DANIELA SILVA BARROSO DE OLIVEIRA

**aPDT: FOTOSSENSIBILIZADORES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE
LUZ NÃO INFLUENCIARAM NA RESPOSTA TECIDUAL DE
CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato

Ribeirão Preto
2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DA PRESENTE OBRA, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, DESDE QUE CITADA A FONTE.

DANIELA SILVA BARROSO DE OLIVEIRA

FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Daniela Silva Barroso

APDT: Fotossensibilizadores e Tempos de Exposição de Luz não Influenciaram na Resposta Tecidual de Camundongos Isogênicos. Ribeirão Preto, 2016.

115p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

Orientador: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato

1. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.
2. Derivado Fenotiazínico.
3. Curcumina.
4. Camundongos Isogênicos.
5. Tecido subcutâneo

DANIELA SILVA BARROSO DE OLIVEIRA

**aPDT: FOTOSSENSIBILIZADORES E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO DE LUZ NÃO
INFLUENCIARAM NA RESPOSTA TECIDUAL DE CAMUNDONGOS ISOGENICOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientador: Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

DANIELA SILVA BARROSO DE OLIVEIRA

- Nascimento:** 12 de julho de 1974, São Paulo, SP
- Filiação:** Januário José Corrêa Barroso e Marilda das Graças Silva Corrêa Barroso
- 1995-1998:** Curso de Graduação em Odontologia
Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG
- 1999-2001:** Especialização em Odontopediatria
Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG
- 2001-2003:** Mestrado em Odontologia
Área de Concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo
- 2003-2005:** Professora Substituta das Disciplinas Odontopediatria I, Odontopediatria II e Clínica de Odontopediatria
Departamento de Clínica e Cirurgia
Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG
- 2006-Atual:** Professora das Disciplinas Odontopediatria I, Odontopediatria II e Clínica de Odontopediatria
Departamento de Clínica e Cirurgia
Universidade Federal de Alfenas – Unifal-MG

Assim Mesmo

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.

Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto e franco assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.

Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje, pode ser esquecido amanhã.

Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode não ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que, no final das contas, é tudo entre você e Deus.

Nunca foi entre você e os outros.

Madre Tereza de Calcutá

Dedico este trabalho

A você,

Pedro Paulo Csizmar de Oliveira,

...Amor, Esposo, Companheiro, Pai...

O sol nasce e brilha todos os dias permitindo que a vida na Terra exista, sem nos atentarmos para a sua essencialidade. Só lembramos da sua importância quando passamos por vários dias chuvosos. Assim foi a sua presença na minha vida... luz, calor que fazia brotar, germinar, favorecia a minha vida. Dedico a você este trabalho porque antes dediquei a minha vida, assim como você me dedicou a sua. Você sempre acreditou, viveu e pregou o Reino de Deus e eu sei que Nele você está.... olhando por mim, pelos nossos filhos, pela vitória que alcanço hoje, porque você sempre viveu comigo e venceu comigo todas as conquistas da minha vida!

“ Algumas vezes, quando uma pessoa está faltando, o mundo inteiro parece despovoado.”

Alphonse de Lamartine

Agradecimento Eterno

À Deus,

Porque de Vós vem o amor, a fé e a esperança...

E hoje, mais do que nunca, eu sei que este amor me move...

E a fé e a esperança me sustentam...

“E quando penso que vou naufragar,
sinto uma mão forte me puxar para cima,
me colocar em um lugar seguro e me abrigar.

É Deus,

que chega para acalmar a tempestade,
parar o vento e levar o meu barco ao porto seguro.

É na minha fraqueza que o poder de Deus se manifesta.

Isso não é ter sorte, é ser abençoado.”

Ylla Fernandes

À Nossa Senhora,

Porque de Vós vem a proteção e o consolo...

Agradeço...

Aos meus filhos, Rafael e Gabriela

Por darem a razão à minha vida em cada sorriso e olhar. Por terem uma doçura e um carinho contagiantes, os quais me fortalecem, me renovam e me dão energia para viver. Amo vocês infinitamente!!!!

Aos meus pais, Januário e Marilda

Pelo amor incondicional e pelas orações constantes que me mantêm lutando. Pelos exemplos que me fizeram ser quem sou hoje. E, principalmente, por cuidarem dos meus tesouros com tanto amor e dedicação durante a minha ausência. Minha eterna gratidão!!!

Aos meus sogros, Pedro e Izabel...

Pelo amor e carinho que vocês dedicam à mim e as crianças e por toda a ajuda nos momentos em que eu não estive presente. Obrigada sempre!!!

Aos meus irmãos Débora, Daniel, Danilo e Diego

*Aos meus cunhados Clandemir, Michele, Natália, Amanda, Daniel, Larissa,
Luciane e Ryan*

Aos meus sobrinhos Giovana, Isabela, Davi e Lucas

Porque a vida de vocês alegria e ampara a minha vida. Cada um, a sua maneira, é essencial e me dá forças para seguir. Vocês são especiais!!!

Ao meu Tio Paulinho

Por ser um porto seguro onde atraquei meu barco em dias de mar turbulento e aí encontrei paz, descanso e serenidade. Por um amor genuíno e gratuito que me renova. Obrigada sempre!!!

“Fundamental é mesmo o amor. É impossível ser feliz sozinho”

Tom Jobim

Agradeço...

Às minhas famílias de coração...

Família Brassi Luccas

Pedro, Rosa, Mariana, Beatriz e Pedrinho... Deus os colocou em minha vida porque sabia que seria impossível prosseguir sem vocês. Nos momentos alegres e tristes, a casa de vocês é o meu refúgio, a presença de vocês é o meu vigor. E você Rosa.... é para sempre!

Família Rios Honório

Heitor, Dani e Marina... Não há como expressar em palavras a gratidão que eu tenho por ter vocês em minha vida. Por todos os momentos pessoais e profissionais que compartilhamos, por fazerem da casa de vocês a minha casa e por serem exemplos da vida universitária que eu quero para minha vida. E você Heitor.... é um irmão!!!

Benditos os que guardam amigos, os que entregam o ombro pra chorar.

Porque amigo sofre e chora.

Amigo não tem hora pra consolar!

Laura Helena

Agradeço...

Aos amigos...

“Meus amigos são todos assim: metade loucura, outra metade santidade. Escolho-os não pela pele, mas pela pupila, que tem que ter brilho questionador e tonalidade inquietante. Escolho meus amigos pela cara lavada e pela alma exposta. Não quero só o ombro ou o colo, quero também sua maior alegria. Amigo que não ri junto, não sabe sofrer junto. Meus amigos são todos assim: metade bobeira, metade seriedade. Não quero risos previsíveis, nem choros piedosos. Quero amigos, daqueles que fazem da realidade sua fonte de aprendizagem, mas lutam para que a fantasia não desapareça. Não quero amigos adultos, nem chatos. Quero-os metade infância e outra metade velhice. Crianças, para que não esqueçam o valor do vento no rosto, e velhos, para que nunca tenham pressa. Tenho amigos para saber quem eu sou, pois vendo-os loucos e santos, bobos e sérios, crianças e velhos, nunca me esquecerei de que a normalidade é uma ilusão imbecil e estéril.”

Fernando Pessoa

Elaine Franco de Carvalho porque pensar em força e sinceridade é pensar em você e isso é essencial para mim. Obrigada por estar sempre presente, por me estimular a prosseguir e por me contar nos dedos da sua mão, assim como eu te conto nos dedos da minha.

Lelela Zanetti porque o sorriso alegra a vida e vê-lo sempre presente no seu rosto me enche de esperança. Obrigada por nunca perder a doçura.

Gabriela Santin porque se é possível que exista tanta bondade em um coração, esse coração é o seu. Obrigada por estar comigo em tantos momentos difíceis, os quais eu suportei por causa do seu ombro amigo e por sempre me ajudar com o coração generoso e disponível.

Marília Moreira porque a sua energia e alegria de viver deixam a vida leve e saborosa. Obrigada por sempre me encorajar a recomeçar todos os dias.

Dieley Barreiros por me motivar a me amar mais e a lutar pelos meus desejos. Por ser uma companhia essencial em todos os momentos.

Katharina Morant por ser uma guerreira ao meu lado na luta contra a tristeza e o desânimo. Pelo seu coração generoso e disponível.

Priscila Coutinho por cada abraço carinhoso em que eu sentia o que é o calor de um amigo. Pelo exemplo de dedicação e perseverança.

Carolina Maschietto por fazer os meus dias tão alegres com sua risada deliciosa e por ser um exemplo de disponibilidade e determinação.

Marília Lucisano porque estar perto de você faz tudo ser sempre leve e doce. Pelo exemplo de paciência, generosidade e meiguice tão raros de se encontrar.

Érika Calvano por tantas vezes me chamar à realidade e me ajudar a superar tantos obstáculos. Por me ajudar a lutar por meu crescimento científico.

Aline Mori porque a alegria que você emana é contagiante e faz a vida mais feliz.

Mariele Andrade porque você é a tranquilidade que tantas vezes me fez desacelerar e pela companhia por tanto tempo.

Raquel Freire pela companhia rara, por toda a cumplicidade e pela oportunidade dessa bonita amizade que germina a cada dia.

Nilya Leticia porque a sua alegria, o seu otimismo, a sua disponibilidade e a sua generosidade tornam a nossa rotina tranquila e prazerosa. Porque ao longo desses anos descobri que é muito bom conviver com você e quero continuar convivendo.

Marco Antônio pelos anos de amizade e por doar seu tempo para que meu trabalho pudesse ser feito a tempo e, com isso, por todos os momentos descontraídos e todas as grandes conversas agradáveis.

Agradecimentos Especiais...

À minha Orientadora, Professora Raquel Assed Bezerra Segato...

Exemplo de dedicação, trabalho, esforço e perseverança, sempre demonstrando que vale a pena dar o melhor de si, sempre. Te agradeço pela paciência em meus momentos difíceis, pelo estímulo constante e por sempre acreditar no resultado do meu trabalho.

Ao meu Coorientador, Professor Paulo Nelson-Filho...

São tantos anos de uma admiração difícil de ser expressa em palavras. Exemplo de professor completo e ser humano raro. Agradeço por tudo que fez por mim em todos esses anos, principalmente por trabalhar o meu conhecimento e acreditar na minha capacidade.

À Professora Léa Assed Bezerra da Silva...

Por todas as oportunidades que me deu, desde o início. Pelo exemplo admirável de determinação, amor a docência e a pesquisa, mas principalmente, pelo exemplo de mãe amorosa, dedicada, incondicional.

Ao Professor Alberto Consolaro...

Pela dedicação ao partilhar tantos conhecimentos e por sua capacidade admirável de amar o ensinar. Por toda generosidade e dedicação para que os resultados deste trabalho fossem alcançados.

“Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais.”

Rubem Alves

Meus Agradecimentos...

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva e do Vice-Diretor Prof. Dr.^a. Arthur Belém Novaes Júnior.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora Prof.^a. Dr.^a Raquel Assed Bezerra Segato e da Vice-Coordenadora Prof.^a. Dr.^a. Léa Assed Bezerra da Silva.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof.^a. Dr.^a Alexandra Mussolino de Queiroz, Prof.^a. Dr.^a. Aldevina Campos de Freitas, Prof.^a. Dr.^a Maria Cristina Borsatto, Prof.^a. Dr.^a Andíara De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho e Prof.^a. Dr.^a. Kranya Victória Díaz Serrano, pela agradável convivência, pelas conversas atenciosas e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos Professores da Disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Prof. Dr. Adilson Thomazinho, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Prof.^a. Dr.^a. Maria Bernadete Sasso Stuaní e Prof.^a. Dr.^a. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, pelos conhecimentos transmitidos e disponibilidade em todos os momentos.

À Profª. Drª. Maria da Conceição Pereira Saraiva, *Professora da Disciplina de Epidemiologia*, pelas boas memórias compartilhadas de Alfenas e por toda atenção e disponibilidade.

Ao *Professor Dr. Heitor Marques Honório* pelo auxílio na execução da análise estatística e pela confecção do fluxograma.

À *Universidade Federal de Alfenas* pela concessão do afastamento para cursar o doutorado.

Aos Professores da Disciplina de Odontopediatria da Universidade Federal de Alfenas, *Profª. Dra. Ana Beatriz da Silveira Moretti*, *Prof. Dr. Edmêr Silvestre Pereira Júnior* e *Profª. Dra. Vivien Thiemy Sakai* por todos os anos e experiência partilhados no trabalho e pelo apoio para o meu afastamento para cursar Doutorado.

Aos *Professores da Universidade Federal de Alfenas* Profª. Dra. Francisca Isabel Ruela, Profª. Dra. Elaine Manso Oliveira Franco de Carvalho, Profª. Dra. Heloísa Helena Vieira Zanetti, Prof. Dr. Paulo Antônio de Arantes Vieira, Prof. Dr. Alessandro Aparecido Pereira, Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, Profª. Dra. Ana Cláudia Pedreira de Almeida, Profª. Dra. Daniela Coelho de Lima, Prof. Dr. Leandro Araújo Fernandes, Profª. Dra. Valéria Maria Gomes Totti, Prof. Dr. Ronaldo Célio Mariano, Prof. Dr. Carlos Eduardo Gomes do Couto Filho e Prof. Dr. Walter Alves de Araújo por todo o apoio e companheirismo durante a vida acadêmica.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, *Fátima Aparecida Jacinto, Filomena Leli Placciti, Mathews Morelli Zanella e Micheli Cristina Leite Rovanholo* por todo o carinho a mim dispensado sempre, pela atenção e ajuda em todas as horas. Serei sempre grata.

Dr. *Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva*, agradeço por todo o conhecimento transmitido durante o curso, especialmente durante a disciplina de Pesquisa Clínica. Obrigada pela disponibilidade em todos os momentos.

Dr.^a *Carolina Paes Torres Mantovani*, por toda atenção a mim dispensada durante todos esses anos, sempre prestativa, alegre e carinhosa.

