



UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOFOTÔNICA APLICADA ÀS
CIÊNCIAS DA SAÚDE

ELLEN PERIM ROSA

A ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE COM A DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA EM MODELO EXPERIMENTAL E OS EFEITOS DO
TRATAMENTO PERIODONTAL ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA
NA MODULAÇÃO DA INFLAMAÇÃO

São Paulo

2018



ELLEN PERIM ROSA

**A ASSOCIAÇÃO DA PERIODONTITE COM A DOENÇA PULMONAR
OBSTRUTIVA CRÔNICA E OS EFEITOS DO TRATAMENTO PERIODONTAL
ASSOCIADO À TERAPIA FOTODINÂMICA NA MODULAÇÃO DA
INFLAMAÇÃO PULMONAR**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho para a
obtenção do título de Mestre em
Biofotônica aplicada às Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anna Carolina
Ratto Tempestini Horliana.

São Paulo

2018

Ficha catalográfica

Rosa, Ellen Perim.

A associação da periodontite com a doença pulmonar obstrutiva crônica e os efeitos do tratamento periodontal associado à terapia fotodinâmica na modulação da inflamação pulmonar. / Ellen Perim Rosa. 2018.

64 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2018.

Orientador (a): Dr^a. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana.

1. Periodontite. 2. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. 3. PDT. 4. Terapia Fotodinâmica.

S6o Paulo, 16 de dezembro de 2018

Aluno (a): Ellen Perim Rosa

Titulo da Dissertaggo: "Influência do tratamento periodontal associado com terapia fotodin8mica em modelo experimental de Doenga Pulmonar Obstrutiva Cr6nica"

Presidente: PROF^o. DR^o. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA *Anna Carolina Ratto Horliana*

Membro: PROF^a. DR^a. ADRIANA LINO SANTOS FRANCO *Adriana Lino Santos Franco*

Membro. PROF^o DR^o PRISCILA LARCHER LONGO *Priscila Larcher Longo*

Dedicatória

Ao meu avô Luiz Perim *in memoriam*, meu maior incentivador do caminho acadêmico. Sabendo do orgulho que tinha em cada conquista, me empenhei para defender o honroso título de Mestre.

Ao meu esposo Adriano Nascimento, pois a conclusão deste mestrado só foi possível graças a ele. Abdicar dos próprios sonhos para realizar o de outra pessoa é genuinamente um ato de amor.

Agradecimentos

A gratidão é uma virtude que me permite neste momento honrar aos que colaboraram para que este trabalho fosse concluído. Esta dissertação não poderia chegar a bom porto sem o suporte de pessoas dispostas a colaborar com a pesquisa.

Agradeço primeiramente a minha orientadora Anna Carolina, que me fez percorrer esse caminho de aprendizado de um modo suave. Obrigada por me incentivar a buscar o conhecimento para que gradualmente eu me tornasse Mestre, pois sabemos que o caminho mais fácil não é aquele que agrega. Seu esforço e dedicação são louváveis e espelho para os seus alunos.

Agradeço aos amigos que adquiri ao decorrer do mestrado, nunca havia visto tamanha união, em tão pouco tempo nos tornamos “velhos amigos”. Meu amigo Felipe Murakami que esteve comigo desde o primeiro dia e em todos os momentos difíceis do modelo experimental.

Aos professores que colaboraram na co-orientação, em especial a Adriana Lino e Ana Paula Ligeiro.

A toda equipe de laboratório e biotério que esteve sempre pronta a ajudar.

Aos alunos de iniciação científica que auxiliaram na execução do projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Resumo

A influência da Periodontite em alterações sistêmicas tem sido amplamente estudada, assim como na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Os métodos convencionais de tratamento periodontal (TP) têm sido associados a adjuvantes como a terapia fotodinâmica ou photodynamic therapy (PDT), que surge como um tratamento eficiente sem efeitos colaterais e sem promover a seleção bacteriana. Desse modo, o objetivo deste estudo foi verificar a associação da periodontite com a DPOC e os efeitos do tratamento periodontal associado à PDT na modulação da inflamação pulmonar. Os camundongos C57Bl/6J foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais (n=8): Basal, Periodontite (P), P+Tratamento(T), P+T+PDT, DPOC, DPOC+P, DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT. A DPOC foi induzida pela instilação orotraqueal de 30µl de extrato de cigarro, 3 vezes/semana, 7 semanas. A periodontite foi induzida pela técnica da ligadura, permanecendo por 15 dias. A terapia periodontal foi realizada com cureta no sulco gengival do primeiro molar inferior. A PDT foi realizada através da inserção de azul de metileno (0,005%, 0,05 mg/ml), após foi irradiado o laser de diodo, com exposição radiante de 318 J/cm², λ= 660 nm, 9J por ponto, dois pontos, sessão única. A eutanásia foi realizada no 51º dia, após foram analisadas contagem total e diferencial de leucócitos no soro, no lavado femural e no lavado bronco alveolar (LBA), análise histomorfométrica de mandíbula e pulmão, avaliação dos níveis de citocinas no soro e no LBA. A análise estatística foi realizada por Anova one-way, seguida por Student-Newman-Keuls. No grupo DPOC+P percebeu-se redução nos níveis de IL-6 (p<0,001) e na contagem total de leucócitos no LBA (p<0,05), em contrapartida IL-10 apresentou aumento (p<0,001). A associação das patologias com perfil inflamatório semelhante parece favorecer um mecanismo regulatório sistêmico. Quando tratamos a periodontite com cureta e com PDT, os níveis de IL-6 tendem a se elevar nos grupos com DPOC. Concluindo, o tratamento convencional da periodontite e associado a PDT é capaz de influenciar na resposta inflamatória pulmonar e sistêmica. São necessários mais estudos para esclarecer o processo regulatório.

Palavras-chave: Periodontite, Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, PDT, terapia fotodinâmica.

Abstract

The influence of periodontitis in systemic disease has been much studied, as well as in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). Conventional methods of periodontal treatment (PT) have been associated with adjuvants such as photodynamic therapy (PDT), because it does not present bacterial resistance. Thus, the main of this study was to verify the association between periodontitis and COPD, and PT associated with PDT in the modulation of pulmonary inflammation. The C57Bl/6J mice were randomly divided into eight experimental groups (Basal, Periodontitis (P), P+Treatment (T), P+T+PDT, COPD, COPD+P, COPD+P+T and COPD+P+T+PDT). COPD was induced by orotracheal instillation of 30µl of cigarette extract, 3 times/ week, 7 weeks. Periodontitis was induced by the ligation technique, remaining for 15 days. Periodontal therapy was performed with a curette in the gingival sulcus of the lower first molar. The PDT was performed by insertion of methylene blue (0.005%, 0.05 mg / ml) after irradiation of diode laser with radiant exposure of 318 J / cm², λ = 660 nm, 9J per point, 2 points, single session. The euthanasia was performed on 51st day, then analyzed the total and differential count of leukocytes in the serum, without femoral lavage and without bronchoalveolar lavage (BAL), histomorphometric analysis of the mandible and lung, serum cytokine levels and in the LBA. The statistical analysis was done by Anova one-way, followed by Student-Newman-Keuls. The COPD+P group presented reduction of IL-6 (p<0.001) and inflammatory infiltrate in LBA (p<0.05), on the other hand, IL-10 was an increase (p <0.001). The association between the pathologies may suggest a systemic regulatory mechanism. When the treatment was done with curette and with PDT, IL-6 levels tend to increase in the COPD groups. In conclusion, the conventional treatment of periodontitis and associated PDT is capable of influencing the pulmonary and systemic inflammatory response. Further studies are needed to clarify the regulatory process.

Key words: Periodontitis, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, PDT, photodynamic therapy.

Sumário

1.	Contextualização.....	12
2.	Objetivos.....	23
	2.1 Objetivo geral.....	23
	2.2 Objetivos específico.....	23
3.	Materiais e Métodos.....	24
	3.1 Animais.....	24
	3.2 Delineamento experimental.....	24
	3.3 Indução da DPOC.....	25
	3.4 Indução da Periodontite.....	26
	3.5 Tratamento periodontal e terapia fotodinâmica.....	28
	3.6 Eutanásia dos animais	30
	3.7 Determinação do número de leucócitos e plaquetas no sangue.....	30
	3.8 Contagem de células presentes no LBA.....	31
	3.9 Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo.....	32
	3.10 Dissecção do pulmão e análise histomorfométrica.....	33
	3.11 Contagem de células presentes no Lavado Femural.....	34
	3.12 Avaliação dos níveis de citocinas.....	34
	3.13 Análise estatística.....	34
4.	Resultados.....	35
5.	Discussão.....	50
6.	Conclusão.....	55
7.	Referências.....	56
8.	Anexos.....	63
	8.1 Aprovação do CEUA.....	63

Lista de símbolos e abreviações

DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva crônica
TP	Tratamento Periodontal
PDT	Photodynamic Therapy
P	Periodontite
T	Tratamento
LBA	Lavado Bronco Alveolar
PALATINO	Projeto Latino Americano de Investigação Pulmonar
<i>Pg</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
MMP	Metaloproteínases
PG	Prostaglandinas
IL	Interleucina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral
APC	Células Apresentadoras de Antígenos
MO	Macrófagos
PMN	Polimorfonucleares
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TLRs	Toll Like
STATs	Transdutor de Sinal e Ativadores de Transcrição
SOD	Superoxido Dismutase
FS	Fotossensibilizador
HE	Hematoxilina e Eosina
FMO	Fluorescência Minus One
MFI	Mean Fluorescência Intensity
EPM	Erro Padrão de Média

Lista de figuras, tabelas e quadros

Figura 1.1. Biogeografia da colonização da microbiota dental e periodontal.....	13
Figura 1.2. Resposta Inata e Adaptativa relacionada à Periodontite.....	15
Figura 1.3. Produção de mediadores inflamatórios.....	17
Quadro 3.1. Grupos Experimentais.....	24
Figura 3.1. Fluxograma grupos com indução de Periodontite.....	25
Figura 3.2. Fluxograma grupos com indução de DPOC.....	25
Figura 3.3. Indução de DPOC.....	26
Figura 3.4. Indução de Periodontite pela Técnica da Ligadura.....	28
Quadro 3.2. Parâmetros empregados na PDT.....	29
Figura 3.5 Tratamento Periodontal Convencional e PDT.....	29
Figura 4.1. Quantificação do número total de células no LBA.....	35
Figura 4.2. Citometria de fluxo – Macrófagos.....	36
Figura 4.3. Citometria de fluxo – Neutrófilos.....	37
Figura 4.4. Citometria de fluxo – Número total de linfócitos.....	38
Figura 4.5. Citometria de fluxo – células TH8.....	39
Figura 4.6. Citometria de fluxo – células TH4.....	40
Figura 4.7. IL-6 no BAL.....	41
Figura 4.8. IL-17 no BAL.....	42
Figura 4.9. IL-10 no BAL.....	43
Figura 4.10. Contagem total de células no Lavado Femural.....	44
Figura 4.11. Leucócitos totais no sangue.....	45
Figura 4.12. Quantificação de células inflamatórias no sangue.....	46
Figura 4.13. Quantificação de plaquetas no sangue.....	47

Figura 4.14. Análise de reorganização colágena nas vias aéreas por picrossírius.....	48
--	----

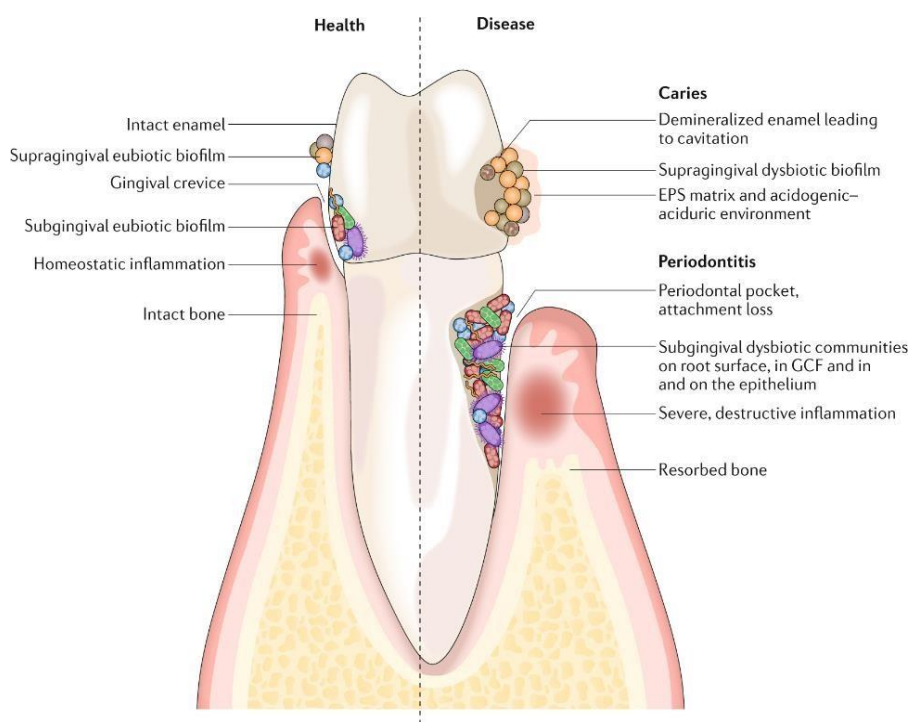
1 Contextualização

Evidências sugerem que a periodontite pode influenciar o curso de doenças sistêmicas, entre elas, a DPOC^{1,2}. Apresenta prevalência de 19% para adultos no Brasil³ sendo bastante relevante em saúde pública^{4,5}. De acordo com dados do Projeto Latino Americano de Investigação Pulmonar (PALATINO), a prevalência de DPOC no Brasil é de 15,8% em pessoas acima de quarenta anos, e apresenta elevados custos no tratamento quando comparada com outras doenças⁶. Em 1990 a DPOC ocupava a décima segunda posição na categoria de incapacidades relacionadas a doenças, mas a projeção é que até 2020 ocupe a quarta posição. Seu curso é ascendente, superando incapacidades por HIV e doenças diarreicas⁷. Nos últimos anos, muitos estudos sugeriram a associação entre doenças pulmonares e doença periodontal^{1,8,9,10}, embora não esteja clara a relação causal entre elas^{11,12,13,14,15,16}.

A periodontite é uma doença disbiótica¹⁷ caracterizada pela perda de inserção do ligamento periodontal e destruição dos tecidos ósseos e conjuntivos adjacentes¹⁸. Hoje já se sabe que as alterações inflamatórias locais são determinantes para a seleção da microbiota, e aquelas mais adaptadas a esse ambiente, foram mais prevalentes¹⁹. Diversos processos contribuem para a transição de uma comunidade microbiana equilibrada para a disbiose²⁰. Entre eles, os mais importantes são alterações na dieta e competência imunológica do hospedeiro²¹. Esses dois fatores podem influenciar o panorama metatranscricional, e aumentar virulência desses microrganismos²¹. Uma vez que uma comunidade se altera, o seu metabolismo e subprodutos da resposta imune do hospedeiro podem causar mudanças no ambiente local que facilitam o crescimento de outros microrganismos associados a um estado disbiótico²⁰. A microbiota associada à saúde é mais generalista, enquanto a microbiota associada à doença é mais especializada e possui um alto grau de virulência²². Depois que uma comunidade faz a transição a um estado disbiótico essa condição de persistir por um longo período de tempo, e doenças orais, como a

periodontite podem progredir lentamente²⁰. Inúmeros eventos inflamatórios estão envolvidos com o início e progressão da doença periodontal. Entretanto, a maior parte dos estudos sobre periodontite focam no estudo das bactérias e suas interações. São necessários mais estudos que entendam o perfil inflamatório predominante na periodontite²³ e sua influência em outras doenças sistêmicas.

