com HE, conforme anexo 4.



Figura 9. Preparo da lâmina histológica. G) Cobertura da lâmina com lamínulas.

Todos esses procedimentos foram realizados por profissionais técnicos no laboratório de Histologia no Centro de Ciências Biológicas da UFRN.

4.7 – ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.7.1 Estereologia

Para a estimativa do volume total da retina, V_{ref} , foi utilizado o Princípio de Cavalieri (HOWARD e REED, 2010). O método de Cavalieri permite estimar o volume total da área em uma amostragem aleatória sistêmica de seções através de um sistema teste sobreposto aleatoriamente sobre a estrutura a ser estudada. Para isso, um sistema teste quadrático com área conhecida foi aplicado sobre a estrutura da retina (Figura 10) e a seguinte fórmula foi utilizada: $V = \sum P * t * F^{-1} * \frac{a}{p}$, onde $\sum P$ é o somatório de pontos do sistema teste que tocam a estrutura desejada (neste caso, a retina); t é a espessura fixa dos cortes ($3\mu\text{m}$), F^{-1} é o inverso da distância entre os cortes e $\frac{a}{p}$ é a área associada a cada ponto do sistema teste. Em cada retina analisada contou-se entre 200 e 300 pontos em seções equidistantes, amostradas de modo

sistemático e aleatório, as quais cobriram toda a área da retina. As imagens da retina total sob as quais foi aplicado o método de Cavalieri foram obtidas de uma câmera acoplada a um microscópio de luz com objetiva de 2x de aumento.

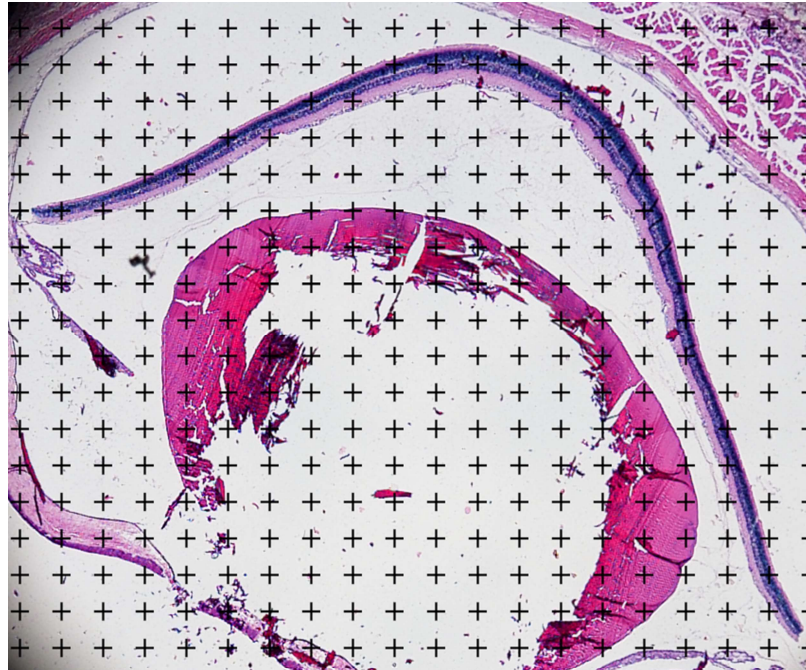


Figura 10. Secções axiais da retina de ratos do grupo controle demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume total da retina. Coloração: HE. Escala de barra: 1000 μm .

A densidade de volume das camadas ($V_{vcamada}$) da retina foi obtida a partir do V_{ref} e foi estimada de acordo com a seguinte equação: $V_{vcamada} = \frac{\sum P(\text{camada})}{\sum P(V_{ref})}$ onde, $\sum P(\text{camada})$ é o número total de pontos (de um sistema teste quadrático) que tocam cada uma das camadas da retina (CCG, CPI, CNI, CPE, CNE e PCB) e $\sum P(V_{ref})$ é o número total de pontos (do mesmo sistema teste) que tocam na retina.

Para estimar o volume total de cada camada da retina, utilizou-se a seguinte equação: $V_{totcamada} = V_{vcamada} * V_{ref}$ onde, $V_{totcamada}$ é o volume total da camada ocupada na retina, $V_{vcamada}$ é a densidade de volume das camadas da retina e V_{ref} é o volume total da retina, estimado pelo princípio de Cavalieri. As imagens para avaliar o volume de cada camada da retina sob as quais foi aplicado o método de Cavalieri foram obtidas de uma câmera acoplada a um microscópio de luz com objetiva de 10x de aumento (Figura 11).

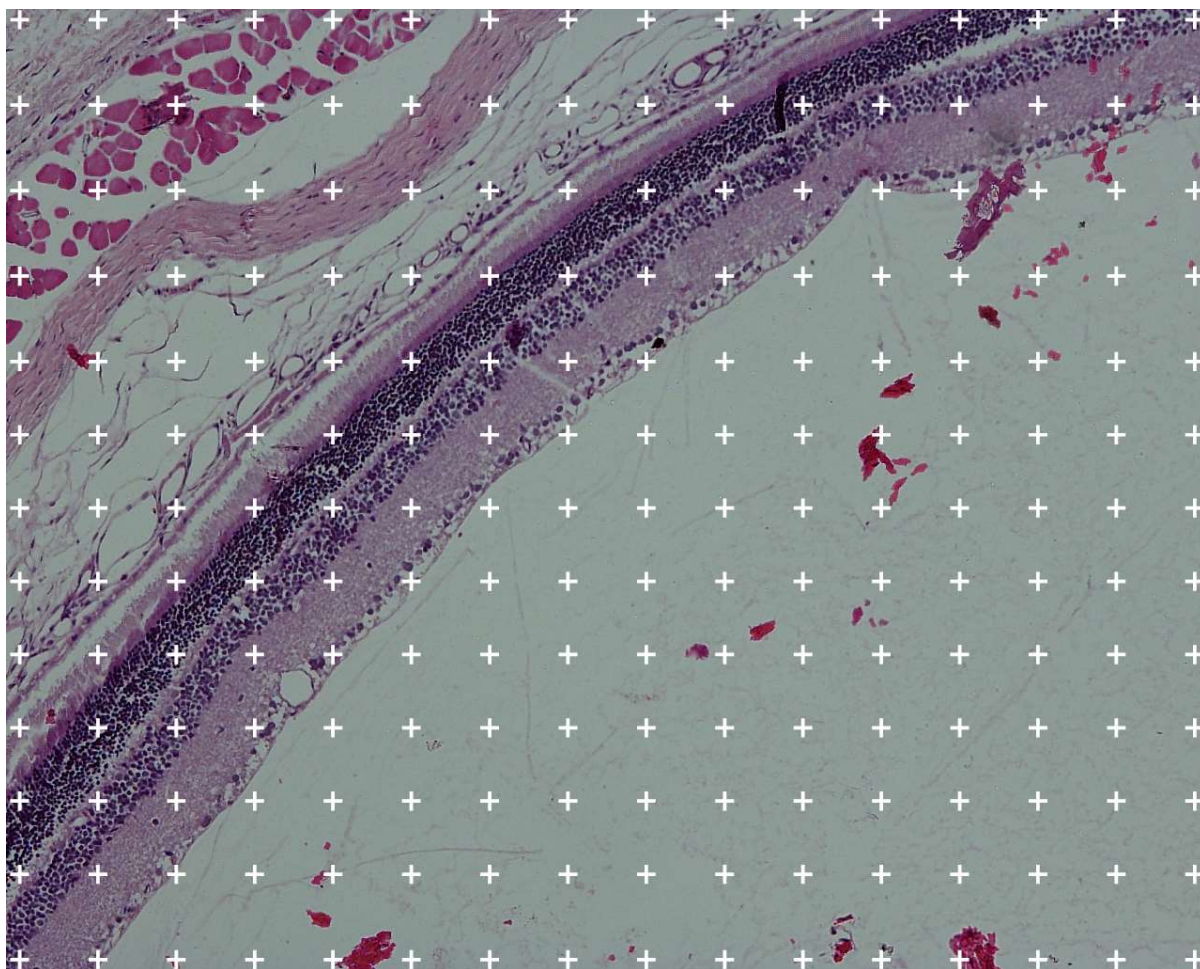


Figura 11. Secções axiais da retina de ratos do grupo controle demonstrando a aplicação do Princípio de Cavalieri para a estimativa do volume total de cada camada da retina. Coloração: HE. Escala de barra: 100 μ m.

4.7.2 Histomorfometria

A análise histomorfométrica foi realizada por meio de imagens digitalizadas das lâminas histológicas obtidas utilizando uma câmera (Nikon, DS – Ri1, Melville, USA) acoplada ao microscópio (Olympus, BX-41, Melville, USA) e conectada a um computador (Dell Optiplex 9020, Miami, USA), presente no laboratório. Os parâmetros morfométricos foram aferidos com o uso do *software* Canvas 12 (ACD Systems, Victoria, Canadá), por três examinadores cegos e calibrados a partir de um mesmo padrão de avaliação, com a finalidade de garantir a fidedignidade dos resultados.

