

**UNIVERSIDADE DE UBERABA - UNUIBE  
PROPEPE – PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

**UBERABA-MG  
2014**

**FERNANDO FACHINELLI RODRIGUES**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATOS WISTAR  
SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Odontologia da área de concentração de Biopatologia da Universidade de Uberaba - UNIUBE, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino.

**UBERABA-MG  
2014**

**Ata da Sessão Pública de defesa de dissertação para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração em Biopatologia, a que se submeteu o aluno Fernando Fachinelli Rodrigues – matrícula 5012206, orientado pelo Prof. Tony de Paiva Paulino.**

Aos nove dias do mês de maio do ano de dois mil e quatorze, às 14h, na sala 2C02 na Universidade de Uberaba, reuniu-se a Comissão Julgadora da defesa em epígrafe indicada pelo Colegiado do Programa de Mestrado em Odontologia da Universidade de Uberaba, composta pelos Professores Doutores: Tony de Paiva Paulino - **Presidente**, Elisângela Ribeiro da Silva e Daniela de Stefani para julgar o trabalho do candidato Fernando Fachinelli Rodrigues, apresentado sob o título: "ANÁLISE HISTOLÓGICA DO REPARO ÓSSEO ALVEOLAR DE RATOS Wistar SUBMETIDOS À TERAPIA FOTODINÂMICA". O Presidente declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros da Comissão Julgadora. A seguir o candidato dissertou sobre o seu trabalho e foi arguido pela Comissão Julgadora, tendo a todos respondido às respectivas arguições. Terminada a exposição, a Comissão reuniu-se e deliberou pelo seguinte resultado:

**APROVADO**

**REPROVADO** (anexar parecer circunstanciado elaborado pela Comissão Julgadora)

Para fazer jus ao título de MESTRE EM ODONTOLOGIA, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO BIOPATOLOGIA, a versão final da dissertação, corrigida na totalidade das sugestões oferecidas documentalmente pelos membros da banca, considerada aprovada, devidamente conferida pela Secretaria do Mestrado em Odontologia, deverá ser entregue à Secretaria dentro do prazo de 30 dias, a partir da data da defesa. O aluno aprovado que não atender a esse prazo será considerado Reprovado. Após a entrega do exemplar definitivo, o resultado será homologado pela Universidade de Uberaba, conferindo título de validade nacional aos aprovados. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente declara a sessão encerrada, cujos trabalhos são objeto desta ata, lavrada por mim, que segue assinada pelos Senhores Membros da Comissão Julgadora, pelo Coordenador do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE, com ciência do aluno. Uberaba, nove dias do mês de maio de dois mil e quatorze.

Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino \_\_\_\_\_

Prof.ª Dr.ª Elisângela Ribeiro da Silva \_\_\_\_\_

Prof.ª Dr.ª Daniela de Stefani \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Cesar Penazzo Lepri \_\_\_\_\_  
Coordenador do Programa de Mestrado Acadêmico em Odontologia da UNIUBE

Flávia Michele da Silva \_\_\_\_\_  
Secretária do Programa de Mestrado em Odontologia da UNIUBE

Ciência do Aluno \_\_\_\_\_

## **APORTE FINANCEIRO**

Esta pesquisa contou com o aporte financeiro das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM - Laboratório CEFORES
- Universidade de Uberaba - UNIUBE – PROPEPE – Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão mestrado em Odontologia.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Tony de Paiva Paulino, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela contribuição, ensinamentos, paciência, e por sempre me mostrar caminhos pelos quais poderíamos trilhar sem medo.

À Coordenação geral da pós-graduação em Odontologia da Universidade de Uberaba-UNIUBE, pela disponibilidade, gentilezas e grande oportunidade.

Aos colegas do Laboratório, pela disponibilidade e contribuição em auxiliar para que este trabalho pudesse se concretizar.

À Banca examinadora pela gentileza e disponibilidade.

À minha família pelo incentivo, estímulo e apoio.

E, finalmente, agradeço a Deus, por proporcionar estes agradecimentos a todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. Deus, que a mim atribuiu alma e missões pelas quais já sabia que eu iria batalhar e vencer, agradecer é pouco. Por isso lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, é o principal, viver é o meu modo de agradecer sempre.

## RESUMO

RODRIGUES, Fernando Fachinelli. **Análise histológica do reparo ósseo alveolar de ratos Wistar submetidos Terapia Fotodinâmica.** 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Uberaba, Uberaba (MG), 2014.

O uso da Terapia Fotodinâmica na reparação alveolar após extração dental pode gerar avanços técnicos e procedimentais que irão tornar este processo mais ágil e possibilitará obter resultados clínicos, estéticos e funcionais com maior qualidade e menor comprometimento dos tecidos envolvidos. O objetivo desta pesquisa foi o de investigar a eficácia da Terapia Fotodinâmica, com a luz de LED e o fotossensibilizador protoporfirina IX, na reparação alveolar, especificamente na produção celular de mastócitos e colágeno após a extração do 2º molar em ratos da linhagem Wistar. Como percurso metodológico foram utilizados 24 ratos machos *Wistar*, que após exodontia foram divididos em dois grupos, doze no grupo experimental (1) e doze no grupo controle (2). Cada grupo foi subdividido em três partes iguais, contendo quatro ratos cada subgrupo (A, B e C). Os animais do grupo experimental foram submetidos a sessões de TFD no primeiro, quarto, sétimo, décimo quarto e vigésimo dia. O estudo histológico foi feito, após eutanásia de um rato de cada subgrupo, com a retirada da mandíbula e a extração da região alveolar. As amostras de cada dia foram comparadas ao grupo controle, que passaram pelo mesmo processo, porém sem passar pela TFD. Os resultados encontrados demonstraram aumento da quantidade de mastócitos e colágeno, no grupo experimental em relação ao controle. A produção de mastócitos no décimo quarto dia foi maior no grupo experimental, e de colágeno no vigésimo primeiro dia da aplicação da TFD. Conclui-se que a TFD, nas condições analisadas, é um importante recurso no reparo alveolar pós exodontia, e que mais estudos sobre a técnica devem ser realizados a fim de aprimorar e validar o procedimento na prática clínica.

**Palavras-Chave:** Terapia Fotodinâmica; LED; Protoporfirina IX; Exodontia; Reparo alveolar.

## ABSTRACT

RODRIGUES, Fernando Fachinelli. **Histologic analysis of alveolar bone repair in Wistar rats undergoing photodynamic therapy**. 2014. 59f. Dissertation (Masters in Dentistry) - University of Uberaba, Uberaba (MG), 2014.

The use of photodynamic therapy in alveolar repair after tooth extraction can generate technical and procedural advances that will make this process more agile and enable clinicians to obtain, functional and aesthetic results with higher quality and lower impairment of the tissues involved. The objective of this research was to investigate the efficacy of photodynamic therapy with the LED and the photosensitizer protoporphyrin IX in alveolar repair, specifically in the cellular production of collagen and mast cells after extraction of the 2nd molar in Wistar rats. As a methodological route 24 male Wistar rats, which after extraction were divided into two groups, twelve in the experimental group ( 1 ) and twelve in the control group ( 2 ) were used . Each group was subdivided into three equal parts, with four rats each subgroup ( A, B and C ) . The experimental rats were subjected to PDT sessions on the first, fourth, seventh, fourteenth and twentieth day. Histology was done after euthanizing a mouse of each group, with the removal of the mandible and the alveolar region extraction. Samples of each day were compared to the control group, who went through the same process, but without going through the TFD. The results showed increased amounts of collagen and mast cells in the experimental group compared to control. The production of mast cells in the fourteenth day was greater in the experimental group, and collagen in the twenty-first day of the application of PDT. We conclude that PDT, under the conditions studied, is an important feature in alveolar repair after tooth extraction, and that further studies of the technique should be conducted to refine and validate the procedure in clinical practice

**Keywords: Photodynamic:** Therapy LED; Protoporphyrin IX; Exodontia; Alveolar repair.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Mecanismo de indução da protoporfirina IX pelo ácido 5-aminolevulínico através da via biossintética do grupo heme (EMILIO, 2008). .....	20
<b>Figura 2</b> - Espectro de absorção da protoporfirina (EMILIO, 2008). .....	20
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática de um corte de tecido e a penetração de diferentes tipos de comprimento de onda. (EMILIO, 2008). .....	22
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibrilas (ATAYDE, 2011) .....	24
<b>Figura 5</b> - A, B e C: Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório. C e D: Pinça dente de rato e segundo molar - Fonte: Autor do estudo, 2014. ....	30
<b>Figura 6</b> - A, B e C: Sessão fotopolimerizador de resina odontológica de luz LED .	31
<b>Figura 7</b> - Quadro com as fotos das lâminas utilizadas para contabilizar a quantidade de colágenos produzidos após aplicação da TFD no grupo experimental.	37

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> – Comparação estatística da formação de colágeno após TFD entre os grupos controle e experimental .....	36
---	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Reparação do alvéolo dental no homem. ....	26
<b>Quadro 2</b> – Divisão dos ratos Wistar da pesquisa.....	29
<b>Quadro 3</b> – Procedimento de aplicação de luz no grupo experimental .....	30
<b>Quadro 4</b> - Procedimento de eutanásia no grupo experimental e controle.....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1** – Produção de mastócitos entre grupo controle e experimental após TFD.36

## LISTA DE SIGLAS

ALA- Ácido 5-aminolevulínico.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEEA- Comissão de Ética em Experimentação Animal

EGF- Crescimento Epidérmico

Cm<sup>2</sup>- Centímetros quadrados

EDTA- Ácidodiaminotetracético

FDA- Food and Drug Administration.

H<sub>2</sub>O- água

HE Hematoxilina-eosina.

LASER Light amplification by stimulated emission of radiation - Amplificação de luz por emissão estimulada de radiação

LED- Light EmitterDiode - Diodos emissores de luz

µm- Micrômetro

PpIX- Protoporfirina IX

PDT- PhotodynamicTherapy

TFD- Terapia Fotodinâmica

UNIUBE- Universidade de Uberaba.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 HIPÓTESE</b> .....	<b>16</b>
<b>3 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>17</b>
3.1 Terapia fotodinâmica (TFD).....	17
3.2 Fotossensibilizadores .....	18
3.3 Protoporfirina IX .....	19
3.4 A interação com a via biossintética do HEME.....	21
3.5 Diodo emissores de luz – LED .....	21
3.6 Histologia.....	23
3.6.1 Tecido ósseo .....	23
3.6.2 Colágeno .....	23
3.6.3 Mastócitos .....	24
3.7. Reparação ósseo alveolar .....	26
3.7.1 Reparo ósseo alveolar pós- extração dental .....	26
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
4.1 Objetivo geral .....	28
4.2 Objetivos específicos .....	28
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 Delineamento dos grupos estudados - manutenção, manejo e cuidado com os animais.....	29
5.2 O Procedimento experimental – exodontia.....	29
5.3 Terapia de luz .....	30
5.4 Eutanásia dos animais .....	31
5.5 Preparação das lâminas.....	31
5.6 Desmineralização .....	32
5.7 Processamento histológico.....	32
5.8 Análise Histológica .....	33
5.9 Quantificação de mastócitos .....	33
5.10 Determinação da porcentagem de colágeno.....	33
5.11 Análises estatísticas .....	34
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
6.1 Presença de mastócitos .....	35

6.2 Formação de colágeno.....	36
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>47</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, muitos estudos foram feitos para verificar os benefícios da Terapia Fotodinâmica (TFD) em tratamentos de saúde e na reabilitação de lesões. A TFD pode ser considerada uma forma inovadora de tratamento em algumas áreas da saúde, porém já vem sendo utilizada há décadas em tratamentos da odontologia. Com isso, pesquisas que investiguem a contribuição da TFD no reparo alveolar após extração dental, seus benefícios no combate à formação e a presença de bactérias patológicas nas lesões e a formação do biofilme na cavidade oral se fazem de grande valia na área da odontologia, e garante um sucesso maior na reparação das lesões oriundas dos procedimentos odontológicos realizados, em especial, da recuperação após extração dental.

Pizova et al., (2012), apontam a TFD como uma terapia antimicrobiana interessante, cuja aplicação de uma luz, com delimitado comprimento de onda, em uma superfície estimulada e delimitada por um fotossensibilizador, na presença do oxigênio, consegue transferir energia para a formação de espécies tóxicas de oxigênio – singlete ou radicais livres (RL) – que por serem muito reativos, danificam proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e outros componentes das microbactérias que prejudicam a recuperação e a reparação das lesões.