Figura 1.1. Biogeografia da colonização da microbiota dental e periodontal.



Adaptado de Lamont, 2018²⁰

Figura 1.1. Biogeografia da colonização da microbiota oral nos diversos habitats da cavidade bucal. A colonização microbiana ocorre em todas as superfícies disponíveis e os microorganismos também podem penetrar nos tecidos e células epiteliais. A microbiota se agrupa em comunidades de biofilme nas superfícies abiótica e biótica. Em saúde - esquerda, os biofilmes eubióticos mantêm um equilíbrio homeostático com o hospedeiro. Na doença - direita, a cárie e a periodontite ocorrem quando os biofilmes se tornam disbióticos, resultando em níveis aumentados e duração do desafio com baixo pH e na indução de respostas inflamatórias destrutivas, respectivamente²⁰.

A doença periodontal pode se apresentar inicialmente como gengivite, em que há resposta inflamatória e um mecanismo eficaz de defesa²⁴. A evolução da doença periodontal está relacionada a fatores de virulência da bactéria e suscetibilidade individual para desenvolver a doença. Como consequência há uma destruição progressiva dos tecidos de suporte dos dentes⁴. A perda de inserção por destruição de tecido conjuntivo e a reabsorção do osso alveolar caracterizam a periodontite, distinguindo da gengivite²⁵. Na periodontite temos duas respostas à presença de microorganismos acontecendo de modo intrinsecamente relacionados: a resposta inata ou inflamatória e a adaptativa ou humoral²³.

Na resposta inflamatória da periodontite a presença de bactérias e toxinas estimulam a ativação de neutrófilos, que liberam metaloproteinases (MMP), responsáveis pela destruição de colágeno. Monócitos promovem a liberação de prostaglandinas (Pg), especialmente a PGE₂, que estimulam a produção de interleucina 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tecidual (TNF- α). Por sua vez essas citocinas foram responsáveis por estimular os osteoclastos que promove reabsorção óssea^{9,25}. Já a resposta adaptativa na periodontite acontece à medida que há progressão da resposta inflamatória, sendo considerada um processo crônico²⁵.

Ainda a respeito do sistema imunológico regulatório, os linfócitos T helper que exibem perfil Th1 - celular, têm sido associados à fase inicial da periodontite e as células T helper com perfil modificado para Th2 - humoral, são associadas com a progressão da doença²³. O perfil que a célula irá assumir determinará a especificidade das citocinas presentes, contudo, ainda é difícil estabelecer o mecanismo exato da atuação dos linfócitos T na periodontite²³ por isso são necessários mais estudos nessa área.

Figura 1.2. Resposta Inata e Adaptativa relacionada à Periodontite

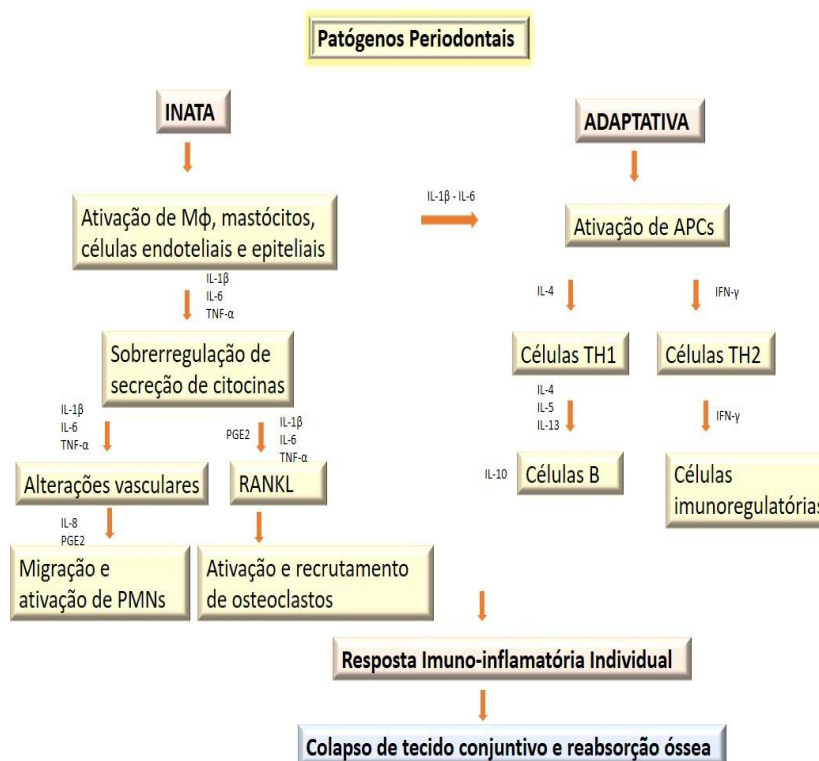


Figura 1.2 - Os patógenos periodontais estimulam a resposta inflamatórias inata e adaptativa . Na resposta inata há recrutamento de células que liberam citocinas pró inflamatórias responsáveis pelo aumento da vasoconstrição e migração de mais polimorfonucleares, e ativação do mecanismo RANK/RANKL. Quanto à resposta adaptativa a ativação de células apresentadoras de antígenos por LPS bacterianos ativam a produção de linfócitos T helper que exibem perfil Th1 - celular - $INT\gamma$ e ativação e células imunoregulatórias e Th2 com a produção de citocinas IL4, IL5 e IL13 para ativação de linfócitos B e produção de anticorpos. APC – células apresentadoras de antígenos, TH1 linfócitos T helper com perfil de liberação de citocinas Th1, Mo – macrófagos, RANKL- ligante regulador da osteoclastogênese, PMN- polimorfonuclear Fonte: Própria

Este processo imuno-inflamatório ou imuno-regulatório da periodontite tem sido considerado como fator influenciador de outras doenças sistêmicas^{2,26,27,28}. A associação da periodontite com doenças pulmonares tem sido cada vez mais frequentes⁹ entretanto os agentes etiológicos da periodontite podem não apresentar uma relação causal exclusiva com afecções pulmonares^{12,13,15,16} como a DPOC. Não se acredita que esses processos sejam unicamente responsáveis por gerar uma infecção pulmonar²⁶, mas é possível que possam influenciá-la^{29,30}.

Sabe-se que o cigarro e seus componentes associados é um fator de risco comum para o desenvolvimento de periodontite e da DPOC^{29,31,32}. Até 2020 é esperado que o tabaco cause mais mortes prematuras e deficiências que qualquer outra doença isolada⁷.

Quando se fala em DPOC considera-se uma patologia heterogênea^{33,34}. A DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo, em geral progressiva independentemente do tratamento instituído, com manifestações respiratórias e sistêmicas³⁵. Ela está associada a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões à exposição e inalação de partículas ou gases nocivos, a queima de biomassa e a poeira tóxica da mineração³⁵.

A DPOC é determinada pela presença de duas patologias: bronquite crônica e enfisema pulmonar. O enfisema apresenta características patológicas mais expressivas na DPOC³⁶. É resultante da distensão do espaço aéreo do bronquíolo respiratório e da destruição do septo alveolar. Já a bronquite crônica é resultante da irritação brônquica, havendo o aumento na proporção de células secretoras de muco no epitélio das vias aéreas¹ cujos sintomas e o risco de desenvolver não são mandatórios, ou seja, o paciente pode ser tabagista ou não³⁷. Os sinais e sintomas clínicos correspondem a tosse crônica, dispneia (principalmente em atividade), sibilância e aperto sobre o peito. Esses indivíduos apresentam maior susceptibilidade em desenvolver infecções respiratórias, incluindo resfriados, influenza e pneumonia²⁹.

Em 2001, a Global Initiative on Obstructive Lung Disease considerou que a DPOC estaria envolvida com uma resposta inflamatória anormal. Contudo, a importância de diferentes células envolvidas na DPOC ainda não é clara, deste modo considera-se necessário desenvolver estudos sobre a resposta inflamatória na DPOC, tanto para aqueles indivíduos fumantes, quanto para aqueles não fumantes. Também tem-se estudado o fator genético da deficiência de α 1-antitripsina, que facilita o desenvolvimento de DPOC³⁸.

Sabe-se que na presença de fumaça de cigarro e outros irritantes, células residentes, como macrófagos, células epiteliais e dendríticas recrutam outras células inflamatórias sanguíneas, como os neutrófilos, monócitos e linfócitos T (CD8+). Estas células então liberam mediadores pro inflamatórios, nas pequenas vias aéreas e parênquima. A destruição do parênquima e a hipersecreção de muco variam de acordo com o indivíduo e o estágio da doença³⁹. A inflamação pulmonar na DPOC pode persistir mesmo após a cessação do tabagismo. Além das células inflamatórias, há a presença de

mediadores inflamatórios, como o $\text{TNF}\alpha$, IL-1 e IL-6, espécies reativas de oxigênio (ROS) e também proteases, essa última associada aos neutrófilos. A produção dos mediadores inflamatórios é desencadeada pela ativação de receptores Toll like (TLRs) e receptores de antígenos que sinalizam por via intracelular, através do NF- κ B e dos transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), levando à liberação do mediador inflamatório³⁴. O processo inflamatório, a proteólise e o estresse oxidativo são característicos da patogênese da DPOC⁴⁰.

Figura 1.3. Produção de mediadores inflamatórios

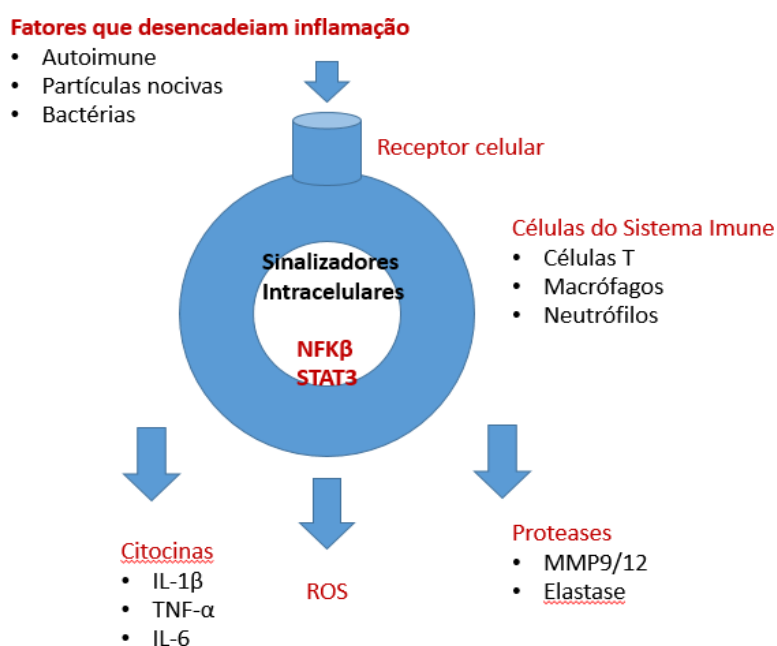


Figura 1.3 - A figura mostra o provável mecanismo de ação para subjacente à DPOC. Ativados pelos fatores que desencadeiam a inflamação, os receptores intracelulares das células do sistema imune produzem citocinas, proteases e ROS, intensificando o processo inflamatório. Células T – linfócitos T, NF κ B - factor nuclear kappa B, STAT3 – fator de transcrição que controla processos celulares como a proliferação e a sobrevivência, IL1 β – interleucina1 β , TNF- α - fator de necrose tumoral alfa- citocina pro inflamatória secretada principalmente por macrófagos. IL-6, ROS – espécies reativas de oxigênio, MMP9 e MMP12 – metaloproteinases conhecidas também como gelatinase e elastase respectivamente. Fonte: Adaptado de King, T. *et al*, 2015³⁴.

As citocinas desempenham um papel importante no processo da patobiologia da DPOC, sobretudo aquelas com perfil pró-inflamatório, como $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-17⁴¹.

O processo de DPOC envolve a resposta imuno-inflamatória inata e adaptativa, estando mais relacionada às pequenas vias aéreas⁴². A apoptose no septo alveolar é expressiva⁴³, há aumento de neutrófilos e macrófagos, bem como aumento na concentração de IL-6 e Superóxido Dismutase (SOD)³⁶.

O estresse oxidativo está presente na patogênese da DPOC. Quando os antioxidantes residentes são incapazes de neutralizar os oxidantes do processo inflamatório, há a presença do estresse oxidativo³⁶. A DPOC está associada a diversos processos sistêmicos além do estresse oxidativo. A inflamação pulmonar está relacionada à sistêmica, bem como aos efeitos extrapulmonares da DPOC^{34,44}. A inflamação e co-morbidades da DPOC poderiam ocasionar alterações como doença arterial coronariana e câncer de pulmão. Sugere-se, porém, que uma grande quantidade de mediadores químicos antiinflamatórios presentes na DPOC, teriam efeito benéfico para o equilíbrio dessas co-morbidades³⁴. Portanto a DPOC e suas co-morbidades deveriam ser mais estudadas.

Com relação à saúde oral, diversos estudos afirmam que a DPOC e a periodontite são patologias que podem estar associadas¹³. Patógenos periodontais e mecanismos inflamatórios presentes na periodontite seriam capazes de exacerbar a inflamação por DPOC^{5,45} ou influenciar o curso de patologias pulmonares². A fim de relacionar a DPOC e a periodontite, são sugeridas algumas hipóteses centrais sobre os mecanismos de associação: 1. a via hematogênica, no qual periodontopatógenos acessam a circulação após ultrapassar o epitélio juncional inflamado em procedimentos do dia a dia, como passagem de fio dental ou escovação⁴⁶ ou após procedimentos odontológicos⁴⁷. 2. a secreção orofaríngea pode ser aspirada a partir das vias respiratórias^{1,48}. 3. a ação à distância de mediadores inflamatórios e / ou complexos imunes de tecidos periodontais infectados¹³. Outro ainda possível mecanismo ligando periodontite às doenças inflamatórias sistêmicas seria a alteração do microbioma intestinal pela alta carga de periodontopatógenos ingeridos por via oral em longo prazo⁴⁹. Com base nessa hipótese, indivíduos com doenças periodontais crônicas acabariam por estabelecer um microbioma intestinal alterado, o que comumente é observado em indivíduos afetados por doenças inflamatórias sistêmicas⁴⁹.

Microrganismos causadores de periodontite podem ser encontrados no aspirado traqueal de pacientes com DPOC⁴⁵. Mas um estudo que trata da atividade inflamatória na DPOC, aponta correlação negativa entre IL-8 e MMP9 presente na saliva e a função pulmonar na DPOC, ressaltando que há correlação positiva de MMPs e IL-8 com a doença periodontal - avaliada pelo sangramento gengival de não fumantes⁵⁰. A DPOC e a periodontite compartilham de fisiopatologias muito semelhantes, havendo destruição tecidual local à medida que a inflamação progride. Como dito, neutrófilos e proteases são cruciais na resposta inflamatória nestas patologias, mas como resposta bidirecional podem causar o colapso tecidual⁵¹. Nesta associação complexa, além de neutrófilos, temos diversos tipos celulares envolvidos, como células CD8+ e macrófagos^{51,52}. Mecanismos como o sistema protease/ anti-protease e a regulação do sistema redox são comuns em ambas patologias⁵¹.