Aos minhas *amigas de turma do Doutorado*, por todos os momentos maravilhosos que vivemos, por dividir experiências e dificuldades, pelo companheirismo e amizade.

Aos *alunos do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria* da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela agradável convivência, pelos conhecimentos e experiências compartilhados.

Aos funcionários do Biotério *Antônio Sérgio Aparecido Mesca, Aline Aparecida Ferraresi Tiballi e Antônio Massaro*, pela gentileza e simpatia com que me receberam diariamente. Obrigada por terem sido tão prestativos e atenciosos.

Aos funcionários da Clínica I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *José Aparecido Neves do Nascimento, Vera do*

Nascimento Scandolari e Karina Dadalt Quaglio, obrigada pela prontidão em me atender, pela alegre convivência, pelo apoio e carinho.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, *Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Mori Sacilloto*, pela atenção, pelo carinho e por estarem sempre à disposição.

À secretária do Curso de Especialização em Ortodontia, *Rosemary Alves de Sá*, pela confecção dos gráficos e formatação. Rose, obrigada pela disponibilidade e atenção.

À equipe da *Valmar Impressão*, pela impressão do trabalho.

À *CAPES* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa.

À *Fapesp* (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Oliveira, DSB. **Terapia Fotodinâmica Antibacteriana (aPDT): compatibilidade tecidual utilizando fotossensibilizadores à base de fenotiazina e curcumina, em tecido subcutâneo de camundongos isogênicos**. Ribeirão Preto, 2016. 115p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Introdução: O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos após o uso da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT), utilizando dois fotossensibilizadores, Derivado fenotiazínico (Helbo Blue) e Curcumina, em diferentes tempos de aplicação de lasers (30 segundos, 1 minuto ou 2 minutos). Foram utilizados 141 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c cujo tecido conjuntivo subcutâneo foi exposto aos dois fotossensibilizadores, e em seguida irradiado com laser diodo no grupo do Derivado Fenotiazínico e ao LED no grupo da Curcumina. Para cada fotossensibilizador foram utilizados três tempos de irradiação: 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos. Ao final de cada um dos períodos experimentais (7, 21 e 63 dias), uma porção do tecido conjuntivo subcutâneo da área do centro da área em que foi aplicada a aPDT foi removida e submetida ao processamento histotécnico de rotina. Foi realizada a descrição do processo inflamatório de forma qualitativa e semi-quantitativa (por meio de escores). Adicionalmente, foi realizada a marcação imunohistoquímica para neutrófilos e macrófagos. Os dados numéricos foram analisados por meio do programa estatístico Sigma Plot 12.0[®], utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo Pós-teste de Dunn, quando houve diferença significativa entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5%. Foi possível observar que, com relação aos parâmetros *fibrosamento*, *espessura* e *infiltrado inflamatório*, no período inicial de 7 dias, as alterações teciduais foram pequena magnitude. No período de 21 dias, apenas o parâmetro *infiltrado inflamatório* apresentou pequenas variações entre os grupos. No período final de 63 dias, a compatibilidade tecidual foi observada para os dois fotossensibilizadores (Derivado Fenotiazínico e Curcumina) que não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, independentemente do tempo de aplicação do laser.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana, Derivado Fenotiazínico, Curcumina, Camundongos Isogênicos, Tecido subcutâneo.

ABSTRACT

Oliveira, DSB. **aPDT: Photosensitizers and light exposure times do not affect the tissue response of isogenic mice.** Ribeirão Preto, 2016. 115p. Thesis – School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

The aim of this study was to evaluate the response of subcutaneous conjunctive tissue of isogenic mice after Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), using two photosensitizers, Phenothiazine derivatives (Helbo Blue) and Curcumin, with different laser application times (30 seconds, 1 minute or 2 minutes). Were used one hundred and forty one (141) isogenic mice BALB/c, which had the subcutaneous conjunctive tissue exposed to the two photosensitizers, followed by irradiation with laser diode to the Phenothiazine derivatives group, and LED to the Curcumin group. Three irradiation times were used to each photosensitizer: 30 seconds, 1 minute and 2 minutes. At the end of each experimental period (7, 21 and 63 days), a sample of the subcutaneous conjunctive tissue, located in the center of the aPDT application area, was collected, subjected to normal histotechnical processing. Then, the present inflammatory process was described qualitative and semi-quantitative, using scores. Additionally, immunohistochemical was performed to mark neutrophils and macrophages. The (numeric?) obtained data was analyzed using the statistical program Sigma Plot 12.0®, the non-parametric Kruskal-Wallis test, followed by the post-test Dunn, when significant difference was found between groups. The significance level adopted was 5%. Descriptive microscopic analysis showed that the two photosensitizers tested presented similar histopathological results in the evaluated periods. It was also possible to note that, in relation with the following parameters: fibrosis, width and inflammatory infiltrate. At the initial period of 7 days, the tissue alteration were of small significance ($p < 0.05$). In the 21-days period, only the inflammatory infiltrate parameter presented variation between groups ($p < 0.05$). In the final time point of 63 days, the tissue compatibility observed to the two photosensitizers (Phenothiazine derivatives and Curcumin) did not present significant differences in the evaluated parameters, independently of the laser application time.

Key-words: Antimicrobial photodynamic therapy, Phenothiazine derivatives, Curcumin, Isogenic mice, Subcutaneous tissue.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	31
PROPOSIÇÃO.....	41
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	61
Análise Microscópica Descritiva.....	63
Análise microscópica semi-quantitativa.....	71
Imuno-histoquímica para marcação de neutrófilos e macrófagos.....	77
DISCUSSÃO.....	83
CONCLUSÃO.....	93
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO.....	113

--- *Introdução*

INTRODUÇÃO

A presença de micro-organismos no sistema de canais radiculares é de fundamental importância para a formação da lesão periapical, caracterizada pela inflamação e destruição dos tecidos periapicais (George e Kishen, 2007; Upadya e Kishen, 2010; Silva, et al., 2012a). Essa infecção endodôntica apresenta natureza polimicrobiana (Assed et al., 1996; Silva et al., 2006; Ruvierre et al., 2007; Silva et al., 2012a; Gergova et al., 2014), com predominância de micro-organismos anaeróbios, especialmente Gram-negativos (Assed et al., 1996; Silva et al., 2012a).

A organização em biofilme microbiano confere às bactérias resistência às terapias convencionais (Gergova et al., 2014; Trindade et al., 2015). Às vezes as bactérias e biofilmes microbianos tornam-se inacessíveis aos procedimentos de limpeza, modelagem e irrigação com substâncias químicas (Silva et al., 2012a; Yildirim et al., 2013; Chrepa et al., 2014).

Embora apresente algumas vantagens para o paciente, como redução do número de visitas e do custo operacional (Figini et al., 2008), o tratamento endodôntico convencional em sessão única favoreça a diminuição de grande parte dos micro-organismos do canal radicular, sua eliminação não é completa após este procedimento (Upadya e Kishen, 2010). As etapas do preparo biomecânico não são capazes de alcançar os micro-organismos que, no caso da lesão periapical, encontram-se disseminados pelos túbulos dentinários, canais acessórios, canais colaterais, delta apical e crateras decorrentes da reabsorção radicular (Leonardo et al., 2002; Soares et al., 2006a, Rocha et al., 2008; Tanomaru et al., 2008; Vera et al., 2012; Xhevdet et al., 2014).

Assim, o objetivo principal do tratamento endodôntico, ou seja, a eliminação microbiana do sistema de canais radiculares (George e Kishen, 2007; Yildirim et al., 2013; Xhevdet et al., 2014), ou a sua redução máxima para obter condições de saúde nos tecidos perirradiculares, não é alcançada apenas com o preparo biomecânico, e as taxas de sucesso desejadas não são obtidas quando não se utiliza uma medicação antibacteriana entre sessões (Silva et al., 2012a; Chrepa et al., 2014; Iuric et al., 2014), favorecendo a neutralização e a redução/eliminação da infecção endodôntica (Holland et al., 2003; Soares et al., 2006a), bem como da endotoxina bacteriana ou LPS (lipopolissacarídeo) (Nelson-Filho et al., 1999; Silva et al., 2002; Xavier et al., 2013).

Embora o hidróxido de cálcio seja amplamente aceito para uso como medicação entre sessões (Leonardo et al., 2006; Paula-Silva et al., 2010; Vera et al., 2012; Silva et al., 2014a), procedimentos alternativos têm sido propostos com o objetivo de potencializar o controle da infecção do sistema de canais radiculares, especialmente em dentes com necrose

pulpar e lesão periapical, como os sistemas de ativação sônica, os sistemas de irrigação por pressão apical negativa e os lasers (Plotino et al., 2016), incluindo a Terapia Fotodinâmica Antibacteriana (aPDT) (Soukos et al., 2006; Xu et al., 2009; Ng et al., 2011; Silva, et al., 2012a; Javed e Romanos, 2013; Gursoy et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Xhevdet et al., 2014; Chrepa et al., 2014; Singh et al., 2015; Frota et al., 2015).

Embora a utilização da luz para tratar doenças date de civilizações antigas, o primeiro relato da utilização dos princípios fotodinâmicos ocorreu em 1900, por Oscar Raab (Raab, 1900 apud Perussi, 2007), com a utilização de eosina e luz para tratar câncer de pele. Além disso, a descoberta da hematoporfirina na década de 60 impulsionou as pesquisas básicas e as aplicações clínicas da aPDT (Dougherty et al., 1975; Yoon et al., 2013).

A aPDT é a técnica na qual um agente fotossensibilizante, denominado fotossensibilizador, é ativado por uma luz de comprimento de onda específico, desencadeando a produção de oxigênio singleto, superóxidos e radicais livres (espécies reativas de oxigênio), que são citotóxicos para as células alvo (Soukos et al., 2006; Perussi, 2007; Fimple et al., 2008; Upadya e Kishen, 2010; Bouillaguet et al., 2010; Kharkwal et al., 2011; Silva et al., 2012a; Okada et al., 2012; Garcia et al., 2013; Yildirim et al., 2013; Gursoy et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Javed e Romanos, 2013; Araújo et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Xhevdet et al., 2014; Chrepa et al., 2014; Späth et al., 2014; Silva et al., 2014b; Trindade et al., 2015; Singh et al., 2015; Frota et al., 2015; Plotino et al., 2016). Esta modalidade de tratamento é também denominada quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana, desinfecção foto-ativada ou desinfecção ativada pela luz (Singh et al., 2015).

A produção de espécies reativas de oxigênio é denominada consumo fotoquímico de oxigênio (Singh et al., 2015) e ocorre pela indução de dois tipos de reações. Na reação tipo I há transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de diversos tipos de radicais livres, superóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio, enquanto que, na reação tipo II, há transferência de energia ao oxigênio pela mudança no *spin* do elétron, levando à produção de oxigênio singleto ou superóxido, que são espécies altamente reativas. Ambas levam à morte celular pela oxidação de moléculas biológicas como proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos (Hamblin e Hasan, 2004; Perussi, 2007; George e Kishen, 2010; Gursoy et al., 2013; Bumb et al., 2014; Singh et al., 2015).

A ação da aPDT se estende a bactérias, fungos, leveduras, vírus e protozoários, dependendo do fotossensibilizador e da fonte de luz utilizada sendo, portanto, de grande utilidade no combate a infecções localizadas (Usacheva et al., 2001; Mainwright, 2004; Jori e Brown, 2004; Perussi, 2007; George e Kishen, 2007; Gursoy et al., 2013; Bumb et al., 2014). No entanto, a terapia tem ação diferente sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-

negativas, devido às diferenças estruturais nas paredes celulares. As primeiras são facilmente eliminadas pela aPDT. Já as bactérias Gram-negativas apresentam uma membrana externa complexa, com duas camadas lipídicas que atuam como uma barreira entre a célula e o ambiente, o que dificulta sua morte (Soukos et al., 2006; Perussi et al., 2007; George e Kishen, 2007; Upadya e Kishen, 2010; Oliveira et al., 2014; Trindade et al., 2015; Singh et al., 2015). Sabe-se que a infecção endodôntica apresenta predominância de bactérias anaeróbias, para as quais a liberação de espécies reativas de oxigênio pela aPDT pode ser nociva (George e Kishen, 2007; Garcia et al., 2013; Garcia et al., 2014).

Vantagens como a alta seletividade aos tecidos alvo, o não desenvolvimento de resistência microbiana com doses repetidas (Konopka e Goslinski, 2007; Gursoy et al., 2013; Bumb et al., 2014), a capacidade de eliminar bactérias rapidamente, a segurança no uso, a facilidade de aplicação, a ausência de sintomatologia dolorosa, a ausência de efeitos colaterais térmicos e o curto tempo de tratamento (Soukos et al., 2006; Gursoy et al., 2013; Oliveira et al., 2014; Silva et al., 2014b; Garcia et al., 2014) tem encorajado a utilização da aPDT para uma grande variedade de aplicações clínicas (Kharkwal et al., 2011). Além disso, por ter ação localizada, a aPDT não causa danos à microbiota indígena do hospedeiro, em especial a bucal e a intestinal (Garcez et al., 2015).

Em Odontologia, as indicações de utilização da aPDT são abrangentes, incluindo o tratamento de câncer bucal e de cabeça e pescoço, de líquen plano, leucoplasia e infecções bacterianas e fúngicas em diversas especialidades (Bumb et al., 2014). Tem sido usada para tratamento de lesões de cárie (Muller et al., 2007; Melo et al., 2015; Neves et al., 2016; Mirzaie et al., 2016), periodontite (Meisel e Kocher, 2005; Queiroz et al., 2014; Moreira et al., 2015; Ramos et al., 2016) e de lesões periapicais (Silva et al., 2012a; Garcez et al., 2015; Borsatto et al., 2016), controle de biofilme em Ortodontia (Paschoal et al., 2015), controle da microbiota bucal (Leite et al., 2014; Santin et al., 2014) e em casos de periimplantite (Hayek et al., 2005; Al Habashneh et al., 2015; Sculean et al., 2015).

