



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

FERNANDA ESTEVES

**Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à terapia
fotodinâmica: estudo em ratos**

Araçatuba - SP

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

FERNANDA ESTEVES

**Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à terapia
fotodinâmica: estudo em ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Odontologia de Araçatuba da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho” –
UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. João Eduardo
Gomes Filho

Araçatuba - SP

2014

A minha família, meus pais e irmãos, com amor, admiração e gratidão por toda compreensão, presença, carinho e incansável apoio ao longo desses cinco anos.

AGRADECIMENTOS

***“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu.
Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e
sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.***

Paulo Beleki

RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um conjunto de procedimentos físicos, químicos e biológicos, que ocorre quando o fotossensibilizador (FS) é ativado por meio de luz de comprimento de onda específico, para destruir a célula-alvo e/ou microorganismos. Entretanto, a literatura é escassa sobre a biocompatibilidade da TFD. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resposta tecidual da TFD pelo implante de tubos de polietileno em ratos, comparando com soluções irrigadoras. Foram empregados cinquenta ratos (*Wistar*), entre 4 e 6 meses de idade, pesando entre 250 e 280g, distribuídos nos grupos: G1-Hipoclorito de sódio 2,5%; G2-Hipoclorito de sódio 5%; G3-Clorexidina 2%; G4-Cloreto de sódio 0,9%; G5-TFD (FS curcumina ativado por luz azul). Após a anestesia, foram inseridas esponjas de fibrina nos tubos de polietileno embebidas nas soluções já citadas. Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias do período de implantação, os animais foram mortos e os tubos de polietileno com os tecidos circundantes foram removidos e fixados em solução formalina 10% e pH 7.0. Os tubos de polietileno foram cortados, processados e incluídos em glicol metacrilato (GMA), seccionados em cortes seriados de 3 µm e 10 µm de espessura, corados respectivamente por H.E. e Von Kossa, e permaneceram sem coloração para serem analisados sob luz polarizada. As reações do tecido em contato com o material na abertura do tubo de polietileno foram avaliadas. Escores foram determinados de acordo com os resultados histológicos e analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,05$). A TFD apresentou biocompatibilidade semelhante ao cloreto de sódio a 0,9% sem diferença estatística significativa. Mas houve diferença estatística significativa entre a TFD ao hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) e clorexidina 2%. Concluiu-se que a TFD foi biocompatível e que pode ser uma nova modalidade terapêutica promissora e coadjuvante ao tratamento endodôntico.

Palavras-chave: TFD . Endodontia . Curcumina . Biocompatibilidade.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a set of physical, chemical and biological procedures, which occurs when the photosensitizer (PS) is activated by light of a specific wavelength to destroy the target cell and / or micro-organisms. However, the literature is scarce on the biocompatibility of PDT. The aim of this study was to evaluate the tissue response of PDT by implanting polyethylene tubes in mice, compared with irrigating solutions. Fifty rats (Wistar) were used between 4 and 6 months of age, weighing 250-280g, assigned to groups G1-2.5% sodium hypochlorite; G2 sodium hypochlorite 5%; G3-Chlorhexidine 2%; G4-Sodium Chloride 0.9%; G5-PDT (FS curcumin activated by blue light). After anesthesia, fibrin sponges were inserted into polyethylene tubes embedded in the aforementioned solutions. After 7, 15, 30, 60 and 90 day implantation period, the animals were killed and the polyethylene pipes to the surrounding tissues were removed and fixed in 10% formalin solution and pH 7.0. Polyethylene tubes were cut, processed, and embedded in glycol methacrylate (GMA), cut in serial sections of 10 m and 3 mm thick, respectively, stained by HE and Von Kossa and remained unstained for examination under polarized light. The reactions of the tissue in contact with the material at the opening of the polyethylene tube were evaluated. Scores were determined according to the histological results and statistically analyzed using the Kruskal Wallis test ($p < 0.05$). PDT had tissue reaction similar to 0.9% sodium chloride with no statistically significant difference. however there was statistically significant difference between the PDT and sodium hypochlorite (2.5% and 5%) and 2% chlorhexidine. It was concluded that PDT was biocompatible and can be a promising new therapeutic modality and adjunct to endodontic treatment

Keywords: PDT. Endodontics. Curcumin. Biocompatibility.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Rato albino macho (Wistar) pesando 279 g.
- Figura 2 – Rato sendo anestesiado com Xilazina e Ketamina.
- Figura 3 – Anti-sepsia da área dorsal com solução de iodo 5%.
- Figura 4 – Incisão de 2 cm no sentido da cabeça para o rabo com uma lâmina de bisturi nº 15.
- Figura 5 – Tubo de polietileno estéril com 1,1 mm de diâmetro interno, 1,6mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento.
- Figura 6 – Tubo de polietileno preenchida com esponja de fibrina.
- Figura 7 – Esponja sendo embebida por 0,1 ml de solução irrigadora.
- Figura 8 – Solução de FS curcumina sendo depositada no tubo de polietileno.
- Figura 9 – FS sendo ativado por LED em ambiente parcialmente escuro.
- Figura 10 – Solução irrigadora sendo colocada no tecido subcutâneo.
- Figura 11 – Divulsão do tecido subcutâneo para implantação dos tubos com as devidas soluções.
- Figura 12 – Sutura com fio de seda 4.0.
- Figura 13 – tubo de polietileno em subcutâneo de rato após período de implantação pré- determinado.
- Figura 14 – Lâmina corada com coloração HE.
- Figura 15 – Avaliação das lâminas contendo os tubos de polietileno com as soluções e a reação dos tecidos circundantes
- Figura 16 – Resultados histológicos dos G1, G2, G3, G4, G5, nos períodos 7, 15, 30, 60, 90 dias, coradas com HE 10x.

LISTA DE ABREVIATURAS

SCR	=	sistema de canais radiculares
PBM	=	preparo biomecânico
MO	=	micro-organismos
LPS	=	lipopolissacarídicos
Laser	=	light Amplification by stimulated emission of radiation
Led	=	light-emitting diode
TFD	=	terapia fotodinâmica
PDT	=	photodynamic therapy
FS	=	fotossensibilizador
GMA	=	glicol metacrilato
HS	=	hipoclorito de sódio
CLX	=	clorexidina

SUMÁRIO

1-Introdução.....	11
2- Material e Método.....	
2.1-Forma de análise.....	
3- Resultados.....	
3.1- Comparação entre os grupos.....	
4- Discussão.....	
5- Conclusões.....	
Referências.....	
Anexos.....	

