



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba

NAYARA KÍVILLA DO CARMO MAIA

**Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à
Terapia Fotodinâmica: estudo in vitro da citotoxicidade em
fibroblastos L-929**

Araçatuba – SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba

NAYARA KÍVILLA DO CARMO MAIA

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

Aos meus pais, Miguel e Lucélia que tanto me apoiaram e fizeram o possível para que o meu sonho fosse realizado. Obrigada por tudo! Vocês são meu espelho. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa da diretora da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e do vice-diretor Prof. Tit. Wilson Roberto Poi.

À Deus, primeiramente, pela graça, misericórdia e todo suporte necessário durante esses anos, sem os quais eu nada seria e conseguiria.

Ao Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, pela atenção, apoio e carinho durante o processo de orientação.

Ao Prof. Ass. Dr. Gustavo Sivieri de Araújo, pela atenção, paciência, apoio e total presença durante a realização desse trabalho.

À Dr. Ludmilla Mota da Silva Santos, pela ajuda na realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa. Processo: 2012/12695-0.

À todo Departamento de Ciências Básicas, disciplina de Farmacologia, pelo uso do laboratório, sem o qual não seria possível a realização desse projeto. Também pela ajuda, ensino e paciência.

Aos amigos, Renan Dal Fabbro e Fernanda Esteves pelo companheirismo e ajuda durante esses anos de convivência no estágio de Iniciação Científica.

Aos meus pais, irmã e amigos (Alda e toda célula), pelas orações constantes, sem as quais eu não conseguiria continuar.

A Júnior Calhiari, por todo amor, carinho, força e apoio nos momentos em que eu precisei.

Porém, como dizem as Escrituras Sagradas: “O que ninguém nunca viu nem ouviu, e o que jamais alguém pensou que poderia acontecer, foi isso o que Deus preparou para aqueles que o amam.”

1 Coríntios 2:9

MAIA, NKC. **Influência de diferentes soluções irrigadoras associadas à Terapia Fotodinâmica: estudo in vitro da citotoxicidade em fibroblastos L-929**. 2013. 25f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Introdução: 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 micro-organismos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade in vitro da TFD em comparação com as soluções irrigadoras. **Material e Métodos:** Foram utilizadas células de linhagem de fibroblastos de camundongos L-929. As culturas foram mantidas sob condições padrão de cultivo celular (37^o C com 5% de CO₂). As soluções foram distribuídas nos seguintes grupos: G1-Hipoclorito de sódio 5%; G2-Hipoclorito de sódio 2,5%; G3-Clorexidina 2%; G4-Cloreto de sódio 0,9%; G5-TFD (FS curcumina ativado por luz azul); G6-Meio de cultura. As soluções foram testadas por 6h, 24h e 48h. Seis poços foram utilizados para cada material. A análise dos resultados da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico MTT. A solução foi adicionada em cada poço contendo os fibroblastos os quais permaneceram incubados por 4h a 37°C em 5% de CO₂. Álcool isopropílico foi adicionado às células, para dissolver os cristais de formazan. A solução foi levada ao espectrofotômetro com comprimento de onda 570 nm para a leitura da absorbância. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA com correção de BonFerroni (p<0,05). **Resultados e Conclusão:** A TFD não foi citotóxica e obteve viabilidade de fibroblastos L-929 semelhante ao cloreto de sódio 0,9%, mas demonstrou resultados distintos das soluções de hipoclorito de sódio 5%, 2,5% e clorexidina 2%.

Palavras-chave: Tratamento do canal radicular, solução irrigadora, terapia fotodinâmica, citotoxicidade.