Segundo Halliwell e Whiteman (2004), com base em pesquisas citaram que a geração de RL, representa um processo contínuo, fisiológico e dinâmico, cumprindo funções biológicas essenciais para a manutenção da vida humana. Nesse aspecto, durante os processos metabólicos, esses radicais agem como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas, dentre elas mediadas pela ação do sistema não-enzimático.

O LED é uma fonte de luz com delimitado comprimento de onda muito utilizada na TFD. Bosquiroli et al., (2006) ressaltam que os aparelhos de LED são de custo mais baixo, não necessitam de filtros por não gerarem comprimentos de onda desnecessários, resultando em mínima geração de calor, além de terem uma vida útil muito maior que outras fontes, possibilitando maior e mais adequado uso rotineiro desta ferramenta na prática clínica.

Embora a maioria das aplicações da TFD esteja associada à luz laser, fontes de luz não laser têm sido empregadas. Além disso, estudos desenvolvidos na última década indicam claramente que o uso de luz visível isolada de um fotopolimerizador

de resina odontológica não induz nenhum dano térmico ou fotoquímico à retina. Quanto ao operador ou ao paciente, não há nenhum tipo de dano aos olhos devido à irradiação UV-A ou UV-B provenientes do próprio equipamento, pelo fato destas potências neste comprimento de onda serem baixas. Quanto ao custo dos fotopolimerizadores de resina odontológica, estes apresentam ser inferiores aos lasers disponíveis no mercado (AHMAD; ABOUMARZOUK; NABI; KATA, 2012).

Para que a TFD alcance as células-alvo, que são as células danificadas ou lesionadas é necessário a aplicação local de um agente fotossensibilizante que consiga formar espécies tóxicas de oxigênio. Neste sentido, Araújo (2010), aponta que a protoporfirina IX (PpIX) é um importante agente citotóxico na TFD, pois é uma substância fluorescente que absorve a luz, que se acumula nos tecidos, reagem com o oxigênio formando o oxigênio singleto alcançando, por fim, a morte do tecido lesionado.

Pensando na importância da boa recuperação pós-cirúrgica nos processos odontológicos, entendemos que a remodelação e a reparação dos tecidos ósseos são de fundamental importância. A respeito da reparação do tecido ósseo, Baroni (2010), aponta que pode ser que ocorram injúrias durante uma remoção cirúrgica de um elemento dentário, e desencadear eventos que podem interferir no processo de reparo ósseo. Devido a essa condição, outras estratégias têm sido desenvolvidas com o intuito de promover uma aceleração no reparo ósseo. Uma alternativa para promover essa aceleração é a TFD, que vem sendo também aplicada no tratamento de diferentes doenças, havendo um estimável esboço de evidências sobre a sua ação regenerativa e anti-inflamatória. Esses efeitos terapêuticos podem ser esclarecidos pela capacidade que a energia luminosa tem de ser envolvida pelos tecidos e instigar ou dificultar processos intracelulares.

Assim, investigar os efeitos terapêuticos da TFD nos procedimentos realizados na odontologia, em especial, na reparação e na remodelação dos tecidos após a extração dentária, torna esta pesquisa relevante e pertinente para a disseminação da técnica da forma mais positiva e segura possível.

## **2 HIPÓTESE**

A hipótese investigada nesta pesquisa é a de que existe considerável melhora e aceleração do processo de reparação alveolar pós-exodontia com o uso da TFD, mediada pela luz LED ( $\pm 440$  nm com 5 joules), possibilitada pelo fotossensibilizador protoporfirina IX.

### 3 DESENVOLVIMENTO TEÓRICO

#### 3.1 Terapia fotodinâmica (TFD)

A TFD deu seus primeiros passos no início do século XX, a partir de um acidente com a elevação da toxicidade e a morte de microrganismos cultivados em um meio de cultura contendo acridina diluída, após terem sido expostos à luz intensa. Em 1907, eles investigaram este tipo de tratamento em tumores na pele utilizando a luz branca, mas com a ajuda de um fluorescente, constatando, assim, uma forma mais assertiva para obter resultados positivos. Com o passar dos avanços realizados na área, a *Photodynamic Therapy*, do inglês (PDT), foi desenvolvida baseando-se então em uma reação fotoquímica, na qual uma luz de determinado comprimento de onda, junto ao oxigênio, ativa um fotossensibilizador que gera oxigênio reativo na área aplicada, conseguindo, assim, impedir o crescimento de microrganismos patológicos (FRANCO, 2010).

Um tipo de luz muito utilizado na TFD é o Diodo Emissor de Luz, ou seja, o LED (*Light-Emitting Diode*). Costa (2010) ressalta que o LED faz parte de uma tecnologia promissora, pois este dispositivo semicondutor é mais versátil que as lâmpadas de iluminação de fluorescência, além de possibilitar uma quantidade bem maior de horas de uso na prática clínica.

Franco (2010) aponta que esta reação fotodinâmica ocorre porque existe transferência de energia entre o feixe de luz e o fotossensibilizante depositado no alvo, que após esta exposição é destruído. Quando a reação ocorre devido à transferência de energia do fotossensibilizador a um substrato, que, ao ser reduzido, se torna oxidável, denomina-se então a reação I (oxido redução), conseguindo fazer com que o fotossensibilizador volte ao estado normal, porém com sucesso na produção de espécies reativas de oxigênio. Mas quando o fotossensibilizador em estado tripleto leva energia para o oxigênio fundamental, resultando em oxigênio singlete, este consegue ser muito oxidante e tóxico para as células-alvo, destruindo-as, chamamos então esta reação de tipo II (peroxidação). Ambas as reações destroem as proteínas, aumentam a permeabilidade da membrana e da parede celular e criam espécies reativas de oxigênio, que, por sua vez, inativam as células-alvo.

### 3.2 Fotossensibilizadores

“Os corantes são caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível. Alguns desses compostos são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas, o que os fazem ser empregados como agentes terapêuticos” (MARIA; CATÃO, 2012, p.25). Contudo, Emilio (2008) alerta que poucos são os corantes (fotossensibilizadores) utilizados na prática clínica e experimental, apesar de termos muitas substâncias denominadas como tal. Esses fotossensibilizadores se classificam quanto à sua estrutura química, e estes se agrupam em famílias como as porfirinas, clorofilas, corantes, entre outras. As de primeira geração são denominadas porfirinas, sendo as derivadas destas consideradas da segunda geração, e as modificadas com conjugados de anticorpos considerados da terceira geração.

Emilio (2008) expõe que os fotossensibilizantes são absorvidos por ambas as células, as normais e as lesionadas, porém se fixam por maior tempo nas células neoplásicas ou com proliferação intensa, devido à angiogênese, à alta permeabilidade vascular e à deficiente drenagem linfática destes tecidos. Assim as características mais desejadas neste corante para obter o sucesso da TFD ocorrem quando eles possuem baixa toxicidade, menor injúria de células saudáveis, rápida eliminação, seletividade, versatilidade, comprimento de onda determinado, baixo custo, segurança, disponibilidade comercial e poucos efeitos colaterais. Isto porque a morte celular ou a necrose pode ocorrer dependendo da localização do fotossensibilizador. Com isso, grande parte dos fotossensibilizadores utilizados na TFD não se acumula no núcleo da célula, gerando baixa probabilidade de formação de mutações no DNA.

Allison et al. (2004), reportaram que um FS apropriado para TFD deve possuir algumas particularidades específicas, dentre elas forte absorção da luz na faixa do vermelho chamada de janela terapêutica, assim como alto rendimento quântico de  $O_2$  singlete; elevada afinidade e penetração no tecido lesado. Além de apresentar simplicidade na formulação, dentre outras vantagens. Nesse aspecto, as porfirinas possuem muitas das características almejadas aos fotossensibilizadores, sendo substâncias de grande interesse para TFD.

Esta substância fotossensível pode ser uma molécula presente em células ou tecidos, mas, em particular em casos de TFD é usada uma droga ou uma pré-droga, tornando-se esta a primeira fase da terapia. Por conseguinte, num segundo momento do tratamento, a célula ou tecido lesado é exposto a uma fonte de luz visível com um comprimento de onda específico a qual é absorvida pelo agente fotossensível. Separadamente, em concentrações terapêuticas o corante ou a irradiação de luz não constam citotoxicidade (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

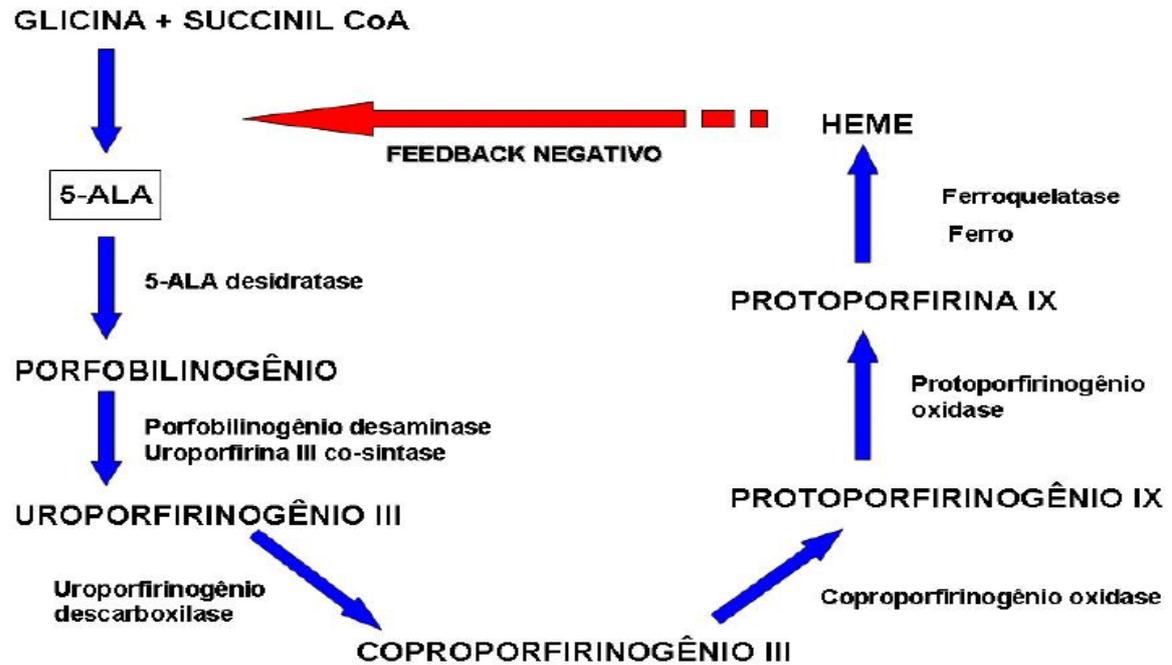
A interação destes dois agentes na presença de  $O_2$  leva à produção de diferentes espécies reativas de oxigênio (ERO's), no caso, o oxigênio singlete entre outros responsáveis por desencadear uma cascata de eventos biológicos, resultando numa possível morte celular (SOUSA et al. 2007).

### **3.3 Protoporfirina IX**

Bertolini (2009) acena que as protoporfirinas são utilizadas há muitas décadas pois fazem parte da classe dos fotossensibilizantes mais estudados e empregados na Terapia Fotodinâmica. O autor cita como características positivas e importantes da PpIX para o sucesso da TFD o fato desta substância ter boa aceitabilidade, isto porque apresenta baixa toxicidade na ausência de luz e interage pouco com outros fármacos.

Segundo Freitas (2010) a protoporfirina é um agente fotossensibilizador que surge a partir da conversão intracelular (na mitocôndria), do acumulo do componente natural ácido 5-aminolevulínico (ALA), presente em todas as células humanas, e é o intermediário envolvido na biossíntese da hemoglobina.

Baglo (et al. 2013, p.1) confirmam quando apontam que “o ALA é um precursor endógeno do potente fotossensibilizador protoporfirina IX (PpIX), que é sintetizado pela via biossintética do heme de células nucleadas”. Podemos observar este processo na figura 1 abaixo:



**Figura 1-** Mecanismo de indução da protoporfirina IX pelo ácido 5-aminolevulínico através da via biossintética do grupo heme  
**FONTE:** EMILIO, 2008.