Estudos relacionam a saúde periodontal à gravidade da DPOC. Sabe-se que em presença de periodontite, um grande número de citocinas inflamatórias e células periféricas mononucleares são liberados continuamente, desencadeando um processo inflamatório acentuado, que seria capaz de gerar maior severidade no quadro clínico da DPOC^{1,29,32}. Na hipótese de exacerbação, mediadores químicos pró-inflamatórios presentes na periodontite podem servir como um estímulo adicional para a inflamação na DPOC e essa cascata inflamatória poderia ocasionar a degradação prévia da via aérea. Há a hipótese de que a co-existência das duas patologias seja facilitada por uma suscetibilidade genética inflamatória³².

Um estudo realizado em 2012⁵³, inicialmente trabalhou com a hipótese da periodontite ser um fator de risco para DPOC. Como resultado observou que as exacerbações respiratórias ocorriam independente da elevação dos títulos de anticorpos (IgG) contra *Pg*. Clinicamente, a periodontite crônica já demonstrou ser mais prevalente em pacientes portadores de DPOC com maior grau de severidade. O nível clínico de inserção ≥ 4 mm em periodontite é significativamente associada com casos de DPOC severa³². A perda de inserção (PI) ≥ 4 mm também estaria relacionada a uma maior proliferação bacteriana⁵⁴. Numa metanálise de 2003 sobre a associação da DPOC e outras patologias pulmonares com a periodontite, o risco de desenvolver DPOC

segundo a inserção periodontal foi maior para indivíduos com $PI \geq 2\text{mm}$, quando comparados aos indivíduos saudáveis. A função pulmonar pareceu reduzir a medida que PI aumentou¹⁴. Já um estudo observacional afirma que indivíduos com DPOC teriam uma maior probabilidade de desenvolver periodontite que a população geral⁵². Para entender melhor essa correlação, são necessários estudos que avaliem o mecanismo de ação subjacente a essas duas doenças.

Considerando que a presença de periodontite seja um fator agravante para DPOC^{31,55} e que a severidade da periodontite teria impacto na qualidade de vida do paciente com DPOC²⁹, o TP tem sido considerado um modo de reduzir as exacerbações nas doenças pulmonares, tais como a DPOC e a bronquiectasia. Espera-se melhora da função pulmonar e qualidade de vida nos pacientes que recebem o TP⁵⁶.

O tratamento convencional para periodontite é realizado através do uso de curetas para raspagem e alisamento corono-radicular, com a finalidade de eliminar os microrganismos presentes no cálculo e biofilme⁵⁷. A remoção mecânica de biofilme é o padrão ouro no tratamento da periodontite. Entretanto possui remoção prejudicada nas áreas de difícil acesso como furcas e defeitos ósseos. A redução de microrganismos utilizando desinfetantes bactericidas/bacteriostáticos e antibióticos tem vários efeitos colaterais, entre eles selecionar a resistência bacteriana. Ultimamente vem sendo testado um tratamento antimicrobiano para periodontite, a PDT, que consiste no uso de lasers de baixa potência com comprimento de onda apropriado e um agente fotossensibilizador (FS)⁵⁸. A PDT corresponde a uma terapia efetiva na substituição dos antimicrobianos convencionais, por não apresentar resistência bacteriana e efeitos colaterais, preservar a microbiota oral e baixa toxicidade⁵⁹. A PDT utiliza três elementos principais, um FS, a luz e o oxigênio⁶⁰. Como resultado dessa interação são geradas espécies reativas de oxigênio, capazes de destruir células microbianas anaeróbias e microaerófilas⁶¹.

O FS tem a propriedade de acumulação seletiva, tanto em tecidos normais, quanto infectados, ele é capaz de penetrar em tecidos danificados e mortos sem desenvolver resistência⁶². Na odontologia há diversos estudos

relacionados a sua aplicação em periodontia e endodontia, utilizando como corante as fenotiazinas⁶³. O FS é composto de moléculas catiônicas que possuem baixo peso molecular, quando inserido numa bolsa periodontal tem a capacidade de ligar-se rapidamente às bactérias locais⁵⁷. O azul de metileno é o FS mais utilizado^{64,65,66}, sobretudo no Brasil, visto que até o momento, é o único que possui a aprovação da ANVISA. Para oferecer o efeito antimicrobiano, o corante é associado a uma luz (laser de baixa potência), estabelecendo um efeito fotoquímico, que ocorre devido a presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. Então há uma fotorregulação no organismo, mudando a atividade funcional e metabólica da célula irradiada⁶⁷. O azul de metileno possui absorção no comprimento de onda de 600 a 660nm, sendo o espectro adequado, onde há a janela terapêutica⁶⁸. As moléculas de oxigênio do FS quando se encontram em estado excitado a partir da irradiação de luz, originam as espécies reativas de oxigênio, tal qual o oxigênio singlete, que é capaz de ocasionar a morte bacteriana seletiva⁵⁷. Por fim, o oxigênio completa essa tríade de elementos fundamentais na PDT. O uso conjunto do TP e da PDT, tem sido considerado eficaz. A PDT, como método auxiliar no tratamento de periodontite, tem relevância como técnica antimicrobiana, eliminando bactérias periodontopatogênicas, capaz de reduzir o uso de antibióticos em alguns casos,^{58,61,69}. A janela terapêutica da PDT é eficaz na erradicação de colônias ou biofilme, no caso da periodontite, ela pode intensificar os resultados do tratamento mecânico convencional^{62,70}. A regularidade no acompanhamento com o cirurgião dentista, permite que os pacientes conheçam a possibilidade da periodontite influenciar na DPOC, de modo que a educação para higiene oral seria uma ferramenta positiva de tratamento e prevenção de agravo^{71,14}. Um estudo coorte retrospectivo, com dados obtidos dos anos 2000 a 2006, sugere que realizar o tratamento periodontal resultaria em menor risco no desenvolvimento de eventos respiratórios adversos e exacerbações na DPOC, dessa forma, haveria redução de hospitalizações, do uso de serviços de emergência e sobretudo na mortalidade por complicações respiratórias secundárias a DPOC. O estudo apontou que o grupo tratado para periodontite apresentou um risco de morte avaliado em 37%, menor que no grupo não tratado⁵². Considerando que ambas patologias representam agravos em saúde pública, que tem como resultado o

aumento de morbimortalidade, é relevante que sejam realizados estudos intervencionistas que elucidem a associação entre as patologias e a influência do tratamento na modulação da inflamação pulmonar. Bem como o aperfeiçoamento destes métodos de tratamento convencionais e adjuvantes para periodontite, reduzindo efeitos adversos de terapias antimicrobianas medicamentosas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar a associação da periodontite com a DPOC em modelo experimental e os efeitos do tratamento periodontal associado à terapia fotodinâmica na modulação da inflamação pulmonar.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a contagem total e diferencial das células inflamatórias no LBA por citometria de fluxo
- Quantificar o padrão inflamatório através das citocinas com perfil Th1 e Th2 no LBA.
- Verificar a contagem total das células inflamatórias no lavado femural
- Verificar a contagem total e diferencial das células inflamatórias no sangue
- Contagem de plaquetas no sangue
- Avaliar histomorfologicamente a via aérea terminal

3. Materiais e Métodos

O presente estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA), bem como com as normas do Conselho Canadense de cuidados com animais (1993) e do Congresso Nacional Brasileiro (1995). Submetido ao Comitê de Ética em animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), com o número do Ceua: AN021/ 2017, aprovado no dia 05/12/2017.

3.1. Animais

Os camundongos (C57Bl/6) foram obtidos no CEMIB (UNICAMP) e acondicionados no biotério da Universidade Nove de Julho, em caixas plásticas apropriadas, sob temperatura mínima de 22°C e máxima de 25°C, com luminosidade controlada em ciclos de 12 horas, alternando entre claro e escuro, com ventilação controlada artificialmente e umidade relativa de 50-60%. Foi utilizada ração para camundongos (NUTRILAB®) e água *ad libitum*. Foram incluídos 64 camundongos (C57Bl/6J) machos, adultos, com peso aproximado de 20g e considerados saudáveis. Os animais foram manipulados três vezes antes do início do experimento, para ambientação e pesagem.

3.2. Delineamento experimental

Quadro 3.1. Grupos Experimentais

Grupo (n=8)	Descrição
Basal	Sem indução da doença
P	Indução de periodontite
P+TP	Indução de periodontite + Tratamento periodontal padrão
P+TP+PDT	Indução de periodontite + Tratamento periodontal padrão + Terapia Fotodinâmica
DPOC	Indução de DPOC
DPOC+P	Indução de DPOC + Indução de periodontite
DPOC+P+TP	Indução de DPOC + Indução de periodontite + Tratamento periodontal padrão
DPOC+P+TP+PDT	Indução de DPOC + Indução de periodontite + Tratamento periodontal padrão + Terapia Fotodinâmica

Figura 3.1- Fluxograma dos grupos com indução de Periodontite

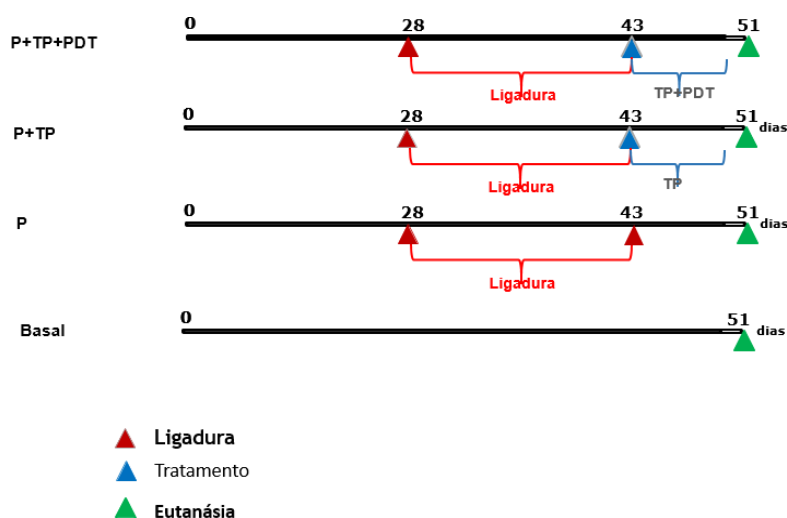
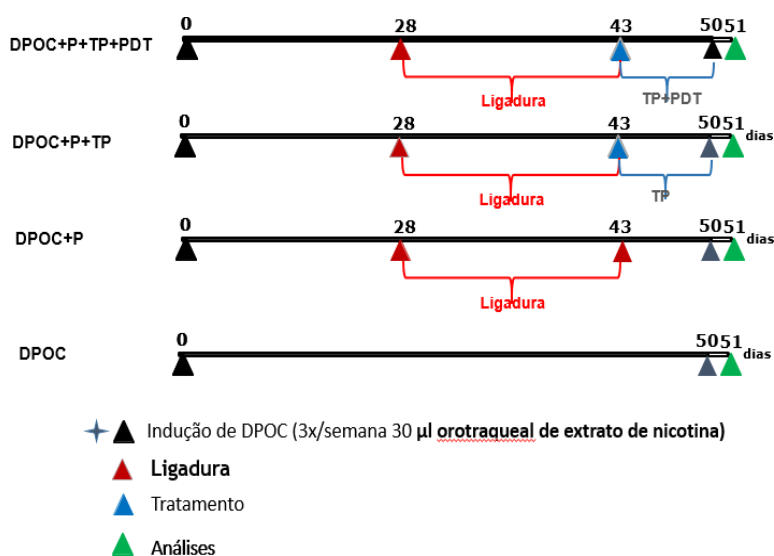


Figura 3.2 - Fluxograma dos grupos com indução de DPOC



3.3. Indução de DPOC

No modelo proposto neste estudo, o extrato de fumaça de cigarro (alcatrão 10,0 mg, nicotina 1,10 mg e monóxido de carbono 9 mg) foi conseguido através de um sistema a vácuo manual, utilizando uma seringa adaptada a uma das 3 vias de uma torneira para infusão de medicamento, na outra via foi adaptado o cigarro e na terceira via acoplou-se uma mangueira que foi inserida a um copo coletor. No copo coletor era dispensada a fumaça aspirada de 1 cigarro pela seringa, que foi homogeneizada em 4ml de água

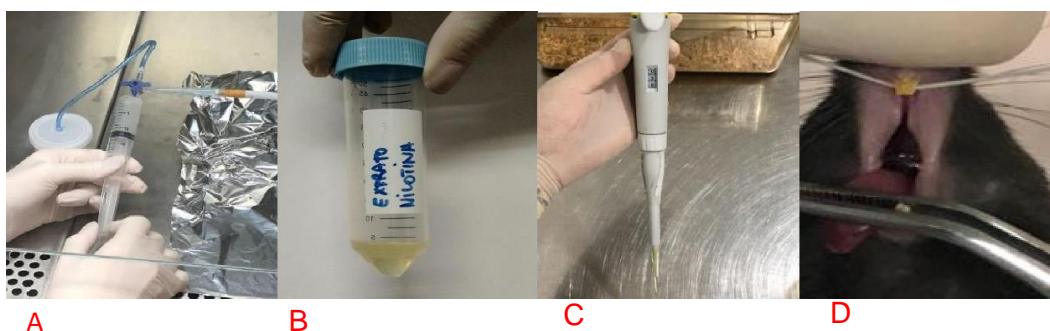
destilada até sua completa dissolução. O preparo era realizado no mesmo dia da indução orotraqueal, em uma capela. A indução de DPOC nos camundongos ocorria posteriormente a anestesia.

- Preparo do anestésico: Ketamina 750 μ l, Xilazina 500 μ l, diluídas em 3.750 μ l de PBS.

- Administração: Ultrafine Seringa de Insulina[®], agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, Ketamina 10% (0,08ml/100g) e xilazina 2% (0,06ml/100g).

Para a indução da DPOC o camundongo era suspenso pelos incisivos centrais em um fio de algodão fixado a duas hastes metálicas. Então a língua era deslocada para a direita com uma pinça e com auxílio de uma pipeta instilado por via orotraqueal 30 μ l de extrato de cigarro. Tampava-se o nariz para que aspirasse todo o líquido e aguardava-se o camundongo retomar a respiração usual (sem ruídos) para acomodá-lo em sua caixa novamente.

Figura 3.3. Técnica de indução de DPOC



A. Material para preparo do extrato de nicotina. B. Extrato de Cigarro. C. Pipeta regulada a 30 μ l para instilação orotraqueal. D. Instilação orotraqueal. Fonte: Própria

3.4. Indução da Periodontite pela técnica da ligadura

Para indução da periodontite os camundongos foram submetidos à anestesia nos seguintes parâmetros:

- Preparo do anestésico: Ketamina 750 µl, Xilazina 500 µl, diluídas em 3.750µl de PBS (armazenado em geladeira).
- Administração: Administração: Ultrafine Seringa de Insulina®, agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, Ketamina 10% (0,08ml/100g) e xilazina 2% (0,06ml/100g).