Como padronização da análise, a retina central foi escolhida como área de interesse e a ampliação da imagem no microscópio foi de 40x de objetiva em todos os animais. Sobre a imagem foi colocado uma retícula de grade (*grid*) (Figura 12) compatível com as dimensões

das camadas em seu respectivo aumento. Cada célula do *grid* foi identificada por um sistema de matriz (linhas x colunas) e sorteadas de modo aleatório, usando a fórmula “=ALEATÓRIOENTRE” (inferior;superior), disponível no *software* Microsoft Excel (Office 2016, Microsoft, EUA). As células presentes nas camadas do *grid* sorteadas tiveram seus parâmetros morfológicos mensurados (densidade e área).

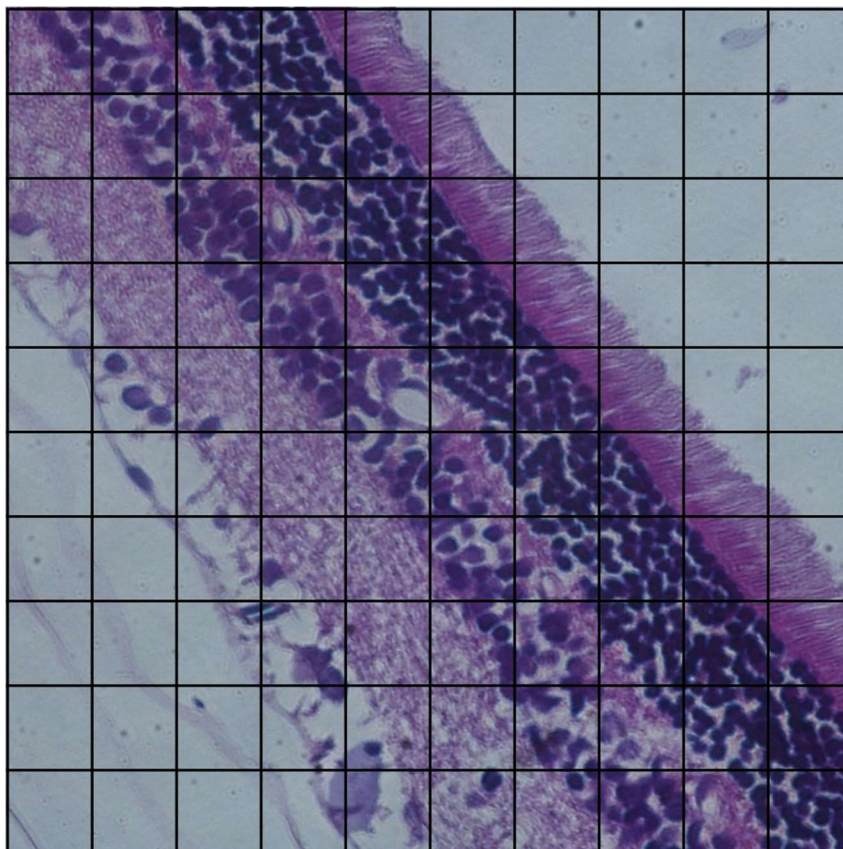


Figura 12. Secções axiais da retina de ratos do grupo controle demonstrando a aplicação do *grid* para a estimativa da densidade e da área nuclear. Coloração: HE. Escala de barra: 50 μ m.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas em conhecimento prévio dos grupos a serem avaliados. Os dados foram coletados e tabulados no programa Microsoft Excel[®] 2016 (Office 2016, Microsoft, EUA). Os valores encontrados foram expressos como média e desvio padrão, sendo utilizados para análise estatística descritiva e inferencial. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o teste de Mann-Whitney para amostras independentes com o objetivo de identificar diferenças entre as médias nos grupos avaliados (experimental x controle), uma vez que os dados não apresentaram distribuição normal e o pequeno tamanho

amostral. O procedimento estatístico foi realizado no *software* estatístico SPSS versão 22.0 (Statistical Package for Social Sciences; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

Todos os animais apresentaram comportamento saudável e sobreviveram até o final do período experimental.

Para a análise dos resultados, foram consideradas as seguintes camadas constituintes da retina: camada de células ganglionares (CCG), camada plexiforme interna (CPI), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear externa (CNE) e os prolongamentos de cones e bastonetes (PCB).

5.1 ESTEREOLOGIA

O volume total da retina (V_{ref}) obtido por contagem de pontos apresentam-se descritos na tabela 1. A comparação entre as médias (valores) dos resultados encontrados demonstrou que houve o aumento estatisticamente significativo do V_{ref} no grupo experimental.

Tabela 1. Volume total da retina por grupo, expresso em valores médios (mm^3) e respectivos desvios padrão.

| | Grupos | n | Média | Desvio Padrão | 95% intervalo de confiança | | P |
|-----------|--------------|---|-------|---------------|----------------------------|--------|--------------|
| | | | | | mínimo | máximo | |
| V_{ref} | Controle | 6 | 0,584 | $\pm 0,106$ | 0,472 | 0,694 | 0,015 |
| | Experimental | 6 | 0,849 | $\pm 0,151$ | 0,689 | 1,007 | |

V_{ref} – volume total da retina.

Fonte: Autor.

O aumento do volume das camadas da retina no grupo experimental apresentou-se significativamente maior nas camadas: CCG, CPI, CNE e PCB, quando comparados ao grupo controle (tabela 2).

Tabela 2. Volume por camada da retina, expresso em valores médios (mm^3) e respectivos desvios padrão.

| Camadas | Grupos | n | Média | Desvio Padrão | 95% intervalo de confiança | | P |
|-------------|--------------|---|-------|---------------|----------------------------|--------|--------------|
| | | | | | Mínimo | máximo | |
| V_{totG} | Controle | 6 | 0,064 | $\pm 0,121$ | 0,051 | 0,076 | 0,015 |
| | Experimental | 6 | 0,104 | $\pm 0,040$ | 0,062 | 0,146 | |
| V_{totPI} | Controle | 6 | 0,153 | $\pm 0,036$ | 0,115 | 0,171 | 0,015 |
| | Experimental | 6 | 0,214 | $\pm 0,041$ | 0,191 | 0,256 | |
| V_{totNI} | Controle | 6 | 0,089 | $\pm 0,021$ | 0,067 | 0,110 | 0,065 |

| | | | | | | | |
|-----------------------|--------------|---|-------|-------------|-------|-------|--------------|
| | Experimental | 6 | 0,128 | $\pm 0,032$ | 0,094 | 0,161 | |
| <i>VtotPE</i> | Controle | 6 | 0,042 | $\pm 0,006$ | 0,036 | 0,048 | 0,240 |
| | Experimental | 6 | 0,059 | $\pm 0,023$ | 0,034 | 0,082 | |
| <i>VtotNE</i> | Controle | 6 | 0,143 | $\pm 0,034$ | 0,106 | 0,178 | 0,015 |
| | Experimental | 6 | 0,195 | $\pm 0,034$ | 0,159 | 0,230 | |
| <i>VtotPCB</i> | Controle | 6 | 0,094 | $\pm 0,014$ | 0,079 | 0,120 | 0,009 |
| | Experimental | 6 | 0,149 | $\pm 0,028$ | 0,108 | 0,178 | |

VtotG – volume total da camada ganglionar, *VtotPI* – volume total da camada plexiforme interna, *VtotNI* – volume total da camada nuclear interna, *VtotPE* – volume total da camada plexiforme externa, *VtotNE* – volume total da camada nuclear externa, *VtotPCB* – volume total dos prolongamentos dos cones e bastonetes.

Fonte: Autor.