Inicialmente, os efeitos da TFD com a aplicação da PpIX, conforme figura-2, podem ocorrer devido a um dano nas mitocôndrias, acumulando protoporfirina no local, e a inibição da fosforilação oxidativa, e por conseguinte, como descreve-se acima, a PpIX é uma molécula fotossensível e precursora do heme na sua via biossintética. (EMILIO, 2008).



**Figura 2 –** Espectro de absorção da protoporfirina  
**FONTE:** EMILIO, 2008.

### 3.4 A interação com a via biossintética do HEME

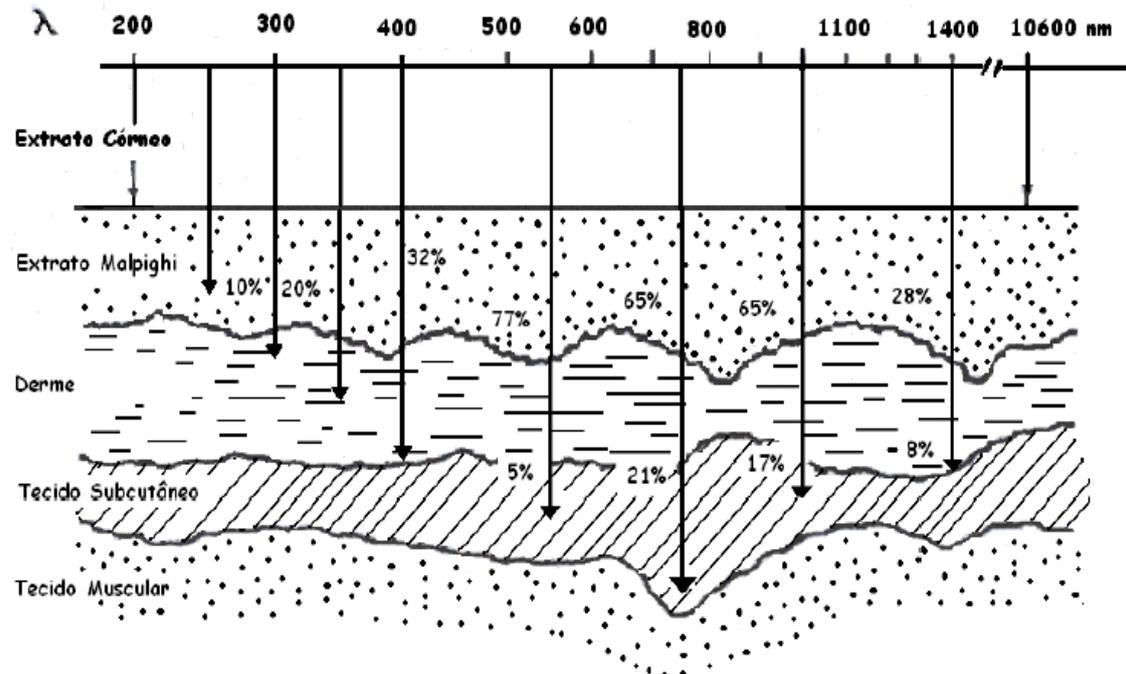
É necessário que ocorra uma quelação catalisada com ferro para que a PpIX se converta em heme, assim a existência de um quelante de ferro aumenta a quantidade de PpIX nas células nucleadas. Substâncias como EDTA, DFO e 3-hidroxy-pyridin-4-onas (CP94; 1,2-dietil-3-hidroxipiridin-4-one cloridrato) são adicionadas para aumentar a produção de protoporfirina, e estas contribuem para a biossíntese do heme. Estudos de Uehlinger e colaboradores se preocuparam em melhorar a quantidade de PpIX e para isso utilizaram de quelantes de ferro para alcançar o sucesso do experimento. O experimento por fim utilizou-se de um similar da pele humana para conseguir que o ferro e um de seus agentes de quelação para a produção de PpIX fosse gerado através do ALA (GERRTSEN, et al., 2009).

### 3.5 Diodo emissores de luz – LED

Kawczyk-Krupka et al. (2011) relata que o *Light Emitting Diode* (LED) é uma tecnologia promissora, pois possui uma luz muito versátil e econômica, que tem tamanho menor que outros aparelhos e maior vida útil.

Oliveira (2013) acrescenta que o LED vem ascendendo nas pesquisas e práticas clínicas, e que o processo alcançado pelos LED acontece pelas conexões positivas (p) e negativas (n), que recebem energia ao serem expostas a fontes de luz (eletroluminescência), e contribuem no processo de cicatrização com riscos insignificantes à pele ou à parte lesionada.

Emilio (2008) defende que apesar de alguns emissores de luz possuírem de 400 a 430nm, bandas acima de 600 nm são utilizadas na TFD por apresentarem maior rendimento quântico para reações I e II, possibilitando maior penetração no tecido irradiado, como demonstrado na figura-3 abaixo:



**Figura 3** - Representação esquemática de um corte de tecido e a penetração de diferentes tipos de comprimento de onda  
**FONTE:** EMILIO, 2008.

Emilio (2008) revela também, que a utilização deste comprimento de onda e a baixa densidade de potência proporcionam melhores resultados e menores danos a células normais. Com isso a autora defende que apesar de os *Lasers* terem sido empregados de início nas TFDs, sua perda parcial da coerência nos primeiros milímetros não garantem que essa seja a melhor fonte de luz a ser usada. Dito isso, aponta que os diodos emissores de luz (LEDs), que apresentam fontes de irradiação não coerentes, nos trazem vantagens, versatilidade e baixo custo em relação aos Lasers. Para comprovar tais afirmações, a autora nos apresenta estudos dos quais a TFD apresenta melhores resultados quando utilizam-se de LEDs e não de Lasers, pois a penetração da luz defendida alcançou um tecido maior.

Oliveira (2013) explica que os LEDs são formados por conexão - semicondutor e dois terminais, o Ânodo (A) e a Cátodo (A), que ao receberem a luz do LED são submetidos ao material que foi o semicondutor. Acrescenta ainda que o LED polarizado produz luz (ânodo positivo em relação ao cátodo), que emitida faz com que os elétrons permaneçam na zona interdita e voltem à banda de valência, quando inversamente polarizada, não emitindo mais a luz (ânodo negativo em relação ao cátodo).

## 3.6 HISTOLOGIA

### 3.6.1 Tecido ósseo

Como conhecido, o tecido ósseo é o componente principal do esqueleto e sustenta tecidos moles, protege órgãos, apóia os músculos, contribui nas funções de suporte, proteção e locomoção, além de servir para depositar, armazenar e liberar cálcio, fosfato, íons, entre outros. Com isso entende-se que seu processo de reparação torna-o frágil, delgado e hipertrófico (OLIVEIRA, 2013).

O tecido ósseo é formado por duas séries, as dos osteoblásticos (matriz óssea), e os osteoclásticos (reabsorção). Os osteoblásticos contribuem na reparação óssea e são originados pelos tecidos do perióstio e do endóstio. O tecido do perióstio encontra-se dividido em duas camadas: na mais interiorizada na qual há tecido conjuntivo vascularizado e, na segunda camada, a mais exteriorizada, ficam as células osteoprogenitoras, e para que estas duas camadas sejam fixadas, alguns feixes e fibras colágenas são utilizados. Tais células são denominadas fibras de *Sharpey*. Já o endóstio possui uma fina camada conectiva, vascularizada e composta por células hematopoiéticas e osteogênicas. Ambos tecidos citados acima conseguem participar do processo de divisão celular e, portanto, contribuem na reparação das lesões. Assim a reparação óssea é um processo no qual os osteoclastos são reabsorvidos e os osteoblastos restauram o osso (OLIVEIRA, 2013).

### 3.6.2 Colágeno

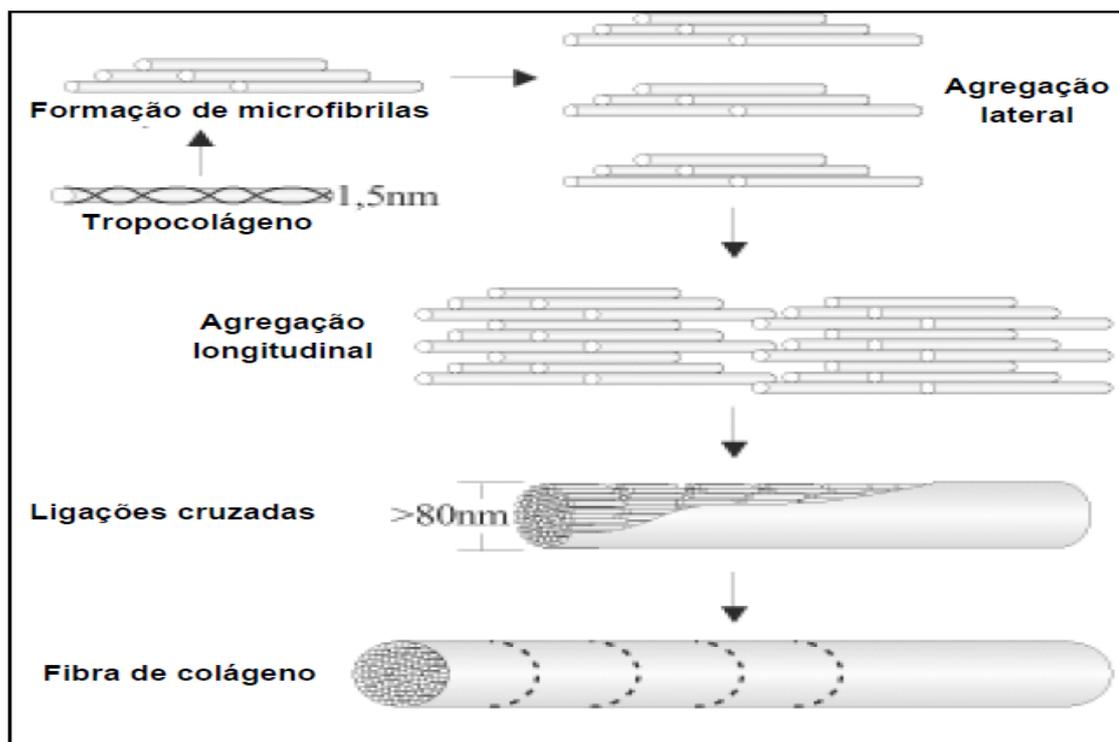
O corpo é revestido pela pele, que tem sua porção epitelial e conjuntiva (epiderme e derme), cuja função é proteção e sustentação. Esta possui várias camadas e a superficial se regenera mais fácil, apesar de ser menos vascularizada, já as camadas mais internas passam por regeneração constante que migra para as camadas mais superficiais, tornando-se queratinizadas. A pele mais superficial se descama e se renova constantemente (AZEVEDO, 2005).

Atayde (2011) nos traz que o colágeno oferece resistência e suporte dos tecidos, sendo uma glicoproteína que está presente em quase todos os tipos de tecido. O colágeno também participa nos processos de diferenciação, adesão,

migração e proliferação. As moléculas de colágeno fibrilar são formadas por três cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias  $\alpha$ , arranjadas numa conformação de tripla hélice, a qual se mantém por pontes de hidrogênio, conferindo à molécula, estabilidade, rigidez e forma de bastão. “Cada uma das cadeias de colágeno possui uma sequência de aminoácidos características, além de uma série de repetições da sequência de aminoácidos Glicina-X-Y, no qual X é frequentemente a prolina, e Y, hidroxiprolina”.

O colágeno ao passar pela biossíntese libera uma matriz extracelular, o procolágeno que, passando por processos, chega a uma molécula nativa denominada tropocolágeno tripla hélice, moléculas que durante a fibrilogênese agregam-se formando fibrilas de colágeno (ATAYDE, 2011).

Este processo é demonstrado na figura-4 abaixo:



**Figura 4** – Representação esquemática do arranjo de moléculas de tropocolágeno em estruturas fibrilares e de fibrilas

**FONTE:** EMILIO, ATAYDE, 2011

### 3.6.3 Mastócitos

Quando se fala em reparação de tecidos moles é preciso compreender que existe uma série de eventos físicos e químicos inter-relacionados. Contudo, durante este processo muitas células aumentam sua produção, como os queratinócitos, os

fibroblastos, os neutrófilos, os macrófagos, os linfócitos e os mastócitos; todos incluídos no processo de reparação. Os mastócitos podem ser observados em três destas fases, sendo elas a de ação anti-inflamatória, a angiogênese e a reparação da matriz extracelular (AZEVEDO, 2005).