Para a técnica da ligadura em molar inferior esquerdo foram utilizados materiais desenvolvidos para a pesquisa. Dois suportes metálicos serviram de pilares para a linha de algodão que foi utilizada para envolver os incisivos centrais superiores do camundongo, a mandíbula foi apoiada em um suporte plano, a língua foi deslocada a direita com afastador desenvolvido para o estudo e o espaço interproximal entre primeiro e segundo molar foi inspecionado com limas tipo K, em tamanhos #20 e #25. A ligadura foi realizada com fio agulhado oftalmológico 6-0 de nylon, cuja agulha foi descartada antes do início da técnica. O fio foi apreendido por dois portagulhas curvos adaptados e inserido entre o primeiro e o segundo molar inferior esquerdo até o sulco gengival, em seguida o primeiro molar foi envolvido pelo fio e foram realizados dois nós cirúrgicos voltados para a vestibular. Foi realizado condicionamento com ácido fosfórico 37%, utilizando uma sonda Carolina do Norte para inserção, foi inserido o adesivo utilizando micro-brush, então o adesivo foi fotopolimerizador e por fim foi inserida uma porção de resina composta com auxílio da sonda Carolina do Norte, essa resina foi fotopolimerizada³⁰.

Os animais foram observados durante os 15 dias que sucederam, quanto alimentação, hidratação, peso, presença da ligadura e evolução da doença periodontal.

Figura 3.4 - Técnica da Ligadura



Técnica da ligadura e os seus principais passos: (A) Materiais preparados para indução da técnica (B) inserção da lima para conseguir espaço entre os molares (C) Ligadura em posição (D) Resultado final .
Fonte: Própria

3.5. Tratamento Periodontal com cureta e PDT

Para realizar o tratamento, a anestesia empregada corresponde aos seguintes parâmetros:

- Preparo do anestésico: Ketamina 750 µl, Xilazina 500 µl, diluídas em 3.750µl de PBS.
- Administração: 0,06ml, Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (porção interna).

De acordo com os grupos delineados no estudo, as seguintes terapias foram empregadas: A terapia periodontal convencional foi realizada com cureta mini-five em todo sulco gengival do molar que recebeu a ligadura, nos camundongos do grupo P+TTO e DPOC+P+TTO, com finalidade de raspagem e alisamento corono-radicular. Após anestesiados os camundongos permanecem fixos as duas hastes metálicas pelos incisivos superiores e a mandíbula apoiada em superfície, a cureta é inserida ao redor da face vestibular e palatina, repetindo 10 vezes o mesmo ciclo.

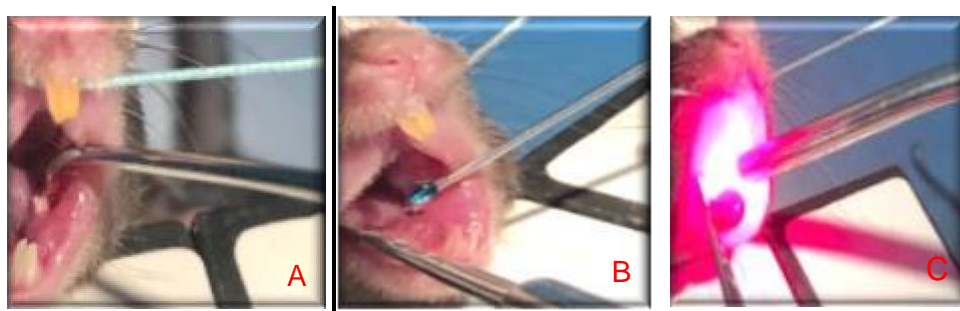
A terapia fotodinâmica foi sempre realizada após o tratamento periodontal convencional com curetas, nos grupos P+TTO+PDT e DPOC+P+TTO+PDT. Foi realizada através da inserção de azul de metileno 0,005%, 0,05 mg/ml, Chimiolux 5, DMC® no sulco gengival, com auxílio de agulha sem bisel. Após aguardar o tempo de inserção segundo o fabricante, foi

irradiado o laser de diodo, cujos parâmetros são citados abaixo. Após irradiação a área recebeu lavagem com soro fisiológico em abundância³⁰.

Quadro 3.2. Parâmetros empregados na PDT

Parâmetros	
Comprimento de onda [nm]	660
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência [mW]	100
Area do feixe [cm ²]	0,02827
Tempo de exposição [s]	90
Irradiância [W/cm ²]	3,5
Exposição radiante [J/cm ²]	318
Energia radiante [J]	9
Número de pontos irradiados	2
Locais de aplicação	Face vestibular e face lingual
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	Sessão única
Energia total irradiada [J]	18
Fotosensibilizador	Azul de metileno (0,005%)

Figura 3.5. Tratamento Periodontal Convencional e PDT



Tratamento Periodontal Convencional e PDT A figura mostra (a) o tratamento periodontal convencional com curetas mini Five (b) inserção de azul de metileno 0,05% na bolsa periodontal, (c) irradiação com laser $\lambda=660\text{nm}\pm 10\text{nm}$ na região de tratamento. Fonte: Própria

3.6. Eutanásia dos Animais

Todos os animais foram eutanasiados no 51º dia, 21 dias após a indução da doença periodontal. Utilizando overdose de anestésico – Ketamina e Xilazina.

- Administração: Xilazina 2% (0,06ml/100g) + Ketamina 10% (0,08ml/100g), Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna).

Então foram realizados exanguinação por meio da aorta abdominal, coleta de sangue da cauda para contagem diferencial das células sanguíneas, coleta LBA com acesso pela traqueia, dissecação e fixação de pulmões em formol 10% para análise histomorfométrica, dissecação do fêmur para obtenção de lavado femoral, dissecação de hemi-mandíbula e da gengiva.

3.7. Determinação do número de leucócitos e plaquetas circulantes no sangue periférico

A cauda do animal foi cortada para obtenção de 20 microlitros de sangue em que foi feito o esfregaço para a contagem diferencial de células do sangue.

A quantificação das células do sangue foi feita através dos seguintes métodos:

- Contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer (Solução de Turk): Foi coletado 20 microlitros de sangue e o mesmo foi diluído em 380 microlitros da Solução de Turk, (Diluição 1:20). Então foi fixada a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preenchida com o sangue diluído, assim, foi contado o número de leucócitos presentes nos 4 quadrantes externos a cruz central, e multiplicado o valor total encontrado por 50.

Cada quadrante possui uma área de 0,1 cm, 4 quadrantes = 0,4 cm, logo, 0,4 cm / 20 (fator de diluição) = 50

- Contagem diferencial de leucócitos: Após a confecção do esfregaço sanguíneo (foi retirada uma gota da cauda do animal - 20 microlitros) e

adicionada uma lâmina extensora e ao se difundir pela sua borda inferior inclinar a 45 graus e realizar o esfregaço. O mesmo foi corado utilizando Metanol (fixador, lâmina submersa por 5 min), Eosina (corante, lâmina submersa por 30 segundos) e Azul de Metileno (corante, lâmina submersa por 60 segundos), feito isso foi realizado a contagem diferencial de Neutrófilos, Linfócitos, Monócitos e Eosinófilos.

- Contagem global de plaquetas utilizando o método de fônio: Foi primeiro determinado a quantidade total de hemácias através da câmara de Neubauer (método hemocitômetro em câmara de Neubauer) utilizando 3980 microlitros da solução de Hayem (Cloreto mercúrico 0,25 g, Sulfato de sódio 2,50 g, Cloreto de sódio 0,50 g, Água destilada 100.0ml) e 20 microlitros de sangue (diluição de 1:200). Então foi fixado a lamínula sobre a câmara de Neubauer e preenchida com o sangue diluído, assim, foi contado o número de hemácias presentes nos 5 quadrantes (5 quadrantes na porção central da cruz da câmara de Neubauer), e multiplicado o valor total encontrado por 10,000. Esta contagem é realizada apenas para possibilitar a contagem de plaquetas.

3.8. Contagem de células presentes no LBA

As células mononucleares e polimorfonucleares presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela técnica descrita por Lima et al.1992. Após realizar o exanguinamento da veia cava inferior foi iniciado o procedimento para coleta do lavado. Foi feita incisão longitudinal na região cervico-ventral e a traqueia foi exposta e canulada (Cateter intravenoso 18 G verde Descarpack®, São Paulo, Brasil). Acoplou-se a cânula a uma seringa pela qual foi realizada a lavagem do espaço alveolar em etapas, injetando-se lentamente um volume de 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS) seguindo da aspiração do mesmo conteúdo, acompanhado de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes até que fosse recuperado um volume de 1,5 ml. O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Para análise das citocinas o sobrenadante foi vertido em outro tubo de microcentrifugação e armazenado a -80°C, pelo método de ELISA foram avaliadas as citocinas inflamatórias e reguladoras. O botão de células foi

ressuspendido em 1ml de PBS e utilizado para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. Noventa microlitros da amostra foram adicionados ao corante cristal violeta (10 microlitros). Com o auxílio da câmara de Neubauer obteve-se a contagem total das células do LBA, ajustada para concentração de 1×10^4 . Foi deixado reservado em -20°C para posterior contagem em um prazo de até 1 semana. O lavado foi colocado em tubos de ensaio (250 microlitros) para citometria. Foram feitos 2 tubos de 250 microlitros para cada animal pois um deles seria o controle.

3.9. Aquisição e análise das amostras por citometria de fluxo

Antes da aquisição das amostras, foi realizada limpeza automática com FACsClean (hipoclorito de sódio 1%), água destilada e deionizada para eliminar partículas e contaminantes. Para monitorar o desempenho de detecção de fluorescência e lasers do equipamento, foi utilizado o reagente Rainbow (Catálogo: 556291; Sphero™) e Calibrate Beads (beads não marcadas para ajustar a voltagem das autofluorescências das mesmas (Negative Control ; Catálogo: 51-90-9001291 ; BD) e beads marcadas para os 4 fluorocromos utilizados no painel de anticorpos do estudo para alinhamento dos fotomultiplicadores (detectores) de fluorescência (Anti-Rat Ig,K; Catálogo: 51-90-9001189;BD).

Além disso, também utilizamos o controle para os anticorpos monoclonais FMO (*Fluorescência Minus One*), para excluir a autofluorescência causada pelos fluorocromos conjugados aos anticorpos nos ensaios que poderiam causar autofluorescência inespecífica e consequentemente interferir nos canais de detecção de outros fluorocromos. A leitura da amostra foi realizada no citômetro FacsCanto I, software FacsDiva (BD becton Dickson, EUA) ajustado para 20.000 eventos a serem adquiridos.

A partir de então, foi construído um gráfico de pontos (dot plot) bidimensional onde foram analisados os parâmetros de tamanho (FSC) e

granulosidade (SSC), em escala linear e outro gráfico para marcação de células com os anticorpos monoclonais específicos: anti-CD11b e anti-CD8 marcado com o fluorocromo FITC (Isotiocianato de fluoresceína), anti-CD4 marcado com o fluorocromo APC (aloficocianina), anti-Ly6G marcado com o fluorocromo PE (ficoeritrina) e anti-CD3 marcado com PERCP Cy5.5 (Peridin – chlorophyll Cianina 5.5).

Feita a padronização e controle de qualidade, imediatamente após a coleta do lavado realizamos a marcação de todos os monoclonais conjugados aos fluorocromos, conforme descrito acima, os tubos foram incubados por 15 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 2 mL de solução de PBS e centrifugados a 2.500 G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram agitados para desprender as células e foi adicionado 200 uL de PBS com 0,1% de azida sódica. A leitura foi realizada no Citômetro de fluxo através do software FacsDiva. As expressões dos anticorpos foram apresentadas pela média de intensidade de fluorescência (*mean fluorescence intensity* - MFI) desta forma, quanto maior for a MFI, maior é a expressão deste anticorpo.

3.10. Dissecção do pulmão e análise histomorfométrica

As amostras do tecido pulmonar foram armazenadas em formalina 10%. Para análise histomorfométrica foi acessada a cavidade torácica com uma primeira perfuração e cortada a parte anterior da cavidade torácica. Sem cortar o coração foram separados os lobos dos pulmões: para análises posteriores. O pulmão esquerdo foi guardado para histologia. Para análise histomorfológica as laminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) (resultados não apresentados) e *picrossírius* (reorganização de fibras colágenas).

Para análise fotográfica das lâminas foi utilizado o microscópio Olympus BX43 e o programa Cellscens Standard, a reorganização colágena foi analisada pelo software Image J pró plus versão 7.0.

3.11. Contagem de células presentes no Lavado Femural

Células da medula óssea foram obtidas a partir da lavagem da cavidade femural. O fêmur esquerdo foi exposto e retirado e com o auxílio de uma pinça e uma tesoura e foi mantido sobre uma gaze e dissecado com holeback e gaze. Em seguida o canal medular foi perfundido com PBS (1 ml) utilizando uma seringa plástica de insulina com ponta. A suspensão medular obtida foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta e centrifugada a 1.500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1ml de PBS.

Noventa microlitros do botão ressuspendido e homogeneizado foi adicionado ao corante cristal violeta (10 microlitros). Foi armazenado por um período máximo de 1 semana. Com o auxílio da câmara de Neubauer obteve-se a contagem total das células da medula femural, ajustada para concentração de 1×10^4 , foi armazenado em -20C. Foi adicionado 100 microlitros na câmara de Newbaueer e contado em um microscópio Nikon Eclipse E 200, aumento de 40x.

3.12. Avaliação dos níveis de citocinas

As citocinas (IL-6, IL-10, IL-17) foram analisadas no sobrenadante do LBA, através do método ELISA, e suas etapas foram realizadas conforme instrução do fabricante, kit Biolegend.

3.13. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste Student Newman-Keuls para comparação entre colunas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Software V.5.01. Os resultados foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Valores de p foram fixados em 0,05.

4. Resultados

Figura 4.1. Quantificação do número total de células recuperadas do LBA

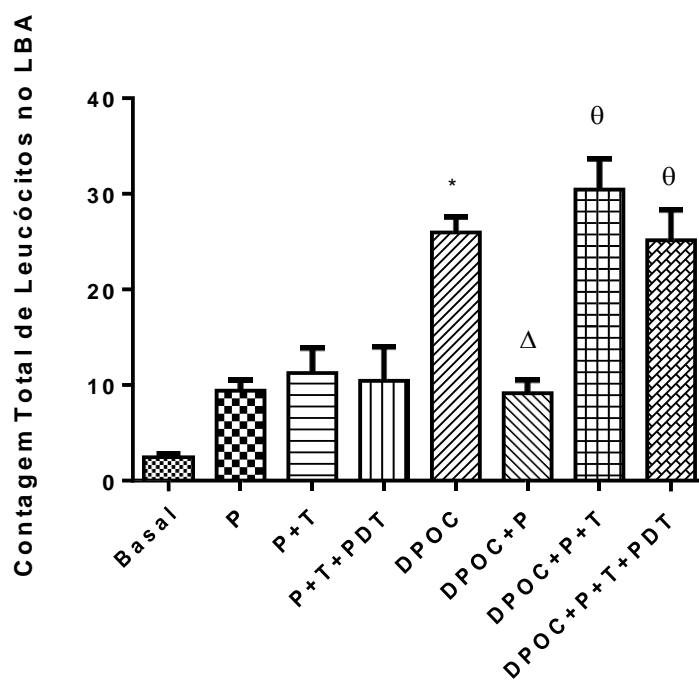


Figura 4.1. Quantificação do número total de células recuperadas do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ DPOC em relação ao grupo Basal, Δ $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao DPOC+P, θ $p < 0,05$ grupo DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC+P, θ $p < 0,05$ grupo DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC+P.

