AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUIMICA PULPAR DE PRÉ-MOLARES CONTENDO PREPARO CAVITÁRIO CLASSE V EXPOSTOS À LUZ DE UM FOTOATIVADOR LED DE ALTA POTÊNCIA

Dayane Jaqueline Gross (PIBIC/ PIBIC/CNPq),
Patrício Runnacles, Eduardo Bauml Campagnoli, Ulisses Coelho, César Augusto Galvão Arrais (Orientador), e-mail: cesararrais@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento Odontologia.

4.00.00.00-1 Ciências da Saúde, 4.02.00.00-0 Odontologia

Palavras-chave: Imunohistoquimica, temperatura, fotopolimerizador.

Resumo

Os fabricantes têm desenvolvido novos aparelhos fotopolimerizadores LED de alta potência, podendo estes causar um aumento na temperatura no interior de câmaras pulpares. O estudo consistiu em avaliar possíveis alterações inflamatórias pulpares iniciais decorrentes da exposição de dentes ao LED de alta potência. Foram selecionados 8 pacientes com indicação de extração ortodôntica de pré-molares. Após o preparo da cavidade Classe V profunda na face vestibular, a mesma foi exposta à luz de um fotoativador a base de LED de alta potência (Bluephase 20i, Ivoclar Vivadent, Schann, Principado de Linchestein) por 60s. O preparo cavitário foi restaurado temporariamente com cimento de ionômero de vidro convencional, enquanto o outro pré-molar inferior serviu como controle. Após 2 horas, os mesmos foram extraídos e encaminhados ao Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia da UEPG para a análise imunohistoquímica. Nos resultados observou-se a presença moderada de ILβ e TNF-α na camada de odontoblastos e interior da polpa. Conclui-se que a luz do fotopolimerizador demonstrou a presença de citocinas, porém não causou alterações pulpares de ordem inflamatória..

Introdução

Os fabricantes têm desenvolvido novos aparelhos fotopolimerizadores a base de diodos emissores de luz (*Light Emitting Diode* - LED) capazes de emitir luz com intensidade acima de 2000 mW/cm^2. Como desvantagem, estas unidades de LED de alta potência geram considerável quantidade de calor[1], que podem ser preocupantes com relação aos possíveis danos na polpa dental.

Em um estudo clássico[2] feito com macacos da espécie *rhesus*, foi constatado que o aumento da temperatura pulpar acima de 5,5°C provocou um quadro inflamatório irreversível no órgão pulpar, induzindo a necrose em 15% das polpas dos dentes avaliados. Em outro estudo, foi visto que a utilização de fotoativadores LED de alta potência é capaz de promover um aumento de até 10,6ºC na temperatura da câmara pulpar, conforme o fotoativador utilizado[3]. Recentemente, em um estudo[4] in vivo realizado em humanos, observou um aumento na temperatura na polpa de pré-molares intactos humanos, o qual era proporcional à densidade de energia depositada no dente. No mesmo estudo, a exposição dos dentes intactos à luz com alta intensidade por 60 s resultou em um aumento na temperatura pulpar

próximo àquele considerado prejudicial ao tecido pulpar. Por isso, a variação de temperatura gerada pela utilização desse aparelho é um fator preocupante, visto que pode afetar a vitalidade da polpa dental.

Na literatura, há estudos *in vitro* que demonstram importantes achados em relação à influência da utilização de fotoativadores LED de alta potência na temperatura da câmara pulpar e das resinas compostas[3;5] porém estudos *in vivo* ainda são escassos. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vivo* a presença de precursores inflamatórios na polpa, decorrentes da exposição em cavidades de classe V de pré-molares, com a luz emitida por um aparelho de fotoativação LED de alta potência.