1. INTRODUÇÃO

O papel do tratamento endodôntico é de fundamental importância para abolir a infecção presente em dentes que apresentam necrose pulpar. O sucesso deste tratamento depende: da eliminação eficiente da infecção no sistema de canais radiculares (SCR) e o correto selamento do canal radicular por meio da obturação (1). Portanto, nestes casos a Endodontia é realizada com intuito de promover a remissão da lesão periapical crônica e conduzir o reparo tecidual pós-tratamento (1-3).

O preparo biomecânico (PBM) do canal radicular é a etapa de limpeza e modelagem dos canais radiculares realizada para reduzir e/ou eliminar a população de micro-organismos (MO) e seus produtos tóxicos (endotoxinas e biofilme apical) presentes na infecção endodôntica (4). A utilização de substâncias irrigadoras que auxiliem na descontaminação por ação química nesta fase é essencial para potencializar a limpeza durante o PBM (4, 5).

Dentre as substâncias químicas auxiliares utilizadas, as soluções de hipoclorito de sódio, em diferentes concentrações, são as mais empregadas e mundialmente aceitas pelas suas propriedades de clarificação, dissolução de tecido orgânico, saponificação, transformação de aminas em cloraminas, desodorização e ação antimicrobiana (5-7).

Outra solução irrigadora auxiliar ao PBM é a clorexidina 2%, que, assim como o hipoclorito de sódio, pertence ao grupo dos compostos halogenados, por apresentar cloro em sua molécula (8, 9).

Embora a erradicação completa da infecção no SCR consiste em um objetivo primordial, estudos revelaram que o PBM mesmo com primorosos instrumentos e técnicas, aliados a soluções irrigadoras endodônticas como hipoclorito de sódio em altas concentrações ou clorexidina 2%, reduzem consideravelmente o número de MO presentes no interior SCR, porém são incapazes de deixar o SCR totalmente livre das bactérias e seus produtos tóxicos residuais (10, 11).

Considerando também a complexidade anatômica do SCR, certas áreas podem permanecer inacessíveis ao PBM, sendo assim, o emprego de uma

medicação intracanal com ação antimicrobiana, como o hidróxido de cálcio puro ou associado, assume um papel essencial para potencializar a eliminação dos MO ainda presentes no SCR (12-14).

No entanto, estudos (15, 16) apontam analogias nos índices de sucesso de tratamentos endodônticos realizados com medicação intracanal (duas sessões) ou sem medicação intracanal (sessão única) em dentes com lesão periapical crônica. Entretanto, a maioria destes estudos que apontaram sucesso endodôntico nos casos de sessão única, foram realizados somente por meio de observações clínicas e radiográficas.

A literatura demonstra que há MO que sobrevivem às ações da terapêutica endodôntica, como as bactérias anaeróbias Gram-negativas, que são predominantes na colonização polimicrobiana do SCR (17, 18). Estas apresentam endotoxinas, que são complexos lipopolissacarídicos (LPS) com potente ação citotóxica, que representam o principal fator de virulência dessas bactérias (19). Estudos evidenciaram que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação e infecção pulpar e periapical (20-22).

Outro fator que determina dificuldade de ação do tratamento endodôntico é a presença do biofilme apical (23, 24). O biofilme apical é um complexo aglomerado microbiano, em que as bactérias se associam e estão envolvidas por uma matriz-extracelular polissacarídica, tornando-o resistentes à ação de agentes antimicrobianos (14). Portanto, novas modalidades terapêuticas devem ser pesquisadas com intuito de combater e erradicar as infecções endodônticas.

Com o advento dos aparelhos de Laser (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*) e Led (*light-emitting diode*), surgiram novas alternativas nos tratamentos médico, odontológico, e fisioterápico (25, 26). Dentre as diferentes propriedades terapêuticas destes aparelhos, deparamos com a terapia fotodinâmica (TFD), em língua inglesa, *photodynamic therapy (PDT)*, que baseia-se em um conjunto de procedimentos físicos, químicos e biológicos, que ocorrem após administrar um agente fotossensibilizador (FS) exógeno ativado por meio de uma fonte de luz visível (Laser ou Led) de comprimento de onda específico para ativar o FS com a finalidade de promover necrose celular em um local específico (célula-alvo) para o tratamento contra câncer, doenças não oncológicas e redução microbiana (27, 28).

Estudos realizados em diversos Grupos de Pesquisa mundiais, dentre eles o Laboratório de Biofotônica do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), do Programa CEPID-FAPESP - Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC-USP), demonstram o mecanismo de ação e as propriedades básicas e aplicadas da TFD (29-32). O mecanismo básico de ação se dá quando o FS absorve os fótons da fonte de luz e seus elétrons passam a um estado mais estimulado. Na presença de um substrato como o oxigênio, o FS transfere a energia ao substrato. Ao retornar ao seu estado natural, forma espécies altamente reativas e de vida curta, como o oxigênio singleto ou também chamado de oxigênio singleto, que provoca sérios danos a célula alvo, como também, aos MO, via oxidação irreversível de componentes celulares (33-35).

Na Endodontia, o emprego da TFD foi proposta após realização do PBM e antes da obturação dos canais radiculares, como uma alternativa para aumentar a desinfecção do SCR. Estudos *in vitro* (35, 36) e *in vivo* (37, 38) demonstram que a TFD potencializa a desinfecção do canal radicular, tanto na ausência quanto na presença da medicação intracanal. Contudo, achados recentes (39, 40), em contraste com os demais estudos, demonstraram que a TFD não obteve completa desinfecção do SCR principalmente na ausência do emprego de medicação intracanal.

Recentemente, foi demonstrado, em dentes unirradiculares recém extraídos contaminados com *Enterococcus faecalis*, que a TFD eliminou cerca de 99,99% dos micro-organismos (41). Em outro estudo, foi demonstrado em dentes recém extraídos e contaminados com *Enterococcus faecalis*, que foi possível obter o efeito bactericida (redução de bactérias atingiram até 100%) sobre a superfície das paredes do canal radicular (42).