Especificamente em Endodontia, a eficácia antimicrobiana da aPDT foi avaliada em diversos estudos *in vitro* (Soukos et al., 2006; Foschi et al., 2007; Fimple et al., 2008; Meire et al., 2009; Rios et al., 2011; Cheng et al., 2012; Hecker et al., 2013; Yildirim et al., 2013; Frota et al., 2015; Soares et al., 2016b), *ex vivo* (Ng et al., 2011; Xhevdet et al., 2014), *in vivo* (Garcez et al., 2008; Garcez et al., 2010) e, em revisão sistemática (Chrepa et al., 2014), onde tem sido demonstrado seu potencial como terapia adjunta na diminuição da contaminação microbiana dos canais radiculares.

No entanto, pouco se sabe com relação ao efeito biológico deste tratamento na Endodontia. A resposta dos tecidos apicais e periapicais de dentes de cães com lesões

periapicais induzidas experimentalmente e tratamento endodôntico em sessão única, com ou sem aPDT, foi avaliada em 2012 por nosso grupo de pesquisa (Silva, et al., 2012a). Os autores avaliaram o efeito do cloreto fenotiazínico (Helbo Blue Photosensitizer), associado ao laser diodo (Helbo Therapielaser). A eficácia da aPDT foi confirmada pela ausência de células inflamatórias, fibrogênese e neoangiogênese moderadas nos grupos nos quais foi utilizada. Entretanto, o processo de reparo ocorreu mais tardiamente, o que foi atribuído pelos autores ao possível extravasamento do corante para os tecidos periapicais, afetando as células do hospedeiro. De acordo com os autores, a aPDT se mostrou um tratamento complementar promissor para dentes com lesão periapical tratados em sessão única.

Posteriormente, nosso grupo de pesquisa (Bosatto et al., 2016) também avaliou a resposta de tecidos periapicais de dentes de cães com lesão periapical induzida após tratamento endodôntico em sessão única, com ou sem aPDT, comparados ao tratamento em duas sessões com curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. Diferenças significantes entre os grupos foram observadas com relação à análise microscópica. O grupo tratado com a aPDT apresentou fibras colágenas, vasos sanguíneos e número limitado ou ausente de células inflamatórias, comparado ao grupo onde foi realizado tratamento em sessão única, onde pôde ser observada resposta inflamatória severa, edema e dissociação fibrilar. Entretanto, os melhores resultados foram obtidos no grupo onde foi utilizada medicação à base de hidróxido de cálcio, onde houve a formação de tecido de granulação, com grande atividade fibroblástica e vascular, e infiltrado inflamatório ausente/suave.

Entretanto, parâmetros como o tipo, concentração e tempo de contato do fotossensibilizador e a dose e o tempo de irradiação da luz devem ser melhor padronizados, para o restabelecimento da integridade dos tecidos periapicais (Silva et al., 2012a).

O sucesso da aPDT está diretamente relacionado à utilização do fotossensibilizador, cuja escolha depende da fonte de luz utilizada (Gursoy et al., 2013; Garcia et al., 2014). Mais de 400 compostos entre corantes, drogas, substâncias químicas ou naturais apresentam propriedades fotossensibilizadoras (Meisel e Kocher, 2005; Soria-Lozano et al., 2015). Dentre as principais substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com potencial fotoativo estão os corantes fenotiazínicos, as ftalocianinas, as clorinas, as porfirinas, os xantenos e os monoterpenos (Singh et al., 2015; Garcez et al., 2015). Para ser considerado ideal, este composto precisa possuir características fotofísicas, químicas e biológicas favoráveis, baixa citotoxicidade, simplicidade na formulação, alta estabilidade, solubilidade em meio aquoso, afinidade e capacidade de penetração nas células bacterianas, alto coeficiente de absorção na região do espectro de excitação da luz, capacidade de transferir energia para gerar espécies reativas de oxigênio e fotoestabilidade elevada (De Rosa e

Crutchley, 2002; Konopka e Goslinski, 2007; Gursoy et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Garcia et al., 2014; Trindade et al., 2015; Paschoal et al., 2015b), além de possuírem ação local (Garcez et al., 2015) e apresentarem um intervalo de tempo curto entre o período de administração e o máximo de absorção pelo tecido (Chiniforush et al., 2015).

Os corantes fenotiazínicos, cuja estrutura fundamental é composta por um anel aromático tricíclico, como o azul de metileno e o azul de toluidina, são os mais utilizados e amplamente estudados para a realização da terapia fotodinâmica e são ativados pela luz no espectro de 620 a 700 nm (luz vermelha) (Harris et al., 2005; Perussi, 2007; Rajesh et al., 2011; Gursoy et al., 2013; Garcia et al., 2014). O azul de metileno e o azul de toluidina apresentam características químicas e físico-químicas semelhantes, com natureza hidrofílica, baixo peso molecular e carga positiva que facilita a passagem pela parede bacteriana (Fimple et al., 2008; Upadya e Kishen, 2010; Trindade et al., 2015), induzindo danos aos ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Garcia et al., 2014). O azul de toluidina apresenta como vantagem adicional uma afinidade pelo lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias Gram-negativas (Usacheva et al., 2001; Usacheva et al., 2003) sendo, em geral, mais efetivo que o azul de metileno (Usacheva et al., 2001).

A ação antimicrobiana dos corantes fenotiazínicos foi anteriormente avaliada em diversos estudos, em diferentes concentrações (Soukos et al., 2006; Fimple et al., 2008; Xu et al., 2009; Raymond et al., 2011; Silva et al., 2014b; Xhevdet et al., 2014), demonstrando sua eficácia na concentração original de 10 mg/mL (Oliveira et al., 2011).

Outro composto que pode ser utilizado como fotossensibilizador na aPDT é a Curcumina, um pó amarelo isolado do rizoma da *Curcuma longa*, derivado polifenólico hidrofóbico que é utilizado como pigmento para culinária, medicina e cosmética na Ásia há mais de 2000 anos (Hatcher et al., 2008). O primeiro relato sobre o uso da Curcumina em humanos foi realizado por Oppenheimer, em 1937 (Oppenheimer, 1937 apud Gupta et al., 2013) para o tratamento de colecistite da vesícula biliar. Por ser uma substância considerada segura, bem tolerada e não tóxica para uso clínico (Gupta et al., 2013), apresentando propriedades biológicas importantes como efeito anti-inflamatório, anticarcinogênico, anti-infeccioso e anti-oxidante, sendo utilizada para o tratamento de doenças hepáticas, feridas e inflamação nas articulações. Além disso, apresenta atividade antimicrobiana (Aggarwal et al., 2007; Okada et al., 2012; Araújo et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Gupta et al., 2013; Paschoal et al., 2015) e atua como molécula sinalizadora influenciando diversas citocinas (Hatcher et al., 2008). Adicionalmente, tem sido atribuída à Curcumina a capacidade de induzir fragmentação e danos ao DNA na presença de isozimas do citocromo p450 presentes no pulmão, linfonodos, fígado e pele (Sakano e Kawanishi, 2002; Hatcher et al., 2008). A

Curcumina tem sido também associada à inibição da função da proteína p53, responsável pela proteção da célula contra o estresse genotóxico, o que pode levar ao acúmulo de estímulos capazes de causar danos ao DNA (Moos et al., 2004; Hatcher et al., 2008).

A Curcumina é uma molécula lipofílica com capacidade de penetrar rapidamente nas membranas celulares ocasionando, de forma imediata, a perda da sua integridade (Hatcher et al., 2008). Sua ativação ocorre entre 300 a 500nm (máximo de 430nm - luz azul) e dentre as suas vantagens destacam-se o baixo custo, a facilidade de manipulação e a efetividade (Araújo et al., 2013). Em Odontologia, sua capacidade fotossensibilizadora foi avaliada sobre micro-organismos presentes na microbiota bucal (Dovigo et al., 2011; Araújo et al., 2012; Andrade et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Leite et al., 2014; Wikene et al., 2015; Paschoal et al., 2015), em lesões de cárie (Araújo et al., 2014), em bactérias endodônticas (Mandroli et al., 2013; Frota et al., 2015), na mucosa bucal (Okada et al., 2012) e para controle de biofilme microbiano em Ortodontia (Paschoal et al., 2015). No entanto, na área da Endodontia não existem trabalhos avaliando a eficácia da Curcumina no tratamento de canais radiculares.

Especificamente com relação à atividade antimicrobiana, a Curcumina foi previamente avaliada por diferentes pesquisadores (Andrade et al., 2013; Mandroli et al., 2013; Manoil et al., 2014; Frota et al., 2015; Neelakantan et al., 2015), em altas (Paschoal et al., 2013) ou em baixas concentrações (Dovigo et al., 2011; Andrade et al., 2013; Mandroli et al., 2013; Frota et al., 2015).

Outro fator importante para a utilização da aPDT é a luz utilizada. A ativação do fotossensibilizador depende da exposição a uma fonte de luz de baixa potência e comprimento de onda específico, os chamados lasers de baixa potência (LLL – *Low-level Laser*). A terapia com estas fontes de luz tem sido utilizada por demonstrar, tanto em Medicina quanto em Odontologia, propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e regenerativas, que se manifestam estimulando atividades celulares que acarretam em redução da inflamação, aumento do metabolismo e proliferação de fibroblastos (Posten et al., 2005; Stein et al., 2009; Percival et al., 2015). Diferentemente, os efeitos da luz nas células bacterianas estão associados à desnaturação de proteínas da parede celular e à ativação de porfirinas endógenas, que atuam como fotossensibilizadores, produzindo espécies reativas de oxigênio, levando à morte bacteriana (Percival et al., 2015).

Os lasers de baixa potência mais utilizados na aPDT são os lasers diodo e diodos que emitem luz (LEDs). Embora a maioria dos estudos utilizem o laser diodo, os LEDs vem se tornando uma alternativa promissora por serem de tamanho reduzido, apresentarem

custo mais acessível e facilidade de operação e já se encontrarem disponíveis nos consultórios odontológicos (Singh et al., 2015; Paschoal et al., 2015).

Deve ser salientado ainda que qualquer agressão imposta aos tecidos ocasiona uma resposta por parte do organismo, com o objetivo de promover o reparo tecidual. Este processo envolve fenômenos vasculares, exsudativos e celulares, onde há uma interação complexa entre vasos sanguíneos, matriz extracelular, diferentes tipos celulares e diversas citocinas e mediadores. A primeira etapa deste processo é chamada de resposta inflamatória e envolve a migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos para o tecido lesado, com o objetivo de destruir o agente agressor. Em seguida, ocorre a fase proliferativa, que tem por objetivo diminuir as reações ou sequelas da fase inflamatória e é caracterizada pela presença de fibroblastos e macrófagos. Finalmente, a terceira fase, de remodelação, é caracterizada pela atuação de fibroblastos que sintetizam matriz extracelular e colágeno para reconstruir a área lesada (Posten et al., 2005; Consolaro, 2015; Percival et al., 2015; Consolaro, 2015).

Apesar da importância do conhecimento da compatibilidade tecidual de diferentes técnicas e materiais que são utilizados clinicamente, o levantamento da literatura específica, nas diferentes bases de dados, evidencia escassez de trabalhos avaliando as reações teciduais frente à aPDT em Odontologia (Luan et al., 2009; Garcia et al., 2010; Sperandio et al., 2010; Okada et al., 2012; Garcia et al., 2014; Cruz et al., 2015; Deyhimi et al., 2016), inclusive na área de Endodontia (Silva et al., 2012a; Borsatto et al., 2016). Considerando ainda a influência da diversidade de parâmetros existentes para a realização da aPDT incluído o tipo de laser, o comprimento de onda da luz (nm), a densidade de energia (J/cm^2) e a intensidade ou potência (W), e a grande variedade de compostos químicos que podem ser utilizados como fotossensibilizadores, em concentrações variáveis (Soukos et al., 2006; Komine e Tsujimoto, 2013), em suas diversas áreas de aplicação, a realização de pesquisas biológicas para viabilizar a utilização da aPDT, na prática clínica, são justificadas.

—————*Proposição*

PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

O objetivo deste estudo foi avaliar a resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos, após o uso da aPDT, utilizando dois fotossensibilizadores (Derivado Fenotiazínico e Curcumina), e diferentes tempos de aplicação do laser.

Objetivos específicos:

- Comparar a resposta tecidual microscópica após a utilização do Derivado Fenotiazínico na concentração de 10mg/mL, e da Curcumina na concentração de 0,0074mg/mL, após 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos de aplicação do laser.
- Descrever as características do tecido conjuntivo subcutâneo, por meio de microscopia convencional, avaliando de forma qualitativa e semi-quantitativa os fenômenos de fibrosamento (número e densidade de fibras colágenas), espessamento do tecido conjuntivo periférico (estratificação das células) e de presença infiltrado inflamatório.
- Descrever a presença ou ausência e localização de neutrófilos e macrófagos por meio de imunohistoquímica.

A hipótese nula considerada foi:

- Não há diferença nas características histopatológicas do tecido subcutâneo, após a aplicação dos dois fotossensibilizadores (Derivado Fenotiazínico e Curcumina), nos tempos de 30 segundos, 1 minuto e 2 minutos de aplicação do laser, em todos os parâmetros avaliados.

—— *Material e Métodos*

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP), tendo sido aprovado e registrado sob o protocolo número 2015.1.598.58.1 (Anexo A). Os cuidados com o bem estar dos animais utilizados no estudo seguiram as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizados 141 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, com 6 a 8 semanas de idade, pesando de 15 a 20 gramas (Figura 1 - A), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. O número de animais por grupo foi calculado com base nos resultados obtidos por Soukos et al. (2006), utilizando o programa Sigma Plot 12.0® (Systat Software Inc., San Jose, Califórnia, EUA), com valor de $\alpha = 5\%$ e poder do teste de 80%.