MAIA, NKC. Cytotoxicity of photodynamic therapy and irrigating solutions. 2013. 25f. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Introduction: The photodynamic therapy (PDT) is an aggregate of physics, chemical and biological procedures, that activate the photosensitizer (PS) with light (Laser or Led) to destroy the target cells. The aim of this study was to evaluate in vitro cytotoxicity of PDT, comparing it to different irrigating solutions. **Methods:** Mouse fibroblasts L-929 were used, held on standard conditions of culture cells (37°C with 5% of CO₂) which were distributed on: G1-sodium hypochlorite 5%; G2-sodium hypochlorite 2,5%; G3-chlorhexidine 2%; G4-sodium chloride 0,9%; G5-PDT; G6-culture medium (Control). PDT was realized with PS curcumin 500 mg/L and Led wavelength (λ) 480 nm for 4 minutes. Were diluted in culture medium DMEM (1x10⁴ cells), 0,001ml of the solutions to be tested for 6h, 24h and 48h. Three wells were used for each solution containing the fibroblasts which remained incubated for 3h. Cell viability was obtained by colorimetric method MTT. The absorbance was realized with espectrophotometer of λ 570 nm. The results were analysed by ANOVA test with correction of BonFerroni ($p < 0,05$). **Results:** PDT and sodium chloride 0,9% presented light cytotoxic effect no significant difference statistics compared to the control. There was a significant difference statistics of PDT compared to sodium hypochlorite 5%, 2,5% and chlorhexidine 2% in the period of 6h, 24h and 48h. **Conclusions:** PDT with curcumin in the concentration used was not cytotoxic unlike the solutions of sodium hypochlorite 5%, 2,5% and chlorhexidine 2%.

KEYWORDS: Endodontic treatment, root canal irrigants, photodynamic therapy, cell culture, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Meio de Cultura	13
Figura 2 – Condições padrão de cultivo celular	14
Figura 3 – Álcool isopropílico adicionado às células	15

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos grupos, em função da solução empregada	14
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 6h	16
Gráfico 2 - Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 24h	17
Gráfico 3: Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 48h	17

LISTA DE ABREVIATURAS

FS= fotossensibilizador

MO= micro-organismos

PBM= preparo biomecânico

SCR= sistema de canais radiculares

TFD= terapia fotodinâmica

SUMÁRIO

1- Introdução	12
2- Material e Método	13
2.1- Cultura de Fibroblastos	13
2.2-Soluções irrigadoras e divisão de grupos	14
2.3-Teste de Citotoxicidade	15
2.4- Forma de análise dos resultados da citotoxicidade in vitro	16
3- Resultados	16
4- Discussão	18
5- Conclusão	20
Referências	

1) INTRODUÇÃO

O tratamento endodôntico é primordial para suprimir a infecção no sistema de canais radiculares (SCR) ¹ e promover o reparo tecidual pós-tratamento ². Entretanto, a manutenção das infecções endodônticas, podem ocorrer pela persistência dos micro-organismos (MO) e seus subprodutos tóxicos, como as endotoxinas ³ e o biofilme apical ^{3, 4}. Além disso, frequentemente são encontrados em dentes com insucesso endodôntico a presença do *Enterococcus faecalis*, que são resistentes à terapia endodôntica ^{1, 5}. Outros fatores como a complexidade anatômica do SCR ⁶, falhas durante a execução do tratamento endodôntico ⁷, infiltração coronária ⁸ e infiltração apical ⁹, podem contribuir para os insucessos endodônticos.

Nos últimos anos, aconteceram avanços na Endodontia, principalmente no que refere ao preparo biomecânico (PBM) do SCR ¹⁰. O PBM realizado com soluções irrigadoras de hipoclorito de sódio ou clorexidina ¹¹ e emprego da medicação intracanal de hidróxido de cálcio reduzem o número de MO e seus produtos tóxicos ¹². Entretanto, apesar dos progressos técnico-científicos, autores demonstraram a persistência de MO no SCR pós-tratamento ³⁻⁵. Portanto, novas estratégias terapêuticas precisam ser investigadas para potencializar o combate das infecções endodônticas.

Recentemente novos métodos como a terapia fotodinâmica (TFD), são empregados nos tratamentos para promover a desinfecção em doenças periodontais, cáries dentais dentre outras especialidades da Odontologia ¹³⁻¹⁵. A TFD, utiliza luz de comprimento de onda (λ) específico que pode ser Laser ou Led para ativar o fotossensibilizador (FS) e produzir uma espécie altamente reativa de oxigênio (oxigênio singleto), que destrói a célula-alvo ¹⁶⁻¹⁸ e auxilia na ação antimicrobiana sem o risco de promover resistência microbiana ^{19, 20}.

Estudos *in vitro* ^{11, 18, 21} e *in vivo* ^{22, 23}, demonstraram a TFD como uma nova modalidade terapêutica antimicrobiana e coadjuvante ao tratamento endodôntico, para aumentar a desinfecção do SCR. Estudos demonstraram que a TFD contra *Enterococcus faecalis*, o FS fixa na membrana celular e atinge picos de absorção e conduz à geração de oxigênio singleto que destrói a parede celular e leva a morte bacteriana ^{18, 24}.