Os mastócitos são células originadas de células hematopoéticas situadas na medula óssea. Estes participam da defesa imunológica e da resposta adaptativa após uma lesão, por possuir vida longa oferecem segurança imunológica por meses após a lesão (MESQUITA et al., 2010).

As reações inflamatórias podem promover permeabilidade vascular e, por conseguinte, edema; por estas razões, estudos do papel do mastócito na reparação tecidual se tornam relevantes (AZEVEDO, 2005).

Mesquita et al. (2010) acrescentam que durante o processo inflamatório a histamina, um mediador celular, busca como uma de suas fontes o mastócito, que acredita-se ser responsável pela presença de grânulos pré formados que dilatam a arteríolas e promovem um aumento da permeabilidade vascular, e assim contribuem no processo inflamatório.

Bock et al. (2008), entendem que as citocinas produzidas por uma variedade de leucócitos ou células teciduais como macrófagos e fibroblastos é resultado de estímulos, que desencadeiam a angiogênese. Estas moléculas têm efeito local em baixas concentrações, mas podem atuar a distância se forem liberadas na circulação sanguínea em concentrações suficientes.

As citocinas compreendem uma vasta família de polipeptídios que abrangem as interleucinas, quimiocinas, fatores de crescimento, fator de necrose tumoral, bem como interferons. Podem ser caracterizadas como proteínas regulatórias secretadas pelas células brancas sanguíneas e por demais células no corpo; as ações pleiotrópicas das citocinas incluem numerosos efeitos nas células como a modulação das respostas inflamatórias (HOSHIDA et al. 2006).

### **3.7 REPARAÇÃO ÓSSEO ALVEOLAR**

#### **3.7.1 Reparo ósseo alveolar pós- extração dental**

Preservar e garantir uma ótima reparação óssea alveolar após a exodontia é um desafio no campo da odontologia, e estudos que garantam o sucesso deste

procedimento e a redução de danos e traumas durante a reparação justificam pesquisas que tenham o intuito de otimizar este processo.

De maneira geral um tecido lesionado gera uma cadeia de eventos contínuos que buscam restaurar morfofisiologicamente a lesão. A fase inicial produz uma inflamação aguda que evoluem para um processo crônico. As etapas são dinâmicas e interagem entre si. Existe, portanto um “aumento da capilaridade, a formação de tecido de granulação, a proliferação de fibroblastos, a síntese de colágeno e a reepitelização são os eventos marcantes desse fenômeno” (FREDDO, 2007, p.86).

Um tecido ósseo danificado naturalmente busca se regenerar, e vários tipos de células participam deste processo reparador, o de cicatrização, inflamação e reação ao corpo estranho. Assim uma série de reações dos tecidos são desencadeados após a extração dental para acumular neste alvéolo tecido ósseo. Estas reações seguem após a extração com o intuito de reparar a fibromucosa gengival e o alvéolo dental, assim conclui-se que o processo acontece com a proliferação do tecido, a união da fibromucosa gengival e seu espaçamento (OLIVEIRA, 2013). Este processo de reparação do alvéolo dental pode ser observado na Quadro-1, abaixo:

<b>FASES FUNDAMENTAIS</b>	<b>CRONOLOGIA/dia</b>
Formação de coágulo	No mesmo dia
Evidência de proliferação tecidual ao nível gengival	4
Substituição do coágulo por tecido de granulação	7
Substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo	20
Fusão epitelial até o espessamento da fibromucosa	24-35
Preenchimento de 2\3 alveolares por trabéculas ósseas (osso imaturo)	40
Preenchimento total do alvéolo por trabéculas ósseas (osso maduro)	64

**Quadro 1** - Reparação do alvéolo dental no homem.

**Fonte:** Marzola et al. (2009 apud OLIVEIRA, 2013).

Almeida et al. (2000) realizaram estudos para investigar se existem diferenças importantes entre a reparação óssea em ratos em relação a humanos, e os resultados encontrados mostraram que a reparação óssea em ratos também acontece a partir do tecido ósseo da margem destes, e a neoformação óssea ocorre ao redor das esquirolas ósseas remanescentes. Assim os autores concluíram que existe grande similaridade no processo de reparação em ambos, podendo assim

utilizarmos de tais espécies para investigar processo que envolvam a reparação óssea em humanos.

Concluindo essa construção de pensamentos, entende-se então nesta pesquisa que os mastócitos e o colágeno são células e fibras fundamentais e participantes ativas do processo de reparação alveolar pós-extração dental, justificando e dando relevância para investigação de técnicas pós-cirúrgicas que estimulem a sua formação, a fim de que estas participem e potencializem o processo de reparação e o sucesso do tratamento odontológico.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Observar a eficácia da Terapia Fotodinâmica, utilizando a luz de LED e o fotossensibilizador protoporfirina IX, na reparação alveolar após a extração do 2º molar em ratos da linhagem Wistar.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os aspectos morfológicos do tecido epitelial no processo de reparação alveolar pós-extração dental do 2º molar em ratos da linhagem Wistar e a aplicação da TFD;
- Realizar análise histomorfológica do corte alveolar após a extração e aplicação da TDF para determinar a presença e a nova formação de colágeno;
- Quantificar e identificar a presença de mastócitos no alvéolo pós-aplicação da TFD.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento dos grupos estudados - manutenção, manejo e cuidado com os animais

Foram utilizados 24 ratos linhagem *Wistar* adultos machos, com peso médio entre 180 e 220 gramas. Os animais foram mantidos no biotério central da Universidade de Uberaba a uma temperatura controlada de aproximadamente 22° Graus, acondicionados em gaiolas plásticas e receberam alimentação sólida (Labina-Purina) e água *ad libitum*. O manuseio dos animais seguiu as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sendo o projeto de pesquisa avaliado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade de Uberaba (UNIUBE), conforme parecer 033/2012 (ANEXO 1). Os 24 ratos *Wistar* foram divididos em dois grandes grupos: 1 (um) grupo experimental, e 2 (dois) grupo controle. Em cada grade grupo houve três subdivisões, contendo cada subgrupo 4 ratos, e cada subgrupo foi denominado por uma letra (A, B, C,). Então o primeiro rato do grupo experimental foi denominado rato G1A. E essa regra seguiu em todos os ratos restantes, como demonstrado na Quadro-2, abaixo:

GRUPO EXPERIMENTAL – G1		GRUPO CONTROLE - G2	
Subgrupo A 4 Ratos	Grupo G1A	Subgrupo A 4 Ratos	Grupo G2A
Subgrupo B 4 Ratos	Grupo G1B	Subgrupo B 4 Ratos	Grupo G2B
SUBGRUPO C 4 Ratos	Grupo G1C	Subgrupo C 4 Ratos	Grupo G2C

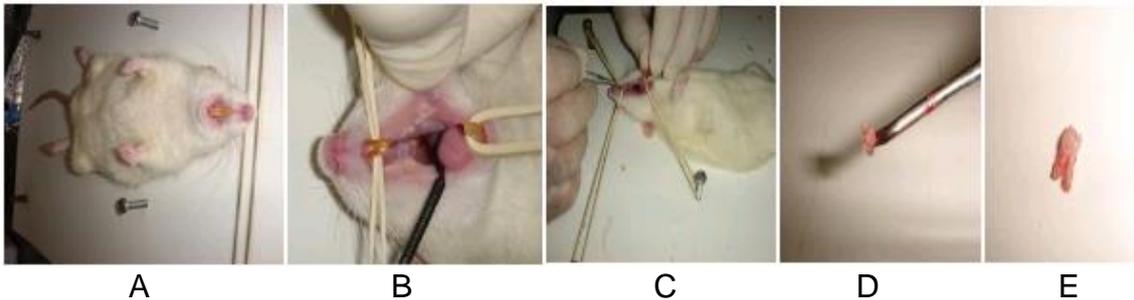
**Quadro 2** – Divisão dos ratos *Wistar* da pesquisa.

**Fonte:** Autor do estudo, 2013.

### 5.2 O procedimento experimental – exodontia

Para que o procedimento de exodontia fosse realizado, os animais receberam anestesia através de injeção intramuscular, com uma combinação de cloridrato de xilazina 2% (*Rompun*®, Bayer) (0,1ml/100g), como sedativo e relaxante muscular, e cloridrato de *Ketamina* 10% (*Ketalar*®, Parke-Davis) (0,1ml/100g), como anestésico geral. Através do instrumento de *Hollemback* na sindesmotomia e uma pinça dente

de rato para a luxação, foram extraídos os segundos dentes molares direito, conforme figura-5.



**Figura 5** – A, B e C: Mesa cirúrgica e acesso ao campo operatório. C e D: Pinça dente de rato e segundo molar - Fonte: Autor do estudo, 2014.

Após exodontia, os animais foram distribuídos em 2 (dois) grupos: Grupo controle (denominado G2) – animais que foram somente submetidos à exodontia; Grupo experimental (denominado G1) – animais submetidos à exodontia acompanhada de sessões de Terapia Fotodinâmica. Cada grupo desta continha 12 ratos, e estes foram subdivididos em três subgrupos, denominados pelas letras A, B, e C, como mostra a figura-6.

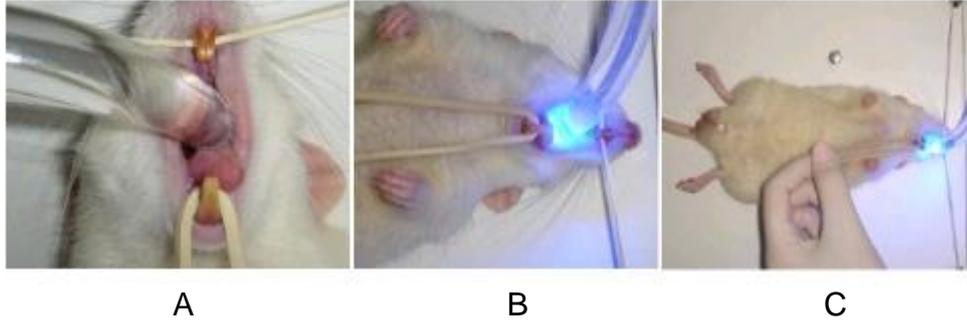
### 5.3 Terapia de luz

As sessões de terapia de luz ocorreram nos dias 0 (zero), 1 (um), 4 (quatro), 7 (sete), 11 (onze) 14 (quatorze) e 18 (dezoito) após a exodontia. A cada sessão Terapia Fotodinâmica com luz de LED com a aplicação do fotossensibilizador PpIX, posicionou-se dentro da cavidade oral o feixe de luz direcionado para a região do alvéolo do 2º molar direito, dispensando uma fluência de 5 *Joules*, por 20 segundos conforme disposto na Quadro-3.

DIA	GRUPO CONTROLE	GRUPO EXPERIMENTAL
0	Exodontia	ExodontiaTerapia fotodinâmica
1	-	Terapia fotodinâmica
4	-	Terapia fotodinâmica (animais restantes)
7	-	Terapia fotodinâmica (animais restantes)
11	-	Terapia fotodinâmica (animais restantes)
14	-	Terapia fotodinâmica (animais restantes)
18	-	Terapia fotodinâmica (animais restantes)

**Quadro 3** – Procedimento de aplicação de luz no grupo experimental.

Fonte: Autor do estudo, 2014.



**Figura 6** – A, B e C: Sessão fotopolimerizador de resina odontológica de luz LED.

**Fonte:** Autor do estudo, 2013.

#### 5.4 Eutanásia dos animais

Ao término do período experimental, os animais passaram por eutanásia, procedimento que ocorreu ao 4<sup>o</sup> (quarto), 7<sup>o</sup> (sétimo), 14<sup>o</sup> (décimo quarto) e 21<sup>o</sup>(vigésimo primeiro) dias após a exodontia, sofrendo eutanásia 3 (três) animais de cada subgrupo para cada dia. Utilizando cloridrato de *Ketamina* 10% (*Ketalar*®, *Parke-Davis*) (0,1ml/100g), como anestésico geral, e posterior deslocamento cervical, conforme protocolo padrão do comitê de ética. Em seguida, foram decapitados; as maxilas dissecadas, amostra dos alvéolos separada e fixadas por 48 horas à temperatura ambiente em solução de formalina neutra tamponada a 10%. Conforme a Quadro-4.