Os procedimentos experimentais foram baseados nas normas preconizadas pela *International Organization for Standardization* (ISO) nº 7405, de 2008. Os animais foram anestesiados na parte interna da pata traseira esquerda com injeção intramuscular de Ketamina a 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilasina a 2% (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), nas doses de 35mg/kg e 7mg/kg, respectivamente (Figura 1 - B). Em seguida, foi realizada a tricotomia do dorso do animal (Figura 1 - C) e a anti-sepsia da região com gluconato de clorexidina a 1%.

Previamente ao ato cirúrgico, a região dorsal do animal foi demarcada com tinta e agulha para tatuagem (Electric Ink, Uberaba, Minas Gerais) (Figura 1 - D) definindo uma área de 2cm², onde foi aplicado o fotossensibilizador e a luz. A demarcação foi realizada a fim de que todo o tecido removido para a análise histopatológica tivesse sido exposto ao tratamento (Figura 1 - E).

O procedimento cirúrgico consistiu de uma incisão realizada com tesoura cirúrgica, na região lombar do dorso do animal, perpendicular à coluna vertebral, com tamanho de 2cm (Figura 1 – F), seguida de divulsão com tesoura romba (Figura 1 - G).

Neste estudo foram utilizados dois fotossensibilizadores: o Derivado Fenotiazínico Helbo Blue Photosensitizer (Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria), na concentração de 10mg/mL (Silva et al., 2012a), e a Curcumina, na concentração de 0,0074mg/mL (Andrade et al., 2013; Frota et al., 2015). Foram avaliados, também, 3 tempos de exposição dos fotossensibilizadores às fontes de luz (30 segundos, 1 minuto e 2 minutos), após 3 períodos experimentais (7, 21 e 63 dias).

O quadro 1 representa a distribuição dos grupos, nos diferentes períodos experimentais analisados.

Quadro 1 – Distribuição dos grupos, períodos experimentais e número de animais.

Período Experimental	Fotossensibilizadores e Tempo de Exposição à Luz	Número de animais
7 dias	Derivado Fenotiazínico 30 s	07
	Derivado Fenotiazínico 1 min	07
	Derivado Fenotiazínico 2 min	07
	Curcumina 30 s	07
	Curcumina 1 min	07
	Curcumina 2 min	07
	Controle	05
21 dias	Derivado Fenotiazínico 30 s	07
	Derivado Fenotiazínico 1 min	07
	Derivado Fenotiazínico 2 min	07
	Curcumina 30 s	07
	Curcumina 1 min	07
	Curcumina 2 min	07
	Controle	05
63 dias	Derivado Fenotiazínico 30 s	07
	Derivado Fenotiazínico 1 min	07
	Derivado Fenotiazínico 2 min	07
	Curcumina 30 s	07
	Curcumina 1 min	07
	Curcumina 2 min	07
	Controle	05

s = segundos; min = minutos.

O Derivado Fenotiazínico Helbo Blue Photosensitizer (Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) foi utilizado na forma original, disponibilizada comercialmente pelo fabricante. A Curcumina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA - peso molecular 368.68) foi, inicialmente, diluída em 10% de DMSO, como preconizado por Frota et al. (2015), originando uma solução-mãe concentrada, a qual foi ajustada em água destilada para a concentração de 0,0074mg/mL (Andrade et al., 2013; Frota et al., 2015). A diluição inicial em DMSO foi necessária para garantir a solubilização do pó, insolúvel em veículos aquosos, e a sua estabilidade, já que é sensível às variações de temperatura ambiente e pode gerar radicais livres (Frota et al., 2015; Wikene et al., 2015).

Nos grupos tratados, o fotossensibilizador foi aplicado na área previamente demarcada no tecido subcutâneo exposto, e mantido em contato por um período de 1 minuto (período de pré-irradiação) para o Derivado Fenotiazínico (Figura 1 – H), seguindo as instruções do fabricante. A Curcumina também foi aplicada na área demarcada e o seu o período de pré-irradiação foi de 5 minutos (Frota et al., 2015)(Figura 1 – I).

Decorrido este período, o tecido foi lavado com 5mL de água destilada, sendo o excesso de solução removido com gaze esterilizada.

Nos grupos onde o Derivado Fenotiazínico foi utilizado, o tecido foi exposto à irradiação com um laser diodo (Helbo 3D Endo Probe Therapielaser, Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria), com parâmetros de 660nm de comprimento de onda (luz vermelha) e densidade de energia ou fluência de 3,3J/cm² (Figura 1 - J). Como esta fibra emite luz de forma tridimensional, toda a região do tecido subcutâneo foi irradiada por um minuto, de acordo com as recomendações do fabricante.

Para a Curcumina, a fonte de luz utilizada foi um LED (Radii-Cal, SDI Limited, Bayswater, Victoria, Austrália), com parâmetros de 450nm de comprimento de onda (luz azul) e densidade de energia ou fluência de 72J/cm² (Figura 1 - K). A ponta da fibra óptica do LED foi posicionada de forma que todo o tecido subcutâneo fosse irradiado.

Para ambos os fotossensibilizadores, o tempo de irradiação dos lasers foi de 30 segundos, 1 e 2 minutos.

Nos grupos controles foram realizados apenas os procedimentos de abertura e divulsão dos tecidos, a fim de avaliar a resposta inflamatória ocasionada pelo ato cirúrgico (*animal sham*).

Após a realização dos procedimentos operatórios, foi realizada a sutura da pele utilizando fio de seda (Vicryl 4-0 – Ethicon – Johnson & Johnson) (Figura 1 - L).

Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, sendo periodicamente observados durante os períodos experimentais, com alimentação e água *ad libitum*. A ocorrência de anormalidades locais, sistêmicas ou comportamentais foi acompanhada diariamente.

Ao final de cada um dos períodos experimentais (7, 21 e 63 dias), para promover a eutanásia, os animais dos grupos experimentais e controle foram anestesiados com injeção intramuscular de Ketamina a 10% (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e Xilasina a 2% (Dopaser, Laboratórios Calier, SA, Barcelona, Espanha), na dose de 35mg/kg e 7mg/kg, respectivamente, e expostos à câmara de CO₂, disponível no Biotério da FORP/USP (Figura 1 - M). Uma porção do tecido conjuntivo subcutâneo e pele, contendo a área tratada, padronizada em 6mm² a partir do centro da loja cirúrgica (Figura 1 - N) foi removida (Figura 1 - O), fixada em formol a 10% e submetida ao processamento histotécnico de rotina.

Figura 1 – Imagens ilustrativas da metodologia empregada. A. Camundongos isogênicos da linhagem BALB/c; B. Anestesia; C. Tricotomia; D e E. Demarcação da área tratada; F. Incisão; G. Divulsão; H. Aplicação do Derivado Fenotiazínico no tecido subcutâneo; I. Aplicação da Curcumina no tecido subcutâneo; J. Aplicação do laser diodo; K. Aplicação do LED; L. Sutura; M. Câmara de CO₂; N. Remoção da área tratada; O. Posicionamento para fixação do tecido para processamento histotécnico.

Processamento histotécnico

As porções de pele e tecido subcutâneo removidas foram submetidas ao processamento histotécnico, realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- FORP/USP.

Após fixação em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e lavagem por, aproximadamente, 4 horas em água corrente, as peças passaram pelos processos de desidratação em álcool de concentrações crescentes (70%, 80% e 95% por 45 minutos cada e 3 trocas de álcool 100% por 45 minutos cada), álcool/xilol por 30 minutos, diafanização em xilol (xilol I, II e III por 40 minutos cada) e inclusão em parafina. Os blocos contendo os tecidos foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). Cortes semi-seriados de 5µm foram obtidos em toda a extensão da peça.

Para a descrição do processo inflamatório e das características do tecido subcutâneo, os cortes obtidos de cada grupo foram corados com hematoxilina e eosina e analisados em microscopia óptica convencional.

Espécimes sequenciais também foram avaliados por meio de imunohistoquímica para a detecção da presença e localização de neutrófilos e macrófagos.

Todas as análises foram realizadas no microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), por patologista experiente, sem conhecimento prévio do grupo analisado.

A figura 2 ilustra as etapas da metodologia empregada.

Figura 2 – Fluxograma ilustrativo das etapas da metodologia empregada.

Análise microscópica

Os espécimes foram analisados em microscopia de luz utilizando objetivas de 10 e 40x. Foram realizadas análises qualitativas (descritivas) e semi-quantitativas (classificação em escores) de acordo com Silva et al. (2009) e Queiroz et al. (2011).

1. Análise microscópica descritiva

Foi realizada a descrição da reação tecidual ocorrida frente à aPDT nos grupos experimentais e ao procedimento cirúrgico nos grupos controle, nos diferentes períodos experimentais. Como a reação tecidual observada nos animais foi semelhante, a análise microscópica descritiva foi feita de maneira geral, para cada fotossensibilizador.

2. Análise microscópica semi-quantitativa

Foram atribuídos escores aos fenômenos de *fibrosamento*, *espessura* e *infiltrado inflamatório* do tecido reacional nos diferentes grupos, de acordo com os seguintes critérios:

Fibrosamento do tecido reacional

A análise considerou o número e a densidade de fibras colágenas de permeio às células periféricas localizadas no tecido reacional. O fibrosamento foi classificado em 3 graus de severidade, de acordo com os seguintes escores:

- Escore 0: ausência de fibrosamento.
- Escore 1 (fibrosamento leve): fibras colágenas individualizadas como em um tecido conjuntivo normal, entremeadas por espaços negativos indicativos de componentes não fibrosos de matriz extracelular.
- Escore 2 (fibrosamento moderado): presença em algumas áreas de fibras colágenas individualizadas, porém com áreas alternadas de matriz extracelular eosinofílicas, sem formações lineares e onduladas, típicas das mesmas.
- Escore 3 (fibrosamento intenso): fibras colágenas em meio a uma matriz extracelular eosinofílica, sem formações lineares e onduladas típicas, não permitindo uma individualização das mesmas.

Espessura do tecido reacional

Foi considerado o número de células fibroblásticas e macrofágicas no tecido conjuntivo periférico. Esta mensuração foi realizada no maior eixo de espessura do tecido reacional. A espessura foi classificada em 3 graus de severidade, com valores numéricos correspondentes aos seguintes escores:

- Escore 0: espessura normal.

- Escore 1 (espessura levemente ampliada): estratificação de 1 a 3 células.
- Escore 2 (espessura moderadamente ampliada): estratificação de 4 a 10 células.
- Escore 3 (espessura intensamente ampliada): estratificação maior que 10 células.

Infiltrado Inflamatório no tecido reacional

Para a análise do infiltrado inflamatório foi considerada a concentração de neutrófilos e macrófagos de permeio ao tecido reacional. Esta concentração foi classificada em 3 graus de severidade, com valores numéricos correspondentes aos seguintes escores:

- Escore 0: ausência de infiltrado inflamatório.
- Escore 1 (infiltrado inflamatório leve): presença de 1 a 10 células inflamatórias no tecido reacional.
- Escore 2 (infiltrado inflamatório moderado): presença de 11 a 20 células inflamatórias no tecido reacional.
- Escore 3 (infiltrado inflamatório intenso): presença de mais de 21 células inflamatórias no tecido reacional.

3. Imuno-histoquímica para marcação de neutrófilos e macrófagos

Para a realização das reações de imuno-histoquímica foi utilizado o método do complexo avidina-biotina-peroxidase (método indireto) (Silva et al., 2012b). Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados, sendo a recuperação antigênica realizada com calor utilizando tampão citrato (pH=6,0) em forno de microondas (12 exposições de 10 segundos cada). Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 10 minutos com PBS e 1 vez com solução PBS/Triton a 0,5% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA), pelo mesmo período. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e PBS/Triton, conforme descrito anteriormente. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de BSA a 1% (albumina de soro bovino)/PBS por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas *overnight* em geladeira com os anticorpos primários diluídos (Anti-macrófago – SC 101447 ou Anti-neutrófilo – SC 59338 – Santa Cruz Biotechnology Inc.) em BSA a 1%.

Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas como previamente descrito e incubadas com anticorpo secundário biotinilado (*goat anti-rabbit IgG-*

B sc-2040 e *rabbit anti-goat* IgG-B sc-2774; Santa Cruz Biotechnology Inc., diluídos 1:200), por 1 hora, à temperatura ambiente.

Após nova lavagem, foi acrescentado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e PBS/Triton e foi efetuada a revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) e H₂O₂ a 3% em PBS por 1 minuto. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos e, novamente lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram diafanizadas, desidratadas e montadas. No controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro não-imune.

A análise para a identificação das células marcadas foi realizada em microscopia, sob luz convencional.

Os dados foram expressos de forma qualitativa, levando-se em consideração a presença ou ausência e localização das marcações (Silva et al., 2012b).

Análise Estatística

Considerando a natureza dos dados obtidos (escores), os resultados foram expressos em mediana, primeiro e terceiro quartis e analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis. Nos grupos onde houve diferença estatística significativa entre os grupos foi aplicado o pós-teste de Dunn. Os dados foram analisados com o auxílio do programa Sigma Plot 12.0[®] (Systat Software Inc., San Jose, Califórnia, EUA). O nível de significância adotado para todas as análises foi 5%.

————— *Resultados*

RESULTADOS

Análise Microscópica Descritiva

Tendo em vista que os fotossensibilizadores, na análise microscópica descritiva, apresentaram resultados histopatológicos semelhantes nos períodos de 7, 21 e 63 dias, independentemente do tempo de aplicação do laser (30 segundos, 1 ou 2 minutos), a descrição da resposta tecidual foi realizada de forma geral, englobando todos os grupos.

a) Derivado Fenotiazínico

Aos 7 e 21 dias, a cápsula reacional apresentou espessura fina e caracterizada por um fibrosamento discreto. Em alguns espécimes o fibrosamento era maior, atingindo um grau moderado. O tecido capsular apresentava continuidade com o tecido normal periférico, se confundindo morfológicamente com o mesmo. Aos 63 dias, o tecido fibroso capsular mostrou características de renovação com fibroblastos e fibras colágenas, adequando-se às demandas funcionais da área.