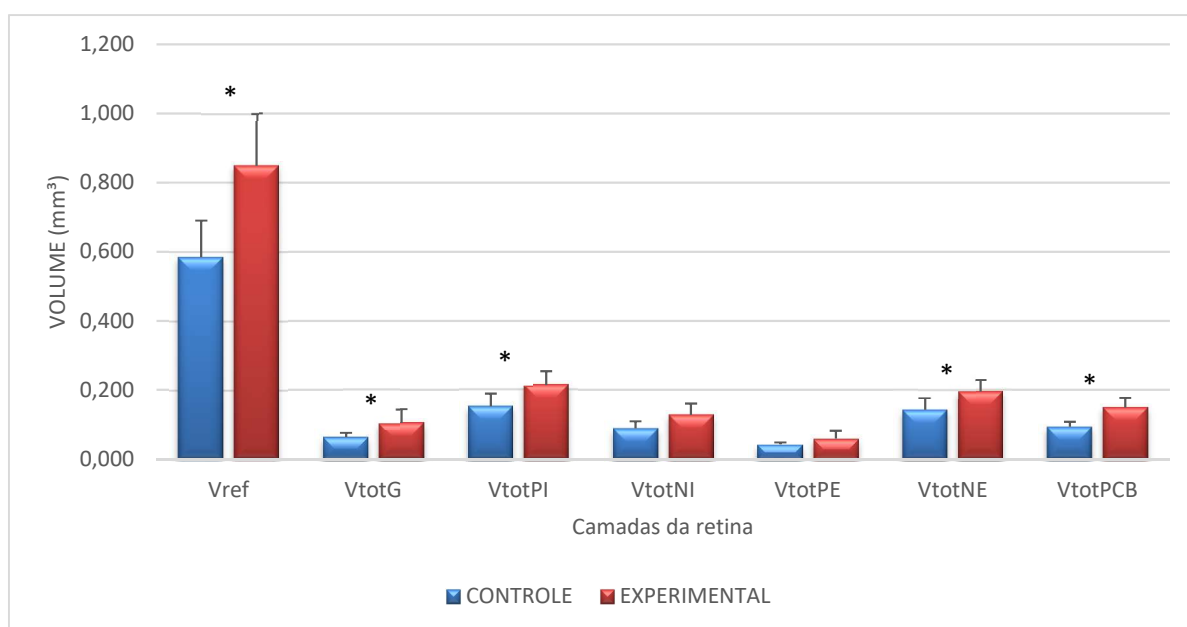


Figura 13. Gráfico representativo dos volumes total da retina e dos volumes de suas camadas nos diferentes grupos.

Vref – volume total da retina, *VtotG* – volume total da camada ganglionar, *VtotPI* – volume total da camada plexiforme interna, *VtotNI* – volume total da camada nuclear interna, *VtotPE* – volume total da camada plexiforme externa, *VtotNE* – volume total da camada nuclear externa, *VtotPCB* – volume total dos prolongamentos dos cones e bastonetes.

5.2 HISTOMORFOMETRIA

A densidade numérica por área e a área nuclear das células da retina foram medidas em três camadas: CNE, CNI e CCG de cada grupo. Calculadas as médias e desvios padrão não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as médias da densidade das camadas entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Densidade numérica por camada, expressas em valores médios (células por 500 μm^2) e respectivos desvios padrão.

| Camadas | Grupos | n | Média | Desvio Padrão | 95% intervalo de confiança | | p |
|---------|--------------|---|--------|---------------|----------------------------|--------|-------|
| | | | | | mínimo | máximo | |
| CNE | Controle | 6 | 21,217 | $\pm 3,545$ | 17,496 | 24,937 | 0,180 |
| | Experimental | 6 | 24,050 | $\pm 4,362$ | 19,471 | 28,628 | |
| CNI | Controle | 6 | 11,583 | $\pm 1,698$ | 9,801 | 13,364 | 0,180 |
| | Experimental | 6 | 13,433 | $\pm 2,866$ | 10,425 | 16,441 | |
| CCG | Controle | 6 | 2,006 | $\pm 0,280$ | 1,514 | 2,102 | 0,394 |
| | Experimental | 6 | 2,250 | $\pm 0,680$ | 1,535 | 2,964 | |

CNE –camada nuclear externa, CNI – camada nuclear interna, CCG – camada de células ganglionares.

Fonte: Autor.

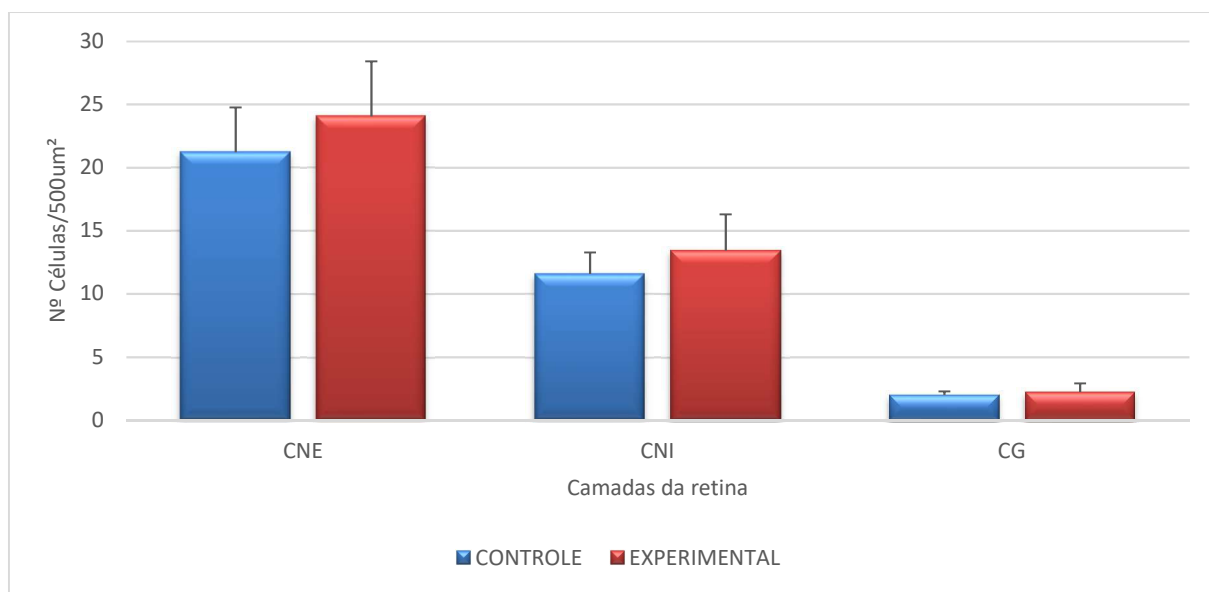


Figura 14. Gráfico representativo da densidade numérica das camadas estudadas nos diferentes grupos.

CNE – camada nuclear externa, CNI – camada nuclear interna e CG – camada de células ganglionares.

Entretanto, observou-se um aumento estatisticamente significativo da área nuclear das células em todas as camadas estudadas no grupo experimental quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4. Área nuclear das células, expressas em valores médios (μm^2) e respectivos desvios padrão.

| Camadas | Grupos | n | Média | Desvio Padrão | 95% intervalo de confiança | | p |
|---------|--------------|---|--------|---------------|----------------------------|--------|-------|
| | | | | | mínimo | máximo | |
| CNE | Controle | 6 | 12,307 | $\pm 1,754$ | 10,466 | 14,148 | 0,002 |
| | Experimental | 6 | 20,729 | $\pm 0,592$ | 20,107 | 21,350 | |
| CNI | Controle | 6 | 19,123 | $\pm 3,209$ | 15,755 | 22,491 | 0,015 |
| | Experimental | 6 | 30,520 | $\pm 4,699$ | 25,588 | 35,451 | |
| CCG | Controle | 6 | 40,219 | $\pm 5,312$ | 34,644 | 45,793 | 0,002 |
| | Experimental | 6 | 53,226 | $\pm 0,680$ | 49,523 | 56,929 | |

CNE –camada nuclear externa, CNI – camada nuclear interna, CCG – camada de células ganglionares.

Fonte: Autor.

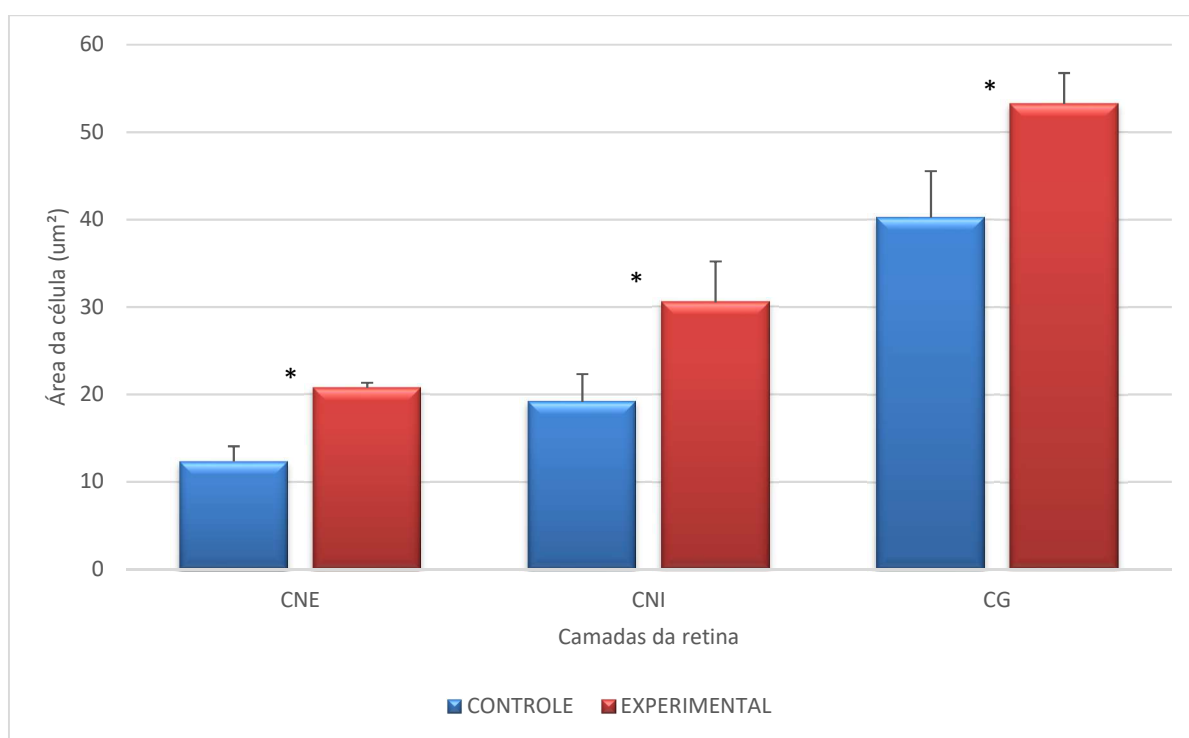


Figura 15. Gráfico representativo da área nuclear das células nas camadas estudadas nos diferentes grupos.