Porém, estudos sobre a citotoxicidade da TFD na Endodontia são escassos, além do que, evidências científicas que comparem a citotoxicidade da TFD com as soluções irrigadoras são inexistentes, portanto, a literatura carece de respostas. Considerando o emprego atual da TFD, novos estudos são necessários para elucidar a citotoxicidade da TFD na Endodontia. O objetivo deste estudo foi determinar a citotoxicidade da TFD em cultura celular de fibroblastos L-929 comparando-a às diferentes soluções irrigadoras.

2) MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte de um outro projeto de pesquisa maior, que foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, Processo: 00682-2012.

2.1) Culturas de Fibroblastos

Foram utilizadas células de linhagem de fibroblastos de camundongos L-929, os fibroblastos foram mantidos em garrafas de cultura com meio Dulbecco's modificado (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino, 100 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de streptomicina, 300 ng/ml anfotericina B e 200 mM de glutamina (Figura 1). As culturas foram mantidas sob condições padrão de cultivo celular (37° C, 100% de umidade, 5% de CO₂) (Figura 2).

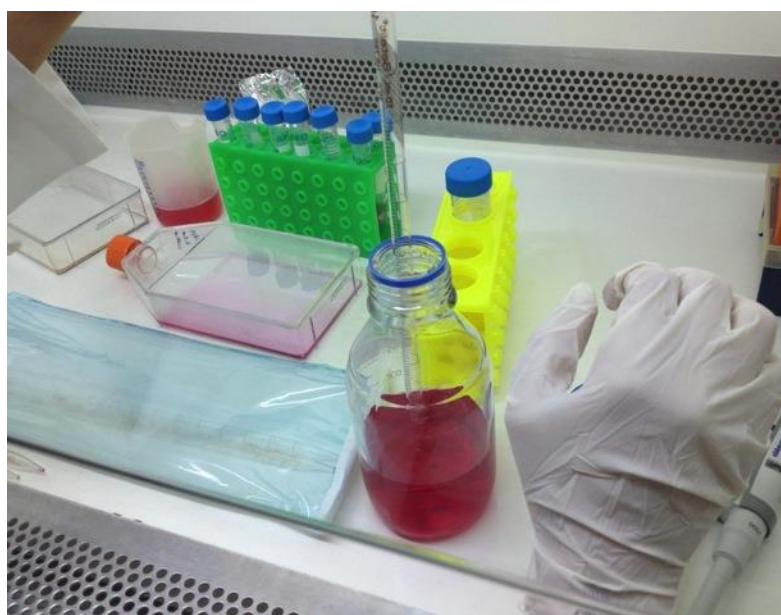


Figura 1 - Meio de Cultura

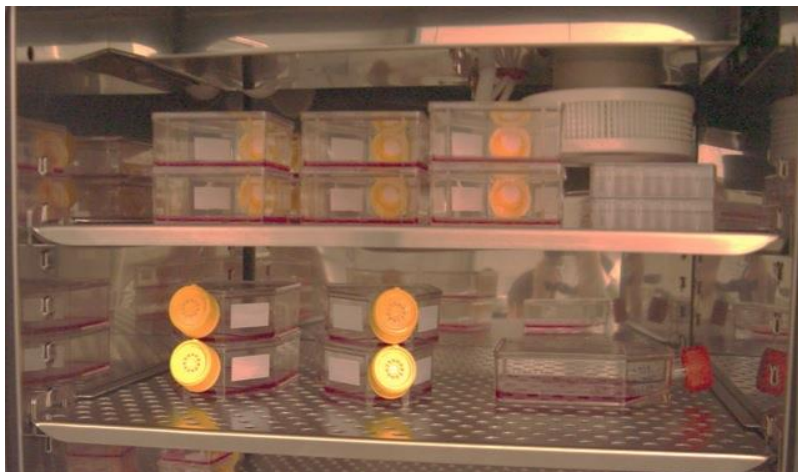


Figura 2 - Condições padrão de cultivo

2.2) Soluções irrigadoras e divisão em grupos

Foi empregado em cada poço 450 μ l de meio de cultura DMEM, acrescidos 50 μ l de cada solução a ser testada. Inicialmente todas as soluções a serem testadas, encontravam-se em uma concentração superior de 20 vezes do pretendido, para que no momento da diluição com o meio de cultura DMEM, estas realmente pudessem estar na concentração desejada e obter um volume total de 500 μ l (meio de cultura DMEM mais cada solução a ser analisada), de acordo com Malheiros et al.³⁴. As soluções foram utilizadas de acordo com o Quadro 1. A TFD foi executada seguindo o mesmo protocolo citado no item 2.1.