Aos 7 dias, o infiltrado inflamatório presente era moderado com células inflamatórias esparsamente distribuídas e de forma difusa. Dos 21 para os 63 dias este infiltrado tornou-se progressivamente discreto, até estar ausente na maior parte dos espécimes aos 63 dias (Figura 3).

b) Curcumina

Aos 7 e 21 dias, a cápsula reacional mostrou-se fina e pouco colagenizada, com fibrosamento variando de leve a moderado. Aos 63 dias, no grupo onde foi realizada a exposição ao laser por dois minutos, a cápsula fibrosa apresentou-se heterogênea e com graus variáveis de fibrosamento.

Aos 7 dias, quando a exposição ao laser aconteceu por dois minutos, o infiltrado caracterizou-se como moderado. Nos demais períodos, o infiltrado inflamatório era discreto, difuso e desorganizado, com leucócitos esparsos distribuídos aleatoriamente e, em alguns casos, ausente. (Figura 4)

c) Controles

Os grupos controles apresentaram uma estrutura capsular fina, com poucas fibras colágenas, porém bem organizadas, e permeada por macrófagos e fibroblastos. Não foram observados neutrófilos. A organização, espessura e composição estrutural do tecido reacional foi muito semelhante à dos grupos experimentais (figura 5).

Figura 3 – Aspectos microscópicos representativos da reação inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo tratado com Derivado Fenotiazínico, nos diferentes tempos de aplicação do laser - M: músculo, TR: tecido reacional, FC: fibra colágena, N: neutrófilo, Mo: macrófago, F: fibroblasto (Hematoxilina e Eosina - A e B: 7 dias; C e D: 21 dias, E e F: 63 dias - A, C e E: 100X; e B, D e F: 400X)

Figura 4 – Aspectos microscópicos representativos da reação inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo tratado com Curcumina, nos diferentes tempos de aplicação do laser - M: músculo, TR: tecido reacional, FC: fibra colágena, N: neutrófilo, Mo: macrófago, F: fibroblasto (Hematoxilina e Eosina - A e B: 7 dias; C e D: 21 dias, E e F: 63 dias - A, C e E: 100X; e B, D e F: 400X).

Figura 5 – Aspectos microscópicos representativos da reação inflamatória no tecido conjuntivo subcutâneo nos grupos controle - M: músculo, TR: tecido reacional, FC: fibra colágena, N: neutrófilo, Mo: macrófago, F: fibroblasto (Hematoxilina e Eosina - A e B: 7 dias; C e D: 21 dias, E e F: 63 dias - A, C e E: 100X; e B, D e F: 400X).

Análise microscópica semi-quantitativa

A representação gráfica percentual dos escores obtidos após a análise microscópica semi-quantitativa do parâmetro *fibrosamento*, após o uso dos dois fotossensibilizadores em todos os períodos de tempo avaliados pode ser observada na figura 6. A evolução do processo inflamatório foi representada por *fibrosamento* leve a moderado que permaneceu até o último período experimental.

Figura 6 – Porcentagens dos escores atribuídos ao *fibrosamento*, após diferentes tempos de aplicação do Derivado Fenotiazinico e da Curcumina nos períodos de avaliação de 7, 21 e 63 dias (d: dias; Fen: Derivado Fenotiazinico; Cur: Curcumina; C 7: Controle 7 dias; C 21: Controle 21 dias; C 63: Controle 63 dias; s: segundos; m: minutos).

A tabela 1 apresenta os valores relativos à mediana, 1º e 3º quartis para os escores atribuídos ao parâmetro *fibrosamento*, evidenciando que não houve diferença estatística entre os grupos, nos três períodos de avaliação ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos com relação ao parâmetro *fibrosamento*, após utilização dos fotossensibilizadores Derivado Fenotiazínico e Curcumina, por 30 segundos, 1 minuto ou dois minutos nos períodos de 7, 21 e 63 dias.

Parâmetro	Período de Avaliação	Grupo	Mediana (50%)	1º Quartil (25%)	3º Quartil (75%)	p (teste de Kruskal-Wallis)
Fibrosamento	7 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	1 ^a	1	1	p = 0,104
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 30segundos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 1 minuto	2 ^a	1	2	
		Curcumina 2 minutos	1 ^a	1	2	
		Controle	1 ^a	1	1	
	21 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	2 ^a	1	2	p=0,139
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 30segundos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 1 minuto	1 ^a	1	1	
		Curcumina 2 minutos	2 ^a	1	2	
		Controle	1 ^a	1	1	
	63 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	1 ^a	1	2	p=0,212
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1,5 ^a	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	2 ^a	1	2	
		Curcumina 30segundos	2 ^a	1	2	
		Curcumina 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Curcumina 2 minutos	2 ^a	1,75	2	
		Controle	1 ^a	1	1	

* Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, nos três períodos de avaliação (Pós-teste de Dunn; $p < 0,05$).

A figura 7 representa a distribuição do parâmetro *espessura*, que apresentou variação de leve a moderadamente ampliada nos períodos de 7, 21 e 63 dias. Nos períodos experimentais de 21 e 63 dias observou-se homogeneidade entre os grupos.

Figura 7 – Porcentagens dos escores atribuídos à *espessura*, após diferentes tempos de aplicação do Derivado Fenotiazínico e da Curcumina nos períodos de avaliação de 7, 21 e 63 dias ((d: dias; Fen: Derivado Fenotiazínico; Cur: Curcumina; C: Controle; C 7: Controle 7 dias; C 21: Controle 21 dias; C 63: Controle 63 dias; s: segundos; m: minutos).

A análise estatística dos resultados do parâmetro *espessura* (tabela 2), evidenciou que houve diferença significativa entre os grupos apenas no período de 7 dias, onde os dois fotossensibilizadores utilizados expostos à luz por dois minutos foram diferentes dos demais tempos de exposição ($p < 0,005$).

Tabela 2 – Comparação dos resultados obtidos com relação ao parâmetro *espessura*, após utilização dos fotossensibilizadores Derivado Fenotiazínico e Curcumina, por 30 segundos, 1 minuto ou dois minutos nos períodos de 7, 21 e 63 dias

Parâmetro	Período de avaliação	Grupo	Mediana (50%)	1º Quartil (25%)	3º Quartil (75%)	p (teste de Kruskal-Wallis)
Espessura	7 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	1 ^b	1	1	p = 0,003
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^b	1	1	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	2 ^a	1	2	
		Curcumina 30 segundos	1 ^b	1	1	
		Curcumina 1 minuto	1 ^b	1	1	
		Curcumina 2 minutos	2 ^a	1	2	
		Controle	1 ^b	1	1	
	21 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	1 ^a	1	1	p=0,256
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	1 ^a	1	1	
		Curcumina 30 segundos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Curcumina 2 minutos	1 ^a	1	1	
		Controle	1 ^a	1	1	
	63 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	2 ^a	1	2	p=0,132
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^a	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	1 ^a	1	2	
		Curcumina 30 segundos	1 ^a	1	1	
		Curcumina 1 minuto	1 ^a	1	1	
		Curcumina 2 minutos	1,5 ^a	1	2	
		Controle	1 ^a	1	1	

* Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos, nos três períodos de avaliação (Pós-teste de Dunn; $p < 0,05$).

A figura 8 representa a distribuição dos escores atribuídos ao *infiltrado inflamatório*. Aos 7 dias, este foi caracterizado, na grande maioria dos animais, como leve a moderado. Com a evolução dos períodos experimentais, o infiltrado inflamatório caracterizou-se como leve a ausente. Também aos 7 dias, quando o fotossensibilizador Derivado Fenotiazínico foi exposto a 2 minutos de luz, alguns espécimes apresentaram infiltrado intenso, porém sem diferença estatística com os demais ($p > 0,05$). Aos 63 dias, o infiltrado era moderado para a Curcumina, mas também sem diferença significativa em relação aos outros grupos ($p > 0,050$).

Figura 8 – Porcentagens referentes aos escores atribuídos ao *infiltrado inflamatório*, após diferentes tempos de aplicação do Derivado Fenotiazínico e da Curcumina nos períodos de avaliação de 7, 21 e 63 dias (d: dias; Fen: Derivado Fenotiazínico; Cur: Curcumina; C: Controle; C 7: Controle 7 dias; C 21: Controle 21 dias; C 63: Controle 63 dias; s: segundos; m: minutos).

De acordo com os dados da tabela 3, houve diferença estatisticamente significativa para o *infiltrado inflamatório* nos períodos de 7 e 21 dias ($p < 0,05$). Aos 7 dias, o infiltrado inflamatório mais intenso foi observado para o Derivado Fenotiazínico nos tempos de 30 segundos e 2 minutos de aplicação da luz, os quais apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle ($p < 0,05$).

Por outro lado, aos 21 dias, o infiltrado inflamatório foi mais intenso para a Curcumina, após 30 segundos e 1 minuto de aplicação da luz, os quais apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Ressalta-se que, no período final de 63 dias, não houve diferença entre os grupos, com relação ao infiltrado inflamatório ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Comparação dos resultados obtidos com relação ao parâmetro *infiltrado inflamatório*, após utilização dos fotossensibilizadores Derivado Fenotiazínico e Curcumina, por 30 segundos, 1 minuto ou dois minutos nos períodos de 7, 21 e 63 dias

Parâmetro	Períodos de avaliação	Grupo	Mediana (50%)	1º Quartil (25%)	3º Quartil (75%)	p (teste de Kruskal-Wallis)
Infiltrado Inflamatório	7 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	2 ^a	2	2	p<0,001
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^{ab}	1	2	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	2 ^a	2	2,25	
		Curcumina 30segundos	1 ^{ab}	1	1	
		Curcumina 1 minuto	1 ^{ab}	1	2	
		Curcumina 2 minutos	2 ^{ab}	1	2	
		Controle	0 ^b	0	0	
	21 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	1 ^a	1	1	p=0,008
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	1 ^{ab}	0	1	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	1 ^{ab}	0	1	
		Curcumina 30segundos	0 ^{ab}	0	1	
		Curcumina 1 minuto	1 ^a	1	1	
		Curcumina 2 minutos	1 ^{ab}	0	1	
		Controle	0 ^b	0	0	
	63 dias	Derivado Fenotiazínico 30 segundos	0 ^a	0	0	p=0,142
		Derivado Fenotiazínico 1 minuto	0 ^a	0	0,25	
		Derivado Fenotiazínico 2 minutos	0 ^a	0	0	
		Curcumina 30segundos	0 ^a	0	1	
		Curcumina 1 minuto	0 ^a	0	0	
		Curcumina 2 minutos	0,5 ^a	0	1,25	
		Controle	0 ^a	0	0	

* Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos, nos três períodos de avaliação (Pós-teste de Dunn; p<0,05).

O resultado com relação à influência na aplicação de cada tempo de exposição à luz sobre cada fotossensibilizador mostrou que diferenças significativas foram observadas no parâmetro *espessura*, aos 7 dias, para o Derivado Fenotiazínico e para a Curcumina no tempo de exposição de 2 minutos, comparado aos outros dois tempos de exposição (p<0,050). Além disso, no parâmetro *infiltrado inflamatório* também foram observadas diferenças para o Derivado Fenotiazínico, também aos 7 dias, quando comparados aos tempos de 1 e 2 minutos (p=0,004). Nas demais comparações, não foram observadas diferenças significativas (p>0,05).

Assim, embora no período inicial (7 dias) de exposição à luz os tempos mais adequados tenham sido 30 segundos ou 1 minuto, nos períodos finais (21 e 63 dias) os três

tempos de exposição à luz (30 segundos, 1 minuto ou 2 minutos) apresentaram compatibilidade tecidual, para os dois fotossensibilizadores analisados.

A análise global dos resultados microscópicos obtidos, com relação aos parâmetros *fibrosamento*, *espessura* e *infiltrado inflamatório* evidenciou, no período inicial de 7 dias, alterações teciduais de pequena magnitude. No período de 21 dias, apenas o parâmetro *infiltrado inflamatório* apresentou pequenas variações entre os grupos. No entanto, no período final de 63 dias, a compatibilidade tecidual foi observada para os dois fotossensibilizadores (Derivado Fenotiazínico e Curcumina) que não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados, independentemente do tempo de aplicação do laser.

Imuno-histoquímica para marcação de neutrófilos e macrófagos

Imagens representativas da imunomarcação se encontram nas figuras 9 e 10.

Marcações positivas para macrófagos estavam presentes no tecido reacional nos grupos tratados com os dois fotossensibilizadores (Figura 9 A - D), nos diferentes períodos de avaliação e nos três tempos de exposição à luz.

Não foram observadas marcações positivas para neutrófilos no tecido reacional para o Derivado Fenotiazínico (Figura 10 A – B) e Curcumina (Figura 10 C - D) em nenhum dos grupos avaliados.

Figura 9 – Aspectos microscópicos representativos da marcação imunohistoquímica para macrófagos, no tecido conjuntivo subcutâneo tratado com Derivado Fenotiazínico e Curcumina - M: músculo, TR: tecido reacional, FC: fibra colágena, N: neutrófilo, Mo: macrófago, F: fibroblasto (A e B: Derivado Fenotiazínico; C e D: Curcumina – A e C: 100X; e B e D: 400X).

Figura 10 – Aspectos microscópicos representativos da marcação imuno-histoquímica para neutrófilos, no tecido conjuntivo subcutâneo tratado com Derivado Fenotiazínico e Curcumina - M: músculo, TR: tecido reacional, FC: fibra colágena, N: neutrófilo, Mo: macrófago, F: fibroblasto (A e B: Derivado Fentotiazínico; C e D: Curcumina – A e C: 100X; e B e D: 400X).