Ao avaliar a contagem total de células imuno-inflamatórias presentes no LBA ($\times 10^4/\text{ml}$), percebe-se que no grupo DPOC houve um aumento quando comparado ao grupo Basal ($p < 0,05$). A associação das patologias DPOC e periodontite apresentou menor concentração de células imuno-inflamatórias no LBA ($p < 0,05$) que o grupo com apenas DPOC. O grupo DPOC+P+T+PDT ($p < 0,05$) e o DPOC+P+T ($p < 0,05$) apresentaram maior quantidade de células no pulmão do que o grupo DPOC+P, que não recebeu tratamento algum

Figura 4.2. Macrófagos recuperados do LBA avaliados por citometria de fluxo.

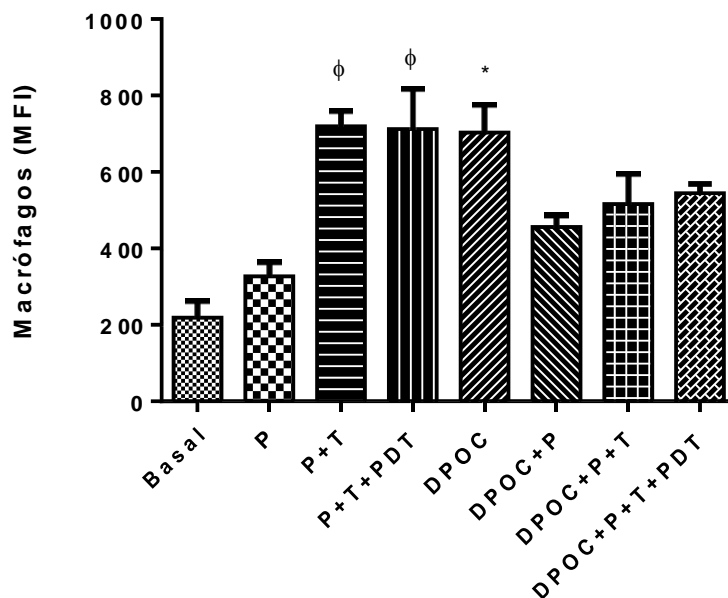


Figura 4.2. Citometria de fluxo do número de macrófagos recuperados do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média ±EPM de 1 experimento (n=8); *p<0,05 grupo DPOC em relação ao Basal, φ p<0,05 grupo P em relação ao P+T e em relação ao P+T+PDT.

Ao analisar a citometria de fluxo das células recuperadas no LBA, observa-se o aumento do grupo DPOC (p<0,05), em relação ao grupo Basal. Também se observa um aumento após o tratamento convencional e o tratamento com PDT comparados ao grupo P (p<0,05).

Figura 4.3. Neutrófilos recuperados do LBA avaliados por citometria de fluxo.

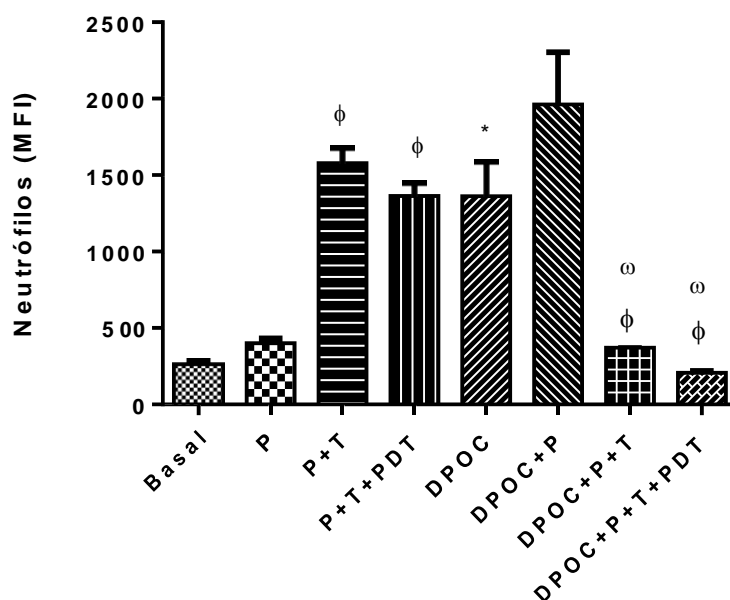


Figura 4.3. Citometria de fluxo do número de neutrófilos recuperados do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ grupo basal em relação ao grupo DPOC, Φ $p < 0,05$ grupo P em relação ao grupo P+T e em relação ao grupo P+T+PDT, θ $p < 0,05$ grupo DPOC+P em relação ao grupo DPOC+P+T, ω $p < 0,05$ grupo DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC+P, e ω $p < 0,05$ DPOC em relação ao grupo DPOC+P+T, ω $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao grupo DPOC+P+T+PDT.

Observa-se um aumento da quantidade de neutrófilos no grupo DPOC quando comparado ao grupo basal. Também se observa um aumento considerável na quantidade de neutrófilos no grupo P+T e P+T+PDT ($p < 0,01$), quando comparado ao grupo P, de camundongos que não receberam tratamento algum. Os grupos que tiveram ambas patologias induzidas e foram tratados de modo convencional e com PDT para periodontite - DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT ($p < 0,05$) obtiveram grande redução de neutrófilos encontrados no LBA, quando comparado ao grupo DPOC+P e também quando comparados ao grupo DPOC.

Figura 4.4. Linfócitos recuperados do LBA avaliados por citometria de fluxo.

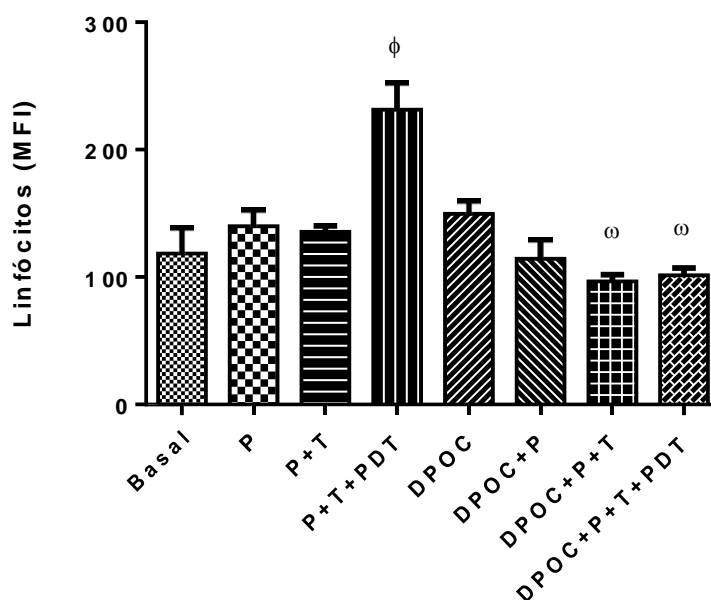


Figura 4.4. Citometria de fluxo do número total de Linfócitos recuperados do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); ϕ $p < 0,05$ quando o grupo P+T+PDT é comparado ao grupo P, ω $p < 0,05$ quando os grupos DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT são comparado ao grupo DPOC.

O grupo P+T+PDT ($p < 0,05$) apresentou considerável elevação de linfócitos totais no LBA quando comparado ao grupo P e os grupos DPOC + P + T e DPOC + P + T + PDT apresentaram diminuição da quantidade de linfócitos totais quando comparado ao grupo DPOC.

Figura 4.5. Citometria de fluxo de células CD8+ recuperadas do LBA.

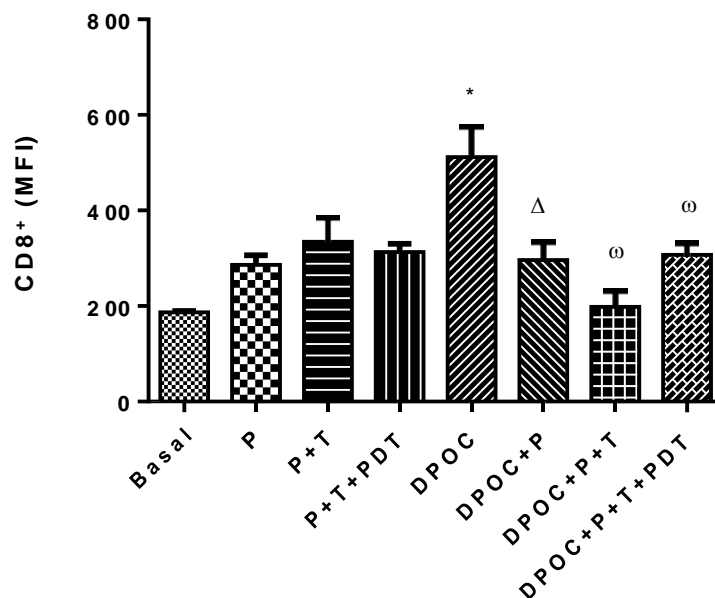


Figura 4.5. Citometria de fluxo de células CD8 recuperados do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ quando o grupo DPOC é comparado com o grupo basal, Δ $p < 0,05$ quando o grupo DPOC é comparado ao grupo DPOC+P, ω $p < 0,05$ quando os grupos DPOC+P+T+PDT e DPOC+P+T são comparados ao grupo DPOC.

O grupo em que houve a indução para DPOC ($p < 0,05$) apresentou um aumento de células CD8+ recuperadas no LBA quando comparado ao grupo Basal. Ao adicionarmos periodontite no grupo com DPOC houve uma diminuição de linfócitos CD8+ ($p < 0,05$) que se manteve após o tratamento periodontal ($p < 0,05$) e após o tratamento com terapia fotodinâmica ($p < 0,05$).

Figura 4.6. Citometria de fluxo de células CD4+ recuperadas do LBA.

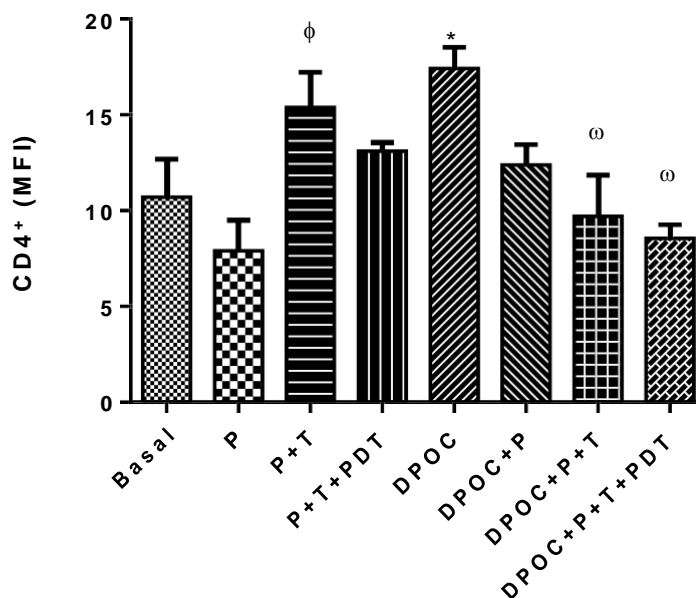


Figura 4.6. Citometria de fluxo de células CD4+ recuperados do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8). Φ $p < 0,05$ quando o grupo P é comparado com P+T, * $p < 0,05$ quando o grupo DPOC é comparado ao Basal e ω $p < 0,05$ quando o grupo DPOC é comparado com os grupos DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT.

Foram encontradas diferenças entre os grupos P e P+T ($p < 0,05$) e grupo DPOC em relação ao Basal. Quando o grupo DPOC é comparado com os grupos DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT também houve diminuição da quantidade de células CD4+ recuperadas do LBA dos camundongos.

Figura 4.7. Análise da citocina IL-6 no sobrenadante do LBA.

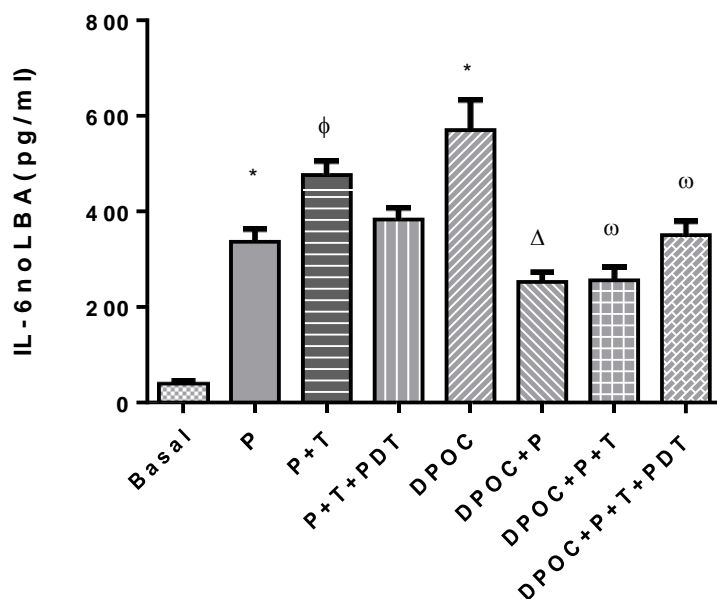


Figura 4.7. Análise da citocina IL-6 no sobrenadante do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ Basal em relação a DPOC, * $p < 0,05$ Basal em relação a P, ϕ $p < 0,05$ grupo P+T em relação a P, Δ $p < 0,05$ DPOC+P em relação ao grupo DPOC, ω $p < 0,05$ DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC, ω $p < 0,005$ - DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC,

O grupo DPOC ($p < 0,05$) e o P ($p < 0,05$) apresentaram níveis elevados de citocina pró-inflamatória IL-6 quando comparados ao grupo Basal. O grupo P+T apresentou níveis aumentados quando comparado a P. Quando as duas patologias foram associadas, DPOC+P, os níveis de IL-6 foram menores que o grupo DPOC ($p < 0,05$). Os grupos DPOC+P+T ($p < 0,05$) e DPOC+P+T+PDT ($p < 0,05$) apresentaram valores menores que o grupo DPOC.

Figura 4.8- Análise da citocina IL-17 no sobrenadante do LBA.

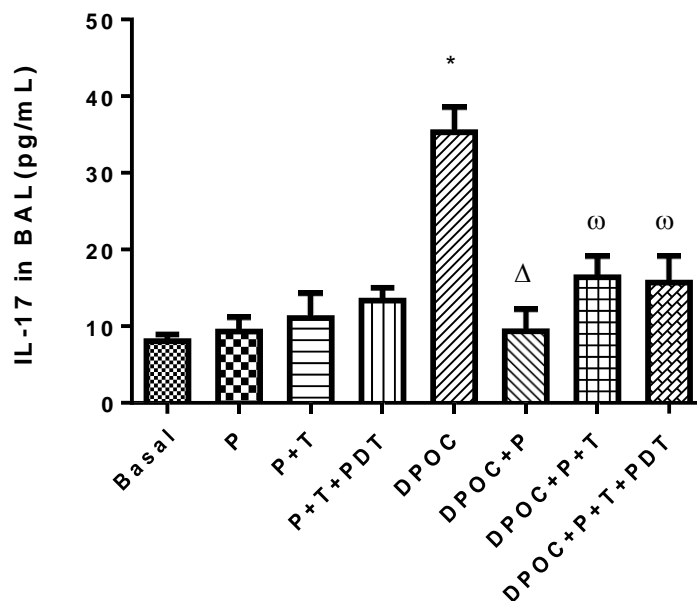


Figura 4.8-. Análise da citocina IL-17 no sobrenadante do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ Basal em relação a DPOC, Δ $p < 0,05$ DPOC+P em relação ao grupo DPOC, ω $p < 0,05$ DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC, ω $p < 0,001$ DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC.