Materiais e Métodos

Este projeto foi previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), protocolo número 255,945. Foram selecionados 8 sujeitos que necessitavam de exodontia de pré-molares (PM) inferiores ou superiores por motivos ortodônticos vindos da UEPG e Associação Brasileira de Odontologia (ABO) secção Paraná. As idades destes sujeito variaram entre 12 e 30 anos. Os sujeitos foram atendidos nas clínicas da UEPG, passaram por uma consulta inicial e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Os voluntários foram anestesiados por meio de bloqueio do nervo alveolar inferior no caso de PM inferiores ou anestesia infiltrativa no caso de PM superiores para realização dos procedimentos. Cavidades Classe V profundas foram confeccionadas na face vestibular próxima à margem gengival com broca diamantada (n. FG 2131, KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) em alta rotação com irrigação constante. Ao final do preparo, a face vestibular do dente foi exposta à luz do fotoativador a base de LED de alta potência (Bluephase 20i, Ivoclar Vivadent, Schann, Principado de Linchestein) por 60 s (n=5). Como grupo controle, PM contendo a cavidade Classe V não foram expostos à luz do fotoativador. Os PM foram restaurados temporariamente com cimento de ionômero de vidro convencional (Vidrion R, SSWhite, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e extraídos após um intervalo de aproximadamente 2 horas após a exposição à luz. Após extração, os dentes foram imediatamente armazenados em formol tamponado a 10% e encaminhados ao Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia da UEPG para análise da resposta inflamatória do tecido pulpar. Os PM foram fixados em formol tamponado a 10% por no máximo 48 horas e descalcificados em solução de EDTA a 9%, mantidos em constante agitação e com trocas diárias da solução de EDTA. Concluída a descalcificação, o material foi lavado em água corrente e então submetido ao processamento imunohistoquímico. Para isso, as amostras de tecido pulpar já incluídas em parafina foram cortadas na espessura de 3 µm e colocadas em lâminas previamente tratadas com 3-Aminopropyl-triethoxi-silano (silanizadas). O processo de recuperação antigênica foi feito por meio de calor úmido irradiado (microondas) em tampão Citrato 10 mM, ph 6,0 ou conforme protocolo informado pelo fabricante do anticorpo. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em água oxigenada a 20 volumes, água destilada e solução salina tamponada com fosfatos (PBS). Posteriormente, as amostras foram incubadas com anticorpos primários por 16 horas (overnight) a 4°C, com diluições previamente testadas (seguindo a orientação do fabricante), neste estudo foram utilizados anticorpo primário para IL-1β e TNF-α. Na seqüência os cortes foram lavados com PBS (3

trocas de 3 minuto) e a reação revelada com o Novo Link Polymer Detection System (Novocastra, Brasil). Para tanto os cortes foram incubados com solução bloqueadora pós-primária (durante 30 minutos), NovoLink TM Polímero (30 minutos) e solução de revelação de DAB (50 µl de 3,3'-diaminobenzina - cromógeno e 1000 µl solução tampão – durante 05 minutos em câmara escura 37°C). Em seguida, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Carazzi, diafanizados em xilol e montados com bálsamo do Canadá. Como controle negativo das reações, lâminas com cortes foram submetidas a todas as etapas da reação imunohistoquímica, exceto a incubação com o anticorpo primário. A imagem foi capturada em ampliação de 400 vezes por meio de câmera de vídeo acoplada ao microscópio e analisada em programa específico (ImageJ,1.46r, National Institute of Health, EUA), enquanto o estudo histomorfométrico realizado com auxílio do programa ImagePro-Plus®. Os resultados foram na busca de avaliar visualmente sinais que demonstrassem, uma possível inflamação pulpar, como a presença de precursores inflamatórios**.**

Resultados e Discussão

A figura 1 mostra uma imagem representativa do tecido pulpar do grupo controle após a análise imunohistoquímica com marcadores para os precursores inflamatórios TNF-α**.** Na lâmina notou-se alguma marcação inespecífica no tecido e reação com a peroxidase endógena presente nas hemácias. Já no grupo com exposição à luz do LED por 60s (Figura 2), imunomarcação moderada para TNF-α (área acastanhada) foi observada na região da camada de odontoblastos, com algumas áreas imunomarcadas também no interior do tecido pulpar quantidade.

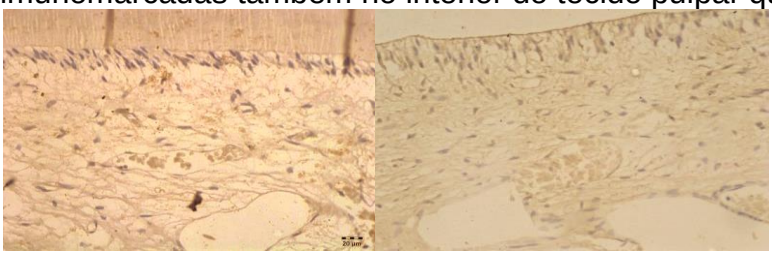


Figura 1 e 2 – Grupo controle (dentes sem exposição) e exposição por 60s (TNF-α). (400x)

A figura 3 exibe uma imagem representativa do grupo controle após imunomarcação para IL-1β, enquanto a figura 4 uma imagem representativa do tecido pulpar exposto à luz do fotoativador LED por 60 s após imunomarcaçãp para IL-1β. Enquanto no grupo controle (Figura 3) não se observou imunomarcação para IL-1β, nos dentes analisados expostos à luz do LED, na figura 4 notou-se áreas focais de ordem moderada dispersa no interior do tecido pulpar.