CNE – camada nuclear externa, CNI – camada nuclear interna e CG – camada de células ganglionares.

Ademais, por meio da análise comparativa dos cortes histológicos referentes aos olhos expostos à luz LED e aos olhos não expostos, houve alteração morfológica visualmente

perceptiva em algumas estruturas retinianas entre os grupos. Aspectos como a desorganização das camadas, aumento do espaço citoplasmático das células, aumento da camada PCB e núcleos hipercromados, que são sugestivos de picnose celular, foram detectados (Figura 16).

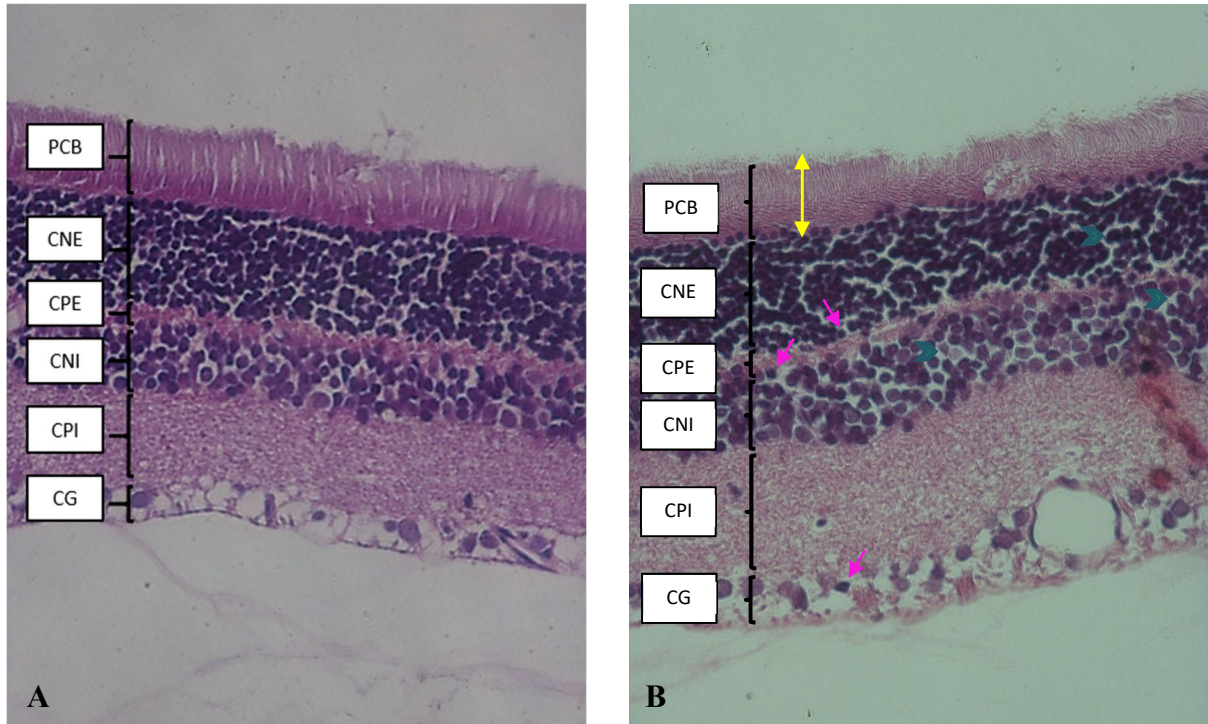


Figura 16. Secções histológicas da retina do rato A (Controle) e B (Experimental) – Camada de células ganglionares (CG); Camada plexiforme interna (CPI); Camada nuclear interna (CNI); Camada plexiforme externa (CPE); Camada nuclear externa (CNE); Prolongamento de cones e bastonetes (PCB). Ambas as fotos no aumento de 40x, animal 3, lâmina 15, secção 2.

- ↘ - Célula hipercromada sugestiva de picnose;
- - Aumento do espaço citoplasmático;
- ↕ - Aumento dos prolongamentos de cones e bastonetes.

6 DISCUSSÃO

A luz azul é indispensável para dar início à cascata de polimerização dos materiais resinosos utilizados na Odontologia, sendo fundamental uma adequada relação entre a potência e o tempo de exposição (JANDT et al., 2000). Entretanto, esse mesmo componente azul (450 nm – 495 nm), associado a alta intensidade, é considerado uma das maiores preocupações com relação aos efeitos nocivos do LED ao olho humano, especialmente na região fotossensível da retina (JAADANE et al., 2015). Estudos mostram que esse comprimento de onda (luz azul) é um fator crítico para a toxicidade na retina, em virtude dos danos na camada de fotorreceptores, além de gerar um grande desconforto visual devido ao caráter pontual, alto nível de iluminância (lux) e estresse oxidativo gerado nas células fotossensíveis (SHANG et al., 2014; KRIGEL et al., 2016; SHANG et al., 2017).

O conhecimento da estrutura retiniana, evidenciando detalhes que estavam fora do alcance da microscopia óptica, iniciou-se com MAEDA (1959) que estudou vasos retinianos de olhos humanos normais. Na década de 60, vários trabalhos foram desenvolvidos, descrevendo a estrutura da retina normal do ser humano (TOUSSAINT e DUSTIN, 1963; KUWABARA e COGAN, 1960; 1963; 1965) e de outros animais, como: o rato (KISSEN e BLOODWORTH, 1961) e o macaco (ISHIKAWA, 1963). Diante dos achados histológicos, a literatura relata similaridade das camadas da estrutura retiniana de ratos e camundongos com a estrutura retiniana dos humanos, o que nos permite utilizar esses animais para estudos experimentais (SCHELLINI, 1992; IOSHIMOTO, 2010; FREITAS, 2011).

Em 1966, estes animais experimentais foram utilizados nos primeiros estudos acerca dos potenciais danos ao olho causados pelo efeito da luz no estudo de referência de NOELL (1966). Os achados iniciais descreveram um inchaço celular, com citoplasma pouco corado e núcleo aumentado. Além disso, a picnose, descrita como o sinal inicial indicativo de apoptose celular e representada por um núcleo hipercromado, também foi descrita, especialmente na região central da retina, tomando como referência a fóvea central.

Assim sendo, o presente trabalho focou as análises histológicas nesta região da fóvea central, que foi identificada a partir da análise da disposição do cristalino e das outras estruturas do globo ocular.

O aparelho fotopolimerizador utilizado (VALO® - *Ultradent*) apresenta amplo espectro, com comprimentos de ondas no intervalo de 395 nm – 480 nm, abrangendo as luzes ultravioleta e azul. Apesar dos estudos já relatarem maior risco de danos oculares à luz azul, a luz

ultravioleta proveniente do fotopolimerizadores de LEDs odontológicos com iluminância de 1000 lux, inferior ao valor mensurado no aparelho utilizado nesta pesquisa (3500 luxes), sobre a mesma distância de 30 cm entre o aparelho e o olho, também demonstrou potência suficiente para causar danos visuais severos e a resposta fisiológica da retina foi afetada irreversivelmente através de danos fotoquímicos (RASSAEI et al., 2013).

Os resultados do estudo demonstraram que houve alterações volumétricas significativas no volume total da retina. Os valores médios obtidos foram de 0,584 mm³ no GC e 0,849 mm³ no GE. Assim, observa-se que a fotoestimulação com luz LED de alta potência na retina do rato provocou um aumento estatisticamente significativo no volume total da retina.

Ao analisar os valores referentes aos volumes médios de cada camada da retina, os resultados mostram que houve aumento de volume nas CCG, CPI, CNE e PCB, exatamente aquelas camadas que contém as células fotossensíveis.

Os cones e bastonetes, as células encontradas especialmente na CNE, são as principais células fotossensíveis que são estimuladas diretamente pela exposição a luz. Dessa forma, diante do estímulo local, a exposição a luz LED, todas as organelas presentes trabalham para suportar a atividade das células fotorreceptoras. Assim, essas células passam a ter uma atividade metabólica maior para processar a informação e com isso se faz necessário um maior desenvolvimento e produção de energia (GUYTON, 2011), justificando o aumento em volume dessa camada, quando comparado ao olho controle.