Os níveis de IL-17 estão elevados no grupo DPOC ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo Basal. Quando associamos a Periodontite à DPOC ($p < 0,05$) os níveis caem em relação ao grupo DPOC. Para os grupos com a DPOC e tratados para periodontite – DPOC+P+T ($p < 0,05$) e DPOC+P+T+PDT ($p < 0,05$), os níveis se mantêm inferiores.

Figura 4.9- Análise de citocina IL-10 no sobrenadante do LBA

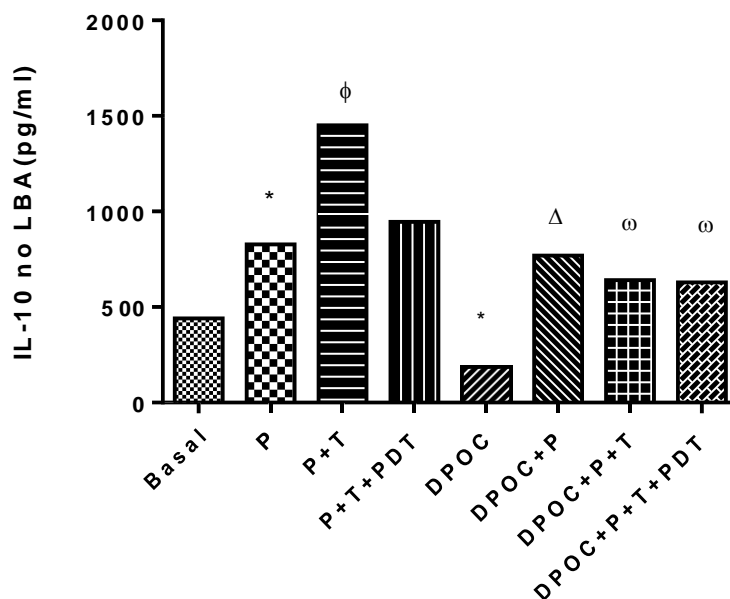


Figura 4.9. Análise da citocina IL-10 no sobrenadante do LBA. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8) ; * $p < 0,05$ grupo P em relação ao Basal, ϕ $p < 0,05$ grupo P em relação P+T, *grupo DPOC em relação ao Basal, Δ $p < 0,05$ grupo DPOC relação ao grupo DPOC+P, ω $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao grupo DPOC+P+T, ω $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao grupo DPOC+P+T+PDT.

O grupo P ($p < 0,05$) apresentou elevação em relação ao grupo Basal, já o grupo DPOC ($p < 0,05$) apresentou diminuição em relação ao Basal. Quando o grupo P foi comparado ao grupo ao grupo tratado houve aumento de IL-10 ($p < 0,05$). Quando a periodontite foi induzida em camundongos com DPOC houve aumento de IL-10 ($p > 0,05$). Após o tratamento periodontal convencional ou associado à PDT, os níveis de IL-10 se mantiveram ($p > 0,05$).

Figura 4.10- Análise da contagem total de células do Lavado Femural.

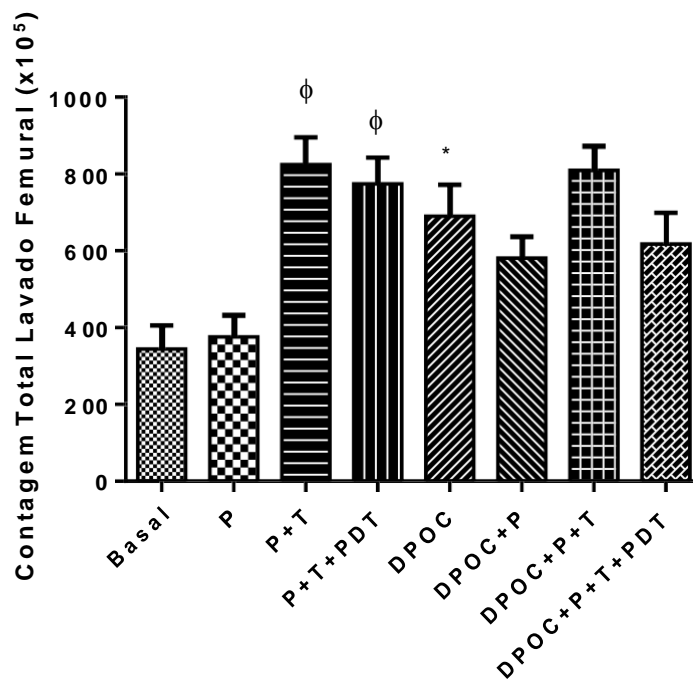


Figura 4.10- Análise da contagem total de células do Lavado Femural. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao grupo Basal, Φ $p < 0,001$ grupo P+T em relação ao grupo P, Φ $p < 0,05$ grupo P+T+PDT em relação ao grupo P.

O grupo DPOC ($p < 0,05$) apresentou maior contagem de células no Lavado Femural quando comparado ao grupo Basal. Os grupos que tiveram apenas indução de periodontite e receberam tratamento, P+T ($p < 0,05$) e P+T+PDT ($p < 0,05$) apresentaram uma contagem maior de células quando comparados ao grupo com Periodontite.

Figura 4.11- Análise de leucócitos totais no esfregaço de sangue.

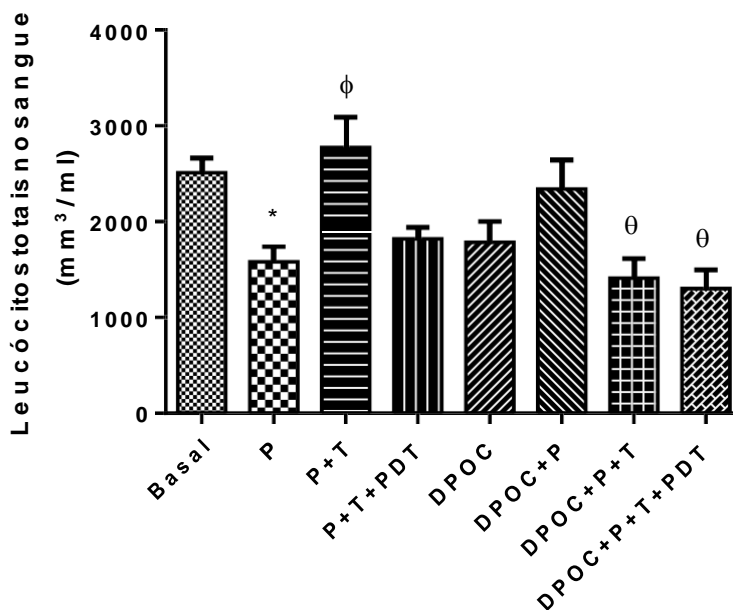


Figura 4.11- Análise de leucócitos totais no esfregaço de sangue. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8). * $p < 0,05$ grupo P em relação ao Basal, Φ $p < 0,05$ grupo P+T em relação ao grupo P, θ $p < 0,05$ grupo DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC+P.

Grupo P ($p < 0,05$) apresenta-se reduzido com relação ao Basal. Quando tratado, o grupo P+T ($p < 0,05$) apresenta quantidade maior de leucócitos circulantes que o grupo P. Os grupos com indução de DPOC+P que receberam tratamento periodontal associado à PDT apresentam valores menores de leucócitos que o grupo DPOC+P, não tratado ($p < 0,05$).

Figura 4.12- Quantificação de Neutrófilos (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e Eosinófilos (D).

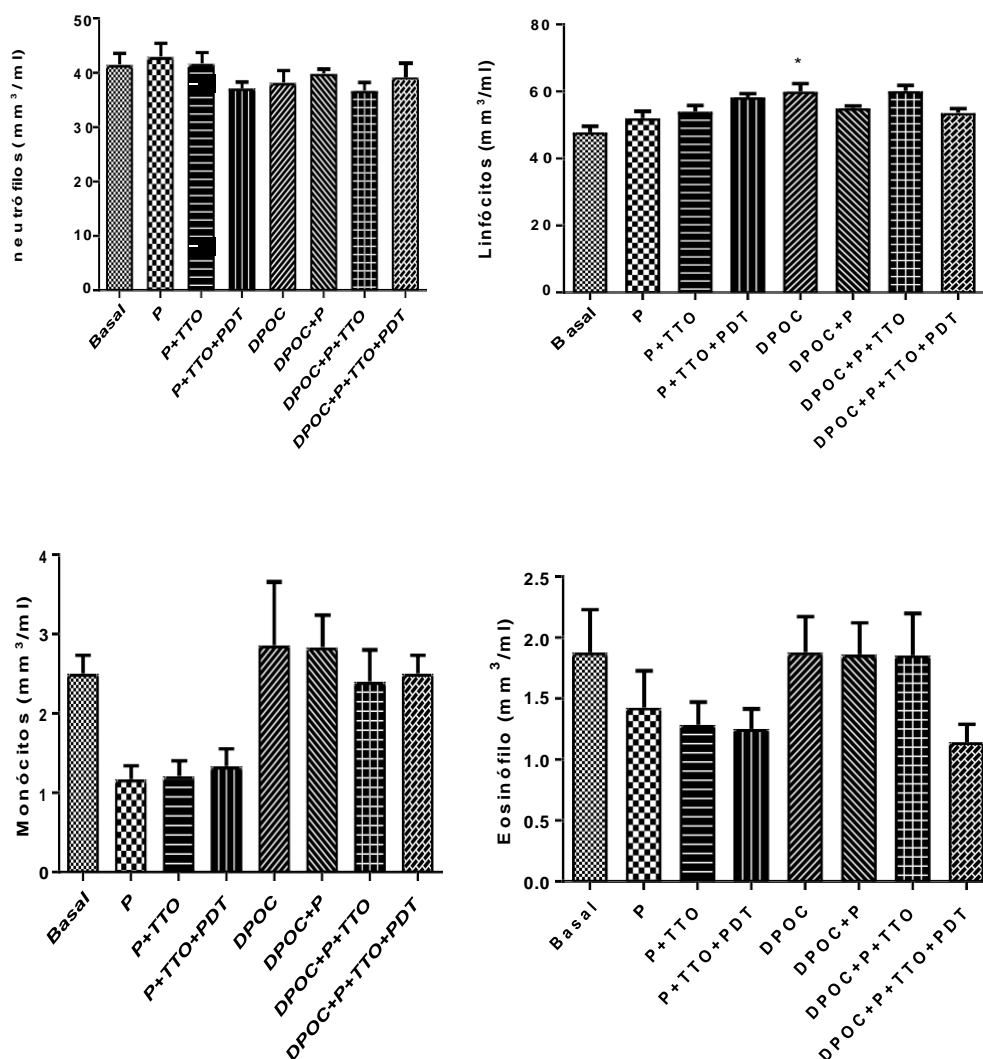


Figura 20. Quantificação de Neutrófilos (A), Linfócitos (B), Monócitos (C) e Eosinófilos (D) no sangue. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+TTO (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+TTO+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+TTO (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+TTO+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); (B) * $p < 0,05$ grupo DPOC em relação ao grupo Basal para linfócitos.

A única diferença encontrada na quantificação diferencial de células do sangue foi em relação ao grupo DPOC ($p < 0,05$) que apresentou maior número de linfócitos quando comparado ao grupo Basal.

Figura 4.13- Quantificação de plaquetas no sangue.

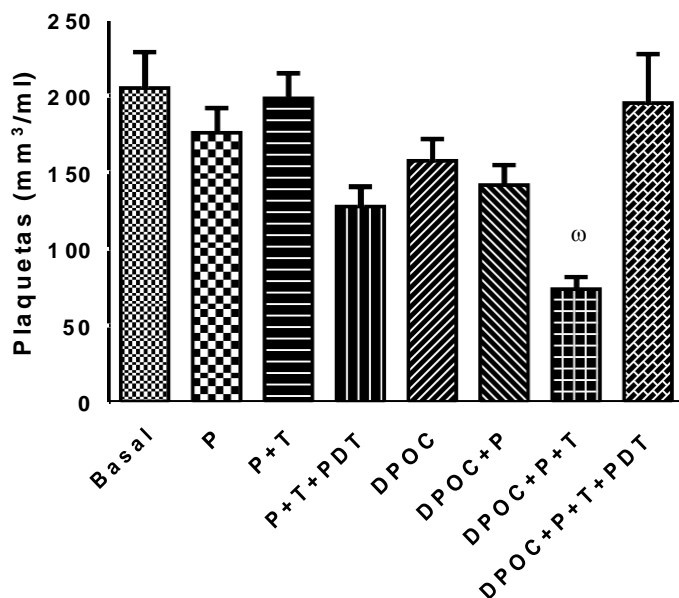


Figura 4.13- Quantificação de plaquetas no sangue. Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapi a Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); ω $p<0,05$ grupo DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC.

O grupo DPOC+P+T apresentou redução no número de plaquetas quando comparado ao grupo DPOC ($p<0,05$).

Figura 4.14- Análise da reorganização de colágeno nas vias aéreas por *picrossírius*.