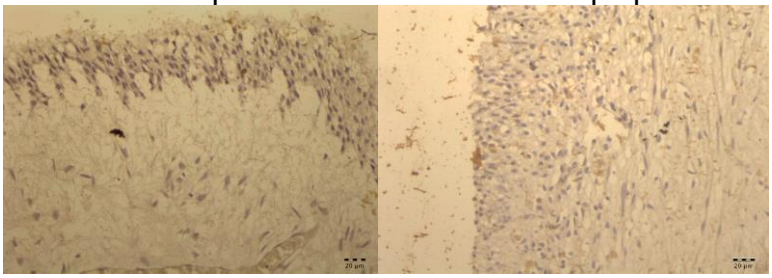


Figura 3 e 4 - Grupo controle (dentes sem exposição) e exposição por 60s (IL-1β). (400x)

Foi possível verificar a presença de citocinas pró-inflamatórias tanto para IL-1β e TNF-α, de ordem moderada. A primeira é um importante mediador da resposta inflamatória, e está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose. A segunda citocina está envolvida em inflamação sistêmica e estimula a fase aguda da resposta inflamatória. Porém, mesmo com a presença destes imunomarcadores, deve-se atentar que apesar de ter ocorrido a agressão, não significa que haverá resposta inflamatória[6], pois o tecido pulpar pode aumentar o fluxo sanguíneo na tentativa de dissipar o calor emitido pela luz do fotoativador[7], eliminar os mediadores pela circulação, protegendo assim o tecido pulpar contra o estímulo térmico.

Cabe salientar também, que o intervalo entre o momento da exposição e a exodontia dos dentes foi de apenas 2 horas. Desta forma, é possível que esse intervalo ainda não seja suficiente para que se inicie o processo inflamatório.

Conclusões

Conclui-se, dentro das limitações desse estudo, que a luz de alta intensidade do fotopolimerizador LED de alta potência de monstrou a presença de citocinas na polpa, porém não causou alterações pulpares de ordem inflamatória.

Agradecimentos

Ao CNPq, pelo auxílio concedido para a este projeto de pesquisa, ao Prof. Dr. César Arrais por toda sua ajuda e dedicação e à Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela disponibilização de toda a infraestrutura para a realização da pesquisa.

Referências

1. ASMUSSEN E, PEUTZFELDT, A. Temperature rise induced by some light emittingDiode and quartz-tungsten-halogen curing units. **Eur J Oral Sci,** v. 113, n. 1, p. 968, Feb 2005.
2. ZACH, L.; COHEN, G. Pulp Response to Externally Applied Heat. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol,** v. 19, p. 515-30, Apr 1965.
3. GOMES M, DEVITO-MORAES A, FRANCCI C, MORAES R, PEREIRA T, FROESSALGADO N, YAMAZAKI L, SILVA L & ZEZELL D. I. Tempreature increse and Thermal Variation at the Pulpal Floor of Cavities: An Infrared Thermographic Analysis. **Oper Dent,** Vol. 38, N. 3, p.324-333. May/Jun 2013.
4. RUNNACLES P, ARRAIS CA, POCHAPSKI MT, DOS SANTOS FA, COELHO U, GOMES JC, DE GOES MF, GOMES OM, RUEGGEBERG FA. In vivo temperature rise in anesthetized human pulp during exposure to a polywave LED light curing unit. Dental Materials. v.31, n.5, p.505-13; 2015.
5. LEPRINCE J, DEVAUX J, MULLIER T, VREVEN J & LELOUP G. Pulpal temperature rise And polymerization efficiency of LED curing lights. **Oper Dent**, v. 35, n.2, p.220-30, Mar/Apr 2010.
6. LUISI SB, BARABACHAM JJD, CHIES JAB. Resposta pulpar frente a agressões: lesões inflamatórias. **R. Fac. Odonto**., Porto Alegre, v.45, n.1, p. 60-63, jul. 2004
7. RAAB WH. Temperature related changes in pulpal microcirculation. **Proceedings of the Finnish Dental Society,** v.88, p.469–79, 1992.