_____ *Discussão*

DISCUSSÃO

O contato de diferentes materiais com os tecidos desencadeia uma resposta biológica a partir da interação entre os componentes do material e as respostas celulares frente ao seu potencial agressivo (Anderson et al., 2008). A interface entre o material e o tecido e as interações decorrentes do seu contato são dinâmicas (Wataha et al., 2012), onde a associação de fenômenos vasculares, exsudativos e celulares visa a eliminação do agente agressor e a resolução do processo (Consolaro, 2015). No presente estudo, a resposta tecidual da aPDT após o uso de dois fotossensibilizadores estimulados por laser foi avaliada com base na resposta tecidual inflamatória ocasionada em três diferentes períodos experimentais (inicial, intermediário e tardio). Segundo Kao et al. (2006) se a resposta tecidual a um material é favorável aos 60 dias, em roedores, é pouco provável que ocorra uma reincidência do processo inflamatório a menos que haja contaminação bacteriana. Assim, esse período é suficiente para analisar a resposta tecidual aos materiais.

Os fotossensibilizadores foram aplicados em tecido subcutâneo de camundongos da linhagem BALB/c para a observação da compatibilidade tecidual. A avaliação de materiais em tecido subcutâneo é uma prática adotada em Endodontia (Kolokuris et al., 1998; Nelson-Filho et al., 1999; Hauman, 2003; Queiroz et al., 2011; Pereira et al., 2014; Takamiya et al., 2016). A utilização desta linhagem de animais justifica-se pelo fato de que os mesmos proporcionam resultados confiáveis e favorecem uma resposta homogênea aos agentes testados, uma vez que camundongos isogênicos, sendo gerados em laboratório, apresentam similaridade genética, o que evita os inconvenientes de testar todos os materiais no mesmo animal, que é um procedimento necessário quando se emprega o rato como modelo experimental (Nelson-Filho et al., 1999).

Os critérios utilizados para a avaliação da resposta tecidual neste estudo incluíram eventos relacionados à resposta do organismo frente a agressões impostas pelo material testado, como o fibrosamento e a espessura do tecido reacional formado e a intensidade do infiltrado inflamatório na área afetada. A inter-relação dos eventos e o período em que ocorrem na evolução do processo inflamatório estão esquematizados na figura 10 e embasam os critérios estabelecidos por Queiroz et al. (2011), de acordo com os quais foi feita a avaliação semi-quantitativa, no presente estudo.

Figura 11 – Representação esquemática dos fenômenos fisiopatológicos da inflamação (adaptado de Sandritter, 1967).

Para a avaliação do *fibrosamento* foram considerados o número e a densidade das fibras colágenas circundadas por células periféricas, localizadas no tecido reacional. O escore leve significa que o tratamento foi pouco agressivo e as reações representam apenas uma acomodação do organismo frente ao material colocado no tecido subcutâneo. Um fibrosamento severo reflete um potencial mais agressivo do material, que desencadeia uma circunscrição maior por parte do organismo. A avaliação do *fibrosamento* do tecido reacional, no presente estudo, mostrou que não houve diferenças entre os grupos estudados em nenhum dos três períodos experimentais. Variações entre os espécimes possivelmente ocorreram em função da simultaneidade dos eventos desencadeados pela reação do material com o ato cirúrgico para a sua colocação, das características de difusibilidade inerentes ao processo inflamatório nesse período e do ângulo de corte do tecido. Assim, as alterações ocorridas aos 7 dias devem ser analisadas com critério para a comparação entre grupos. Segundo Wataha (2012), a cápsula fibrosa colagênica mediada por monócitos e macrófagos atua como uma barreira entre o material e os tecidos. Assim, a semelhança entre os grupos tratados e os controles, no presente estudo, demonstra que a aplicação da aPDT foi pouco agressiva aos tecidos. Além disso, essas alterações se mantiveram até o período de 63 dias, demonstrando a evolução do processo de reparo pelo organismo.

A atribuição de escores para o parâmetro *espessura* levou em consideração o número de células fibroblásticas e macrofágicas no tecido conjuntivo periférico. Um tecido reacional com espessura levemente ampliada apresenta menor estratificação de células, menos edema e menos infiltrado inflamatório, indicando que a reação frente ao material foi menos agressiva. Por outro lado, o tecido com espessura intensamente ampliada demonstra

uma reação tecidual mais severa frente ao tratamento realizado. A análise da *espessura* do tecido reacional evidenciou que, aos 7 dias, resultados diferentes em relação aos demais grupos e ao controle foram encontrados para os dois fotossensibilizadores quando a luz foi aplicada por dois minutos ($p=0,003$). Avaliar a espessura do tecido reacional implica em inferir sobre a quantidade de exsudato, infiltrado inflamatório e fibrosamento presentes. Nesse aspecto, os resultados do presente estudo indicaram que, nos dois grupos onde a luz foi aplicada por 2 minutos, a reação frente a agressão foi moderada em todos os períodos experimentais, com diferença estatística aos 7 dias ($p<0,001$), porém diminuiu com o decorrer dos períodos experimentais, indicando a reabsorção do exsudato pelas vênulas, dando lugar ao reparo, representado por macrófagos e fibrosamento. Embora Cruz et al. (2015) tenham observado um número aumentado de vasos sanguíneos em animais tratados com aPDT em casos de mucosite induzida em hamsters, não mencionaram achados sobre a presença de exsudato.

As alterações representadas nos parâmetros espessura e fibrosamento indicam que a reação inflamatória induzida nos diferentes grupos do presente estudo se mostrou quase inócua e a agressão pode estar relacionada mais aos aspectos físicos da colocação do material no tecido do que à possível agressão química causada pela aPDT.

A análise do *infiltrado inflamatório* foi baseada na concentração de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) e mononucleares (macrófagos) de permeio ao tecido reacional que estava em contato com o material. Um infiltrado intenso, com grande quantidade de neutrófilos, indica um processo inflamatório inicial, já que estas células são as primeiras a migrarem para o local do processo inflamatório e tem um período de vida muito curto. Pode indicar também que a agressão não cessou ou permaneceu constante ou, ainda, que ocorreu contaminação bacteriana. Os macrófagos são células fagocitárias e a sua presença no local da agressão está relacionada à eliminação de partículas do agente agressor no local da agressão, ou ainda a liberação de substâncias envolvidas no processo de defesa.

Com relação ao *infiltrado inflamatório*, os resultados do presente estudo mostraram diferenças entre os grupos aos 7 e 21 dias. A aplicação do Derivado Fenotiazínico seguido pela luz por 30 segundos e 2 minutos promoveu, aos 7 dias, resultados diferentes em relação aos demais grupos e ao controle ($p<0,001$). Aos 21 dias, o resultado do Derivado Fenotiazínico se manteve e foi semelhante à Curcumina por 1 minuto. Aos 7 dias, assim como na análise dos parâmetros anteriores, as diferenças possivelmente ocorreram em função de que, nesta etapa do processo inflamatório, os eventos são simultâneos aos do ato cirúrgico. Aos 21 dias, o processo deve ser mais estável e mais homogêneo e as reações

mais condizentes com a agressão imposta pelo material. Com relação à qualidade do infiltrado, a presença de neutrófilos foi praticamente nula ou eventual na análise microscópica qualitativa, já que aos 7 dias, sem agressão tecidual persistente e na ausência de contaminação bacteriana, essas células não devem mais estar presentes. Por outro lado, no presente estudo, os macrófagos predominaram durante todo o período experimental. A presença de infiltrado moderado para a Curcumina irradiada por 2 minutos aos 63 dias possivelmente ocorreu por um discreto atraso no processo de reparo, em função de uma eliminação tardia do infiltrado inflamatório inicial, pelo organismo. Entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,142$), em comparação aos outros grupos.

A avaliação do infiltrado inflamatório é um critério utilizado por quase todos os autores em estudos histopatológicos (Luan et al., 2009; Sperandio et al., 2010; Garcia et al., 2010; Silva et al., 2012a; Garcia et al., 2014; Borsatto et al., 2016). Especialmente com relação à aPDT, os resultados obtidos são variáveis, de acordo com os parâmetros utilizados e da região onde é empregada. Utilizando azul de toluidina nos tecidos periodontais, Luan et al. (2009) não observaram infiltrado inflamatório após 72 horas da aplicação da aPDT. Garcia et al. (2014) compararam a ação dos dois fotossensibilizadores fenotiazínicos, azul de metileno e azul de toluidina, também em tecidos periodontais, observando que, no período experimental final, apenas um pequeno foco de células inflamatórias foi observado nos tecidos. Esses estudos corroboram com o presente estudo, uma vez que demonstramos a presença de infiltrado leve ou ausente, na maior parte dos casos no período experimental final após o emprego da aPDT.

A avaliação do processo de reparo em feridas induzidas em ratos e tratadas com PDT foi avaliada por Sperandio et al. (2010). Embora, aos 7 dias, os autores tenham observado uma reação inflamatória menos intensa nos grupos tratados apenas com laser, os autores afirmam que a PDT não promoveu atraso no processo de reparo, resultado também demonstrado no presente estudo.

Baseado nestas considerações sobre a relação entre os tipos celulares e as etapas do processo inflamatório, justifica-se a marcação negativa para neutrófilos obtida nos resultados do presente estudo, uma vez que é uma célula de vida curta e presente nas etapas iniciais do processo inflamatório. Além disso, esse fato indica que a agressão ocasionada pela aPDT não foi persistente. Pelas mesmas razões, no presente estudo, os macrófagos foram marcados positivamente, já que são células de vida longa e presentes em todas as etapas do processo inflamatório (Consolaro, 2015).

A análise microscópica descritiva dos resultados obtidos neste estudo mostrou que os dois fotossensibilizadores, associados à aplicação do laser, promoveram reações

teciduais semelhantes ao final do período de 63 dias de avaliação, evidenciando a ocorrência do processo de reparo. Como demonstrado por Castañeda et al. (2011) que, aos 63 dias, observou aspecto de normalidade tecidual em tecido subcutâneo de camundongos isogênicos quando o material apresentou compatibilidade tecidual.

Embora a avaliação dos eventos relacionados ao processo inflamatório sejam de fundamental importância para determinar o potencial agressivo de materiais e/ou tratamentos, ainda há um número reduzido de trabalhos em Odontologia demonstrando as alterações microscópicas em diferentes tecidos (mucosa bucal, tecidos periodontais, queimaduras cutâneas e feridas em dorso de ratos) frente ao uso da aPDT (Luan et al., 2009; Garcia et al., 2010; Sperandio et al., 2010; Okada et al., 2012; Garcia et al., 2014; Cruz et al., 2015; Deyhimi et al., 2016).

Especificamente em Endodontia, uma das áreas de aplicação principal da aPDT em Odontologia, apenas dois estudos realizados por nosso grupo de pesquisa avaliaram as características histopatológicas dos tecidos periapicais de dentes de cães, após tratamento endodôntico utilizando protocolos de aPDT. Silva et al., (2012a) analisaram as reações teciduais após a aplicação ou não da aPDT em dentes de cães submetidos a tratamento endodôntico em sessão única. Nos grupos onde os dentes receberam a aPDT, observou-se áreas não reparadas de cimento reabsorvido e a região periapical estava moderada a severamente ampliada, porém isenta de células inflamatórias. Além disso, foram observadas neoangiogênese e fibrogênese moderadas e osso alveolar com grandes áreas de reabsorção não reparada. Nos grupos que não receberam a aPDT, a região apical e periapical apresentava infiltrado inflamatório significativamente maior, dissociação fibrilar e edema generalizado. Além disso, na contagem celular observou-se um número significativamente maior de células inflamatórias nos grupos onde a aPDT não foi utilizada. Embora o estudo de Silva et al. (2012a) seja *in vivo* e com o objetivo de avaliar as características microscópicas dos tecidos após a aplicação da aPDT, assim como no presente estudo, não se pode realizar comparação direta entre os resultados. O estudo de Silva et al. (2012a) foi efetuado em dentes de cães que apresentavam lesão periapical induzida e o objetivo era avaliar o efeito da aPDT no reparo tecidual de uma área previamente infectada, com presença de inflamação e reabsorção dos tecidos mineralizados. No presente estudo, a avaliação em tecido subcutâneo de camundongos teve por objetivo avaliar a compatibilidade tecidual, sem a presença de bactérias ou de processos patológicos pré-existent. A presença de bactérias influencia as características do infiltrado inflamatório e o curso do reparo. Silva et al. (2012a) destacam a importância da realização de pesquisas visando estabelecer um protocolo de

uso da aPDT que seja seguro, capaz de inativar bactérias sem causar agressão aos tecidos apicais e periapicais, o que justifica a realização deste estudo.

Em 2016, Borsatto et al. avaliaram a resposta de dentes de cães com lesão periapical tratados em sessão única após aPDT, comparados com o tratamento utilizando medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio. Após 90 dias, a análise histopatológica do grupo que recebeu terapia fotodinâmica mostrou que existiam áreas de cemento não reparadas na região periapical, sendo que as lacunas cementárias apresentavam-se aumentadas, porém isentas de células inflamatórias. O ligamento periodontal estava moderada a severamente ampliado e o osso alveolar desnudo e distante do ápice. Na região periapical haviam células inflamatórias residuais. Os resultados obtidos no presente estudo são muito semelhantes aos obtidos por estes autores, levando-se em consideração que os escores ausente e leve representam um infiltrado inflamatório reduzido e são muito semelhantes em termos biológicos, indicando praticamente a mesma condição histopatológica.

Com base nas considerações anteriores, fica evidente que a comparação direta dos resultados do presente estudo com os demais achados da literatura é dificultada, uma vez que há escassez de trabalhos em tecido subcutâneo avaliando protocolos de aPDT. Por mais que se realize a extrapolação dos resultados obtidos com esta terapia em outros tecidos para os nossos achados, não se pode afirmar que ambos representam exatamente as mesmas reações inflamatórias. Tais considerações são importantes uma vez que as características do tecido alvo, juntamente com as do fotossensibilizador e os parâmetros da fonte de luz influenciam os efeitos da aPDT (Chrepa et al., 2014).