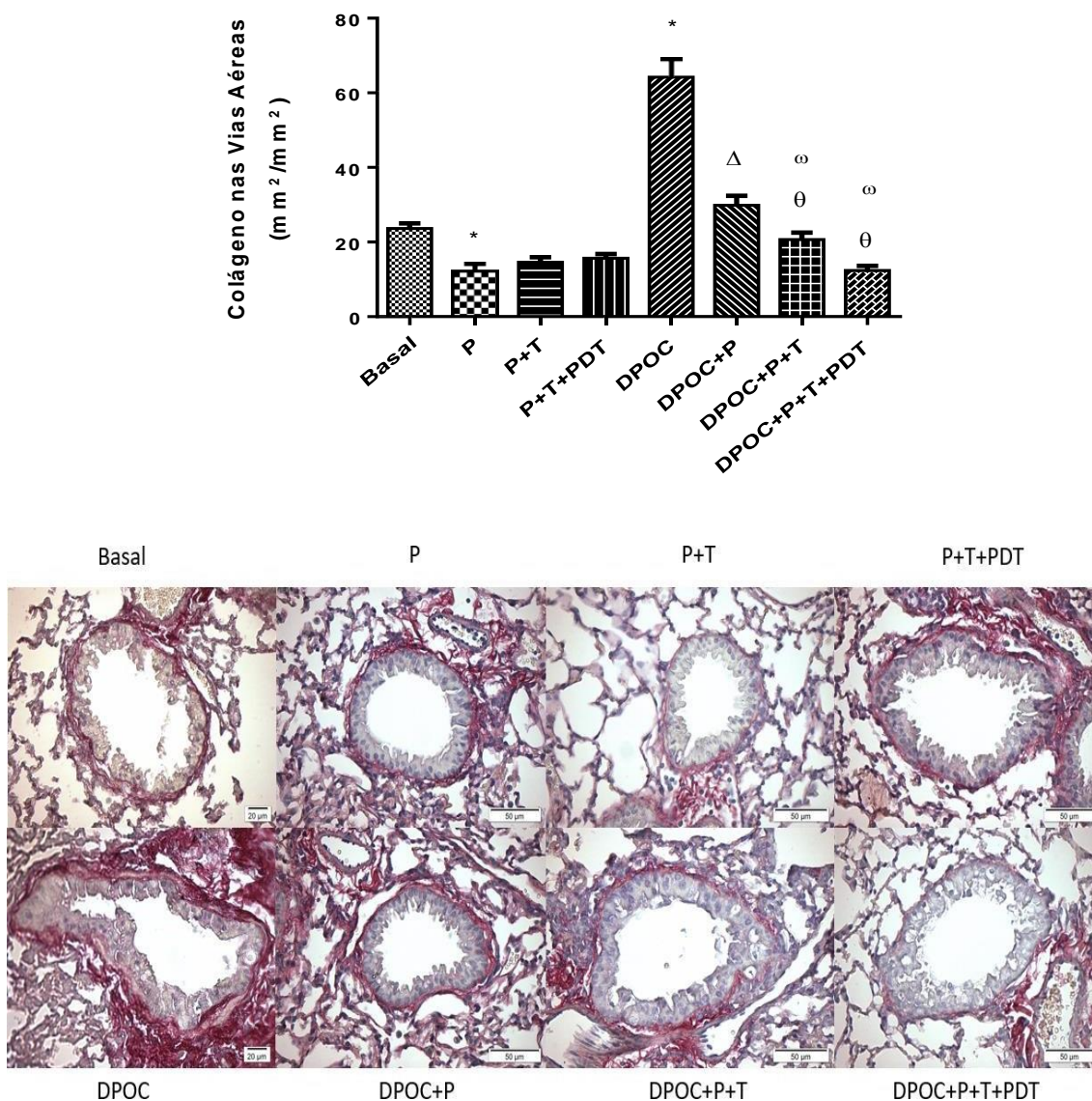


Figura 22. Análise da reorganização de colágeno nas vias aéreas por Picrossírius . Os grupos foram constituídos por: Basal (animais não manipulados), P (indução de periodontite), P+T (Periodontite + tratamento periodontal convencional), P+T+PDT (Periodontite + tratamento periodontal + terapia fotodinâmica), DPOC (indução de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica), DPOC+P (DPOC + Periodontite), DPOC+P+T (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal), DPOC+P+T+PDT (DPOC + Periodontite + Tratamento Periodontal + Terapia Fotodinâmica). Os resultados apresentam média \pm EPM de 1 experimento (n=8); * p<0,05 Basal em relação a P, * p<0,05 Basal em relação a DPOC, Δ p<0,05 DPOC+P em relação a DPOC, ω p<0,05 grupo DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC, ω p<0,05 grupo DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC, θ p<0,05 grupo DPOC+P+T em relação ao grupo DPOC+P, θ p<0,05 grupo DPOC+P+T+PDT em relação ao grupo DPOC+P.

O grupo P apresentou-se reduzido em relação ao Basal ($p < 0,05$). O grupo DPOC ($p < 0,05$) apresentou quantidade superior de fibras colágenas quando comparado ao grupo Basal. O grupo com DPOC associado a periodontite – DPOC+P ($p < 0,05$) apresentou níveis menores fibras colágenas comparado ao grupo DPOC. Os grupos DPOC+P+T+PDT ($p < 0,05$) e DPOC+P+T ($p < 0,05$) apresentaram níveis menores de fibras colágenas que os grupos DPOC e também quando os mesmos grupos foram comparados ao grupo DPOC+P ($p < 0,05$).

5. Discussão

Tendo em vista que a periodontite tem sido associada com as exacerbações das doenças pulmonares²⁹, torna-se importante investigar o mecanismo de ação subjacente a essas duas doenças. Neste trabalho estudamos a associação da Periodontite com a DPOC em modelo experimental, bem como o TP mecânico e associado à PDT na modulação da inflamação

Neste contexto a DPOC foi capaz de aumentar a quantidade de leucócitos no LBA acompanhado do aumento de IL6 e IL17. A associação com a periodontite diminuiu a quantidade de células no LBA, e após seu tratamento os grupos retornaram aos níveis alcançados pelo grupo DPOC. Interessante notar que IL-10 acompanha inversamente esses resultados. Os níveis de IL-6 também estiveram elevados para os grupos Periodontite e Periodontite tratada com curetas, mostrando que a periodontite é capaz de repercutir sistemicamente e que o seu tratamento com cureta não foi capaz de diminuir esses níveis em um intervalo de uma semana. Este estudo utilizou camundongos C57Bl/6 diferentemente de outros autores³⁰. O camundongo é o modelo ideal em termos de pesquisa imunológica mecanicista, contudo o pequeno tamanho da cavidade oral é considerado um desafio técnico para inserção da ligadura e indução da doença periodontal¹⁷. O camundongo C57Bl/6 é o mais utilizado para avaliar resposta imuno-inflamatória da periodontite⁷². Tendo em vista as implicações éticas que o estudo da DPOC pode causar em humanos torna-se inevitável estudar modelos animais. Entre os animais mais estudados encontram-se os camundongos⁷³

Sabendo que a DPOC é uma patologia em que há remodelamento, reorganização de vasos e fibras colágenas⁴², observamos que o grupo DPOC apresentou maior acúmulo de fibras colágenas quando comparado aos demais grupos. No grupo em que a Periodontite foi associada, houve menor reorganização de colágeno, e ao realizar o tratamento periodontal esse acúmulo foi ainda menor.

A indução da DPOC provocou um aumento de macrófagos, linfócitos T – CD8+, CD4+, neutrófilos, bem como da citocina IL-6 e IL-17 validando assim, o

modelo experimental de DPOC estabelecido para este estudo. Como afirmado no estudo de Barnes, 2003³⁹, a DPOC é capaz de produzir aumento de células inflamatórias e por consequência de citocinas pró-inflamatórias. Para indução da DPOC são utilizados modelos de indução com elastase^{74,75}, LPS^{76,77}, e fumaça de cigarro^{78,79} com vários protocolos distintos de indução e frequência⁷³. No estudo de He *et al*⁸⁶, o extrato da fumaça de cigarro foi preparado utilizando um cigarro para 4ml de PBS, a fumaça foi aspirada por meio de uma bomba à vácuo e após o composto foi filtrado, a instilação foi realizada por via intraperitoneal, diferente do nosso que teve a indução orotraqueal e bomba manual. Outro estudo⁸⁰ comparou a instilação de extrato de cigarro via intranasal e orotraqueal de ratos, a instilação orotraqueal apresentou macrófagos $257 \pm 80 \times 10^3$ cels ($p < 0,001$) e neutrófilos $4,5 \pm 3,5 \times 10^3$ cels em grande quantidade, assim como em nosso experimento. Nesse estudo também houve aumento de TNF α ⁸⁰ o que condiz com a quantidade aumentada de macrófagos. Em nosso estudo percebemos aumento de IL-17 e IL6 acompanhadas de grande quantidade de neutrófilos.

Adicionalmente houve aumento do número de células totais da medula femoral, que pode ser explicado por ser uma doença de característica crônica^{81,82}. Interessante notar que houve aumento das células da medula após o tratamento periodontal convencional e com a PDT, o que pode configurar recrutamento de células ativadas para o reparo.

Foi interessante observar que a citocina anti-inflamatória IL-10 quantificada no LBA, por sua vez, esteve mais reduzida na DPOC que na Periodontite, podendo sugerir uma maior regulação anti-inflamatória na periodontite, visto que DPOC apresentou valores muito inferiores aos demais, porém quando associado a Periodontite (DPOC+P), os valores de IL-10 se elevam ($p < 0,001$).

A IL-17 foi expressiva para o grupo DPOC, entretanto, quando associada a Periodontite seus valores diminuem e apresentam tendência a se elevar novamente nos grupos tratados para periodontite (DPOC+P+T+PDT e DPOC+P+T), porém no momento estudado os valores ainda são menos elevados que no grupo DPOC, seria interessante análise tardia para verificar a

tendência de crescimento destes dois grupos. Ressaltamos a que a citocina IL-17 tem sido alvo de inúmeros estudos em casos de DPOC, dada sua relevância no curso da patologia⁴¹, em nosso estudo o aumento de IL-17 no grupo induzido para DPOC foi semelhante ao aumento de macrófagos e linfócitos CD8⁺.

Mesmo sendo um resultado de difícil interpretação, podemos afirmar que IL-6 e IL-17 seguiram um mesmo padrão. São necessários mais estudos para entender esse mecanismo de ação. IL-6 e IL-17 têm sido estudadas no desenvolvimento de drogas com anticorpos específicos, pois IL-6 é associada a severidade da DPOC e IL-17 é considerada importante para o desenvolvimento⁴².

IL-17 é uma citocina importante para a imunidade e regulação inflamatória na mucosa oral e periodontite, níveis elevados não são adequados para manter a homeostase local. Em modelos experimentais de periodontite a inibição de IL-17 foi capaz de deter a perda óssea inflamatória e reverter a disbiose microbiana⁸³. Em nosso modelo experimental não houve aumento de IL-17 para os grupos com periodontite e tratados, contudo sua elevação não é determinante para caracterizar a doença⁸³.

Em nosso estudo avaliamos a repercussão sistêmica do tratamento convencional e associado a PDT. Interessante notar que o tratamento periodontal convencional e a PDT induziram aumento da quantidade de leucócitos totais no LBA de modo significativo. Ainda, houve aumento da produção de IL-6 IL17 e IL-10. Pode-se aventar a possibilidade do início de um processo de reparo precedido de um processo inflamatório agudo produzido pelo tratamento periodontal, mas são necessários mais estudos.

Para Garcia, 2014⁷⁰ a PDT pode intensificar os resultados do tratamento mecânico convencional. Em nosso estudo percebe-se tendência de redução de neutrófilos e linfócitos CD4⁺ no grupo que recebeu tratamento para periodontite com a PDT, contudo necessitamos realizar o refinamento da comparação entre esses dois grupos de TP.

Embora tenha sido observada a tendência de redução para o grupo tratado com PDT, a elevação dos níveis de neutrófilos e macrófagos no LBA nos grupos P+T e P+T+PDT chama a atenção, sendo necessário aprofundamento do estudo para estes achados.

Na medula houve aumento do número total de células para os dois tratamentos periodontais propostos em camundongos sem DPOC, entretanto apenas o tratamento convencional aumentou o número de células no sangue. São necessários dados da repercussão local de células e mediadores inflamatórios para que se entenda com maior profundidade esses achados. Alguns estudos mostram que há diminuição dos marcadores inflamatórios em indivíduos que receberam tratamento para periodontite⁴, sobretudo com uso de PDT em bolsas periodontais, utilizando azul de metileno como fotossensibilizador associado a luz no comprimento de onda de 670 nm⁸⁴.

Em nosso estudo, a periodontite não foi capaz de produzir exacerbação ou mesmo estímulo inflamatório adicional para a inflamação na DPOC. Diferente dos achados do estudo de Leuckfeld, 2008³², a cascata inflamatória da periodontite não produziu degradação prévia da via aérea, como percebe-se no gráfico de reorganização colágena da via aérea. Para alguns autores a periodontite pode ser capaz de influenciar no curso inflamatório da infecção pulmonar, mas não é atribuída à ela a capacidade de produzir uma inflamação pulmonar^{29,30}.

No estudo de Takahashi et al., 2012⁵³ trabalhou-se a possibilidade da periodontite ser um fator de risco para a DPOC e os achados demonstraram que as exacerbações respiratórias ocorriam independente da titulação de IgG contra *Pg*. A periodontite não foi considerada um fator agravante para a DPOC nos estudos de Bhavsar et al., 2015³¹ e Zeng et al., 2012¹¹, corroborando com nossos achados.

A associação de patologias com o perfil inflamatório semelhante parece favorecer um mecanismo regulatório sistêmico, conforme visto nos resultados de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatória do nosso estudo. Quando ocorre o tratamento de uma das patologias, neste caso a Periodontite, os níveis de células imuno-inflamatórias na contagem total do LBA sobem. Esses

resultados sugerem que ao retirar o fator inflamatório (periodontite) através do tratamento periodontal, a doença pulmonar volta a se expressar de maneira mais intensa. Em outras palavras, quando o tratamento da periodontite é efetivo os níveis de IL-10 apresentam tendência para diminuição, assim como ocorre no grupo em que se induziu apenas DPOC. Esses dados sugerem que essa diminuição se dá pois, uma única patologia volta a ser soberana na inflamação.

Sabe-se da importância de realizar o TP mesmo que em nosso experimento a associação das duas patologias tenha apresentado redução do infiltrado inflamatório pulmonar. Chamamos a atenção para a redução dos níveis de neutrófilos e CD4+ nos grupos DPOC+P+T e DPOC+P+T+PDT em relação aos grupos DPOC e DPOC+P, ou seja, pode haver uma perspectiva positiva no tratamento periodontal em casos de DPOC associada, considerando o padrão neutrofílico das patologias e de predominância de CD4+ na periodontite. Apesar de interessantes, esses achados precisam ser confirmados com novos estudos intervencionistas experimentais e clínicos, em diferentes momentos, como tardiamente após realização do tratamento.

6. Conclusão

Ao associar a Periodontite com a DPOC não houve estímulo inflamatório adicional para o modelo experimental pulmonar. Houveram achados sistêmicos e pulmonares após o tratamento periodontal mecânico e associado a PDT. Com relação a inflamação pulmonar seguida do tratamento periodontal, observou-se a redução de neutrófilos. Contudo, faz-se necessário realizar o aprofundamento dos estudos para elucidar a associação das patologias e a terapia fotodinâmica na modulação da inflamação pulmonar.

Referências

1. Bansal M, Katri M, Taneja V. Potential role of periodontal infection in respiratory diseases – a review. *J of Med and Life* 2003 Jul-Sep;6(3):244-48.
2. Card JW, Carey MA, Voltz JW, Bradbury JA, Ferguson CD, Cohen EA, et al. Oral bacteria and allergic lung inflammation. *Infect Immun* 2010 Jun; 78(6):2488-96.
3. Ministério da Saúde. Pesquisa nacional de saúde buccal. SB Brasil 2010-2012.
4. Tonetti MS, Van Dyke TE. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the joint EFP/ AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Periodontal* 2013;84(4):24:29.
5. Prasanna, S.J. Causal relationship between periodontitis and chronic obstructive pulmonary disease. *J of Indian Soc of Periodontol* 2011 Oct-Dec;15(4):359-65.
6. Menezes AM, Jardim JR, Pérez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, Hallal PC Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in São Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica*. 2005 Sep-Oct;21(5):1565-73. Epub 2005 Sep 12.
7. Murray CJL, Lopez AD. The global burden of disease: a comprehensive assessment of mortality and disability from diseases, injuries, and risk factors in 1990 and projected to 2020. Harvard School of Public Health, Harvard, World Health Organization 1996.
8. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol*. 1999 Jul;70(7):793-802.
9. Weidlich P, Cimões R, Pannuti CM, Oppermann RV. Association between periodontal diseases and systemic diseases. *Braz Oral Res*. 2008;22 Suppl 1:32-43.
10. Azarpazhooh A, Leake JL. Systematic review of the association between respiratory diseases and oral health. *J Periodontol*. 2006 Sep;77(9):1465-82.
11. Zeng XT, Tu ML, Liu DY, Zhenq D, Zhang J, Leng W. Periodontal disease and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis of observational studies. *Plos One* 2012;7(10):1-9.
12. Agado BE, Crawford B, DeLaRosa J, Bowen DM, Peterson T, Neil K, Paarmann C. Effects of periodontal instrumentation on quality of life and illness in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a pilot study. *J Dental Hyg* 2012;86(3):204-14.
13. Scannapieco FA, HO AW. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of national health and nutrition examination survey III. *J Periodontol* 2001 Jan;72(1):50-56.
14. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive

pulmonar disease. A systematic review. *Ann of Periodontol* 2003 Dec;8(1):54-69.