Dia	GRUPO CONTROLE	GRUPO EXPERIMENTAL
4	Eutanásia (3ratos)	Eutanásia (3ratos) - Terapia fotodinâmica (ratos restantes)
7	Eutanásia (3ratos)	Eutanásia (3ratos) - Terapia fotodinâmica(ratos restantes)
14	Eutanásia (3ratos)	Eutanásia (3ratos) - Terapia fotodinâmica(ratos restantes)
21	Eutanásia (3ratos)	Eutanásia (3ratos)

**Quadro 4** - Procedimento de eutanásia no grupo experimental e controle.

**Fonte:** Autor do estudo, 2013.

## 5.5 Preparação das lâminas

As maxilas dissecadas geraram amostras dos alvéolos que passaram por fixação. Essas amostras foram extraídas e fixadas em formaldeído tamponado 10% (v/v) por 48 horas, desmineralizadas em EDTA a 2 % (p/v) e incluídas em parafina. Os fragmentos posteriormente processados para análise histológica H.E.

No processo de preparação das lâminas para determinação de colágeno, as lâminas do terceiro subgrupo (G1c) foram danificadas, especificamente as dos dias 7, 14 e 21 e somente as lâminas do quarto dia puderam ser analisadas, contudo os outros dois grupos (G1A e G1B) não sofreram nenhuma danificação ou alteração durante o estudo, e por isso a investigação, para não ter vieses não contemplou as lâminas danificadas.

## 5.6 Desmineralização

Após a fixação, as maxilas foram desmineralizadas em solução tamponada de EDTA (Ácido diaminotetracético) a 2 % (p/v), (pH entre 7,2 e 7,4) à temperatura ambiente, com trocas a cada 2 dias, durante um período de 40 dias. Após a desmineralização, as maxilas foram lavadas em H<sub>2</sub>O corrente por uma noite e separadas em metades direita e esquerda.

## 5.7 Processamento histológico

Os fragmentos foram, então, processados para análise, histomorfológica e histomorfométrica, conforme protocolo a seguir: Desidratação: os tecidos foram mergulhados em uma série crescente de álcool (70%, 80%, 90%, absoluto I, absoluto II, absoluto III), com um tempo de 30 minutos em cada banho; Diafanização: os tecidos foram mergulhados em três banhos de *xilol*, durante 30 minutos em cada banho; Infiltração: foram realizados três banhos em parafina a 58°C, durante 90 minutos em cada. Após o último banho, as peças foram incluídas em blocos de parafina. Os blocos de parafina procedentes de todos os animais foram cortados no sentido transversal ântero-posterior, em um micrótomo, obtendo-se cortes seriados de 6µm de espessura. Os cortes foram coletados em lâminas de vidro e colocados para secar durante um dia. Em seguida, foram realizados os

procedimentos de coloração de *hematoxilina-eosina* (HE) para análises histológicas dos mastócitos e picro-sírius para a análise das fibrilas de colágeno.

### **5.8 Análise histológica**

Para a análise dos mastócitos os cortes foram feitos com 6µm de espessura, e as lâminas foram preparadas pelas técnicas histológicas rotineiras com coloração de hematoxilina-eosina (HE) na investigação do número de mastócitos presentes no campo delimitado para estudo, através de um microscópio ótico.

Para a análise da quantidade de fibrilas de colágeno, seguindo a mesma espessura de corte, após coloração com picrocírius, as lâminas foram analisadas pela microscopia de luz convencional para estudo histológico. Os cortes foram analisados procedendo-se à leitura em varredura longitudinal, através de microscopia de luz, utilizando-se um microscópio *ScopeA1* (*Carl Zeiss*, Berlim, Alemanha), acoplado com uma câmera *AxioCam ICc1*. Para as contagens foi utilizado o *software Axion Vision 4.8* que delimitou a porcentagem de área das fibrilas colágeno. (*Carl Zeiss*, Berlim, Alemanha). Após as contagens, os dados foram avaliados estatisticamente.

### **5.9 Quantificação de mastócitos**

Após ser aplicada a coloração de hematoxilina-eosina nas lâminas, uma área foi delimitada através de uma ocular micrometrada, e os resultados encontrados foram obtidos após investigação da quantidade de mastócitos visualizados através de microscopia ótica que possibilitou determinar uma quantidade numérica média para cada grupo, o controle e o experimental.

Para a quantificação dos mastócitos utilizaram-se as lâminas coradas pela hematoxilina-eosina em um microscópio de luz comum, com objetiva de 100x. Para obtenção da área avaliada, com o auxílio de uma ocular micrometrada, calculou-se a área de campo. Depois, foram feitas as contagens de mastócitos por campo. Com o número de mastócitos e a área, calculou-se a densidade de mastócitos, sendo expressa em número de mastócitos por cm.<sup>2</sup> A densidade dos mastócitos foi alcançada através do uso de uma fórmula  $d = \text{num. Cel} / \text{campo} \times \text{área}$ .

### 5.10 Determinação da porcentagem de colágeno

Na determinação da porcentagem de colágeno alveolar, utilizaram-se lâminas coradas com picro-sírius em microscopia de luz, utilizando-se um microscópio *ScopeA1* (*Carl Zeiss*, Berlim, Alemanha), acoplado com uma câmera *AxioCam ICc1*, Com Objetiva de 20x e as imagens fotografadas e armazenadas em um banco de dados.

Bittencourt (2014) aponta que o microscópio de luz (microscópio ótico) utiliza luz branca comum para observar materiais, fornecendo uma imagem aumentada, invertida vertical e horizontalmente, e que este aparelho é constituído por uma parte de suporte e uma parte óptica com sistema de lentes (condensador, objetivas e oculares).

### 5.11 Análises estatísticas

Os mastócitos foram quantificados após coloração da hematoxilina-eosina e sua contabilização por área de campo selecionada, seguido de comparação entre o grupo experimental e o controle.

Os resultados obtidos da quantificação do colágeno, após coloração com picro-sírius e análise microscópica de luz, foram comparados com os grupos controles, os dados obtidos foram distribuídos em uma planilha e, em seguida, as variáveis foram testadas a distribuição normal pelo Teste de Lilliefors e para a comparação dos diferentes grupos a análise de variância Anova *oneway*, observou-se então que não havia distribuição normal do colágeno. Não havendo normalidade não foi possível usar o teste que utiliza média e desvio padrão, então utilizou-se do teste de Mann-Whitney, que comparou as medianas através do programa *Bioestat 5.0*. Apresentando um valor de significância de P.0,005.

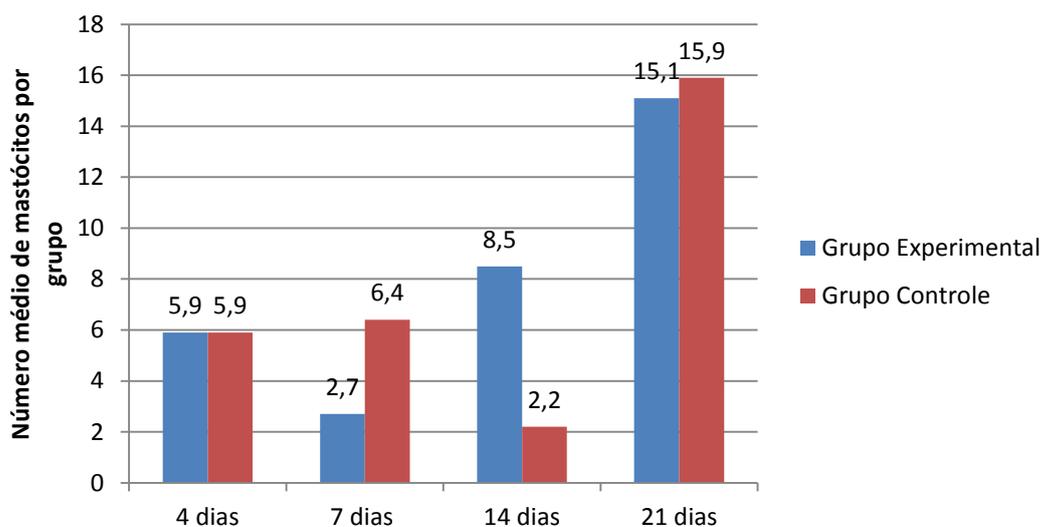
## 6 RESULTADOS

Apresentam-se os dados referentes às análises realizadas da formação de fibrilas colágeno e mastócitos durante o processo de reparo ósseo em alvéolos dentais de ratos no prazo compreendido entre 04, 07, 14 e 21 dias, após a exodontia e tratamentos posteriores com a Terapia Fotodinâmica nos grupos Controle e Experimental.

### 6.1 Presença de mastócitos

Conforme o gráfico apresentado abaixo se observa que a presença de mastócitos foi igual no quarto dia após a aplicação da TFD, com média de mastócitos (5.9); no sétimo dia, o grupo controle teve um número maior de mastócitos em relação ao experimental (6.4 para 2.7); já no décimo quarto dia foi o grupo experimental que possuía maior número de mastócitos (8.5 para 2.2); e por fim, no vigésimo primeiro dia, observou-se que os dois grupos continham semelhante número de células mastócitos por área analisada (15.1 para 15.9).

Como a pesquisa possui uma quantidade pequena de amostra o valor de p no 7º e 14º dias apresentou o valor de p 0,24, entretanto a diferença ainda pode ser considerada importante.



**Gráfico 1** – Produção de mastócitos entre grupo controle e experimental após TFD.

## 6.2 Formação de colágeno

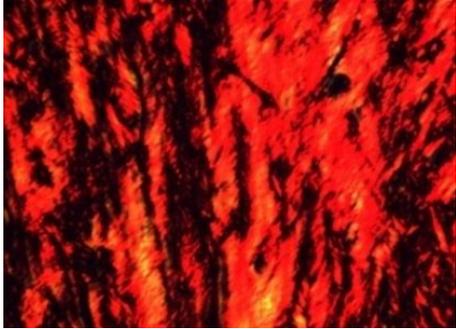
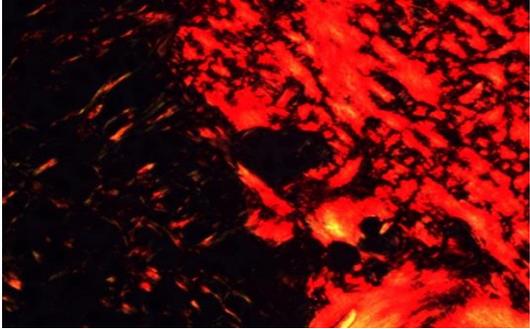
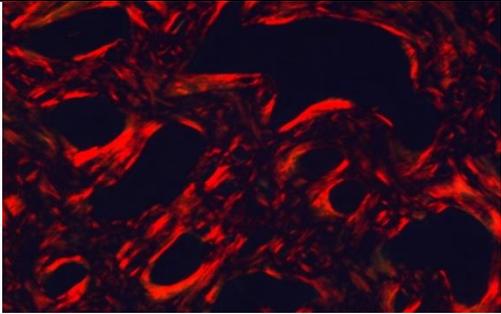
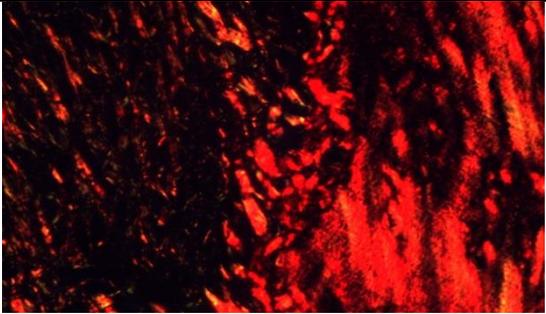
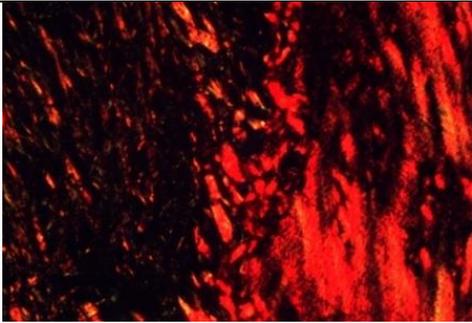
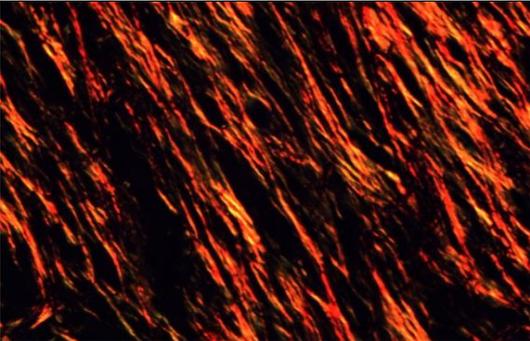
**Tabela 1** – Comparação estatística da formação de colágeno após TFD entre os grupos controle e experimental