Entretanto, os cones e bastonetes não são as únicas células fotossensíveis da retina. Em um estudo realizado por PROVENCIO et al. (2000), observou-se que um pequeno grupo de células ganglionares da retina era intrinsicamente fotossensível e foram denominadas de células ganglionares intrinsicamente fotossensíveis da retina. Essas células constituem menos de 2% da população de células ganglionares da retina e contém como pigmento fotossensível a *melanopsina*, uma opsina diferente da encontrada nos cones, e cujo pico de absorção fica na região espectral dos comprimentos de onda curtos da luz azul, em torno de 480 nm.

Além disso, as células ganglionares da retina têm seus dendritos na CPI e seus corpos celulares na CCG. Especificamente nas retinas dos mamíferos, a sua maioria apresenta a célula ganglionar *azul-ON*, a qual recebe a saída de estímulo em resposta ao impulso luminoso de cone azul. Dessa forma, o feixe de luz azul projetado sobre a retina (luz LED), é capaz de estimular as células ganglionares, resultando numa maior atividade metabólica dessas células e o conseqüente aumento das camadas que as contem, a CPI e a CCG. Dessa forma, é possível

compreender e inferir as alterações ocorridas nessas camadas em virtude da exposição à luz LED.

Dessa forma, é possível compreender e inferir que, em virtude da exposição à luz LED, as células fotossensíveis passam a ter uma atividade metabólica para processar a informação e com isso se faz necessário um maior desenvolvimento e produção de energia, especialmente por parte das mitocôndrias (GUYTON, 2011), justificando o seu aumento em espessura, quando comparado ao olho controle. Além disso, é reconhecido que a emissão de luz azul também atua fortemente na formação de radicais de superóxidos a partir dessas mitocôndrias, que podem ser rapidamente transformados em componentes tóxicos quando em estado mais avançado de exposição, causando danos oxidativos às células (SHANG, 2017).

Dentre as camadas com resultados significativos, a camada PCB foi a que ocorreu maior diferença estatisticamente significativa, aumentando de 0,094 para 0,149 mm³, em média. Sabe-se que esta camada é composta basicamente pelos maiores componentes citoplasmáticos dos cones e bastonetes, e onde se concentra toda a maquinaria metabólica dessas células. Dessa forma, o aumento do volume dos PCB resulta da exacerbação da atividade metabólica, o que confere uma resposta ativa dessas células fotossensíveis à exposição aumentada à luz (GUYTON, 2011; ROSS, 2012).

Não obstante, apesar do aumento do volume da retina, a densidade numérica das camadas estudadas não se comportou da mesma forma, apresentando um aumento não significativo. Essa medida se caracteriza pela razão entre o número de células e a área da camada. Dessa forma, os achados desse estudo sugerem que não houve alterações no número das células, apesar de ter ocorrido o aumento no volume das camadas.

Destarte, a alteração do volume da retina no grupo exposto a luz, ocorreu não por conta da variação do número de células, mas sim em razão do aumento do seu conteúdo citoplasmático. Sabemos que as organelas responsáveis por toda a atividade metabólica se concentram nesse compartimento celular. Dessa forma, as mitocôndrias que são responsáveis pela produção energética celular passam a produzir cada vez mais essa energia à medida que a oferta de luz se torna abundante. Assim sendo, as células fotorreceptoras e neuronais possam trabalhar no sentido do processamento e transdução em impulsos elétricos que gerem a informação visual (GUYTON, 2011; ROSS, 2012).

Ao analisar os dados da área nuclear das células, os resultados mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo dessa área em todas as camadas analisadas: CNI, CNE, CCG. Se associarmos isto à análise visual é possível notar que algumas células estão

hipercromadas, especialmente quando comparadas ao padrão mais homogêneo do grupo controle. Apesar deste aspecto picnótico representar uma condensação da cromatina, o que sugere uma diminuição da área nuclear, estatisticamente houve um aumento dos valores da área, representando um inchaço. Estudos mostram que, a princípio, esse fenômeno se inicia com uma remodelação e aumento dessa medida, descrita como fase 1 picnótica (JONES, 2005; MARC, 2008; SHANG, 2017), o que corrobora com nossos achados.

Apesar do protocolo de exposição ter sido relativamente baixo, representado apenas por três exposições em um único dia, é necessário considerar os parâmetros relacionados à vida média dos ratos, visto que estes constituem o nosso objeto de estudo. Desta forma, de acordo com ANDREOLLO (2012) e DUTTA e SENGUPTA (2016) aproximadamente cada dia de vida de um rato equivale a 30 dias na vida de humanos, o que à princípio justificaria a classificação dessa metodologia como aguda. Assim sendo, compreende-se que os resultados do trabalho devem ser levados em consideração para uma prática clínica com segurança, visto que um profissional de saúde que trabalha com este tipo de aparelho fotoativador executa este tipo de procedimento por pelo menos 30 anos. Desta forma, danos oculares tidos como potenciais, passam a ser reais.

A comprovação das alterações morfométricas nas camadas da retina, indicando atividade metabólica aumentada e possíveis danos a essa estrutura, chamam a atenção quanto à necessidade de proteção contra essa exposição à luz LED. Os filtros de luz, que estão inclusos como um acessório destes aparelhos fotoativadores, muitas vezes tem seu uso negligenciado e deve ser obrigatoriamente utilizado pelos profissionais. Em um estudo realizado por Soares (2017), foi comprovado em um estudo que pelo menos 97% da irradiação nociva consegue ser bloqueada por filtros de diversas marcas e, especialmente o filtro do VALO® (Ortho, Ultradent, South Jordan, Utah, Estados Unidos), mostrou a maior eficácia entre todos os outros testados, reafirmando os benefícios do seu uso rotineiro. Apesar de todos os fabricantes recomendarem o uso de filtro laranja para a proteção dos olhos, a adesão do uso dos óculos de bloqueio da luz azul é baixa (ERNST et al., 2018), fato este que não deve ser negligenciado pelos profissionais.

Apesar das limitações inerentes ao estudo em animais e da pesquisa apresentar protocolo de exposição aguda, novos trabalhos com protocolo crônico devem ser realizados para avaliação em longo prazo, visto o efeito da luz azul é cumulativo e está presente na rotina regular dos ortodontistas, o que representará um grande risco à integridade da retina.

7 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos e na metodologia aplicada:

- Houve aumento do volume total da retina no grupo exposto a luz;
- Dentre as camadas da retina, observou diferenças estatisticamente significativas na CCG, CPI, CNE e PCB, exatamente aquelas que possuem as células fotossensíveis;
- Não houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos valores da densidade numérica apresentadas pelos grupos, não houve aumento do número de células;
- As células fotorreceptoras e neuronais de todas as camadas estudadas responderam ativamente, demonstrando intenso metabolismo celular em resposta à luz LED;
- A área nuclear das células de todas as camadas avaliadas (CNI, CNE e CCG) aumentou significativamente no grupo experimental.

REFERÊNCIAS

- ACCETTA, D.F.A. et al. Influência dos fotopolimerizadores (luz halógena X led) na resistência à compressão de resinas compostas. **Rev. Fac. Odontol. Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 49, n. 3, p. 17-19, set./dez., 2008.
- AMATO, P.A.F. et al. Time reduction of light curing: Influence on conversion degree and microhardness of orthodontic composites. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 146, n. 1, p. 40-46, jul. 2014.
- ANDREOLLO, N.A., FREITAS E, ARAÚJO M.R.; LOPES L.R. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.** 25(1):49–51, 2012.
- ARTHUR, A.M.; IANO, Y.; TURUDA, P.D.; LARICO, R.F.; ARTHUR, R. Técnicas de análise da retina humana: revisão breve sobre os recursos e as renovações propedêuticas disponíveis à prevenção e o diagnóstico precoce das complicações vasculares da retina associadas às doenças sistêmicas. **Ensaio e Ciência, Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**. Vol.15, n. 4. 2011.
- BAILES, H.J.; LUCAS, R.J. Melanopsin and inner retinal photoreception. **Cellular and Molecular Life Science**, 67:99 - 111, 2010.
- BASHA, A.A.; MATHANGI, D.C.; SHYMALA, R.; RAO, K.R. Protective effect of light emitting diode phototherapy on fluorescent light induced damage in wistar strain albino rats. **Annals of Anatomy** 196, 312-316, 2014.
- BERMER, Oswaldo Arruda et al. **Manual de Técnicas para Histologia Normal e Patológica**. São Paulo, EDART, Ed. Da Universidade de São Paulo, 1976.
- CEPKO, C.L.; AUSTIN, C.P.; YANG, X.; ALEXIADES, M.; EZZEDDINE, D. Cell fate determination in the vertebrate retina. **Proc Natl Acad Sci**. v. 93: p. 589–595, USA.1996.
- CEREKJA, E.; CAKIRER, B. Effect of short curing times with a high-intensity light-emitting diode or high-power halogen on shear bond strength of metal brackets before and after thermocycling. **The Angle Orthod.** 2011; 81:510-516.
- DIAS, R.M.S.L. **Efeito do comprimento de onda e da intensidade da luz sobre o ritmo circadiano da atividade motora em saguis (Callithrix jacchus)**. 114f. Tese (Doutorado em Psicobiologia) – Programa de pós-graduação em Psicobiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2016.
- DOWLING, J.E.; BOYCOTT, B.B. Organization of the primate retina: electron microscopy. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** Nov 15, 166 (1002): 80 – 111, 1966.
- DUTTA, S.; SENGUPTA, P. Men and mice: Relating their ages. **Life Sciences**. v. 152, n.1, p. 244-248, 2016.