QUADRO 1 - Distribuição dos grupos, em função da solução empregada.

Grupos Experimentais	Soluções
G1	Hipoclorito de sódio 5%
G2	Hipoclorito de sódio 2,5%
G3	Clorexidina 2%
G4	Cloreto de sódio 0,9%
G5	FS Curcumina com Luz Led (TFD)
G6	Meio de Cultura

2.3) Teste de citotoxicidade

Para o teste de citotoxicidade, os fibroblastos foram distribuídos em placas de 24 poços e foram diluídos em meio de cultura DMEM (1×10^4 células/poço). Após o período de incubação de 24h, os fibroblastos em confluência foram utilizados nos ensaios. As culturas foram mantidas a 37°C , 100% de umidade, 5% de CO_2 . As soluções foram testadas por 6h, 24h e 48h. Três poços foram utilizados para cada solução contendo os fibroblastos que permaneceram incubados por 3h.

A análise da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.). 5mg da solução MTT foi diluída em 1mL de PBS (2,5-difenil brometo de tetrazolium) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) filtrados com filtro Millipore $0,22 \mu\text{m}$ estéril ^{25, 27}.

A solução foi adicionada em cada poço (40 μL de MTT por 360 μL de meio de cultura), contendo os fibroblastos pós-estímulo os quais permaneceram incubados por 3h a 37°C em 5% de CO_2 . Posteriormente, a solução de MTT foi retirada dos poços e descartada ^{25, 27}.

Álcool isopropílico (200 μL) foi adicionado às células, e foram deixadas em mesa agitadora à temperatura ambiente por 20 minutos para dissolver os cristais azuis (cristais de formazan). A solução azul foi transferida para uma placa de 96 poços (Figura 3).

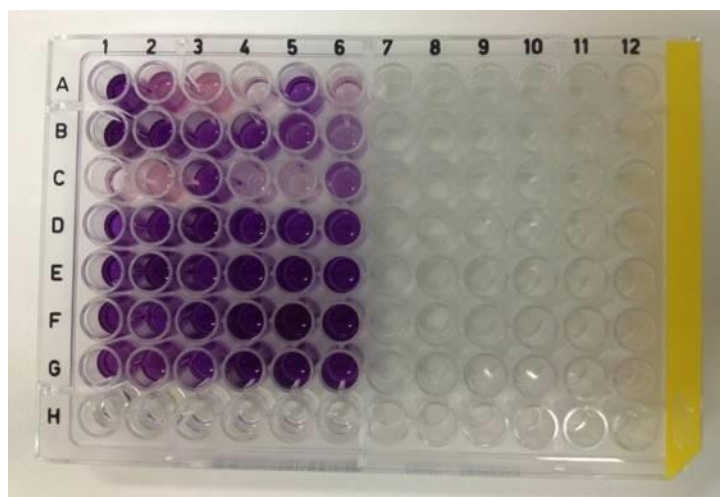


Figura 3 - Álcool isopropílico adicionado às células

2.4) Forma de análise dos resultados da citotoxicidade in vitro

A análise dos resultados da viabilidade das células estimuladas foi feita por espectrofotometria. Foi empregado o espectrofotômetro com λ 570 nm para a leitura da absorbância. Os resultados Foram analisados estatisticamente por meio do teste ANOVA com correção de BonFerroni ($p < 0,05$).

3) RESULTADOS

Os resultados do teste MTT nos períodos 6h, 24h e 48h revelaram que o G4 (cloreto de sódio) e G5 (TFD) apresentaram efeito citotóxico leve, mas sem diferença estatística significativa quando comparados ao G6 (controle). Entretanto, houve diferença estatística significativa da TFD comparada com ao G1 (hipoclorito de sódio 5%), G2 (hipoclorito de sódio 2,5%) e G3 (clorexidina 2%) (Gráficos. 1, 2, 3).