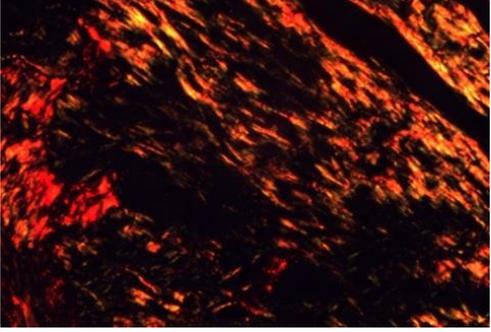
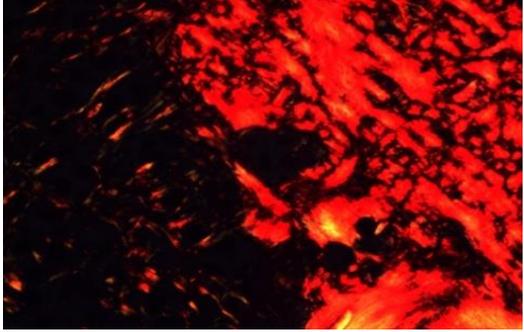
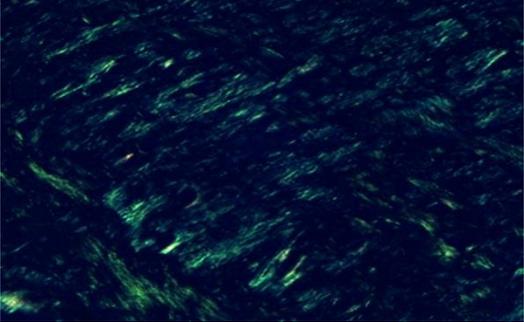
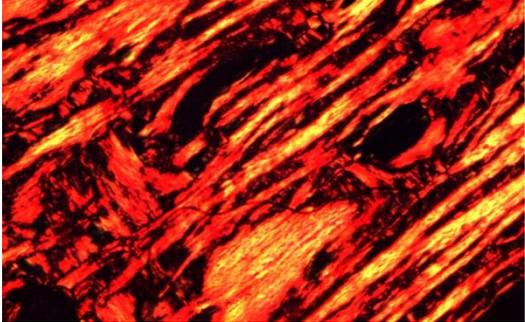
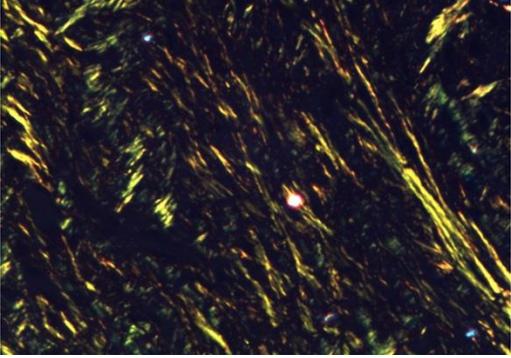
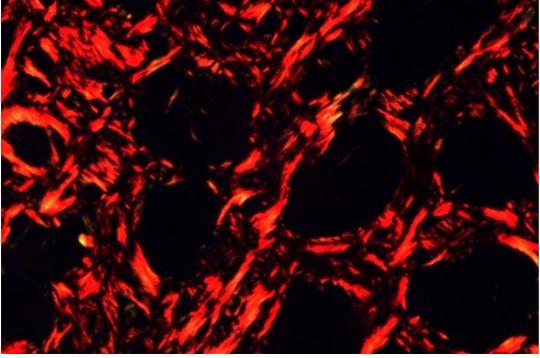
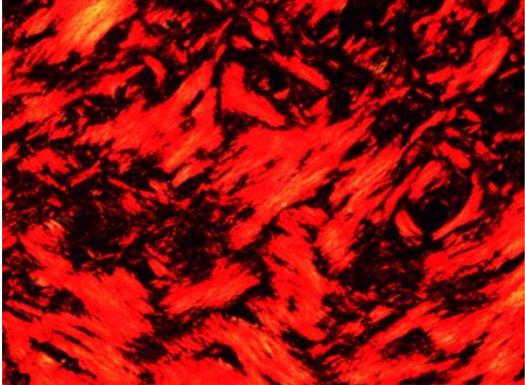
Grupo	Mediana*		Valor de p
	Experimental (Tamanho da amostra)	Controle (Tamanho da amostra)	
4 dias	30,61 (117)	17,28 (141)	0,0001
7 dias	25,44 (79)	5,27 (71)	0,0001
14 dias	19,29 (53)	31,37 (104)	0,02
21 dias	45,73 (59)	9,81 (131)	0,0001

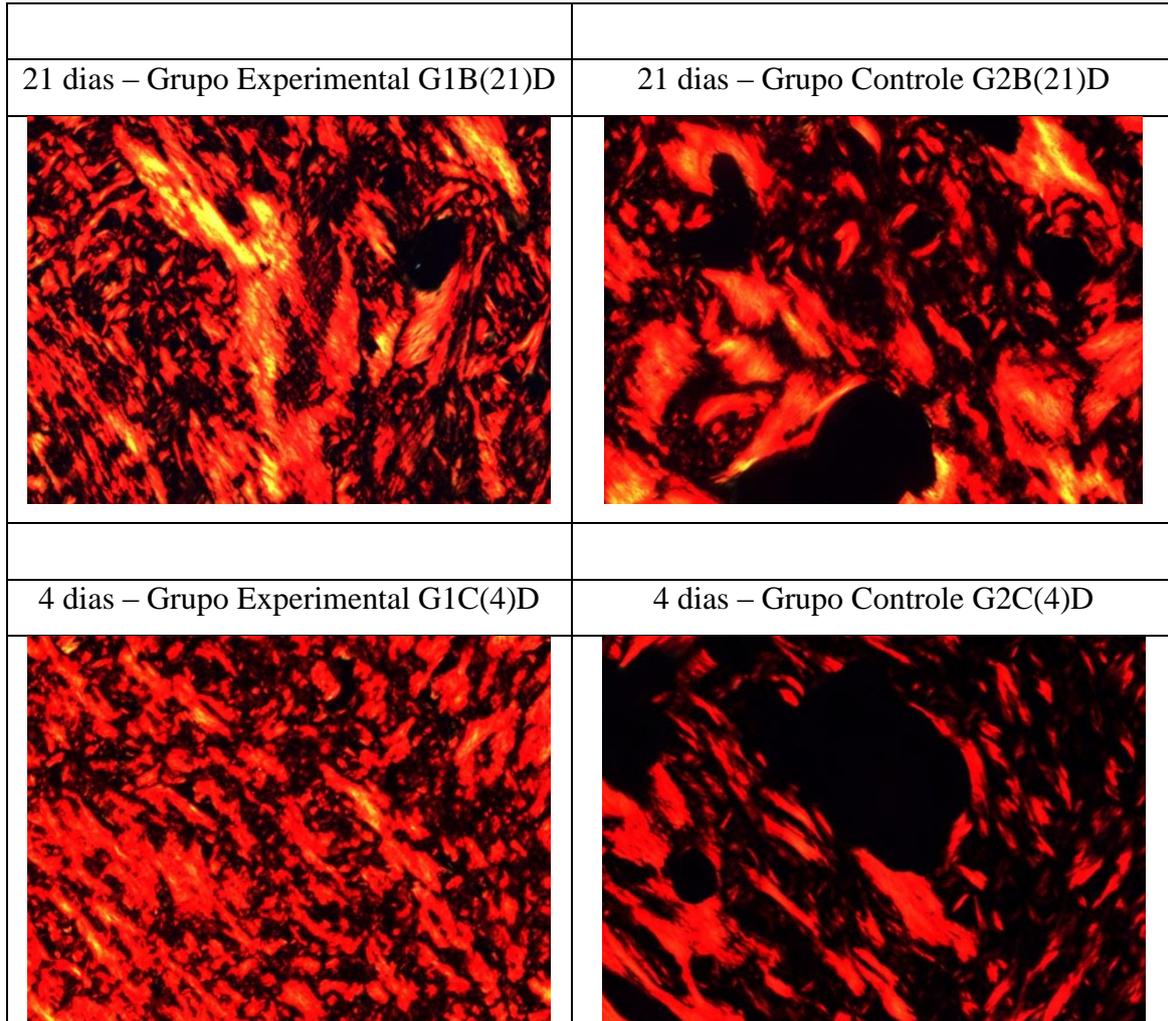
\*Teste de Mann-Whitney

Pode-se perceber na tabela acima que no quarto dia o grupo experimental demonstrou maior produção de colágeno em relação ao grupo controle (30,61 X 17,28), e no sétimo dia essa constante se manteve (25,44 X 5,27), porém no décimo quarto dia o grupo controle apresentou maior produção de colágeno (31,37 X 19,29), contudo, ao final do experimento, no vigésimo primeiro dia, o grupo controle demonstrou uma produção maior que a do grupo controle (45,73 para 9,81).

Observa-se então, que na maioria dos grupos analisados, houve diferença estatística relevante entre eles, com média ou mediana maior no grupo experimental. Somente nos grupos G1A(14)D e G2A(14)D, que o grupo controle teve mediana maior que o grupo experimental, que pode ser observado na figura-7 abaixo:

4 dias – Grupo Experimental G1A(4)D	4 dias – Grupo Controle G2A(4)D
	
7 dias – Grupo Experimental G1A(7)D	7 dias – Grupo Controle G2A(7)D
	
14 dias – Grupo Experimental G1A(14)D	14 dias – Grupo Controle G2A(14)D
	
21 dias – Grupo Experimental G1A(21)D	21 dias – Grupo Controle G2A(21)D

	
4 dias – Grupo Experimental G1B(4)D	4 dias – Grupo Controle G2B(4)D
	
7 dias – Grupo Experimental G1B(7)D	7 dias – Grupo Controle G2B(7)D
	
14 dias – Grupo Experimental G1B(14)D	14 dias – Grupo Controle G2B(14)D
	



**Figura 7** – Quadro com as fotos das lâminas utilizadas para contabilizar a quantidade de colágenos produzidos após aplicação da TFD no grupo experimental.

## 7 DISCUSSÃO

As atuais descobertas tecnológicas que envolvam as ciências biológicas, sobretudo, no que se refere à Medicina moderna tem se tornado fonte de inspiração para muitas pesquisas. Em meio a essas transformações a TFD tem aplicações recentes e ainda pouco descritas na literatura e, embora seja uma radiação não-ionizante, tem suas propriedades citotóxicas ainda pouco conhecidas. Nesse contexto, estudos experimentais já foram feitos, em sua maioria concordando com a hipótese de que a TFD pode ser capaz de influenciar nos processos celulares, uma vez que estimula a proliferação de várias células, como fibroblastos, osteoblastos, logo, beneficiando o reparo ósseo (HENRIQUE; CAZAL; CASTRO, 2010; MARCH e CASTRO, 2005).

Segundo Perussi (2007), na TFD com administração tópica ou sistêmica de corante atóxico sensível à luz seguida da irradiação em baixas doses com luz visível e comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio em células combinado com fotossensibilizador (FS) ativado, pode vir a reagir com moléculas vizinhas por transferência de elétrons ou hidrogênio, conduzindo à produção de radicais livres (RL), ou por transferência de energia ao oxigênio, produzindo, espécies reativas de oxigênio. Em consonância, Zhou, Xing e Chen (2009), relatam que ambas alternativas levaram a destruição do tecido. Isso confere a TFD vantagens relevantes no processo de reparo tecidual

Com base nisso, Issa e Manela-Azulay (2010), reportaram em estudos que a TFD usada com o intuito de causar destruição seletiva de tecidos, quando realizada em duas etapas, a primeira com uso de uma droga sensibilizante tópica ou sistêmica, e a segunda com uma irradiação de uma luz visível e adição de fotossensibilizantes, administrados exogenamente ou endogenamente, quando ativados pela fonte de luz, transferiu energia ao oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete para estimular a apoptose.

Colnot et al., (2005) e Baroni (2010), pesquisando alternativas para acelerar o reparo ósseo em ferimentos, descreveram que a TFD pode favorecer o reparo tecidual, já que atua em meio aos processo da cascata de inflamação, otimizando a proliferação das células sanguíneas, além de ter contribuído para remodelação do tecido.