ERNST, C.P. et al. Visible Light Curing Devices – Irradiance and Use in 302 German Dental Offices. **J Adhes Dent** 20: 41–55, 2018.

FLEMING, P.S. et al. Curing lights for orthodontic bonding: A systematic review and meta-analysis. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v.143, n.4, p.92-s103, abr. 2013.

FREITAS, E.B.; MURAKAMI, V. Y.; RAINERE NETO, R.; FILADHELFO; A. L. Estudo comparativo de retinas de animais domésticos e seres humanos – revisão de literatura. **Revista Científica eletrônica de medicina veterinária**, n. 17, 2011.

GUPTA, S.P.; SHRESTHA, B.K. Shear bond strength of a bracket-bonding system cured with a light-emitting diode or halogen-based light-curing unit at various polymerization times. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dentistry**; (10): 61-67, 2018.

GUYTON e HALL. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12nd ed. São Paulo: Elsevier; 2011. p. 645-53.

HANNING, M.; BOTT, B. In-vitro pulp chamber temperature rise during composite resin polymerization with various light-curing sources. **Journal of Dental Materials**. v. 15, n. 4, p. 275-281, jul. 1999.

HOWARD, C.V.; REED, MG. **Unbiased stereology: three-dimensional measurement in microscopy**, 2nd ed. New York: BIOS Scientific Pu, 2005: 277 p.

IOSHIMOTO, G. L. **Estudo da eletrorretinografia do camundongo modelo de Alzheimer (3xTg-AD)**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, 2010.

ISHIKAWA, T. Fine structure of retinal vessels in man and macaque monkey. **Invest. Ophthalmol.**, v.2, p.1-8, 1963.

JAADANE, I; BOULENGUEZ, P; CHAHORY, S; et al. Free Radical Biology and Medicine Retinal damage induced by commercial light emitting diodes (LEDs). **Free Radic. Biol. Med.** 84:373–84, 2015.

JAADANE, I. et al. Retinal damage induced by comercial light emitting diodes (LEDs). **Free Radical Biology and Medicine** 84.,73-384. 2015

JANDT, K.D.; MILLS, R.W. A brief history of LED photopolymerization. **Journal of Dental Materials**. v.29, n.6, p. 605-617, jun. 2013.

JANDT, K.D. et al. Depth of cure and compressive strength of dental composites cured with blue light emitting diodes (LEDs). **Journal of Dental Materials**. v.16, n.1, p. 41-47, jan. 2000.

JONES, B.W., MARC, R.E. Retinal remodeling during retinal degeneration. **Exp. Eye Res.** 81(2):123–37. 2005.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro Brasil, 2004, pag. 453-466.

KILKENNY, C. et al. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. **British Journal of Pharmacology**, v.160, n.7, p.1577-1579, 2010.

KISSEN, A.T., BLOODWORTH Jr., J.M.B. Ultra-structure of retinal capillaries of the rat. **Experimental Eye Research**, v.1, p.1-4, 1961.

KIM, G.H; KIM, H.I.L; PAIK S, JUNG S.W; KANG S, KIM I. Functional and morphological evaluation of blue light-emitting diode-induced retinal degeneration in mice. **Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol**, 254(4):705–16. 2016.

KRIGEL A, BERDUGO M, PICARD E, ET AL. Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals led phototoxicity. **Neuroscience**, 339:296–307, 2016.

KURACHI C, TUBOY AM, MAGALHÃES DV, BAGNATO VS. Hardeness evaluation of dental composite polymerized whit experimental LED–based devices. **Dental Materials**, 17:309-315; 2001.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Studies of retinal vascular patternsnormal architetur. **Arch. Ophthalmol.**, v.64, p.904-11, 1960.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns: mural cells of the retinal capillaries. **Arch. Ophthalmol.**, v.65, p.114-24, 1963.

KUWABARA, T., COGAN, D.G. Retinal vascular patterns-acellular change. **Invest. Ophthalmol., Vis. Sci.**, v.4, p.1049-58, 1965.

LABRIE, D.; et al. Evaluation of ocular hazards from 4 types of curing lights. **J Can Dent Assoc.**, v. 77, p. 1-9, out. 2011.

LEONARD, D.L.; et al. Polymerization Efficiency of LED Curing Lights. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 14, n. 5, p. 286-295, set. 2002.

LEPRINCE, J.; et al. Pulpal-temperature Rise and polymerization efficiency of LED curing Lights. **Operative Dentistry**, v. 35, n. 2, p. 220-230, abr. 2010.

MACHADO, C.T. et al. Novos Tipos de Fontes Fotopolimerizadoras Existentes no Mercado: Conceitos Atuais. **Odontol. Clin. Cient.**, Recife. v. 6, n. 3, p. 207-211, jul./set. 2007.

MAEDA, J. Electron microscopy of the retinal vessels - human retina. **Jpn. J. Ophthalmol.**, v.3, p.37-47, 1959.

MARC, R.E, Jones BW, Watt CB, Vaughan DK, Organisciak DT. Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration. **Molecular Vision**, 14(March):782–806.2, 2008.

MARGALIT, E; SADDA S.R. Retinal and Optic Nerve Diseases. **Artificial Organs**, Vol. 27, No. 11, 2003.

MCCUSKER, N. et al. Light curing in orthodontics; Should we be concerned. **Dental Materials**. v. 29, n. 6, p. 85-90, jun. 2013.

MILLEN, C. et al. A Study of Temperature Rise in the Pulp Chamber during Composite Polymerization with Different Light-curing Units. **The Journal of Contemporary Dental Practice**. v. 8, n. 7, p. 1-13, nov. 2007.

MILLS, R.W. et al. High power light emitting diode (LED) arrays versus halogen light polymerization of oral biomaterials Barcol hardness, compressive strength and radiometric properties. **Biomaterials**. v. 23, n. 14, p. 2955-2963, jul. 2002.

MOLLON, J. D; BOWMAKER, J.K. The spatial arrangement of cones in the primate fovea. **Nature**, 360:677-9, 1992.

NAKAMURA, M. et al. The involvement of the oxidative stress in murine blue LED light-Induced retinal damage model. **The Pharmaceutical Society of Japan** v. 40, n.8, 2017.

NAKAMURA, M. et al. Exposure to excessive blue LED light damages retinal pigment epithelium and photoreceptors of pigmented mice. **Experimental Eye Research** v. 177; 1-11; 2018.

NOELL, W.K; WALKER, V.S; KANG, B.S; BERMAN S. Retinal damage by light in rats. **Invest. Ophthalmol**. 5(5):450-73, 1966.

NOSEDA, R. et al. A neural mechanism for exacerbation of headache by light. **Nature Neuroscience**, 13, 239-245, 2010.

OESTERLE, L.J.; NEWMAN, S.M.; SHELLHART, W.C. Comparative bond strength of brackets cured using a pulse xênon curing light with 2 different light-guide sizes. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 122, n.3, p. 242-50, set. 2002.

PALOMARES, N.B. et al. Effect of high-intensity LED units at reduced curing time on in vitro bond strength of orthodontic brackets. **World Journal of Orthodontics**. v. 9, n. 3, p. 203-208. 2008.

PANDIS, N. et al. Occupational hazards in orthodontics A review of risks and associated pathology. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 132, n. 3, p. 280-292, set. 2007.

PEREIRA, T.M. et al. Temperature changes on dental pulpal chamber during Led light curing simulation. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**. v. 12, n. 3, p. 1-4, mai. 2010.

PROVENCIO, I.; RODRIGUEZ I.R.; JIANG, G.; HAYES W.P.; MOREIRA, E.F.; ROLLAG, M.D. A novel human opsin in the inner retina. **The Journal of Neuroscience**. v. 20, p. 600-605, 2000.

RAHIOTIS, C., PATSOURI, K., SILIKAS, N., KAKABOURA, A. Curing efficiency of high-intensity light-emitting-diode (LED) devices. **Journal of Oral Science**, v. 52, n.2, 187-195, 2010.

RASSAEI, M., THELEN, M., ABUMUAILEQ, R. Effect of high-intensity irradiation from dental photopolymerization on the isolated and superfused vertebrate retina. **Graefes. Arch. Clin. Exp. Ophthalmol**; 251(3):751–62, 2013.