Período de 6h

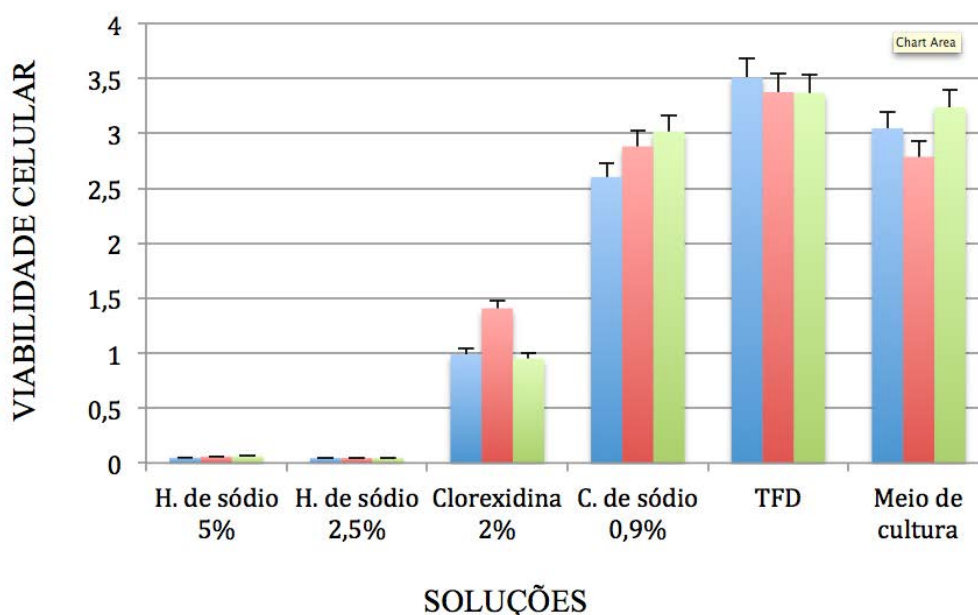


Gráfico 1: Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 6h.

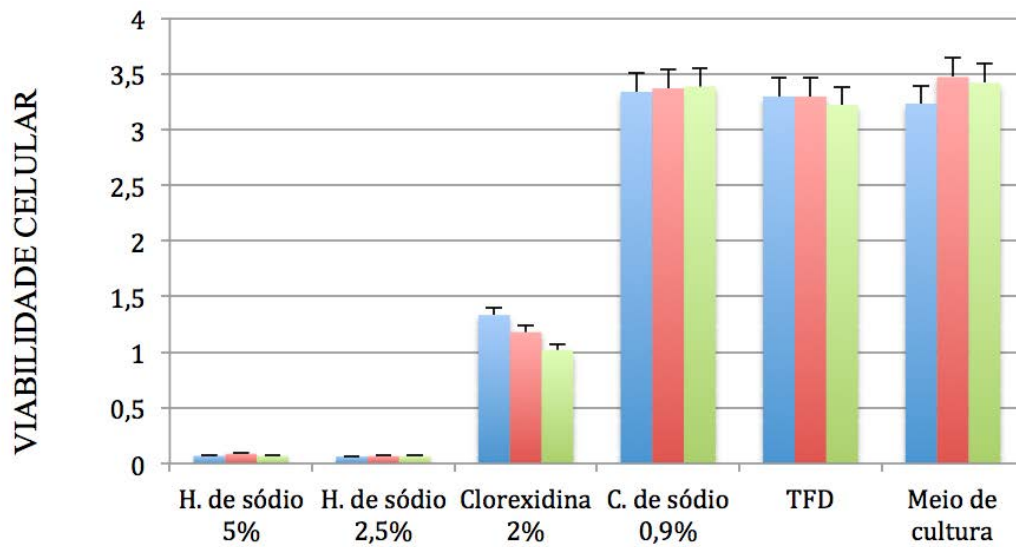
Período de 24h**SOLUÇÕES**

Gráfico 2: Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 24h.