Embora haja risco de manchamento das estruturas dentais pelo FS, o azul de metileno e o azul de toluidina são comumente empregados como FS na TFD endodôntica (43). Há autores (38, 44), que recomendam novas investigações para conseguir um FS que não manche as estruturas dentais e ao mesmo tempo, aumente o potencial antimicrobiano para uso da TFD no controle e combate às infecções endodônticas, antes mesmo que seja preconizado o uso clínico na Endodontia.

A curcumina é um composto de cor amarela, extraída do rizoma da planta *Curcuma longa L* (açafrão) que está sendo pesquisado como FS na TFD contra o câncer (45, 46). A curcumina possui efeitos: antimicrobianos (47, 48), anti-inflamatórios (49), imunomoduladores (46), que são potencializados na presença de uma luz (Laser ou Led) de comprimento de onda específico ativá-la.

Recentemente, realizamos um estudo in vitro sobre o emprego da curcumina como FS na Endodontia em relação ao seu potencial de alterar ou não a cor da dentina radicular. Concluímos que as estruturas dentais radiculares podem sofrer manchamento em função do tipo e também da concentração do FS utilizado. A curcumina foi o FS que apresentou menor índice de manchamento, sem comprometer a cor da estrutura dental, quando comparado ao azul de metileno (50).

Existem questionamentos que precisam ser bem esclarecidos e necessitam no presente momento de respostas com evidências científicas para o emprego das soluções irrigadoras quando associadas à TFD na terapia endodôntica. Embora já exista protocolos clínicos sendo preconizados, os benefícios da TFD na Endodontia ainda não foram bem estabelecidos cientificamente, principalmente quando utilizada no tratamento endodôntico de sessão única.

Assim, a ideia de analisar a influência das diferentes soluções irrigadoras à TFD tornou este estudo oportuno, a fim de constituir melhores embasamentos científicos do assunto pertinente.

2. MATERIAL E MÉTODO

Este projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Processo: 00682-2012 (Anexo I).

Cinquenta ratos albinos machos (Wistar), entre 4 e 6 meses de idade, pesando entre 250 e 280 g foram distribuídos em 5 grupos (Fig. 01).



Fig. 01 – Rato albino macho (Wistar) pesando 279 g.

Os animais foram provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP e foram mantidos em gaiolas coletivas, num ambiente com temperatura controlada, e receberam ração e água ad libitum antes e após os experimentos.

No interior das gaiolas havia cama de serragem (maravalha), que foi trocada três vezes por semana, antes, porém das trocas, as gaiolas foram limpas. Quando foram realizados os experimentos, foi feita a anestesia com Xilazina (10 mg/kg) e Ketamina (25 mg/kg) (Fig. 02) e depois foi realizada a tricotomia da região dorsal e anti-sepsia da área com solução de iodo 5%. Foi feita uma incisão de 2 cm no sentido da cabeça para o rabo com uma lâmina de bisturi nº 15 (Fig. 03 e Fig. 04).



Fig.02 – Rato sendo anestesiado com Xilazina e Ketamina.

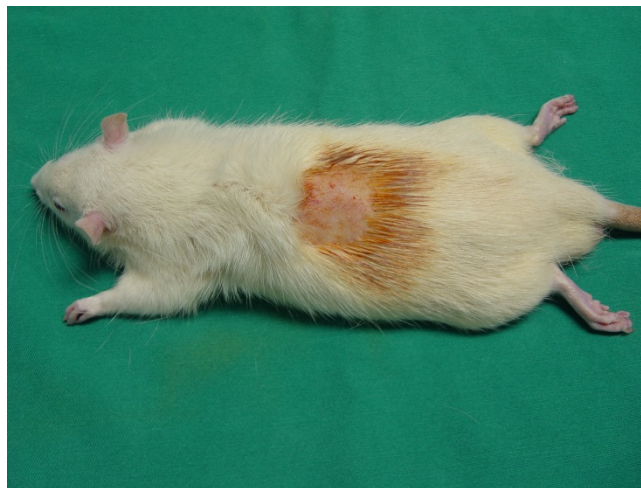


Fig. 03 - Anti-sepsia da área dorsal com solução de iodo 5%.



Fig. 04 - Incisão de 2 cm no sentido da cabeça para o rabo com uma lâmina de bisturi nº 15.

Foram inseridas esponjas de fibrina, nos tubos de polietileno estéreis com 1,1 mm de diâmetro interno, 1,6mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento (Fig. 05 e Fig. 06).



Fig. 05 – Tubo de polietileno estéril com 1,1 mm de diâmetro interno, 1,6mm de diâmetro externo e 10,0 mm de comprimento.

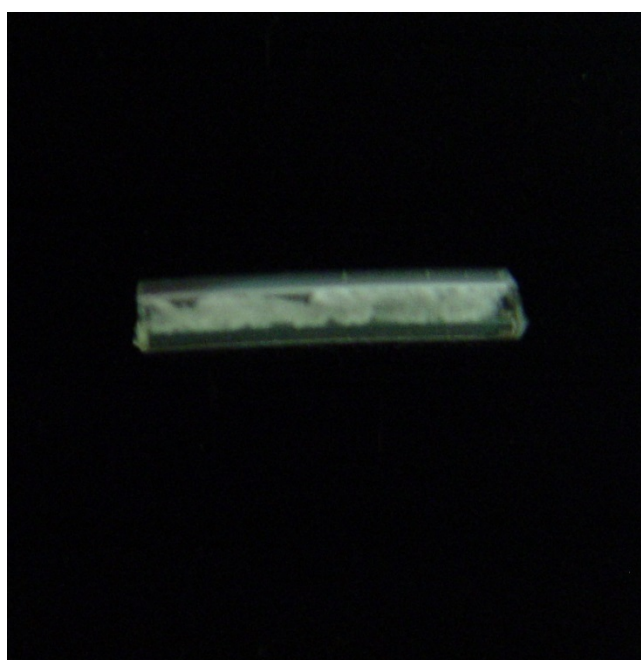


Fig. 06 – Tubo de polietileno preenchida com esponja de fibrina.