REIS, A.; LOGUERCIO, A.D. **Materiais dentários diretos: dos fundamentos à aplicação clínica**. São Paulo: Santos, 2007. 275-320p.

ROLL, E.M.; JACOBSEN, N.; HENSTEN-PETTERSEN, A. Health hazards associated with curing light in the dental clinic. **Clin Oral Invest**, 8:113-117, 2004.

ROSS MH, PAWLINA W. **Histologia: Texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular**. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 921-41.

RUEGGERBERG, F. A. State-of-the-art: dental photocuring - a review. **Dental Materials**, v. 27, n. 1, p. 39-52, 2011.

RUNNACLES, P. et al. In vitro temperature rise in anesthetized human pulp during exposure to a polywave LED light curing unit. **Dental Materials**. v. 31, n. 5, p. 505-5013, fev. 2015.

SANTINI, A. et al. Degree of conversion and microhardness of TPO-containing resin-based composites cured by polywave and monowave LED units. **Journal of Dentistry**, v. 40, n. 7, p. 577-584, 2012.

SCHELLINI, S. A. **Retinopatia diabética experimental. Estudo estrutural, ultraestrutural e morfométrico da retina de ratos normais, diabéticos e diabéticos tratados**. 1992. 160f. Tese (Doutorado) – Programa de pós-graduação em Saúde Coletiva, Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Botucatu - SP.

SHANG, Y., WANG, G., SLINEY, D., YANG, C., LEE, L. White Light – Emitting Diodes (LEDs) at Domestic Lighting Levels and Retinal Injury in a Rat Model. **Environ. Health Perspect**. 122(3):269–76, 2014.

SHANG, Y., WANG, G., SLINEY, D., YANG, C., LEE, L. Light-emitting-diode induced retinal damage and its wavelength dependency. **Int. J. Ophthalmol**. 10(2):191–202, 2017.

STAHL, F. et al. Light-emitting diode (LED) polymerisation of dental composites flexural properties and polymerisation potential. **Biomaterials**. v. 21, n.13, p. 1379-1385, jul. 2000.

STAMATACOS, C.; HARRISON, J.L. The possible ocular Hazards of LED Dental Illumination Applications. **Journal of the Tennessee Dental Association**. V. 93, n. 2, p. 26-32. 2012.

STAUDT, C.B.; KREJCI, I.; MAVROPOULOS, A. Bracket bond strength dependence on light power density. **Journal of Dentistry**, v. 34, n. 7, p. 498-502, 2006.

SWANSON, T. et al. Shear bond strength of orthodontic brackets bonded with light-emitting diode curing units at various polymerization times. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**. v. 125, n. 3, p. 337-41, mar. 2004.

TAVAS, M.A.; WATTS, D.C. Bonding of orthodontic brackets by transillumination of a light activated composite: an in vitro study. **British Journal of Orthodontics**, v. 6, n. 4, p. 207-208, 1979.

TOOVÉ, M.J. **An introduction to the visual system**. Second edition. In __. Cap 2, The eye and forming the image. p. 18-43, Cambridge University Press: New York, 2008.

UEDA, T. et al. Eye damage control by reduced blue illumination. **Experimental Eye Research**. v. 89, n. 6, p. 863-868. Dez. 2009.

VILELLA, O.V. O desenvolvimento da Ortodontia no Brasil e no mundo. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 12, n. 6, p. 131-156, 2007.

USUAMEZ, S. et al. Effect of light-emitting diode on bond strength of orthodontic brackets. **The Angle Orthodontist**. v.74, n. 2, p. 259-263, abr. 2004.

ZACH, L., COHEN, G. Pulp response to externally applied heat. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**. v.19, n. 4, p. 515-30, abr. 1965.

YOON, T.-H. et al. Degree of polymerization of resin composites by different light sources. **Journal of Oral Rehabilitation**, v. 29, n. 12, p. 1165-1173, 2002.

WALLS, H.L., WALLS, K.L., BENKE, G. Eye disease resulting from increased use of fluorescent lighting as a climate change mitigation strategy. **Am. J. Public Health**101, 2222-2225, 2011.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do protocolo experimental empregado (CEUA-UFRN).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA



Av. Salgado Filho, S/N – CEP: 59072-970 – Natal / RN
Fone: (84) 9229-6491 / e-mail: ceua@reitoria.ufrn.br


CERTIFICADO

Natal (RN), 09 de maio de 2017.

Certificamos que a proposta intitulada “**Influência do diodo emissor de luz (LED) de alta potência sobre a retina do rato**”, **PARECER nº 007012/2017, sob a responsabilidade de Sergei Godeiro Fernandes Rabelo Caldas**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n.º 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – CEUA/UFRN.

| | |
|---------------------|---|
| Vigência do Projeto | ABRIL 2018 |
| Espécie/Linhagem | Ratos Wistar |
| Número de Animais | 12 |
| Idade/Peso | 8 semanas / 300g |
| Sexo | Machos |
| Origem | Biotério do DMOR - UFRN |
| Manutenção | Biotério de Experimentação do DEMOR (Museu de Ciências Morfológicas) - UFRN |

Informamos ainda que, segundo o Cap. 2, Art. 13, do Regimento Interno desta CEUA, é função do professor/pesquisador responsável pelo projeto a elaboração de relatório de acompanhamento que deverá ser entregue tão logo a pesquisa for concluída.


José de Castro Souza Neto Júnior
Coordenador da CEUA-UFRN

www.ceua.propesq.ufrn.br



National Centre
for the Replacement
Refinement & Reduction
of Animals in Research

Tradução Português (Brasil)

The ARRIVE guidelines

Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments

As diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) foram desenvolvidas como parte de uma iniciativa do NC3Rs para melhorar o desenho, a análise e o manuscrito de investigação com animais – maximizando a informação publicada e minimizando estudos desnecessários. As diretrizes foram publicadas na revista *PLoS Biology* em Junho 2010 e são atualmente endossadas por revistas científicas, agências de financiamento e sociedades científicas.

Carol Kilkenny¹, William J Browne², Innes C Cuthill³, Michael Emerson⁴ and Douglas G Altman⁵

¹The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, London, UK, ²School of Veterinary Science, University of Bristol, Bristol, UK, ³School of Biological Sciences, University of Bristol, Bristol, UK, ⁴National Heart and Lung Institute, Imperial College London, UK, ⁵Centre for Statistics in Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

As diretrizes pretendem:

- Melhorar o relato da investigação feita com animais.
- Guiar os autores na informação essencial que é necessário incluir num manuscrito, sem ser absolutamente normativo.
- Ser flexível de forma a acomodar relatos de um leque amplo de áreas de investigação e protocolos experimentais.
- Promover a publicação de manuscritos replicáveis, transparentes, precisos, detalhado, concisos, com uma ordem lógica e bem escritos.
- Melhorar a comunicação das observações científicas para toda a comunidade científica.

As diretrizes NÃO pretendem:

- Promover a uniformidade, suprimir a criatividade, ou encorajar os autores a cumprir uma lista de artigos. Alguns dos artigos podem não ser adequados a todos os estudos e alguns artigos podem ser descritos nas legendas de tabelas, figuras ou diagramas de fluxo (e.g. números de animais usados, observados e analisados).
- Ser um guia de como desenhar e conduzir as experiências. No entanto, alguns dos artigos da lista, tais como a randomização, observações às cegas e grupos controle, podem ser úteis no planeamento experiências pois reduzem o risco de enviesamento e aumentam a solidez da investigação.

Para quem são as diretrizes?

- Autores experientes e inexperientes
- Editores de revistas
- Revisores de artigos
- Agências de financiamento

A que tipo de áreas de investigação se aplicam estas diretrizes?

As diretrizes serão mais úteis para estudos comparativos, onde dois ou mais grupos de animais experimentais são comparados e onde um ou mais dos grupos podem ser considerados como controle. Também se aplicam a estudos comparativos de diferentes doses de fármacos ou, por exemplo, onde um único animal é usado como seu próprio controle (within-subject experiment).

A maioria das recomendações também são aplicáveis a estudos que não tem grupos controle.

As diretrizes são adequadas em qualquer área de ciências biológicas onde são usados animais de laboratório.

Como podem ser usadas estas diretrizes?

As diretrizes fornecem uma lista para quem prepara ou revê um manuscrito para publicação.

Referências

- Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010) Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS Biol* 8(6): e1000412. doi:10.1371/journal.pbio.1000412
- Schulz KF, Altman DG, Moher D, the CONSORT Group (2010) CONSORT 2010 Statement: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ* 340:e332.

Financiamento

O projeto de diretrizes de relato de experiências em animais de laboratório foi financiado pelo National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research (NC3Rs).