15. Peter KP, Mute BR, Doiphode SS, Bardapurkar SJ, Borkar MS, Raje DV. Association between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease: a reality or just a dogma? *J Periodontol* 2013 Dec;6(1):1717-23

16. Garcia RI, Nunn ME, Vokonas PS. Epidemiologic associations between periodontal disease and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann Periodontol* 2011 Dec;6(1):71-7.

17. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2015 Jan;15(1):30-44.

18. G Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, L Mealey B, Papapanou PN, Sanz M, Tonetti M. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018 Jun;45 Suppl 20:S1-S8.

19. Mira A, Simon-Soro A, Curtis MA. Role of microbial communities in the pathogenesis of periodontal diseases and caries. *J Clin Periodontol* 2017;44(18): 23–38.

20. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Dec;16(12):745-759. doi: 10.1038/s41579-018-0089-x. Review.

21. Valm AM, Mark Welch JL, Rieken CW, Hasegawa Y, Sogin ML, Oldenbourg R, Dewhirst FE, Borisy GG. Systems-level analysis of microbial community organization through combinatorial labeling and spectral imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 8;108(10):4152-7.

22. Dabdoub SM1, Ganesan SM1, Kumar PS1. Comparative metagenomics reveals taxonomically idiosyncratic yet functionally congruent communities in periodontitis. *Sci Rep.* 2016 Dec 19;6:38993.

23. Gemmell E, Seymour GJ. Immunoregulatory control of Th1/ Th2 cytokine profiles in periodontal disease. *Periodontol 2000* 2004;35:21-41.

24. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2004;34:9-21.

25. Almeida RF, Pinho MM, Lima C, Faria I, Santos P, Bordalo C. Associação entre doença periodontal e patologias sistêmicas. *Rev Port Clin Geral* 2006;22:379-90.

26. Linden GJ, Herzberg MC. Periodontitis and systemic diseases: a record of discussions of working group 4 of the Joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *J Periodontol* 2013;84(4):20-23.

27. Preshaw PM, Aba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K, Taylor R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* 2012 Jan;55(1):21-31.

28. Bakhshandeh S, Murtomaa H, Vehkalahti MM, Mofid R, Suomalainen K. Dental findings in diabetic adults. *Caries Res* 2008;42(1):14-8.
29. Zhou X, Han J, Liu Z, Song Y, Wang Z, Sun Z. Effects of periodontal treatment on lung function and exacerbation frequency in patients with chronic obstructive pulmonary disease and chronic periodontitis: A 2-year pilot randomized controlled trial. *J Clin Periodontol* 2014; 41:564-572.
30. Candeo LC, Rigonato-Oliveira NC, Brito AA, Marcos RL, França CM, Fernandes KPS, Mesquita-Ferrari RA, Bussadori SK, Vieira RP, Lino-Dos-Santos-Franco A, Ligeiro-Oliveira AP, Horliana ACRT. Effects of periodontitis on the development of asthma: The role of photodynamic therapy. *PLoS One*. 2017 Nov 16;12(11):e0187945. doi: 10.1371/journal.pone.0187945. eCollection 2017.
31. Bhavsar NV, Dave BD, Brahmhatt NA, Parekh R. Periodontal status and oral health behavior in hospitalized patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J of Nat Sc, Biol and Med* 2015 Aug; 6(1):93-7.
32. Leuckfeld I., Obregon-Whittle MV, Lund MB, Geiran O, Bjortuft O, Olsen I. Severe chronic obstructive pulmonary disease: Association with marginal bone loss in periodontitis. *Resp Med* 2008;102: 488-94.
33. Rennard SI, Vestbo, J. Natural stories of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2008;5:878-83.
34. King PT. Inflammation in chronic obstructive pulmonary disease and its role in cardiovascular disease and lung cancer. *Clin Trans Med* 2015;4(26)1-13.
35. Global Strategy for the Diagnosis, Management and Prevention of COPD, Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2014. Available from: <http://www.goldcopd.org/>.2014.
36. He ZH, Chen P, Chen Y, He SD, Ye JR, Zhang HL, *et al*. Comparison between cigarette smoke extract-induced emphysema. *Tabaco Induced Diseases* 2015;13(6)1-8.
37. Ferreira J, Drummond M, Pires N, Reis G, Alves C, Robalo-Cordeiro C. Optimal treatment sequence in COPD: Can a consensus be found? *Rev Port Pneumol* 2016;22(1):39-49.
38. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PMA, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/ WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1256-76.
39. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672-88.
40. Kim C, Lee JM, Park SW, Kim KS, Lee MW, Paik S *et al*. Attenuation of cigarette smoke-induced emphysema in mice by apolipoprotein A-1 overexpression. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016 Jan;54(1): 91–102.
41. Caramori G, *et al*. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *Int J of COPD* 2014;9 397-412.

42. Zhang Y, Cao J, Chen Y, Chen P, Peng H, Cai S, et al. Intraperitoneal injection of cigarette smoke extract induced emphysema, and injury of cardiac and skeletal muscles in BALB/C mice. *Experimental Lung Research* 2013;39:18-31.
43. da Cunha Moraes G, Vitoretti LB, de Brito AA, Alves CE, de Oliveira NCR, Dos Santos Dias A, et al. Low-Level Laser Therapy Reduces Lung Inflammation in an Experimental Model of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Involving P2X7 Receptor. *Oxid Med Cell Longev*. 2018 Mar 4;2018:6798238.
44. Agustí A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease what we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:522–525.
45. Pinto EH, Longo PL, Camargo CCB, Dal Corso S, Lanza FC, Stelmach, et al. Assessment of the quality of microorganisms associated with bronchiectasis in saliva, sputum and nasal lavage after periodontal treatment: a study protocol of a randomised controlled trial. *BMJ Open* 2016;6:1-8.
46. Tomás I, Diz P, Tobías A, Scully C, Donos N (2012) Periodontal health status and bacteraemia from daily oral activities: systematic review/meta-analysis. *J Clin Periodontol* 39: 213–28.
47. Horliana AC, Chambrone L, Foz AM, Artese HP, Rabelo Mde S, Pannuti CM, Romito GA. Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review. *PLoS One*. 2014 May 28;9(5):e98271. doi: 10.1371/journal.pone.0098271. eCollection 2014. Review.
48. Zhou X, Wang Z, Song Y, Zhang J, Wang C. Periodontal health and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Medicine* 2011;105:67-73.
49. Lourenço KS, Suleiman AKA, Pijl A, van Veen JA, Cantarella H, Kuramae EE. Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and to temporary bacterial invasion. *Microbiome*. 2018 Aug 13;6(1):142.
50. Ji J, Schéele IV, Bergström J, Billing B, Dahlén B, Lantz AS, Larsson K, Palmberg L. Compartment differences of inflammatory activity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory Research* 2014;15(104):1-9.
51. Usher AKH, Stockley RA. The link between chronic periodontitis and COPD: a common role for the neutrophil? *BMC Medicine* 2013;11(241)1-11.
52. Shen TC, Chang PY, Lin CL, Chen CH, Tu CY, Hsia TC, et al. Risk of periodontal diseases in patients with chronic obstructive pulmonary disease. A Nationwide population-based cohort study. *Medicine* 2015 Nov;94(46):1-6.
53. Takahashi T, Muro S, Tanabe N, Terada K, Kiyokawa H, Sato S, et al. Relationship between periodontitis-related antibody and frequent exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Plos One* 2012 Jul;7(7):1-7.

54. Terashima T, Chubachi S, Matsuzaki T, Nakajima T, Satoh M, Iwami E, et al. The association between dental health and nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Chronic Respiratory Disease* 2016;1-8.
55. Zeng XT, Tu ML, Liu DY, Zheng D, Zhang J, Leng W. Periodontal disease and risk of chronic obstructive pulmonary disease: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One*. 2012;7(10):e46508
56. Santos SR, Pinto EH, Longo PL, Dal Corso S, Lanza F C, Stelmach R, et al. Effects of periodontal treatment on exacerbation frequency and lung function in patients with chronic periodontitis: study protocol of a 1-year randomized controlled trial. *BMC Pulmonary Medicine* 2017;17(23):1-6.
57. Betsy J, Prasanth CS, Baiju KV, Prasanthila J, Subhash N. Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy in the management of chronic periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2014 Jun;41(6):573-81.
58. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: an overview. *J of Indian Soc of Periodontol* 2011 Oct-Dec;15(4):323-327.
59. P. Konopka, G. Günther, R. Müller, F. H. S. Dos Santos, C. Schiller, et al.. Contribution of mixing to upward transport across the tropical tropopause layer (TTL). *Atmospheric Chemistry and Physics, European Geosciences Union* 2007; 7(12):3285-3308.
60. Braun A, Dehn C, Krause F, Jepsen S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol* 2008 Oct;35(10):877-84.
61. Prates RA, Yamada AM, Suzuki LC, França CM, Cai S, Mayer MPA. Histomorphometric and microbiological assesment of photodynamic therapy as an adjuvant treatment for periodontitis: a short-term evaluation of inflammatory periodontal conditions and bacterial reduction in a rat model. *Photom and Laser Surg* 2011;29(12):835-44.
62. Prazmo EJ, Kwasny M, Lapinski M, Mielczarek A. Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. *Adv Clin Exp Med* 2016;25(4):799–807.
63. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang YY, Dai T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers Surg Med* 2011 Sep;43(7):755-767.
64. Pfitzner A, Sigusch BW, Albrecht V, Glockmann E. Killing of periodontopathogenic bacteria by photodynamic therapy. *J Periodontol* 2004 Oct;75(10):1343-49.
65. Quin YL, Luan XL, Bi LJ, Sheng YK, Zhang ZG. Comparison of touluidine blue-mediated photodynamic therapy and conventional scaling treatment for periodontitis in rats. *J Periodontol Res*. 2008;43:162-167.
66. Wilson M, Dobson J, Sarkar S. Sensitization of periodontopathogenic bacteria killing by light from a low-power laser. *Oral Microbiol Immunol Munksgaard* 1993;8:182-187.

67. Karu T, Pyatibrat LV, Kalendo G. Thiol reactive agentes eliminate stimulation of possible involvement of celular redox status into low power laser effects. *Laser Ther* 1999;11:177-87.
68. Wainwright M, Antczak J, Baca M, Louqhran C, Meegan K. Phenothiazinium photoantimicrobials with basic side chains. *J Photochem Photobiol B* 2015; 150:38-43.
69. Evangelista EE, França CM, Veni P, Silva TO, Gonçalves RM, Carvalho VF, et al. Antimicrobial photodynamic therapy combined with periodontal treatment for metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2015;16(229)1-6.
70. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2014 Oct;49(5):584-94.
71. Sjögren P, Nilsson E, Forsell M, Johansson O, Hooqstraate J. A systematic review of the preventive effect of oral hygiene on pneumonia and respiratory tract infection in elderly people in hospitals and nursing homes: effect estimates and methodological quality of randomized controlled trials. *J Am Geriatr Soc* 2008;56(11):2124-30.
72. Saadi-Thiers K1, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre JE, Tenenbaum H, Davideau JL. Periodontal and systemic responses in various mice models of experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and Porphyromonas gingivalis infection. *J Periodontol.* 2013 Mar;84(3):396-406.
73. Ghorani V, Boskabady MH, Khazdair MR, Kianmeher M. Experimental animal models for COPD: a methodological review. *Tob Induc Dis.* 2017 May 2;15:25.
74. Rodrigues R, et al. Modelo murino de enfisema induzido por instilação de elastase e exposição a fumaça de cigarro *J Bras Pneumol.* 2017;43(2):95-100
75. Antunes MA, Rocco PR. Elastase-induced pulmonary emphysema: insights from experimental models. *An Acad Bras Cienc.* 2011 Dec; 83(4):1385-96
76. Wright JL, Churg A. Animal models of COPD: Barriers, successes, and challenges. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008 Oct;21(5):696-8.
77. Fehrenbach H. Animal models of pulmonary emphysema: a stereologist's perspective. *Eur Respir Rev.* 2006;15(101):136–147.
78. Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2004 Nov 2; 5():18.
79. Leberl M, Kratzer A, Taraseviciene-Stewart L. Tobacco smoke induced COPD/emphysema in the animal model—are we all on the same page? *Front Physiol.* 2013;4.

80. Lamb DJ, Parker N, Ulrich K, Walsh R, Yeadon M, Evans SM. Characterisation of a mouse model of cigarette smoke extract-induced lung inflammation. *J Pulmon Resp Med* 2012;2(3):125.
81. Barnes PJ. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2018 Apr 6.
82. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of asthma and COPD. *Clin Sci (Lond)*. 2017 Jul 1;131(13):1541-1558.
83. Abusleme L, Moutsopoulos NM. IL-17; overview and role in oral immunity and microbiome *Oral Dis*. 2017 October; 23(7): 854–865.
84. Campanile VSM, Giannopoulou C, Campanile G, Cancela JA, Mombeli A. Single or repeated antimicrobial photodynamic therapy as adjunct to ultrasonic debridement in residual periodontal pockets: clinical, microbiological, and local biological effects. *Lasers Med Sci* 2015;30:27–34.

8. Anexos

8.1. Aprovação do CEUA

UNINOVE
● ● ● ● ●
Universidade Nove de Julho

**Parecer do Formulário Unificado Para Solicitação de Autorização
Para Uso de Animais AN0021.2017**

A influência do tratamento periodontal associado à terapia fotodinâmica após indução da periodontite pela técnica da ligadura na modulação da inflamação pulmonar em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica.

Pesquisador/Professor: Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana

Apresentado a este Comitê para análise ética, foi considerado:

APROVADO

Com pendência, devendo o Pesquisador encaminhar as modificações sugeridas, e iniciar a coleta de dados somente após a aprovação do projeto por este Comitê.

Não-Aprovado

São Paulo, 05 de dezembro de 2017



Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos
Coordenação – Comitê de Ética no Uso de Animais
Universidade Nove de Julho



CERTIFICADO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Certificado que o projeto intitulado A influência do tratamento periodontal associado à terapia fotodinâmica após indução da periodontite pela técnica da ligadura na modulação da inflamação pulmonar em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica, protocolo nº AN0021.2017, sob a responsabilidade de Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Nove de Julho em reunião de 05/12/2017.

Vigência do Projeto: 06/12/2017 - 20/12/2021

Espécie/linhagem: Mus musculus/C57bl/6

Nº de animais: 64

Peso/Idade: 30g/ 4 semanas

Sexo: machos

Origem: UNINOVE

Ativa
Acesse
ativar.c

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'R. Labat', is written over a horizontal line.

Prof. Dr Rodrigo Labat Marcos