Dois fotossensibilizadores foram escolhidos para a aplicação da aPDT neste estudo. O Helbo Endo Blue Photosensitizer (Helbo Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Austria) é um Derivado Fenotiazínico na concentração de 10mg/mL. O emprego desta categoria de fotossensibilizadores está fundamentada na literatura por diversos estudos (Soukos et al., 2006; Fimple et al., 2008; Xu et al., 2009; Raymond et al., 2011; Silva et al., 2014; Xhevdet et al., 2014). De modo particular, o Derivado Fenotiazínico utilizado neste estudo também já teve sua eficácia comprovada em aPDT (Oliveira et al., 2011; Silva et al., 2012a; Yildirim et al., 2013; Macedo et al., 2014). A concentração utilizada demonstrou efeito antimicrobiano em estudo prévio (Oliveira et al., 2011) e resposta tecidual satisfatória em dentes de cães com lesão periapical no estudo de Silva et al. (2012a), assim como em nosso estudo, a qual foi evidenciada por fibrosamento leve a moderado e infiltrado ausente/leve no período experimental de 63 dias.

Por outro lado, estes fotossensibilizadores apresentam uma reação adversa importante que é a sua coloração azul intensa, com capacidade para manchar os dentes e restaurações estéticas de resina composta (Figueiredo et al., 2014; Garcez et al., 2015; Paschoal et al., 2015), o que torna o seu uso clínico limitado.

Embora a Curcumina venha sendo utilizada em diversas modalidades terapêuticas por um longo período (Hatchner et al., 2008) sua ação como agente fotossensibilizador com atividade antimicrobiana é relativamente recente (Aggarwal et al., 2007; Okada et al., 2012; Araújo et al., 2013; Paschoal et al., 2013; Gupta et al., 2013; Frota et al., 2015; Paschoal et al., 2015). Ao contrário do Derivado Fenotiazínico, ainda não há um produto comercial pronto para uso. Assim, neste estudo, a Curcumina foi manipulada em uma concentração de 0,0074mg/mL, com capacidade antimicrobiana demonstrada por Andrade et al. (2013) e Frota et al. (2015).

No presente estudo, a Curcumina também apresentou uma resposta tecidual favorável ao final do período experimental de 63 dias. Isso pode ser atribuído ao fato de que, segundo alguns autores, a Curcumina é capaz de regular numerosos fatores de transcrição, citocinas, quinases, moléculas de adesão e enzimas relacionadas à inflamação (Aggarwal e Harikumar, 2009; Mandroli e Bhat, 2013).

A ação da luz sobre os tecidos é tão importante no resultado da aPDT quanto a ação dos fotossensibilizadores. A sua aplicação com parâmetros corretos, pode promover a cicatrização de feridas, proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, produção de fatores de crescimento e ATP, proliferação de células epidérmicas indiferenciadas, além da diminuição do número de células inflamatórias e aumento na disposição de colágeno (Percival et al., 2015). Os resultados do presente estudo mostraram que, nos períodos finais (21 e 63 dias) os três tempos de exposição à luz (30 segundos, 1 minuto ou 2 minutos) apresentaram compatibilidade tecidual. Dessa forma, os resultados satisfatórios obtidos neste estudo podem ser atribuídos, além do potencial pouco agressivo dos fotossensibilizantes, aos efeitos bioestimuladores da luz. A ação antimicrobiana da aPDT utilizando azul de metileno e variando os tempos de exposição do fotossensibilizador a um laser diodo em 1, 2 ou 4 minutos mostrou que o tempo de 1 minuto é suficiente para a morte de *Enterococcus faecalis* (Yildirim et al., 2013). Entretanto, em Odontologia, não existem estudos na literatura científica avaliando a compatibilidade tecidual após a variação dos tempos de irradiação com laser, em aPDT.

O presente estudo demonstrou que, no período experimental final de 63 dias, os dois fotossensibilizadores utilizados, Derivado Fenotiazínico e Curcumina, apresentaram compatibilidade tecidual, nos 3 tempos de exposição à luz (30 segundos, 1 minuto e 2 minutos). Estudos clínicos avaliando estes protocolos são necessários, a fim de fornecer subsídios para sua ampla indicação e utilização por parte do clínico.

Conclusão

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos nas condições experimentais deste estudo, e a partir da hipótese nula considerada, foi possível concluir que os dois fotossensibilizadores apresentaram adequada compatibilidade tecidual nos três tempos de exposição à luz (30 segundos, 1 minuto e 2 minutos), ao final do período experimental. Assim, a hipótese nula foi aceita.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Aggarwal BB, Sundaram C, Malani N, Ichikawa H. Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 595: 1-75.
2. Aggarwal BB, Harikumar KB. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *Int J Biochem cell Biol.* 2009; 41: 40-59.
3. Al Habashneh R, Asa'ad FA, Khader Y. Photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Quintessence Int.* 2015;46(8):677-90.
4. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008; 20(2): 86-100.
5. Andrade MC, Ribeiro APD, Dovigo LN, Brunetti IL, Giampaolo ET, Bagnato VS, Pavarina AC. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida* spp. *Arch Oral Biol.* 2013; 58: 200-210.
6. Araújo NC, Fontana CR, Bagnato VS, Gerbi MEM. Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers Med Sci.* 2014; 29(2): 629-635.
7. Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol.* 1996; 12: 66-69.
8. Borsatto MC, Correa-Afonso AM, Lucisano MP, Silva RAB, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva LAB. One-session root canal treatment with antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): an *in vivo* study. *Int Endod J.* 2016; 49: 511-518.
9. Bouillaguet S, Wataha JC, Zapata O, Campo M, Lange N, Schrenzel J. Production of reactive oxygen species from photosensitizers activated with visible light sources available in dental offices. *Photomed Laser Surg.* 2010; 28(4):519-525.

10. Bumb SS, Bhaskar DJ, Agali CR, Punia H, Gupta V, Singh V, Kadtane S, Chandra S. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubules in a root canal system: an in vitro study. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(11): ZC67-ZC71.
11. Castañeda ER, Silva LAB, Gatón-Hernandez P, Consolaro A, Rodriguez EG, Silva RAB, Queiroz AM, Nelson-Filho P. Filtek Silorane and Filtek Supreme XT Resins: tissue reaction after subcutaneous implantation in isogenic mice. *Braz Dent J.* 2011; 22: 105-110.
12. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiag Photodyn Ther.* 2004; 1(4): 279-293.
13. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai Q, Tian Y, Yu Q. Evaluation of bactericidal effect of Nd:Yag, Er:Yag, Er, Cr:YSGG Laser radiation and Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in experimentally infected root canals. *Lasers Surg Med.* 2012; 44: 824-831.
14. Chininforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Bahador A. Clinical approach of high technology techniques for control and elimination of endodontic microbiota. *J Lasers Med Sci.* 2015; 6(4): 139-150.
15. Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod.* 2014. 40(7): 891-898.
16. Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. 2ª ed. Maringá: Ed. DentalPress; 2015.
17. Cruz EP, Campos L, Pereira FS, Magliano GC, Benites BM, Arana-Chavez VE, Ballester RY, Simões A. Clinical, biochemical and histological study of the effect of antimicrobial photodynamic therapy on oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters *Photodiag Photodyn Ther.* 2015; 12: 298-309.
18. De Rosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev.* 2002; 233-234: 521-526.

19. Deyhimi P, Khademi H, Birang R, Akhoondzadeh M. Histological Evaluation of Wound Healing Process after Photodynamic Therapy of Rat Oral Mucosal Ulcer. J Dent Shiraz Univ Med Sci. 2016; 17(1): 43-48.
20. Diniz IM, Horta ID, Azevedo CS, Elmadijan TR, Matos AB, Simionato MR, Marques MM. Antimicrobial photodynamic therapy: a promise candidate for caries lesions treatment. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015; 12(3): 511-518.
21. Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR, Boyle DG. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. J Natl Cancer Inst. 1975; 55: 155-121.
22. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. Photochem Photobiol. 2011; 87(4): 895-903.
23. Figini L, Lodi G, Gorni F, Gagliani M. Single Versus Multiple Visits for Endodontic Treatment of Permanent Teeth: A Cochrane Systematic Review. J Endod. 2008; 34(9): 1041-1047.
24. Figueiredo RA, Anami LC, Mello I, Carvalho ES, Habitante SM, Raldi DP. Tooth discoloration induced by endodontic phenothiazine dyes in photodynamic therapy. Photomed Laser Surg. 2014; 32: 458-462.
25. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner ACR, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection *in vitro*. J Endod. 2008; 34(6): 728-734.
26. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, Riahi R, Vera A, Doukas AG, Pagonis TC, Kent R, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals *in vitro*. Lasers Surg Med. 2007; 39:782-787.
27. Frota MF, Tanomaru JMG, Tanomaru-Filho M, Bagnato VS, Espir CG, Berbet FLCV. Photodynamic therapy in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis* using curcumin as photosensitizer. Lasers Med Sci. 2015; 30(7):1867-72.

28. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod.* 2008; 34: 138-142.
29. Garcez AS, Nunez SC, Hamblin MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod.* 2010; 36: 1463-1466.
30. Garcez AS, Arantes-Neto JG, Sellera DP, Fregnani ER. Effects of antimicrobial photodynamic therapy and surgical endodontic treatment on the bacterial load reduction and periapical lesion healing. Three years follow up. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12: 575-580.
31. Garcia VG, Lima MA, Okamoto T, Milanezi LA, Gualberto Júnior C, Fernandes LA, Almeida JL, Theodoro LH. Effect of photodynamic therapy on the healing of subcutaneous third-degree-burn: histological study in rats. *Lasers Med Sci.* 2010; 25: 221-228.
32. Garcia V, Longo M, Fernandes LA, Gualberto-Júnior EC, Santinoni CS, Bosco AF, Nagata MJH, Theodoro LH. Treatment of experimental periodontitis in rats using repeated adjunctive antimicrobial photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* 2013; 28:143-150.
33. Garcia V, Longo M, Fernandes LA, Gualberto-Júnior EC, Santinoni CS, Bosco AF, Nagata MJH, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontol Res.* 2014; 49: 584-594.
34. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *J Biomed Opt.* 2007; 12(3): 034029.
35. Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, Krasteva-Panova AZ, Kalchinov V, Mitov I, Kamenoff J. Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *J Investig Clin Dent.* 2014; doi: 10.1111/jicd.12147.

-
36. Gill GS, Bhuyan AC, Kalita C, Kataki R, Bhuyan D. Single Versus Multi-visit Endodontic Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: An *in vivo* Study with 1-year Evaluation. *Ann Med Health Sci Res.* 2016; 6(1): 19–26.
 37. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *The Am Assoc Pharmac Sci J.* 2013; 15(1): 195-218.
 38. Gursoy H, Tomruk-Ozcakir C, Tanalp j, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest.* 2013; 17: 1113-1125.
 39. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3(5): 436-450.
 40. Harris F, Chatfield LK, Phoenix DA. Phenotiazinium based photosensitizers: photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. *Curr Drug Targets.* 2005; 6: 615-627.
 41. Hatcher H, Planalp R, Cho J, Torti FM, Torti SV. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65: 1631-1652.
 42. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J.* 2003; 36: 75-85.
 43. Hayek RR, Araujo NS, Gioso MA, Ferreira J, Baptista-Sobrinho CA, Yamada AM, Ribeiro MS. Comparative study between the effects of photodynamic therapy and conventional therapy on microbial reduction in ligature-induced peri-implantitis in dogs. *J Periodontol.* 2005; 76(8): 1275: 81.
 44. Hecker S, Hiller KA, Galler KM, Erb S, Mader T, Schmalz G. Establishment of an ex vivo system for artificial root canal infection evaluated by use of sodium hypochlorite and the photodynamic therapy. *Int Endod J.* 2013; 46:449-457.

45. Holland R, Otoboni Filho JA, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Dezan Jr E. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dog's teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2003; 29: 121-125.
46. Iuric IB, Plecko V, Panduric DG, Anic I. The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic re-treatment: a clinical study. *Photodiag Photodyn Ther*. 2014; 11: 549-555.
47. Javed F, Romanos GE. Does photodynamic therapy enhance standard antibacterial therapy in dentistry? *Photomed Laser Surg*. 2013; 31(11): 512-518. Jori G, Brown SB. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochem Photobiol Sci*. 2004; 3(5): 403-405.
48. Kao CT, Tsai CH, Huang TH. Tissue and cell reactions to implanted root-end filling materials. *J Mater Sci Mater Med*. 2006; 17: 841-847.
49. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med*. 2011; 43(7): 755-767.
50. Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2013; 39: 411-414.
51. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Den Res*. 2007; 86: 694-707.
52. Leite DPV, Paolilo FR, Parmesano TN, Fontana CR, Bagnato VS. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg*. 2014; 32(11): 627-632.
53. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifácio KC EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod*. 2002;28(12):815-8.

54. Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(5):680-5.
55. Leonardo MR, Rossi MA, Bonifácio KC, Silva LAB, Assed S. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth. *Ultrastruct Pathol.* 2007; 31(4): 321-325.
56. Luan XL, Qin YL, Bi LJ, Hu CY, Zhang ZG, Lin J, Zhou CN. Histological evaluation of the safety of toluidine blue-mediated photosensitization to periodontal tissues in mice. *Lasers Med Sci.* 2009; 24: 162-166.
57. Macedo GO, Novaes Jr AB, Souza SLS, Taba Jr M, Palioto DB, Grisi MFM. Additional effects of aPDT on nonsurgical periodontal treatment with doxycycline in type II diabetes: a randomized, controlled clinical trial. *Lasers Med Sci.* 2014; 29: 881-886.
58. Mainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci.* 2004; 3: 406-411.
59. Mandroli OS, Bhat K. An in vitro evaluation of antibacterial activity of curcumin against common endodontic bacteria. *J Appl Pharmac Sci.* 2013; 3(10): 106-108.
60. Manoil D, Filieri A, Gameiro C, Lange N, Schrenzel J, Wataha JC, Bouillaguet S. Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2014; 11: 372-379.
61. Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Effectiveness of different laser systems to kill *Enterococcus faecalis* in aqueous suspension and infected tooth model. *Int Endod J.* 2009; 42:351-359.
62. Meisel P, Kocher T. Photodynamic therapy for periodontal diseases: state of art. *J Photochem Photobiol B.* 2005; 76(8): 1275-1281.
63. Melo MA, Rolim JP, Passos VF, Lima RA, Zanin IC, Codes BM, Rocha SS, Rodrigues LK. Photodynamic antimicrobial chemotherapy and ultraconservative caries removal for management of deep caries lesion. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2015; 12(4): 581-586.