Further Information

www.nc3rs.org.uk/ARRIVE
enquiries@nc3rs.org.uk
[@NC3Rs](https://twitter.com/NC3Rs)

Referências

O NC3Rs agradece a competência técnica e recomendações que todos os contribuidores deram para o desenvolvimento das diretrizes. Queremos agradecer em particular a contribuição do Grupo de Trabalho de Diretrizes do NC3Rs. Gostaríamos de agradecer aos bolsistas do NC3Rs, ao Medical Research Council, Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC), Wellcome Trust, Parkinson's Disease Society, British Heart Foundation e seus bolsistas e membros de comitês de avaliação de financiamento que deram opiniões sobre as diretrizes.

Gostaríamos de agradecer a Dr Monica Marta (Queen Mary University of London), Professor Katherine Athayde Teixeira de Carvalho (Federal University of Paraná) e Dr José Mauro Granjeiro (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) pela ajuda na tradução para o Português do Brasil.

| ARTIGOS | RECOMENDAÇÕES |
|--------------------------------|---|
| Título | 1 Permite uma descrição do conteúdo do artigo que seja precisa e concisa. |
| Resumo | 2 Proporciona um sumário do contexto, objetivos do estudo, incluindo pormenores da espécie ou estirpe de animais usada, métodos e resultados mais importantes e conclusões do estudo que sejam precisas e concisas. |
| INTRODUÇÃO | |
| Contexto | 3 a. Inclui suficiente contexto científico (incluindo referências relevantes de publicações prévias) de forma a compreender o motivo e o contexto para o estudo, e explica a estratégia e lógica experimentais. b. Explica como e porque a espécie e modelo animais usados podem atingir os objetivos científicos e, onde possível, descreve a pertinência do estudo para a biologia humana. |
| Objectives | 4 Descreve com clareza os objetivos primário e secundários do estudo ou a hipótese a ser testada. |
| MÉTODOS | |
| Declaração ética | 5 Indica as revisões por Conselhos de Ética e a natureza destes Conselhos de Ética. Inclui as diretrizes institucionais e nacionais para a utilização de modelos animais específicas para o estudo realizado. |
| Plano do estudo | 6 Para cada experiência, fornece pormenores do desenho de estudo que incluem: a. Número de grupos experimentais e grupos controle. b. Iniciativas para minimizar os efeitos de enviesamento subjetivo no processo de escolha de animais para o grupo de estudo ou controle (processo de randomização) e na observação/coleta de resultados (situações em que os investigadores estavam "cegos"). c. A unidade experimental (animais isolados, em grupo e as caixas/gaiolas usadas, se estavam em isolamento). Um diagrama ou fluxograma é útil e ilustrativo no caso de estudo complexos. |
| Procedimentos das Experiências | 7 Fornece detalhes de todos os procedimentos técnicos, para cada experiência cada grupo experimental, incluindo controles. Exemplos: a. Como (i.e. dose e formulação do fármaco, via de administração e posologia; descrição de procedimentos para analgesia ou anestesia, incluindo o monitoramento, procedimento cirúrgico e método de eutanásia). Detalhes do equipamento especializado usado, incluindo fornecedores. b. Quando (hora do dia). c. Onde (caixa ou gaiola, bancada de laboratório, labirintos de água). d. Porque (lógica para a escolha de anestésico, vias de administração, fármacos e doses usadas). |
| Animais | 8 a. Descreve os animais usados, espécies e estirpes, sexo, idade (média ou mediana e variação), peso (média ou mediana e variação). b. Descreve a origem dos animais, a nomenclatura internacional, modificações genéticas (i.e. knock-out ou transgênico), genótipos, declaração veterinária de saúde, estado de saúde ou imunidade, procedimento farmacológico ou técnico, procedimentos prévios nos animais). |



The ARRIVE Guidelines: Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments. Originally published in *PLOS Biology*, June 2010¹

| | | |
|--|----|--|
| Instalações e condições veterinárias dos animais | 9 | Fornecer dados de: a. Instalações: tipo de biotério (i.e. estéril, caixas em isolamento), tipos de caixas/gaiolas usadas, material do fundo das gaiolas/caixas, número de animais por caixa, forma e material de tanques (para peixes). b. Condições de manutenção de animais (programa de reprodução, tipo e frequência de alimentação, ciclos de luz e escuro, temperatura, qualidade de água, acesso a água e comida, enriquecimento do meio). c. Avaliação de bem-estar e intervenções atitudes durante ou pré e pós experiência. |
| Números da amostra | 10 | a. Descreve o número total de animais usados em cada experiência e o número de animais em cada grupo experimental. b. Explica como a decisão do número de animais a usar foi tomada (cálculo estatístico dependente do efeito esperado da intervenção). c. Indica o número de vezes que a experiência foi repetida, caso seja pertinente. |
| Atribuição de animais aos grupos experimentais | 11 | a. Detalha como os animais foram atribuídos a um ou outro grupo, randomização ou emparelhamento. b. Descreve a ordem usada para tratar ou observar cada animal. |
| Resultados experimentais | 12 | Definição clara dos resultados principais e secundários e da quantificação ou qualificação dos resultados medidos (morte celular, marcadores moleculares, mudanças comportamentais). |
| Métodos estatísticos | 13 | a. Descreve pormenores dos métodos estatísticos usadas para cada análise. b. Descreve a unidade usada em cada análise (um animal, grupo de animais, um neurónio). c. Descreve os métodos usados para avaliar, se os resultados atingiram os requisitos estatísticos. |
| RESULTADOS | | |
| Valores de base | 14 | Para cada grupo experimental, descreve das características importantes e saúde dos animais (i.e. peso, infeções, fármacos/intervenções prévias) antes da intervenção (esta informação pode ser em tabelas). |
| Números analisados | 15 | a. Descreve o número absoluto de animais usados em cada grupo incluído em cada análise (por exemplo 10/20 e não 50%). b. Explicita caso algum animal ou valor não tenha sido incluído e a razão. |
| Resultados e estimativas | 16 | Descreve os resultados para cada experiência, com medidas da precisão usada (erro padrão e intervalos de confiança). |
| Efeitos adversos | 17 | a. Detalha os efeitos laterais em cada grupo experimental. b. Descreve quaisquer modificações feitas ao protocolo de forma a reduzir o aparecimento de efeitos laterais. |
| DISCUSSÃO | | |
| Interpretação/ implicações científicas | 18 | a. Interpreta os resultados, considerando os objetivos e hipóteses iniciais e o conhecimento corrente e publicado. b. Comenta as limitações do estudo, incluindo potenciais vieses, limitações do modelo animal e imprecisões dos resultados ² . c. Descreve quaisquer implicações dos métodos experimentais ou observações para os 3Rs (Substituição, Refinamento, Redução). |
| Generalização ou translação | 19 | Comenta se como os resultados do estudo podem ser traduzidos para outras espécies ou sistemas, incluindo se são relevantes para a biologia humana. |
| Financiamento | 20 | Lista as fontes de financiamento (número da bolsa ou subsídio) e qual o papel dos financiadores no estudo. |

Anexo 3. Sequência do processamento das amostras para confecção das lâminas. Laboratório de técnicas histológicas – UFRN, Natal/RN, 2018.

| ETAPA | REAGENTE |
|--|---------------------|
| Desidratação (1h em cada solução) | Álcool 70% |
| | Álcool 80% |
| | Álcool 90% |
| | Álcool absoluto I |
| | Álcool absoluto II |
| Diafanização (1h em cada solução) | Álcool absoluto III |
| | Xilol PA I |
| | Xilol PA II |
| Impregnação (1h em cada solução) Estufa 60°C | Xilol PA III |
| | Parafina I |
| | Parafina II |
| | Parafina III |

Anexo 4. Descrição do protocolo de coloração histológica das retinas em Hematoxilina/Eosina. Laboratório de técnicas histológicas – UFRN, Natal/RN, 2018.

| ETAPA | ESTÁGIO | REAGENTE | DURAÇÃO |
|--------------|--|------------------------|----------------|
| 1 | Desparafinização | Estufa a 45°C | 40 min |
| 2 | Desparafinização | Xilol I | 10 min |
| 3 | Desparafinização | Xilol II | 10 min |
| 4 | Hidratação | Álcool Etílico 100% | 5 min |
| 5 | Hidratação | Álcool Etílico 80% | 5 min |
| 6 | Hidratação | Álcool Etílico 70% | 5 min |
| 7 | Lavagem | Água | 7 min |
| 8 | Coloração | Hematoxilina | 7 min |
| 9 | Lavagem | Água Corrente | 3 min |
| 10 | Coloração | Eosina | 7 min |
| 11 | Lavagem | Água Corrente | 3 min |
| 12 | Desidratação | Álcool Etílico 70% | 5 min |
| 13 | Desidratação | Álcool Etílico 80% | 5 min |
| 14 | Desidratação | Álcool Etílico 100% I | 3 min |
| 15 | Desidratação | Álcool Etílico 100% II | 3 min |
| 16 | Fixação do corante e conservação do material | Xilol I | 5 min |
| 17 | Fixação do corante e conservação do material | Xilol II | 10 min |