Devescovi, Leonardi, Ciapetti e Cenni (2008), elucidaram que a resposta inflamatória é iniciada e orquestrada por mediadores de origem celular, bem como por aqueles de origem plasmática que vão prover os sinais característicos desta resposta, ou seja, dor, calor, rubor e tumor, que podem vir associados ou não da perda de função do tecido ou órgão afetado. Nesse sentido, a reação inflamatória expressa-se clinicamente como um fenômeno estereotipado e independente da natureza do agente agressor, mediado por vários fatores, e pode ocorrer somente pequenas variações em determinadas situações, dependentes do tecido ou órgão afetado, e da coexistência de estados patológicos, que alterariam a capacidade do organismo de mobilizar as fontes de defesa.

Azevedo (2005), investigando o papel do mastócito na fase aguda da inflamação, mas não em fases decorrentes, nas quais os tecidos são remodelados, entende que os mastócitos ativam a procalagenase e degradam a matriz celular, e com isso processa o procolágeno que forma as fibrilas. Com isso, o mesmo observou que o acúmulo de mastócitos na fase da inflamação contribui para a formação de fibrilas colágenas.

Martins et al., (2011); Martinez et al., (2007); Hinz et. al., (2001), reportaram que a principal função dos mastócitos consiste em armazenar mediadores químicos da inflamação, reparo tecidual e angiogênese. Dessa maneira, após o trauma cirúrgico ocorre um processo inflamatório, no qual uma cascata de mediadores promove alterações circulatórias e a formação de um coágulo. Em seguida, se estabelece uma regeneração, com formação de tecido ósseo. Numa terceira etapa, ocorre a maturação da ferida por mecanismo de remodelação óssea.

Chery Yang et al., (2013), relataram que, imediatamente após a injúria tecidual desenvolve-se uma camada de componentes orgânicos e inorgânicos do plasma na região alveolar, sobretudo, proteínas como fibronectina e albuminas, que se ligam a células da resposta inflamatória e mesenquimais progenitoras. Tais células liberam e ativam diversas citocinas e fatores de crescimento responsáveis por controlar a inflamação e estimular a proliferação e diferenciação de células em osteoblastos e osteoclastos, além de sintetizar uma rede de colágeno que funciona como suporte para o processo de reparo.

Atayde (2011), descreveu que em situações envolvendo a cicatrização de feridas abertas os fibroblastos direcionam-se da região marginal da ferida, migrando para uma matriz provisória constituindo de coágulo de fibrina. Ao passo

que, com cerca de 7 dias após o ferimento, tal matriz passa a ser substituída por um tecido conjuntivo neoformado chamado de tecido de granulação, composto em sua maioria por pequenos vasos, matriz extracelular e células fibroblástica que quando ativadas convertem-se em miofibroblastos.

Com base nesse entendimento, a avaliação quantitativa e qualitativa do colágeno foi feita com o método de coloração de hematoxilina-eosina (HE) para análises histológicas dos mastócitos e picro-sírius para a análise das fibrilas de colágeno.

Martins et al., (2003), a partir de seus trabalhos expôs que a coloração por picro-sírius consiste em um método específico para colágeno, já que cora efetivamente as glicoproteínas. Os autores supracitados reportaram que ocorre um aumento de, 700% na intensidade de luz devido à birrefringência do colágeno corado pelo picro-sírius quando comparados aos grupos controles. Esses achados são responsáveis por sustentar a observação precisa do colágeno em diferentes tecidos e graus de desenvolvimento. Com base nisso, viu-se que o espectro das diferentes colorações das lâminas, obtidas após os procedimentos da TFD com a coloração de picro-sírius é viável na diferenciação dos tipos de colágeno, uma vez que, a diferenciação de cores deve-se, entre outras, à espessura das fibras.

Da mesma forma, Forrester et al., (2002), em pesquisas trabalhando com comparações acerca dos tipos de fibras colágenas evidenciaram que o esquema de entrelaçamento e o alinhamento das moléculas, e não apenas sua espessura contribuem para determinar o padrão de birrefringência. Neste aspecto, viu-se que quando ofertado luz polarizada, as fibras com maior espessura apresentam-se com um padrão de coloração laranja-avermelhada, confirmando que há colágeno tipo I, logo existe o processo de maturação tecidual, como pode ser visto na análise histológica das lâminas utilizadas de ratos Wistar submetidos ao experimento, após a aplicação da TFD no grupo experimental para contabilizar a quantidade de colágenos produzidos, sobretudo após 14 dias.

Quanto à quantidade de colágenos produzidos, notou-se o predomínio de colágeno tipo I (71,4%) associado à grandes áreas com mastócitos, com bordos bem delimitados, onde as fibras se mantinham unidas por junções celulares. Contudo, diferenças foram constatadas no quarto dia. O grupo experimental apresentou maior produção de colágeno em relação ao grupo controle (30,61 X 17,28), e no sétimo dia essa constante se manteve (25,44 X 5,27), por sua vez, no

décimo quarto dia o grupo controle apresentou maior produção de colágeno (31,37 X 19,29).

Por conseguinte, ao final do experimento, no vigésimo primeiro dia, o grupo controle demonstrou uma produção maior (45,73 para 9,81), a partir deste achado, pode-se verificar a produção de colágeno com a aplicação da técnica de TFD pós-extração dental do 2º molar de rato Wistar, gerou um aumento de colágeno frente ao grupo controle, que não passou pela técnica.

No entanto, foi demonstrado que ainda não se pode afirmar que a produção de colágeno é semelhante no vigésimo primeiro dia, já que no décimo quarto dia (período de resposta inflamatória) ele se apresentava em maior quantidade do grupo que passou pela TFD em relação ao grupo controle (8,2 para 2,2). Assim, entende-se, que o número maior de mastócitos no décimo quarto dia pode ter contribuído para a formação de fibrilas colágenas, que, por conseguinte aumentou o número de fibrilas de colágeno posteriormente, fato constatado quando foi quantificado o número de colágeno produzido após a aplicação da TFD.

Quando se observou padrão de coloração, caracterizado, principalmente pela presença de mastócitos formando pequenas populações, viu-se um infiltrado inflamatório bem definido que variou de moderado a intenso. A matriz conjuntiva colagênica, quando vista nas secções coradas pelo picrossirius, foi abundante na maioria dos casos submetidos a FTD, o colágeno ilustrava um aspecto organizado, com fibras dispostas paralelamente, pós exodontia.

Mazola et al., (2009), em consonância afirmam que, 7 dias após extração de molares de ratos Wistar, o novo tecido conjuntivo recebe quantidade significativa de fibroblastos e capilares neoformados, ao passo que o epitélio apresenta uma proliferação celular pouco mais efetiva. A escolha dos períodos de 4, 7, 14 e 21 dias é adequado, já que o processo de reparação em injurias de exodontia em ratos dura aproximadamente 21 dias, período este que o osso alveolar pode ser preenchido por trabeculado ósseo neoformada.

Mesquita et al., (2010), reforçam essa afirmação quando alertam que os macrófagos também atuam tardiamente nos mecanismos de limpeza e reparo tecidual, porque produz citocinas e fatores de crescimento que ocasionam o aumento de fibroblastos, ou seja, a síntese do colágeno, além de formar novos vasos e substituir tecidos lesados. Com isso, entende-se que pesquisas sobre o papel do mastócito no processo pós-inflamação ainda gera uma janela de pesquisas

e, neste estudo, não constatou afirmações diferentes frente aos autores que tratam do assunto.

As respostas positivas deste estudo podem ser validadas pelos apontamentos de Atayde (2011) que relata que a produção de colágeno é importante na reparação alveolar porque este, ao passar pela biossíntese, libera uma matriz extracelular, o procolágeno, que passando por processos chega a uma molécula ativa denominada tropocolágeno tripla hélice, moléculas que durante a fibrilogênese agregam-se formando também fibrilas de colágeno. Assim, são estas fibrilas que contribuem na reparação e sustentação do alvéolo.

Com isso pode-se deduzir que a TFD aumentou a produção de fibrilas de colágeno durante o processo de reparação alveolar, aspecto que pode ter sido potencializado pela alta produção de células de mastócitos no décimo quarto dia, fato positivo e importante constatado nesta pesquisa. Já que na resposta inflamatória, os mastócitos são células imprescindíveis a serem ativadas e, com a presença das citocinas de alarme.

Para Roth et al. (2006), é descrito na literatura que vários tipos células, incluindo macrófagos, células endoteliais, linfócitos e astrócitos, sintetizam citocinas com atividade pirogênica. Em estudo *in vitro*, Vasconcelos et al., (2009) evidenciaram que, mastócitos de origem peritoneal quando estimulados por um curto período com endotoxina bacteriana liberavam para o sobrenadante fatores pirogênicos. Através de diferentes estímulos, quando ativados podem demonstrar alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais importantes na regulação do processo inflamatório e imunológico.

Assim, para analisar a proliferação de fibroblastos e de colágeno, procedeu-se o exame quantitativo estimando-se de maneira aleatória quantidades recém-formadas de colágeno e fibroblastos, através das lâminas, sendo que as lâminas foram classificadas em quatro grupos por período, com base no percentual de colágenos que foram encontrados na área tratada. Os resultados do presente estudo sugerem que em 14 dias após a aplicação da TFD em ratos Wistar, houve diferenças significativas na proliferação de colágeno e fibroblastos nas amostras investigadas em relação ao grupo experimental. Todavia, os períodos de maior proliferação de fibroblastos coincidiram com os intervalos de maior proliferação de mastócitos. Tais resultados fundamentam a hipótese de a fonte do aumento da quantidade de colágeno tipo I, decorre da presença de mastócitos,

consequentemente correlacionado à resposta inflamatória, ocasionada pela ação da TFD.

Entretanto, existem poucos trabalhos correlacionando a aplicação *in vitro* da TFD e níveis de citocinas. Assim, a aplicação da TFD em reparo ósseo alveolar de ratos Wistar, nos permitirá elucidar se a terapia altera a quantidade de colágenos produzidos, e ainda; ampliaria nosso entendimento sobre o uso da TFD como alvo fisiológico em mastócitos ativados. Por sua vez, o emprego da TFD em mais experimentos *in vitro*, pode viabilizar o entendimento na perspectiva quanto à futura utilização deste tratamento em processos inflamatórios.

## 8 CONCLUSÃO

Esta pesquisa teve por objetivo investigar a eficácia da Terapia Fotodinâmica, utilizando o fotossensibilizador protoporfirina IX, na reparação alveolar após a extração do 2º molar em ratos da linhagem Wistar, assim como averiguar se a técnica contribui na formação de mastócitos e colágeno durante o processo de reparação.

Concluiu-se que a técnica de TFD aumentou consideravelmente, no décimo quarto dia, a produção de mastócitos, assim como também aumentou consideravelmente, no vigésimo primeiro dia, o número de fibrilas de colágeno produzidas na área tratada, fator que trouxe resultados positivos sobre a técnica e mostrou a importância da TFD nos tratamentos realizados na área da odontologia.

Entende-se que mais estudos na área devem ser feitos a fim de analisar a importância de tais benefícios para os tratamentos odontológicos, principalmente aqueles que incluem a extração dental, contudo esta pesquisa fornece um caminho positivo e assertivo para que tais pesquisas sejam realizadas futuramente.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, S; ABOUMARZOUK, O; Somani B, NABI, G; KATA, S. G. (2012 Jul 3). **Oral 5-aminolevulinic acid in simultaneous photodynamic diagnosis of upper and lower urinary tract transitional cell carcinoma - a prospective audit.** Department of Urology, Ninewells Hospital and Medical School, University of Dundee, Dundee, UK.). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22758907>. Acesso em: 14 nov. 2013.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C.; SIBATA, C. H.; Photodiagn. Photodyn. Ther. 2004

ALMEIDA, Janete Dias, CARVALHO, Yasmin Rodarte; ROCHA, Roseli Fernandes da. Estudo da reparação óssea em mandíbula de ratos. Pós-Grad. **Rev. Fac. Odontol.** São José dos Campos, v.3, n.1, jan./jun., 2000. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Meus%20documentos/Downloads/reparo%20%C3%B3seo.pdf>. Acesso 05 fev. 2014.