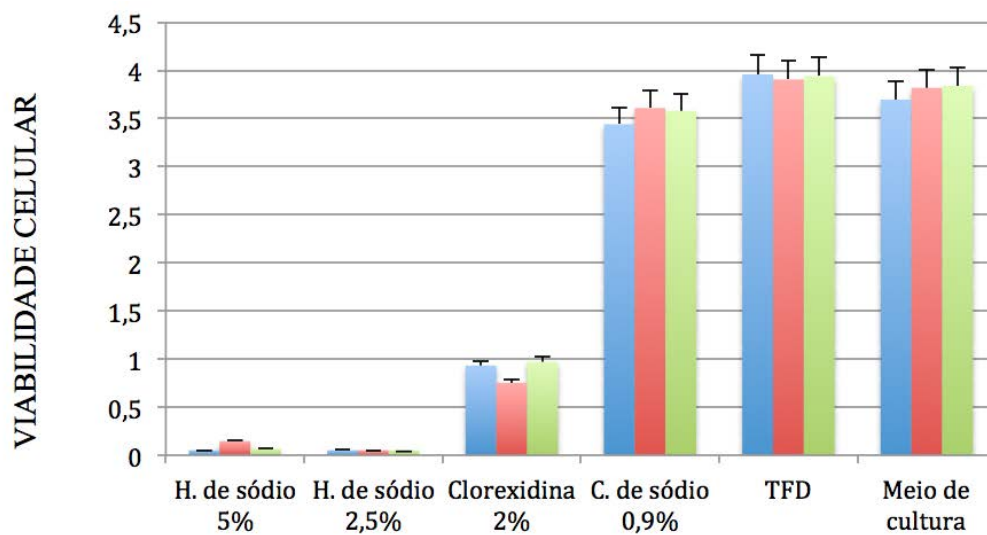
Período de 48h**SOLUÇÕES**

Gráfico 3: Viabilidade dos fibroblastos na presença da TFD e das soluções irrigadoras, no período 48h.

4) DISCUSSÃO

Estudos *in vitro* ^{11, 18, 21} e *in vivo* em cães ²³ e com pacientes ^{22, 29} demonstraram que o tratamento endodôntico combinado a TFD reduziu a população bacteriana proveniente da infecção endodôntica. Assim, os resultados apontam indícios favoráveis ao emprego coadjuvante da TFD para a Endodontia. Embora, Souza et al. ³⁰, sugerem mais evidências científicas antes que o uso clínico da TFD seja preconizado.

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 ³¹.

O gluconato de clorexidina, também vem sendo indicado na irrigação dos canais radiculares, como uma alternativa ao emprego do hipoclorito de sódio como solução irrigadora, pois possui atividade antimicrobiana de amplo espectro, além desta apresentar efeito residual chamado de substantividade de 48 a 72h ^{31, 32}, que favorece na descontaminação dos 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 ³¹⁻³³.

Neste estudo foi demonstrado pelo ensaio MTT, que o G5 (TFD com FS curcumina na concentração e parâmetros do Led azul empregados), quando comparado entre os grupos das soluções irrigadoras (G1, G2, G3) respectivamente, obteve diferença estatística significativa, sendo o G5 superior nos resultados da viabilidade celular (pouco tóxica), em todos os tempos testados (6h, 24h e 48h). Todas soluções irrigadoras foram citotóxicas, sendo a G3 (clorexidina 2%) a menos tóxica dentre as soluções irrigadoras. Não houve diferença estatística significativa entre as duas concentrações de hipoclorito de sódio (2,5% e 5%) testadas. Contudo, nossos resultados mostraram que a TFD apresentou melhor viabilidade celular quando comparado com o G6 (meio de cultura DMEM), seguido do G4 (cloreto de sódio a 0,9%), entretanto sem diferença estatística significativa entre estes 3 grupos nos tempos 6h, 24h e 48h testadas. Resultados semelhantes foram encontrados por

George & Kishen ³⁴, porém empregado o FS azul de metileno e solução de hipoclorito de sódio a 1%.

A maioria dos estudos sobre TFD na Endodontia empregaram azul de metileno como FS ^{21, 24, 35}, obtendo em estudos in vitro elevadas porcentagens de redução microbiana, 97% de *Enterococcus faecalis* planctônico ²⁴ e 98% de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* ²⁸. Entretanto, até o presente momento não foi encontrado nenhum estudo in vitro ou in vivo na Endodontia, que empregou a TFD com o FS curcumina. Um bom FS deve ter uma banda de absorção ressonante com espectro de ação de luz sobre um determinado λ de máxima absorção. Para ativar o FS azul de metileno é necessário um Laser ou Led de λ para a luz vermelha ^{16, 17}.