Nas esponjas foram depositadas 0,1ml de cada solução irrigadora (Fig. 07) e o FS já ativado por luz (Quadro 1).

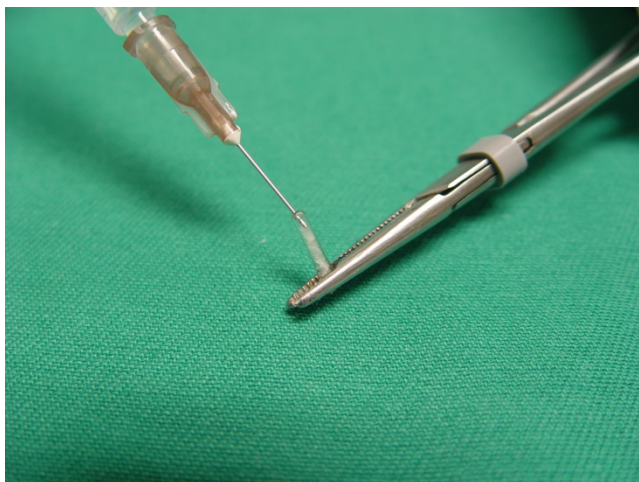


Fig. 07 – Esponja sendo embebida por 0,1 ml de solução irrigadora.

QUADRO 1 - Distribuição dos grupos, em função das soluções irrigadoras empregada e FS ativado Luz (TFD).

Grupos Experimentais	Soluções Irrigadoras
G1	Hipoclorito de sódio 2,5%
G2	Hipoclorito de sódio 5%
G3	Clorexidina 2%
G4	Cloreto de sódio 0,9% (Controle)
G5	FS Curcumina ativado Luz azul (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) foi realizada em contato direto com o tubo de polietileno do grupo experimental G5. Foi utilizado 0,1ml do FS curcumina 500 mg/L (Fig.08).



Fig. 08 – Solução de FS curcumina sendo depositada no tubo de polietileno.

O período de pré-irradiação nos tubos de polietileno foi de 5 minutos. Em seguida, o FS foi ativado por luz visível azul (LED) com comprimento de onda de 450 nm, fluência de 75 J/cm^2 , por 4 minutos, com auxílio de uma fibra óptica flexível de diâmetro de 300 μm , em ambiente parcialmente escuro para não degradar o FS (Fig. 09).

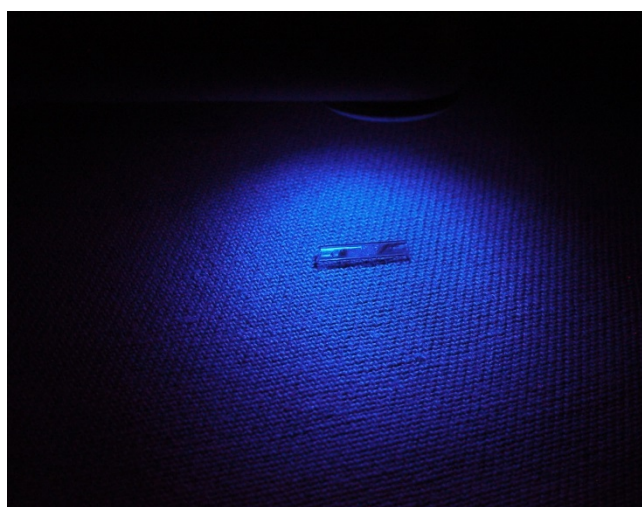


Fig. 09 – FS sendo ativado por LED em ambiente parcialmente escuro.

Ambos FS e LED de luz visível azul com fibra óptica foram provenientes do Laboratório de Biofotônica do Centro de Pesquisa em Óptica e Fotônica (CEPOF), do Programa CEPID-FAPESP - Grupo de Óptica, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC-USP).

Os tubos de polietileno foram implantados no tecido subcutâneo dos ratos em sistema de rodízio tanto para as soluções irrigadoras (Fig. 10), quanto para o FS ativado (TFD).



Fig. 10 – Solução irrigadora sendo colocada no tecido subcutâneo.

Após a incisão, o tecido foi divulsionado (Fig. 11) e realizado o implante dos tubos de polietileno contendo as soluções a serem testadas.



Fig. 11 – Divulsão do tecido subcutâneo para implantação dos tubos com as devidas soluções.

A pele do animal foi suturada com fio de seda 4.0 (Fig. 12).



Fig. 12 – Sutura com fio de seda 4.0.

Após 7, 15, 30, 60 e 90 dias do período de implantação foi realizada a eutanásia com overdose de solução anestésica e os tubos de polietileno com os tecidos circundantes foram removidos e fixados em solução formalina 10% e pH 7.0 (Fig. 13).



Fig. 13 – tubo de polietileno em subcutâneo de rato após período de implantação pré-determinado.

Os tubos de polietileno foram cortados transversalmente ao meio com auxílio de uma lâmina de bisturi. Uma das metades de cada tubo de polietileno foi processada e incluída em glicol metacrilato (GMA), que foram seccionados em cortes seriados de 3 μ m de espessura e corados HE (Fig. 14).

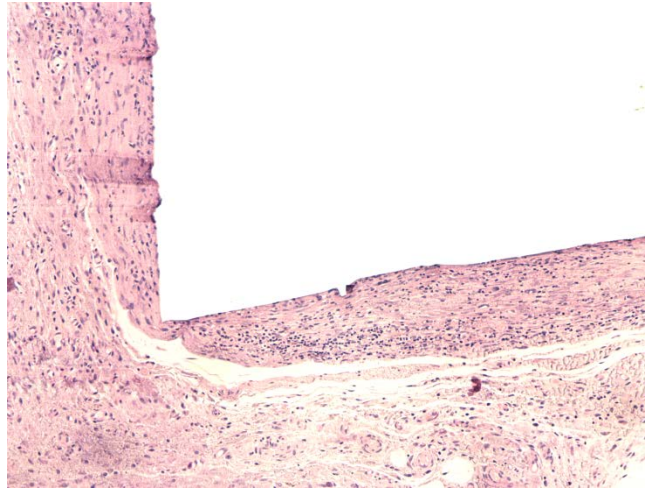


Fig. 14 – Lâmina corada com coloração HE.