64. Mirzaie M, Yassini E, Ashnagar S, Hadadi A, Chiniforush N. Evaluation of temperature change during antimicrobial photodynamic therapy with two different photosensitizers in dental caries. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016; 21: doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.03.005.
65. Moos PJ, Edes K, Mullally JE, Fitzpatrick FA. Curcumin impairs tumor suppressor p53 function in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 2004; 25: 1611-1617.
66. Moreira AL, Novaes Jr. AB, Grisi MF, Taba Jr. M, Souza SL, Palioto DB, Oliveira PG, Casati MZ, Casarin RC, Messoria MR. Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct to Non-Surgical Treatment of Aggressive Periodontitis: A Split-Mouth Randomized Controlled Trial. *J Periodontol.* 2015; 86: 376-386.
67. Muller KP, Rodrigues CR, Nunez SC, Rocha R, Jorge AO, Ribeiro MS. Effects of lower power red laser on induced-dental caries in rats. *Arch Oral Biol.* 2007; 52(7): 648-654.
68. Neelakantam P, Cheng CQ, Ravichandran V, Mao T, Sriramana P, Sridharana S, Subbarao C, Sharma S, Kishen A. Photoactivation of curcumin and sodiumhypochlorite to enhance antibiofilmefficacy in root canal dentin *Photodiag Photodyn Ther.* 2015; 12: 108-114.
69. Nelson-Filho P, Silva LAB, Leonardo MR, Utrilla LS, Figueiredo F. Connective tissue responses to calcium-hydroxide based root canal medicaments. *Int Endod J.* 1999; 32: 303-311.
70. Neves PA, Lima LA, Rodrigues FC, Leitão TJ, Ribeiro CC. Clinical effect of photodynamic therapy on primary carious dentin after partial caries removal. *Braz Oral Res.* 2016; 30(1): pii: S1806-83242016000100246.
71. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod.* 2011; 37:217-222.
72. Okada N, Muraoka E, Fujisawa S, Machino M. Effects of curcumin and capsaicin irradiated with visible light on murine oral mucosa. *In vivo.* 2012; 26: 759-764.

73. Oliveira RR, Novaes Júnior AB, Garlet GP, Souza RF, Taba Júnior M, Sato S, Souza SLS, Palioto DB, Grisi MFM, Feres M. The effect of a single episode of antimicrobial photodynamic therapy in the treatment of experimental periodontitis. Microbiological profile and cytokine pattern in the dog mandible. *Lasers Med Sci.* 2011; 26:359–367.
74. Oliveira BP, Aguiar CM, Câmara AC. Photodynamic therapy in combating the causative microorganisms from endodontic infections. *Eur J Dent.* 2014; 8(3): 424-430.
75. Paschoal MA, Tonon CC, Spolidório DMP, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiag Photodyn Ther.* 2013; 10: 313-319.
76. Paschoal MA, Moura CMZ, Jeremias F, Souza JF, Bagnato VS, Giusti JSM, Santos-Pinto L. Longitudinal effect of curcumin-photodynamic antimicrobial chemotherapy in adolescents during fixed orthodontic treatment: a single-blind randomized clinical trial study. *Lasers Med Sci.* 2015; 30: 2059-2065. a
77. Paschoal MA, Lin M, Santos-Pinto L, Duarte S. Photodynamic antimicrobial chemotherapy on *Streptococcus mutans* using curcumin and toluidin blue activated by a novel LED device. *Lasers Med Sci.* 2015; 30: 885-890. B
78. Paula-Silva FW, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, da Silva LA, Kapila YL (2010) Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int* 87:144-157.
79. Percival S, Francolini I, Donelli G. Low-laser therapy as an antimicrobial and biofilm technology and its relevance to wound healing. *Future Microbiol.* 2015; 10(2): 255-269.
80. Pereira MS, Rossi MA, Cardoso CR, da Silva JS, Bezerra da Silva LA, Kuga MC, Faria G. Cellular and molecular tissue response to triple antibiotic intracanal dressing. *J Endod.* 2014; 40(4):499-504.
81. Perussi JR. Inativação fotodinâmica de microrganismos. *Quim Nova.* 2007; 30(4): 988-994.

82. Plotino G, Cortese T, Grande NM, Leonardi DP, Di Giorgio G, Testarelli L, Gambarini G. New Technologies to improve root canal disinfection. *Braz Den J.* 2016; 27(1): 3-8.
83. Posten W, Wrone DA, Dover JS, Arndt KA, Silapunt S, Alam M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol Surg.* 2005; 31(3): 334-340.
84. Queiroz AM, Assed S, Consolaro A, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva RAB, Silva LAB. Subcutaneous tissue response to primary root canal filling materials. *Braz Dent J.* 2011; 22: 203-211.
85. Queiroz AC, Suaid FA, Andrade PF, Novaes Jr. AB, Taba Jr. M, Palioto DB, Grisi MFM, Souza SLS. Antimicrobial photodynamic therapy associated to nonsurgical periodontal treatment in smokers: microbiological results. *J Photochem Photobiol.* 2014; 141: 170-175.
86. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol.* 2011; 15(4):323-7.
87. Ramos UD, Ayub LG, Reino DM, Grisi MFM, Taba Jr. M, Souza SLS, Palioto DB, Novaes Jr. AB. Antimicrobial photodynamic therapy as na alternative to systemic antibiotics: results from a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical study on type 2 diabetics. *J Clin Periodontol.* 2016; 43:147-155.
88. Raymond NG, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N, Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. Endodontic Photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod.* 2011; 37: 217-222.
89. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod.* 2011; 37: 856-859.
90. Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008; 41(8):664-9.

91. Rocha RASS, Silva RAB, Assed S, Medeiros AI, Faccioli LH, Pécora JD, Nelson-Filho P. Nitric oxide detection in cell culture exposed to LPS after Er:YAG laser irradiation. *Int Endo J.* 2009; 42: 992-996.
92. Ruvière DB, Leonardo MR, da Silva LA, Ito IY, Nelson-Filho P. Assessment of the microbiota in root canals of human primary teeth by checkerboard DNA-DNA hybridization. *J Dent Child.* 2007; 74(2):118-23.
93. Sakano K, Kawanishi S. Metal-mediated DNA damage induced by curcumin in the presence of human cytochrome P450 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 2002; 405: 223-230.
94. Sandritter W. *Color Atlas & Textbook of tissue and cellular pathology.* Chicago: Year Book Medical Publishers Inc; 1967.
95. Santin GC, Oliveira DSB, Galo R, Borsatto MC, Corona SM. Antimicrobial Photodynamic Therapy and Dental Plaque: A Systematic Review of the Literature. *Sci World J.* 2014; doi.org/10.1155/2014/824538.
96. Sculean A, Aoki A, Romanos G, Schwarz F, Miron RJ, Cosgarea R. Is Photodynamic Therapy an Effective Treatment for Periodontal and Peri-Implant Infections? *Dent Clin North Am.* 2015; 59(4):831-858.
97. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hidroxyde on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod.* 2002; 28(2): 94-98.
98. Silva LAB, Nelson-Filho P, Faria G, de Souza-Gugelmin MC, Ito IY. Bacterial profile in primary teeth with necrotic pulp and periapical lesions. *Braz Dent J.* 2006; 17(2):144-8.
99. Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P, Silva LAB, Consolaro A. Subcutaneous tissue response of isogenic mice to calcium hydroxide-based pastes with chlorhexidine. *Braz Dent J.* 2009. 20: 99-106.

100. Silva LAB, Novaes Jr. AB, Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria Jr M, Silva RAB. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. J Endod. 2012; 38(3): 360-366. a
101. Silva RAB, Ferreira PDF, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LAB. Toll-like receptor 2 knockout mice increased periapical lesion size and osteoclast number. J Endod 2012; 38 (6): 803-13.b
102. Silva LAB; Silva RAB; Nelson-Filho P, Cohenca, N. Intracanal medication in root canal disinfection. In: Nestor Cohenca. (Org.). Disinfection of Root Canal Systems: The Treatment of Apical Periodontitis. 1ed. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2014, v. 1, p. 247-275.a
103. Silva EJ, Coutinho-Filho WP, Andrade AO, Herrera DR, Coutinho-Filho TS, Krebs RL. Evaluation of photodynamic therapy using a diode laser and diferente photosensitizers against *Enterococcus faecalis*. Acta Odontol Latinoam. 2014; 27(2): 63-5.b
104. Singh S, Nagpal R, Manuja R, Manuja N, Tyagi SP. Photodynamic therapy: na adjunct to conventional root canal disinfection strategies. Aust Endod J. 2015; 41: 54-71.
105. Sperandio FF, Simões A, Aranha ACC, Corrêa L, Sousa SCOM. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing. Photomed Laser Surg. 2010; 28(5): 581-587.
106. Soares JA, Leonardo MR, Silva LA, Tanomaru Filho M, Ito IY. Histomicrobiologic aspects of the root canal system and periapical lesions in dogs' teeth after rotary instrumentation and intracanal dressing with ca(oh)2 pastes. J Appl Oral Sci. 2006; 14(5): 355-364.a
107. Soares BM, Farias LM. Monitoring the effectiveness of photodynamic therapy with periodic renewal of the photosensitizer on intracanal *Enterococcus faecalis* biofilms. Photodiag Photodyn Ther. 2016; 13:123-127.b

108. Soukos NS, Chen PS-Y, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod.* 2006; 32: 979-984.
109. Späth A, Leibl C, Cieplik F, Lehner K, Regensburger J, Hiller KA, Bäumler W, Schmalz G, Maisch T. Improving photodynamic inactivation of bacteria in dentistry: highly effective and fast killing of oral key pathogens with novel tooth-colored type II photosensitizers. *J Med Chem.* 2014; 57: 5157-5168.
110. Stein E, Koehn J, Sutter W, Schmidl C, Leziac V, Wendtland G, Watzinger F, Turhani D. Phenothiazine Chloride and soft laser light have a biostimulatory effect on human osteoblastic cells. *Photomed Laser Surg.* 2009; 27(1): 71-77.
111. Takamiya AS, Monteiro DR, BernabDG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, Oliveira SHP, Barbosa DB. In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *J Endod.* 2016; 42(6): 953-960.
112. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LAB, Ito IY. Microbial distribution in the root canal system after periapical lesion induction using different methods. *Braz Dent J.* 2008; 19(2): 124-129.
113. Trindade AC, Figueiredo JAP, Steier L, Weber JBB. Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomed Laser Surg.* 2015. 33(3): 175-182.
114. Upadya MH, Kishen A. Influence of bacterial growth modes on the susceptibility to light-activated disinfection. *Int Endod J.* 2010; 43: 978-987.
115. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med.* 2001; 29(2): 165-173.
116. Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. The interaction Comparison of f lipopolysaccharides with phenothiazine dyes. *Lasers Surg Med.* 2003; 33: 311-319.

117. Vera J, Siqueira Jr. JF, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, Cruz AG. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *Int Endod J*. 2012; 38(8): 1040-1052.
118. Wainwright M, Crossley KB. Photosensitizing agents circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2004; 53: 119-126.
119. Wataha JC. Predicting clinical biological responses to dental materials. *Dental materials*. 2012; 28: 23-40.
120. Wiedemann F, Link R, Pompe K, Jacobshagen U, Schaefer HE, Wiesmüller KH, Hummel RP, Jung G, Bessler W, Böltz T. Histopathological studies on the local reactions induced by complete Freund's adjuvant (CFA), bacterial lipopolysaccharide (LPS), and synthetic lipopeptide (P3C) conjugates. *J Pathol*. 1991; 164:265-171.
121. Wikene KO, Hegge AB, Bruzell E, Tønnesen HH. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on curcumin and curcuminoids LII. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015; 41: 969-977.
122. Xavier ACC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AOC, Valera MC, Carvalho CAT. One-Visit Versus Two-Visit Root Canal Treatment: Effectiveness in the Removal of Endotoxins and Cultivable Bacteria. *J Endod*. 2013; 39(8):959-964.
123. Xhevedt A, Stubijar D, Kriznar I, Jukic T, Skvarc M, Veranic P, Ihan A. The disinfecting efficacy of root canals with laser photodynamic therapy. *J Laser Med Sci*. 2014. 5(1): 19-26.
124. Yildirim C, Karaarslan ES, Ozsevik S, Zer Y, Sari T, Usumez a. Antimicrobial efficiency of photodynamic therapy with different irradiation durations. *Eur J Dent*. 2013. 7: 469-473.
125. Yoon I, Li JZ, Shim YK. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. *Clin Endosc*. 2013; 46: 7-23.

Anexo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Terapia Fotodinâmica antimicrobiana: avaliação da resposta do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos isogênicos frente a diferentes fotossensibilizadores e tempos de irradiação”, Protocolo nº 2015.1.598.58.1, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em reunião de 19/08/2015.

Vigência do Projeto	01/09/2015 a 30/11/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo Isogênico BALB/c
Nº de animais	262
Peso/Idade	15 a 20 gramas / 6 a 8 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central do <i>Campus</i> USP – Ribeirão Preto

Ribeirão Preto, 19 de agosto de 2015.

Prof. Dra. Andiara De Rossi Daldegan
Coordenadora da CEUA – FORP/USP

CEUA - FORP/USP