A curcumina é um composto de cor amarela, extraída do rizoma da planta *Curcuma longa* L (açafrão). Possui efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios e imunomoduladores, que podem ser potencializados na presença da luz azul (Laser ou Led), sendo que este FS é muito empregado no tratamento contra o câncer ³⁶. Neste estudo empregamos a concentração do FS curcumina de 500 mg/L e luz azul de λ na banda de 480 nm de acordo com Jurenka ²⁶. Embora, empregamos FS curcumina, não foi possível encontrar relatos na literatura endodôntica de estudos que pudessem ser comparados com nossos resultados, logo, este parecer ser o primeiro estudo do FS curcumina na Endodontia, portanto, nos baseamos nos parâmetros de estudos já publicados sobre o FS azul de metileno.

O período de 5 minutos de pré-irradiação do FS e de 4 minutos da irradiação da luz, concordam com os estudos de outros autores ²⁴ e ^{26, 30} respectivamente, assim como o diâmetro da fibra óptica do Led azul foi 300 μ m ²².

A análise de citotoxicidade nos permite verificar os efeitos de substâncias ou procedimentos em nível celular, além de possibilitar a avaliação do comportamento das células em ambiente controlado, sendo este método simples, rápido e preciso ^{25, 27, 37}. O presente estudo concorda com outros resultados ^{25, 27} em que o ensaio MTT foi usado, para determinar a viabilidade celular das enzimas desidrogenases mitocondriais em células vivas de fibroblastos L-929, para converter o sal de tetrazólio amarelo em cristais de azul de formazan.

Em estudo sobre a citotoxicidade da TFD na Endodontia com azul de metileno e luz vermelha de λ 664 nm ³⁴, foi demonstrado que a TFD não foi citotóxica para as células L-929, quando comparada ao hipoclorito de sódio 1%. Resultado semelhante foi encontrado em nosso estudo empregando a mesma linhagem celular L-929,

porém, empregamos o FS curcumina ativado por Led azul de λ 480 nm e solução irrigadora de hipoclorito de sódio a 2,5% e 5%.

Estudos da citotoxicidade do FS curcumina, ativados por Led azul em comparação com as soluções irrigadoras hipoclorito de sódio a 2,5% e 5% e clorexidina a 2% em linhagem celular L-929, são inexistentes na literatura. Nossos resultados sugerem que o FS curcumina na concentração e nos parâmetros de luz empregados foi pouco citotóxico. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores ³⁴, entretanto com o FS azul de metileno e luz vermelha.

De acordo com a metodologia empregada e com os resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que, a TFD com curcumina na concentração usada e Led azul nos parâmetros empregados não foi citotóxica e não inibiu a viabilidade de fibroblastos L929, demonstrando resultados distintos das soluções de hipoclorito de sódio 5%, 2,5% e clorexidina 2%.

5) CONCLUSÕES

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 não foi citotóxica e obteve viabilidade de fibroblastos L929 semelhante ao cloreto de sódio 0,9%, mas demonstrou resultados distintos das soluções de hipoclorito de sódio 5%, 2,5% 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. SUNDQVIST, G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992;18:427-30.

2. HOLLAND, R; BISCO, FERREIRA L; SOUZA, V. Reaction of the lateral periodontium of dogs' teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. J Endod 2007;33:1192-7.
3. NAIR, PN; HENRY, S; CANO, V. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99:231-52.
4. VERA, J; SIQUEIRA, JF. Jr; RICUCCI, D. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. J Endod 2012;38:1040-52.
5. RÔÇAS, IN; SIQUEIRA, JF. Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. J Clin Microbiol 2012;50:1721-4.
6. ALVES FR; ALMEIDA, BM; NEVES, MA. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. J Endod 2011;37:496-501.
7. GIVOL, N; ROSEN, E; TAICHER, S. Risk management in endodontics. J Endod 2010;36:982-4.
8. GILLEN, BM; LOONEY, SW; Gu, LS. Impact of the quality of coronal restoration versus the quality of root canal fillings on success of root canal treatment: a systematic review and meta-analysis. J Endod 2011;37:895-902.
9. ERSAHAN, S; AYDIN, C. Solubility and apical sealing characteristics of a new calcium silicate-based root canal sealer in comparison to calcium hydroxide-, methacrylate resin- and epoxy resin-based sealers. Acta Odontol Scand 2013;71:857-62.