As reações do tecido em contato com o material na abertura dos tubos de polietileno foram avaliadas de acordo com estudos anteriores (1, 4) (Fig. 15).

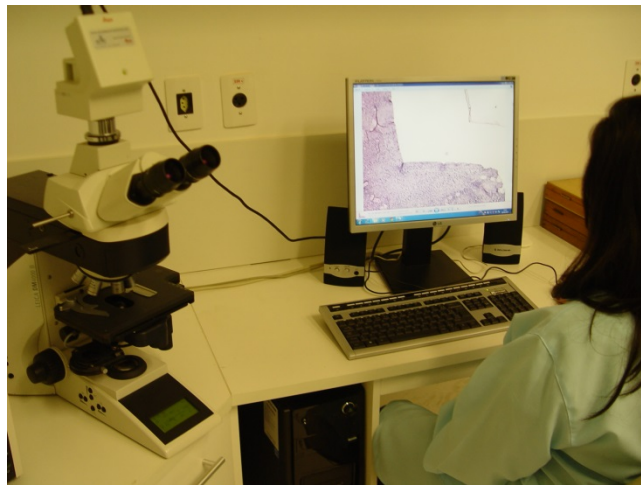


Fig. 15 – Avaliação das lâminas contendo os tubos de polietileno com as soluções e a reação dos tecidos circundantes

2.1 Forma de análise dos resultados da avaliação da resposta tecidual in vivo

Para comparar o processo de reparo tecidual em função de diferentes soluções, os resultados foram expostos de acordo com os seguintes critérios:

0 - nenhuma ou poucas células inflamatórias e nenhuma reação; 1 - menos de 25 células e reação leve; 2 - entre 25-125 células e reação moderada; 3 - 125 ou mais

células e reação severa. Cápsula fibrosa foi considerada fina quando a espessura era $<150 \mu\text{m}$ e espessa quando $> 150 \mu\text{m}$. Necrose e calcificação foram registradas como presente ou ausente. A média do número de células para cada grupo foi obtido em 10 áreas distintas. Foi empregado o teste estatístico Kruskal Wallis (1, 4).

3. RESULTADOS

Cloreto de sódio 0,9%

Ao 7 dia, presença de infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos, macrófagos e áreas focais com de polimorfonucleares e áreas escassas de necrose . Ao 15 dia, infiltrado inflamatório moderado com nítida angiogênese e presença de tecidos de granulação. Aos 30 e 60 dias, infiltrado inflamatório leve com nítida formação de tecido reacional. Ao 90 dia, ausência de inflamação, remodelamento e cicatrização da ferida com presença de cápsula fina. (Figura 16).

Hipoclorito de sódio 2,5%

Ao 7 dia, presença de infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos, macrófagos e áreas de organização de colágeno. Ao 15 dia, infiltrado inflamatório moderado com nítida angiogênese e presença de tecidos de granulação. Aos 30, 60 e 90 dias, infiltrado inflamatório leve com nítida formação de tecido reacional (Figura 16).

Hipoclorito de sódio 5%

Ao 7 dia, presença de infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos, macrófagos e áreas focais com de polimorfonucleares, sendo visualizado alguns vãos sanguíneos congestos e início de formação de cápsula. Aos 15, 30 e 60 dias, infiltrado inflamatório moderado com nítida angiogênese e presença de tecidos de granulação. Ao 90 dia, infiltrado inflamatório leve com presença de cápsula fina (Figura 16).

Clorexidina 2%

Aos 7, 15 e 30 dias, presença de infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos, plasmócitos e organização de algumas células gigantes tipo corpo estranho e áreas escassas de necrose. Ao 60 dia, infiltrado inflamatório moderado com neoformação vascular. Ao 90 dia, infiltrado inflamatório moderado com neoformação vascular e presença de cápsula grossa (Figura 16).

Terapia Fotodinâmica - TFD

Ao 7 dia, presença de infiltrado inflamatório intenso com predomínio de linfócitos, macrófagos e áreas focais com de polimorfonucleares e áreas escassas de necrose. Aos 15 e 30 dias, infiltrado inflamatório moderado com nítida angiogênese e presença de tecidos de granulação. Ao 60 dia, infiltrado inflamatório leve com nítida formação de tecido reacional. Ao 90 dia, ausência de inflamação, remodelamento e cicatrização da ferida com presença de cápsula fina (Figura 16).