AMARAL, Rodrigo Rodrigues et al . Terapia Fotodinâmica na endodontia: revisão de literatura. **RFO, UPF**, Passo Fundo, v.15, n.2, ago. 2010. Disponível em [http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-40122010000200020&lng=pt&nrm=iso](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-40122010000200020&lng=pt&nrm=iso). Acessado em: 12 jan. 2014.

ARAÚJO, L. M. P. C. Dendrímeros como carreadores da protoporfirina IX na terapia fotodinâmica tópica do câncer de pele. 2010. 149f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: [file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Meus%20documentos/Downloads/Tese\\_simplificada.pdf](file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Meus%20documentos/Downloads/Tese_simplificada.pdf). Acesso em 03 jan 2014.

ATAYDE, Sandra Aparecida. Estudo da histoarquitetura do colágeno da cartilagem, ligamentos e sinóvia em modelo experimental de diabetes mellitus. [Dissertação doutorado]. São Paulo: **Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. 2011. Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5164/tde-23022012.../pt-br.php](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5164/tde-23022012.../pt-br.php). Acesso em mar. 2014.

AZEVEDO, Luciane Hiramatsu. Processo reparacional em tecido cutâneo e oral de ratos submetidos à incisão cirúrgica com lasers de CO2 e diodo, e com bisturi elétrico e convencional – uma análise morfométrica. [Tese de doutorado]. São Paulo: **Faculdade de Odontologia da USP**, 2005. Disponível em: <http://www.fo.usp.br/lelo/wp-content/uploads/Azevedo.pdf>. Acesso 15 jan. 2014.

BAGLO, Yan; GABRIELSEN, Mari; SYLTE, Inebrikt; GEDERAAS, Odrun A. Homology Modeling of Human c-Butyric Acid Transporters and the Binding of Pro-Drugs 5-Aminolevulinic Acid and Methyl Aminolevulinic Acid Used in Photodynamic Therapy. Australia: **PLoS ONE**. v. 8(6): e65200. doi:10.1371/journal.pone.0065200.

BARONI, Bruno Manfredini. Efeito da fototerapia prévia ao exercício isocinético sobre a fadiga e o dano muscular. 2010, 96f.;il.. [Dissertação de Mestrado] Porto-Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Escola de Educação Física. Programa de Pós-graduação em Ciências do Movimento Humano. 2010. Disponível em:  
<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/25518/000753818.pdf?sequence=1>  
 . Acesso em: 10 jan. 2014.

BERTOLINI, W. L. H. M. A influência do D-limoneno como promotor de absorção do ácido 5aminolevulínico para a Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas. 2009 118f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- **Universidade de São Paulo**, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em:  
<file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Meus%20documentos/Downloads/tese.pdf> . Acesso em 20 jan 2014.

BITTENCOURT, Simone. Microscópio de Luz. Universidade Federal de São Paulo- Laboratório de Neurofisiologia - **UNIFESP**. 2014. Disponível em:  
<http://www.neurofisiologia.unifesp.br/microscopiodeluz.htm> Acesso em 12 fev. 2014.

BOCK, J. M. et al. Modulation of cellular invasion by VEGF-C expression in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. v. 134, n. 4, p. 355-362, 2008.

BOSQUIROLI, Virginia; FRANCO, Eduardo Batista; PEREIRA, José Carlos; NAVARRO, Maria Fidela de Lima; MONDELI, Rafael Francisco Lia. Fotopolimerização de resina composta com Luz Halógena e LED- Avaliação da resistência composta fotopolimerizável em função de diferentes fontes de Luz e tempos de ativação. Porto Alegre: **RGO**. v.54, n.2, p.129-133, abr/jun. 2006. Disponível em:  
<http://www.revistargo.com.br/ojs/index.php/revista/article/viewArticle/525>. Acesso em 15 jan. 2014.

CHERY YANG et al. Periodontal regeneration with nano-hydroxyapatite-coated silk scaffolds in dogs. **J Periodontal Implant Sci**. December; 43(6): 315–322. 2013.

COLNOT, C. et al. Mechanisms of action of demineralized bone matrix in the repair of cortical bone defects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 435, p. 69-78, 2005.

COSTA, Mardoqueu Martins da. Desenvolvimento de um sistema por imagem de fluorescência óptica para uso médico-odontológico. [Dissertação Mestrado]. São Paulo: **Universidade Federal de São Carlos**. 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18152/tde-11032010-155617/en.php>. Acesso em: 15 jan 2014.

DEVESCOVI, Valentin; LEONARDI, Elisa; CIAPETTI, Gabriela; CENNI, Elisabetta. Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov.* 92:161–168. 2008.

EMILIO, Claudia Rodrigues. Comparação da eficácia do ácido 5-aminolevuliníco com a de seu metil éster utilizando-se da terapia fotodinâmica no tratamento de carcinoma espinocelular felino. [Dissertação de doutorado]. São Paulo: **Universidade de São Paulo**, Institutos de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. 2008. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-31082009-134500/pt-br.php>. Acesso em: 12 dez. 2014.

FORRESTER, J. V. et al. **The eye: basic sciences in practice**. 2. ed. Philadelphia. W.B. Saunders, 2002.

FRANCO, João Eduardo Miranda. Avaliação da terapia fotodinâmica nos tecidos periimplantares durante osseointegração. [Dissertação de mestrado]. São Paulo: **Universidade de São Paulo**, Faculdade de Odontologia. 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23150/tde-22122010-145913/pt-br.php>. Acesso em 11 nov. 2013.

FREDDO, Angelo Luiz. Efeito da Il1t na biomodulação do processo inflamatório perimplantesbioabsorvíveis de plla/pgs em fêmur de ratos. [Dissertação de mestrado]. Porto Alegre: **Faculdade de Odontologia**, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2007. Disponível em: [http://tede.pucrs.br/tde\\_arquivos/19/tde-2008-03-19t075957z-1079/publico/397759.pdf](http://tede.pucrs.br/tde_arquivos/19/tde-2008-03-19t075957z-1079/publico/397759.pdf). Acesso em: 30 nov. 2013.

FREITAS, Danilo de Negreiros; LEÃO, Rodrigo Augusto de Souza; GUEIROS, José Edevanilson de Barros; PEREIRA, Corinto Viana; HORA, Rafael Tavares da. Paratireoidectomia guiada por fluorescência - nova técnica cirúrgica para tratamento do hiperparatireoidismo secundário. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v.39, nº 3, p. 179-183, julho / agosto / setembro 2010. Disponível em: <http://sbccp.netpoint.com.br/ojs/index.php/revistabrscpp/article/viewFile/469/381>. Acesso em: 10 dez. 2013.

GERRTSEN, M. J. P.; SMITS, M. M.; KLEINPENNING, P. C. M.; VANDE KERKHOF, P. E. J. Treatment to Enhance protoporphyrin IX accumulation in photodynamic therapy. *Dermatology* 2009; v. 218:193-202. **THE NETHERLANDS:** University Nijmegen Medical Centre, Nijmegen.

HALLIWELL, B; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol.** 142(2): 231-55. 2004.

HENRIQUES, Águeda Cristina Gomes; CAZAL, Claudia; CASTRO, Jurema Freire Lisboa de. Ação da laserterapia no processo de proliferação e diferenciação celular: revisão da literatura. *Rev. Col. Bras. Cir.*, Rio de Janeiro , v. 37, n. 4, Aug. 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-69912010000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-69912010000400011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 Abr. 2014.

HINZ, Boris et. al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. **Molecular Biology of the Cell.** 12, 2730-2741, set. 2001.

HOSHIDA T. et al. Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. **Cancer Res.** v. 66, n. 16, p. 8065-8075, 2006.

ISSA, Maria Cláudia Almeida; MANELA-AZULAY, Mônica. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro , v. 85, n. 4, Aug. 2010 . Disponível em: from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962010000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962010000400011&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 Abr. 2014.

KAMOUN, W. S. et al. Edema control by cediranib, a vascular endothelial growth factor receptor-targeted kinase inhibitor, prolongs survival despite persistent brain tumor growth in mice. **Clin. Oncol.** v. 27, n. 15, p. 2542-2552, 2009.

KAWCZYK-KRUPKA, A; CZUBA, Z.; SZLISZKA, E.; KRÓL, W.; SIERÓN, A. The role of photosensitized macrophages in photodynamic therapy. **Oncology reports** 26: 275-280, 2011.

MARCHI, Edilene C. S.; CASTRO, Daniel Melo de Castro. Revisão de microscopia. Lavras: **Universidade Federal de Lavras**. 2005. Disponível em: <http://www.if.ufrj.br/~micha/arquivos/apresentacoes/micgeral.PDF>. Acesso em: 20 dez. 2014.

MARIA, Vanda Sanderana Macêdo Carneiro; CATÃO, Helena Chaves de Vasconcelos. Aplicações da terapia fotodinâmica na odontologia. Lins: **Faculdade de Odontologia de Lins/UNIMEP**.v.22(1), p.25-32, jan/jun. 2012. Disponível em:<https://www.metodista.br/revistas/revistas-unimep/index.php/FOL/article/viewArticle/248>. Acesso: 07 jan. 2014.

MARTINEZ, et. al. TGF $\beta$ 1 Enhances the expression of  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin in Cultures Human Pulpal Fibroblasts: Immunochemical and Ultrastructural Analyses – **JOE**. 11, novembro, 2007.

MARTINS, Gabriela Botelh; RIBEIRO, Marlos Barbosa; REIS, Silvia Regina de Almeida. Análise de miofibroblastos no estroma de carcinoma epidermoide da boca. **RPG Rev Pós Grad**.18(4):244-252. 2011.

MARTINS, Gabriela Botelho, REIS, Sílvia Regina de Almeida, SILVA, Tânia Maria Correia. (2003). Expressão do colágeno I em carcinomas epidermóides da cavidade oral. *Pesquisa Odontológica Brasileira*, 17(1), 82-88. **Retrieved April 30, 2014,**

MESQUITA, Danilo Jr.; ARAÚJO, Júlio A. Pereira; CATELAN, Tânia Tiek Takao; SOUZA, Alexandre Wagner Silva de; SILVA, Neusa Pereira da; ANDRADE, Luis Eduardo C.; CRUVINEL, Wilson de Melo. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Rev. Bras. Med.**Edição de agosto, n.3. p, 66-81. 2010. Disponível em: [http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id\\_materia=4053](http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=4053). Acesso: 10 jan 2014.

OLIVEIRA, Fabrício Rocha de. Análise histomorfométrica do reparo ósseo alveolar em ratos wistar submetidos à luz LED. [Dissertação mestrado]. Uberaba: **Universidade de Uberaba**. 2013.

PERUSSI, Janice Rodrigues. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 30, n. 4, Aug. 2007. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000400039&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000400039&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 25 Abr. 2014.

PIONHEIRO, A. L. B. et al. Biomodulative effects of polarized light on healing of cutaneous wounds on nourished and undenourished wistar rat. **Photomedicine And Laser Surgery**, 24, 5, 2006.

PIZOVA K; TOMANKOVA, K; DASKOVA, A; BINDER, S; BAJGAR, R, KOLAROVA, H. Photodynamic therapy for enhancing antitumour immunity. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.** 156(2):93-102. 2012.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Neurol. Clin.**, v.24, p.421-439, 2006.

SHIBUYA, M. Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 and Receptor-2 in Angiogenesis. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v.39, p.469-478. 2006.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, 30, 2, 351-355, 2007.

VASCONCELOS, A.B; CASTANHEIRA, P.; VARAGO, F.C.; SANTORO, M.M.; LAGARES, M.A. Determination of Optimal Glucose Concentration for Microcalorimetric Metabolic Evaluation of Equine Spermatozoa, Brazilian Arch. Biol. Tech. v.52, n. 5: p.1129-1136, 2009.

ZHOU, F.; XING, DA.; CHEN, W.R. Regulation of HSP70 on activating macrophages using PDT-induced apoptotic cells. **Int. J. Cancer**, v.125, p.1380-1389, 2009.

## ANEXO I



## Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-071/2012

Uberaba, 9 de novembro de 2012

Ilmo. Prof.

**Claudio Roberto Reis Filho**

**Assunto:** Encaminha processo nº 033/2012, sobre o protocolo de Aula Prática "Ação modulatória da terapia fotodinâmica e da fosfoetanolamina sobre o reparo ósseo".

Prezado(a) Professor(a),

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 09/11/2012, sendo considerado **aprovado**.

Atenciosamente,

*Prof. Joely F. Figueiredo Bittar*

Coordenadora do CEEA-UNIUBE