10. LOPES, HP; ELIAS, CN; VIEIRA, MV. Fatigue Life of Reciproc and Mtwo instruments subjected to static and dynamic tests. *J Endod* 2013;39:693-6.
11. SHRESTHA, A; KISHEN, A. The effect of tissue inhibitors on the antibacterial activity of chitosan nanoparticles and photodynamic therapy. *J Endod* 2012;38:1275-8.
12. MOHAMMADI, Z; DUMMER, PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J* 2011;44:697-730.
13. THEODORO, LH; SILVA, SP; PIRES, JR. Clinical and microbiological effects of photodynamic therapy associated with nonsurgical periodontal treatment. A 6-month follow-up. *Lasers Med Sci* 2012;27:687-93.
14. ARAUJO, NC; FONTANA, CR; BAGNATO, VS. Photodynamic effects of curcumin against cariogenic pathogens. *Photomed Laser Surg* 2012;30:393-9.
15. GURSOY, H; OZCAKIR-TOMRUK, C; TANALP J. et al. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 2013;17:1113-25.
16. WILSON, BC; PATTERSON, MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 2008;53:R61-109.
17. ALLISON, RR; MOGHISSI, K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013;46:24-9.
18. 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.
19. SARDI, JC; SCORZONI, L; BERNARDI, T. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 2013;62:10-24.

20. GONZALES, FP; FELGENTRÄGER, A; BÄUMLER, W. Fungicidal photodynamic effect of a twofold positively charged porphyrin against *Candida albicans* planktonic cells and biofilms. *Future Microbiol* 2013;8:785-97.
21. Ng, R; SINGH, F; PAPAMANOU, DA. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod* 2011;37:217-22.
22. GARCEZ, AS; NUÑEZ, SC; HAMBLIN, MR. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 2008;34:138-42.
23. SILVA, LA; NOVAES, AB. Jr; OLIVEIRA, RR. Antimicrobial photodynamic therapy for the treatment of teeth with apical periodontitis: a histopathological evaluation. *J Endod* 2012;38:360-6.
24. SOUVKOS NS; CHEN, PS; MORRIS, JT. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32:979-84.
25. GOMES-FILHO, JE; GOMES, AC; WATANABE, S. Evaluation of tissue reaction, cell viability and cytokine production induced by Sealapex Plus. *J Appl Oral Sci* 2011;19:329-36.
26. JURENKA, JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev* 2009;14:141-53.
27. GOMES-FILHO, JE; WATANABE, S; GOMES, AC. Evaluation of the effects of endodontic materials on fibroblast viability and cytokine production. *J Endod* 2009;35:1577-9.
28. GARCEZ, AS; RIBEIRO, MS; TEGOS, GP. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med* 2007;39:59-66.

29. GARCEZ, AS; NUÑEZ, SC, HAMBLIM, MR. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microflora: a preliminary report. *J Endod* 2010;36:1463-6.
30. SOUZA, LC; BRITO, PR; DE OLIVEIRA, JC. 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.
31. GOMES-FILHO, JE. et al. Comparison of the biocompatibility of different root canal irrigants. *J Appl Oral Sci* 2008;16:137-44.
32. CECCHIN, D. et al. Influence of chlorhexidine and ethanol on the bond strength and durability of the adhesion of the fiber posts to root dentin using a total etching adhesive system. *J Endod*. 2011;37:1310-5.
33. HAAPASALO, M. et al. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54:291–312
34. GEORGE, S; KISHEN, A. Advanced noninvasive light-activated disinfection: assessment of cytotoxicity on fibroblast versus antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2007;33:599-602.
35. FIMPLE, JL; FONTANA, CR; FOSCHI, F. Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 2008;34:728-34.
36. ALI, S; AHMAD, A; BANERJEE, S. Gemcitabine sensitivity can be induced in pancreatic cancer cells through modulation of miR-200 and miR-21 expression by curcumin or its analogue CDF. *Cancer Res* 2010;70:3606-17.
37. MALHEIROS, CF; MARQUES, MM; GAVINI, G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod* 2005;31:746-8.

38. TANAKA, M; KINOSHITA, M; YOSHIHARA, Y. Optimal photosensitizers for photodynamic therapy of infections should kill bacteria but spare neutrophils. *Photochem Photobiol* 2012;88:227-32.