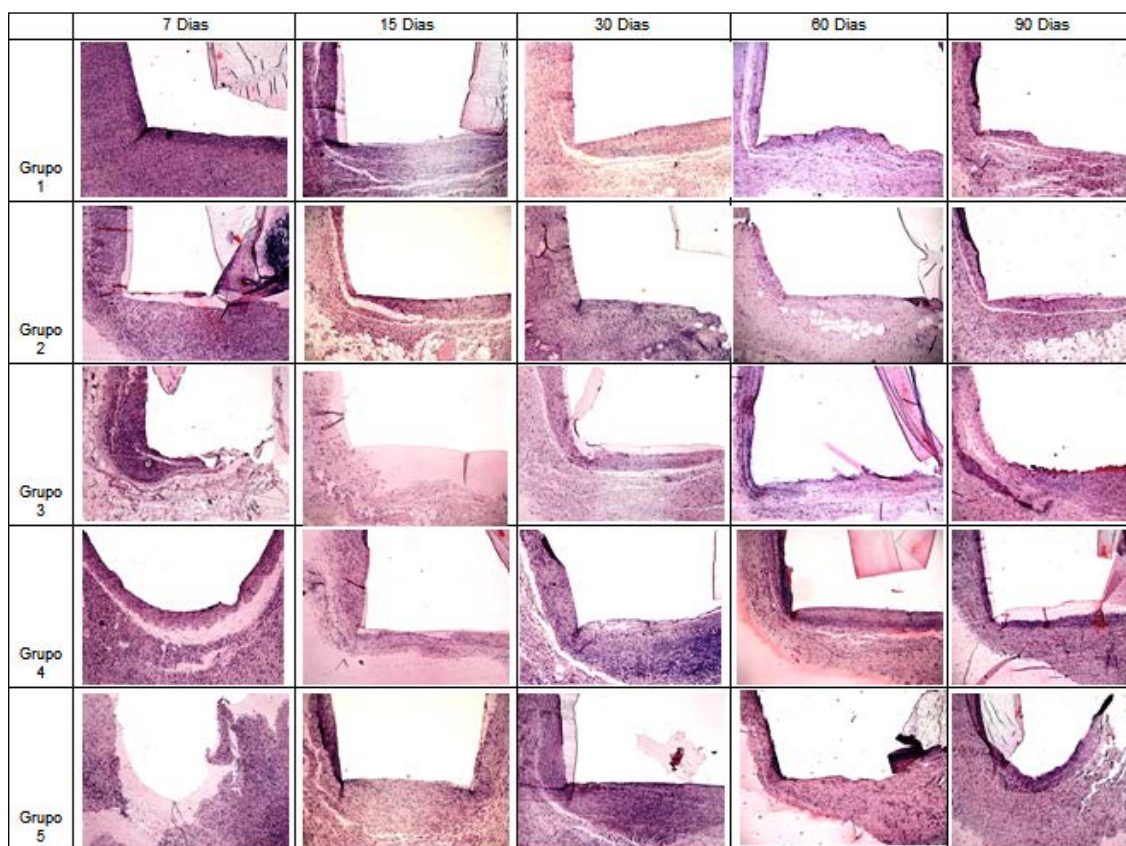


Fig. 16 - Resultados histológicos dos G1, G2, G3, G4, G5, nos períodos 7, 15, 30, 60, 90 dias, coradas com HE 10x.

3.1 Comparação entre os grupos

Os dados foram comparados em cada período experimental e estão presentes na Tabela 1.

MATERIAL	ESCORE				Calcificação	Necrose	Cápsula
	0	1	2	3			
7 dias							
Soro	0	0	0	100	Ausente	Presente	Ausente
HS 2,5%	0	0	0	100	Ausente	Presente	Espessa
HS 5%	0	0	0	100	Ausente	Presente	Espessa
Clx	0	0	0	100	Ausente	Presente	Espessa
TFD	0	0	0	100	Ausente	Presente	Espessa
15 dias							
Soro	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
HS 2,5%	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
HS 5%	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
Clx	0	0	0	100	Ausente	Ausente	Espessa
TFD	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
30 dias							
Soro	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
HS 2,5%	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Espessa
HS 5%	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
Clx	0	0	0	100	Ausente	Ausente	Espessa
TFD	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Fina
60 dias							
Soro	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
HS 2,5%	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
HS 5%	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
Clx	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
TFD	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
90 dias							
Soro	0	0	0	0	Ausente	Ausente	Fina
HS 2,5%	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
HS 5%	0	100	0	0	Ausente	Ausente	Fina
Clx	0	0	100	0	Ausente	Ausente	Espessa
TFD	0	0	0	0	Ausente	Ausente	Fina

*HS-Hipoclorito de sódio; **Clx-Clorexidina; ***TFD-Terapia fotodinâmica.

Tabela 1 - Percentagem de amostras de cada grupo caracterizadas de acordo com os escores.

4. DISCUSSÃO

A opção por testar as diferentes soluções irrigadoras utilizadas na limpeza do sistema de canais radiculares remete ao fato dessas poderem ser comparadas à

TFD quanto à resposta tecidual local. O implante de tubos de polietileno em tecido subcutâneo em ratos é uma metodologia consagrada para determinar a biocompatibilidade e os efeitos locais de substâncias (51).

O PBM, em conjunto com as soluções irrigadoras, limpa, modela o SCR e reduz o número de MO (4). A solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) é a substância mais popular e amplamente utilizada na irrigação dos canais radiculares, devido às suas propriedades como a capacidade de dissolução de matéria orgânica, neutralização de conteúdo tóxico e amplo espectro antimicrobiano (52). O efeito antimicrobiano do hipoclorito de sódio é resultado da formação de ácido hipocloroso (HClO), quando em contato com os restos orgânicos, que exerce o seu efeito por oxidação dos grupos sulfídricos nas enzimas bacterianas, levando a lise do metabolismo (4, 13).

Embora seja um agente antibacteriano eficaz, o hipoclorito de sódio é prejudicial quando extravasado fora dos canais radiculares, provocando injúrias quando em contato com os tecidos periapicais (4, 53).

Nos últimos anos, o gluconato de clorexidina, também vem sendo indicada na irrigação dos canais radiculares, como uma alternativa ao emprego do hipoclorito de sódio como solução irrigadora, porque possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, além desta apresentar efeito residual chamado de substantividade de 48 a 72h (4, 9), que favorece na descontaminação do canais radiculares infectados, como nos casos de necropulpectomias. A clorexidina se liga à membrana citoplasmática bacteriana, prejudicando o equilíbrio osmótico. Também se liga aos tecidos moles e a hidroxiapatita, modificando o campo elétrico (4, 9, 13, 53).

Devido à complexa variação anatômica do SCR, certas áreas podem ficar inacessíveis ao PBM, sendo assim, o emprego de uma medicação intracanal de hidróxido de cálcio potencializa a redução dos MO e seus produtos tóxicos no SCR (2).

Contudo, mesmo com o avanço técnico-científico da terapêutica endodôntica e de todo requinte das técnicas de tratamento endodôntico, há MO que ainda sobrevivem, sendo os principais responsáveis pela manutenção infecção endodôntica e contribuem para os insucessos (4, 5). Logo, novas estratégias

terapêuticas constantemente devem ser investigadas para emprego contra as infecções endodônticas.

A TFD, na endodontia, surge como uma modalidade terapêutica coadjuvante e inovadora ao PBM, que potencializa a desinfecção do SCR com intuito de suprimir os MO resistentes ao tratamento endodôntico (24, 42).

Mas, poucos achados foram encontrados na literatura de estudos que correlacionam as propriedades biológicas e imunológicas da associação entre às diferentes soluções irrigadoras como o hipoclorito de sódio e clorexidina, que possam ser comparados com a TFD, independente da fonte de luz ou FS utilizados.

Neste estudo, a resposta da TFD, foi semelhante aos demais grupos nos períodos de 7 e 15 dias, apresentando necrose e cápsula espessa em todos os grupos aos 7 dias. A reação severa nesse início é esperada devido ao fato de ser a fase de inflamação aguda e migração de células de defesa do organismo e deve ser diminuída com o tempo para provar a biocompatibilidade da solução testada. Com 15 dias a reação dos grupos diminuiu para moderada, com exceção do grupo com a solução de CLX, que permaneceu severa.

Com 30 dias passou a ter reação leve nos grupos cloreto de sódio 0,9% e HS 2,5%, porém as cápsulas fibrosas apresentavam espessuras diferentes: a do grupo cloreto de sódio 0,9% apresentou cápsula fibrosa fina (<150 μm) e a do grupo HS 2,5% espessa (>150 μm). Resposta inflamatória moderada foi observada nos grupos HS 5% e TDF com diferenças nas cápsulas fibrosas apresentando, respectivamente, cápsula espessa e fina. Apenas o grupo CLX apresentou reação severa com cápsula espessa o que indica certa desvantagem perante os demais.

Aos 60 dias a TDF se apresentou semelhante ao cloreto de sódio 0,9% e HS 2,5%, apresentando uma reação inflamatória leve, ausência de calcificação e necrose e cápsula fibrosa fina. Os outros dois grupos (HS 5% e CLX) apresentaram uma resposta pior onde a reação foi moderada e severa, respectivamente e presença de cápsula fibrosa espessa.

Os grupos TFD e cloreto de sódio 0,9%, aos 90 dias não apresentaram reação alguma comprovando assim sua maior biocompatibilidade perante os outros

grupos. Estes resultados do cloreto de sódio 0,9% estão de acordo com (4), que demonstrou que a solução salina promoveu uma reação favorável dos tecidos conjuntivos e pode ser considerado como material biocompatível. Já sobre a TFD não foi possível comparar pela ausência de achados na literatura.

Reação leve foi encontrada nos grupos HS 2,5% e HS 5%, ambas com cápsula fibrosa fina, observando-se assim melhoria na resposta inflamatória no grupo a 5%. O grupo CLX, apesar de ter melhorado a resposta inflamatória, apresentando uma reação moderada, manteve a cápsula espessa, mantendo-se assim, como a solução irrigadora menos biocompatível entre as testadas. Essa diferença estatística significativa das soluções de hipoclorito 5% e clorexidina 2%, que apresentaram infiltrado inflamatório intenso a moderado, quando comparadas com a TFD e com o cloreto de sódio 0,9%, no período de 30 e 60 dias, este resultado das soluções irrigadoras está de acordo com (54), que obteve repostas teciduais semelhantes.

Mas, não foi possível comparar nossos resultados diretamente da TFD com outros estudos, devido ao fato que relatos nesta linha de pesquisa serem inexistentes para a TFD, principalmente empregando o FS curcumina e Led azul.

Assim sendo, comprovamos que a TFD com curcumina e Led azul nos parâmetros empregados, não foi tão eficaz contra o *Enterococcus faecalis* quanto as outras soluções irrigadoras, mas houve expressiva redução de atividade microbiana por *Porphyromonas gingivalis*. Mostrou-se também adequada biocompatibilidade, já que os resultados obtidos foram semelhantes ao cloreto de sódio 0,9%. Logo, nos parece viável a continuidade nos estudos e aprofundar nesta linha de pesquisa promissora, a fim de obter resultados mais precisos antes de preconizar seu emprego clínico.

5. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada nos experimentos até agora finalizados, a TFD com curcumina na concentração e nos parâmetros de Led utilizados, nos permitiu concluir que:

* A TFD apresentou biocompatibilidade semelhante ao cloreto de sódio a 0,9% sem diferença estatística significativa. Mas houve diferença estatística significativa entre a TFD ao hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) e clorexidina 2%.

* A TFD parece ser uma nova modalidade terapêutica promissora e coadjuvante ao tratamento endodôntico. Entretanto, são necessários mais estudos para determinar protocolos clínicos com embasamento científicos.

REFERÊNCIAS

1. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, Pacanaro SV, Lodi CS, de Melo FF. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *J Endod* 2010;36:1698-702.
2. Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan E Jr. A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2003; 29: 121-4.
3. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Gomes AC, Faria MD, Lodi CS, Penha Oliveira SH. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
4. Gomes-Filho JE, Aurélio KG, Costa MM, Bernabé PF. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008;16:137-44.
5. Cintra LTA. Análise microscópica da influência das soluções químicas auxiliares e do uso de medicação intracanal no processo de reparo de dentes de cães portadores de lesão periapical [tese Doutorado]. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP; 2008. p.277.
6. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LA. Effect of irrigation solution and calcium hydroxide root canal dressing on the repair of apical and periapical tissues of teeth with periapical lesion. *J Endod* 2002; 28: 295-9.
7. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007; 40: 85-93.
8. Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999; 25: 167-71.
9. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J* 2013;24:89-102.
10. Iqbal M, Kurtz E, Kohli M. Incidence and factors related to flare-ups in a graduate endodontic programme. *Int Endod J* 2009;42:99-104.
11. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)₂. *J Endod* 2005;31:359-63.

12. Silva LA, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94-8.
13. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:122-30.
14. Karim IE, Kennedy J, Hussey D. The antimicrobial effects of root canal irrigation and medication. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103:560-9.
15. Wang C, Xu P, Ren L, Dong G, Ye L. Comparison of post-obturation pain experience following one-visit and two-visit root canal treatment on teeth with vital pulps: a randomized controlled trial. *Int Endod J* 2010;43:692-7.
16. Singh S, Garg A. Incidence of post-operative pain after single visit and multiple visit root canal treatment: A randomized controlled trial. *J Conserv Dent* 2012;15:323-7.
17. Figdor D, Sundqvist G. A big role for the very small-understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 2007;52(1 Suppl):S38-51.
18. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44:697-730.
19. Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections: a review. *J Calif Dent Assoc* 2011;39:152-5, 158-61.
20. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89-96.
21. Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:321-5.
22. Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti-Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733-9.

23. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2012;38(10):1376-9.
24. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007;39:59-66.
25. Berbert FL, Sivieri-Araujo G, Ramalho LT, Pereira SA, Rodrigues DB, de Araújo MS. Quantification of fibrosis and mast cells in the tissue response of endodontic sealer irradiated by low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* 2011;26:741-7.
26. Sivieri-Araujo G, Berbert FLCV, Ramalho LTO, Rastelli ANS, Crisci FS, Bonetti-Filho I, Tanomaru-Filho M. Effect of red and infrared low-level laser therapy in endodontic sealer on subcutaneous tissue. *Laser Phys* 2011; 21:1-7.
27. Solban N, Rizvi I, Hasan T. Targeted photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006;38:522-31.
28. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:293-302.
29. Vollet-Filho JD, Menezes PFC, Moriyama LT, Grecco C, Sibata C, Allison RR, Castro-E-Silva O, Bagnato VS. Possibility for a full optical determination of photodynamic therapy outcome. *J Appl Phys* 2009;105:1020381-7.
30. Ferraz RCMC, Ferreira J, Menezes PFC, Sibata CH, Castro-E-Silva O, Bagnato VS. Determination of Threshold Dose of photodynamic Therapy to Measure Superficial Necrosis. *Photomed Laser Surg* 2009;27:93-9.
31. Nicolodelli G, Angarita DP, Inada NM, Tirapelli LF, Bagnato VS. Effect of photodynamic therapy on the skin using the ultrashort laser ablation. *J Biophotonics*. 2013 Apr 11. [Epub ahead of print].
32. Giusti JS, Fontana CR, Guimarães OC, Pinchemel LC, Bagnato VS. Single equipment combines simultaneous application of mechanical ultrasound and photodynamic action for microbial control. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2010;7:137-8.

33. Allison RR, Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24-9.
34. Allison RR, Mota HC, Bagnato VS, Sibata CH. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-state of the art review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008;5:19-28.
35. 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;39:411-4.
36. Klepac-Ceraj V, Patel N, Song X, Holewa C, Patel C, Kent R, Amiji MM, Soukos NS. Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria. *Lasers Surg Med* 2011;43:600-6.
37. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblim MR, Suzuki H, Ribeiro MS. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 2010;36:1463-6.
38. Silva LA, Novaes AB Jr, Oliveira RR, et al. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012;38:360-6.
39. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:292-6.
40. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: A quest for predictability. *Aust Endod J* 2011;37:92-8.
41. Garcez AS, Fregnani ER, Rodriguez HM, Nunez SC, Sabino CP, Suzuki H, Ribeiro MS. Nunez, Caetano P. Sabino, Hideo Suzuki, Martha S. Ribeiro. The use of optical fiber in endodontic photodynamic therapy. Is it really relevant? *Lasers Med Sci* 2013;28:79-85.
42. Cheng X, Guan S, Lu H, Zhao C, Chen X, Li N, Bai Q, Tian Y, Yu Q. Evaluation of the 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;44:824-31.

43. Sivieri-Araujo G, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Endodontia (TFDA). Estado Atual e Perspectivas. In: Vanderlei Salvador Bagnato. Controle Microbiológico com Ação Fotodinâmica. São Carlos: Compacta Gráfica e Editora; 2011. p.89-104.
44. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, Ruggiero K, Song X, Pagonis TC, Tanner AC, Kent R, Doukas AG, Stashenko PP, Soukos NS. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34:728-34.
45. Ferrari E, Pignedoli F, Imbriano C, Marverti G, Basile V, Venturi E, Saladini M. Newly Synthesized Curcumin Derivatives: Crosstalk between Chemico-physical Properties and Biological Activity. *J Med Chem* 2011;54:8066-77.
46. Norris L, Karmokar A, Howells L, Steward WP, Gescher A, Brown K. The role of cancer stem cells in the anti-carcinogenicity of curcumin. *Mol Nutr Food Res* 2013 Jul 31. [Epub ahead of print].
47. Chang YF, Chuang HY, Hsu CH, Liu RS, Gambhir SS, Hwang JJ. Immunomodulation of Curcumin on Adoptive Therapy with T Cell Functional Imaging in Mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2011 Dec 1. [Epub ahead of print].
48. Haukvik T, Bruzell E, Kristensen S, Tønnesen HH. Photokilling of bacteria by curcumin in different aqueous preparations. *Studies on curcumin and curcuminoids XXXVII. Pharmazie* 2009;64:666-73.
49. Sun J, Zhao Y, Hu J. Curcumin Inhibits Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Inflammation by Inhibiting IL-1beta and IL-6 Production in Mice. *PLoS One* 2013 Jun 25. [Epub ahead of print].
50. Sivieri-Araujo G, Rastelli ANS, Jacomassi DP, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Kurachi C, Bagnato VS. Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) em Endodontia: avaliação da capacidade de manchamento da dentina radicular. Estudo piloto. *Braz Oral Res* 2011; 25:28-28.
51. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod* 2012;38:91-4.
52. Guerreiro-Tanomaru JM, Morgental RD, Flumignan DL, Gasparini F, Oliveira JE, Tanomaru-Filho M. Evaluation of pH, available chlorine content, and antibacterial activity of endodontic irrigants and their combinations against

Enterococcus faecalis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2011;112:132-5.

53. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing Enterococcus faecalis within root canal and dentinal tubules. Int Endod J 2006;39:10-7.
54. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Philips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigant. J Endod 1995;21:513-5.

ANEXOS

Anexo I


Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à terapia fotodinâmica: estudo em ratos" sob responsabilidade do Pesquisador **JOÃO EDUARDO GOMES FILHO** e colaboração de Gustavo Sivieri de Araujo, Ludmila Santos, Simone Watanabe e Paulo Carvalho Tobias Duarte está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00682-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Influence of diferente irrigating solutions associated to photodynamic therapy: study in rats", process number 00682-2012, under responsibility of **EDUARDO GOMES FILHO** and with collaboration of Gustavo Sivieri de Araujo, Ludmila Santos, Simone Watanabe and Paulo Carvalho Tobias Duarte agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.


Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho
CEUA - Coordenador

Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista - Departamento de Odontologia, Cirurgia e
Reprodução Animal - Rua Dr. Nereu Ramos, 740 - CEP: 13506-900, Aracatuba - SP
Tel: (13) 3626-1444 Fax: (13) 3626-1401 E-mail: fco@fco.unesp.br