

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

SERGIO KOITI KAMEI

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA
PERIODONTITE APICAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

SÃO PAULO

2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU DE BIOFOTÔNICA
APLICADA ÀS CIÊNCIAS DA SAÚDE
SÉRGIO KOITI KAMEI

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NA
PERIODONTITE APICAL EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA PULMONAR OBSTRUTIVA CRÔNICA (DPOC)

Trabalho apresentado à banca examinadora da
Universidade Nove de Julho como requisito
para a obtenção do título de doutor em
biofotônica aplicada às ciências da saúde

Orientadora: Ana Paula Ligeiro de Oliveira
Coorientadora: Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana

SÃO PAULO
2020

Kamei, Sérgio Koiti.

Efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana na periodontite apical em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). / Sérgio Koiti Kamei. 2020.

68 f.

Tese (Doutorado)—Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2020.

Orientador (a): ProP. Dr. Ana Paula Ligeiro de Oliveros

1. Doença pulmonar obstrutiva crônica. 2. Periodontite apical assintomática. 3. aPDT.

t. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de.

II. Título.

CDU 615.831

São Paulo, 12 de junho de 2020

TERMO DE APROVACIO

Aluno (a): Sérgio Koiti Kamei

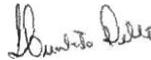
Titulo da Tese: "Efeito da terapia fotodinâmica na periodontite apical e a inflamaggo em modelo experimental de doenga pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)".

Presidentes: PROFA. DRA. ANA PAULA OLIVEIRA LIGEIRO

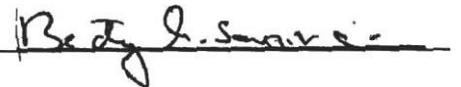
Membro: PROFA. DRA. ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA _____

Membro: PROF. DR. RODRIGO FABAT MARCOS

Membro: PROF. DR. HUMBERTO DELLE _____



Membro: PROFA. OF BEATRIZ SARAIVA MANGUEIRA ROMANHC _____



Dedicatória,

À minha querida e amada,
Naná (Zenaide).
Eu te amo!

Aos meus queridos e amados filhos,
Felipe e César.

Aos meus pais, Hiroshi e Satico,
que nunca mediram esforços para me ensinar o caminho do bem,
e sempre me apoiaram em todas as etapas da minha vida.
Sem vocês, eu não chegaria até aqui.
Muito agradecido por tudo!
O amor que sinto por vocês é incondicional.

À minha irmã Sandra, sinônimo de amor e união.
Grato por acreditar no meu sonho e sempre me motivar a seguir em frente.
É muito bom saber que posso contar com você em todos os momentos.
Amo você!

“Vença a si mesmo e terá vencido o seu próprio adversário.”

Provérbio japonês

Agradecimentos,

A Deus, por sempre colocar pessoas boas e maravilhosas em meu caminho, as quais me fazem acreditar em um mundo melhor e me encorajam a prosseguir. Grato por nunca soltar a minha mão e me guiar em todos os momentos.

Aos meus eternos mentores, professores Marcio B. Lauretti e Sergio T. Maeda. Vocês são os responsáveis pela minha iniciação acadêmica, acreditaram e incentivaram, permitindo a conclusão de mais uma fase da docência. Vocês são exemplos de dedicação, honestidade, justiça e retidão. Gratidão eterna!

A minha orientadora, professora Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira, pela oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço a confiança e por me atender com paciência todas as vezes que bati em sua porta. Agradeço por todos os ensinamentos compartilhados de forma admirável, e por me guiar neste momento da pós-graduação. A minha coorientadora, professora Dr^a. Anna Carolina Ratto Tempestini Horliana, por toda a ajuda durante a realização deste trabalho. Sua contribuição, na fase experimental, foi essencial para a concretização do trabalho desenvolvido neste programa de pós-graduação. Grato!

Aos professores do programa de pós-graduação em Biofotônica aplicada às Ciências da Saúde da Universidade Nove de Julho, por todo conhecimento transmitido durante o curso de Doutorado, e pela convivência agradável no dia-a-dia.

Meus respeitosos agradecimentos pela participação e contribuição da banca examinadora, da Prof^a. Dr^a. Beatriz Saraiva Manguieira Romanholo e dos Prof. Dr. Humberto Delle, Prof. Dr. Rodrigo Labat Marcos.

As amigas Deborah e Marcia, que me apoiaram nos momentos difíceis tornando os dias e noites mais tranquilos. E compartilharam o melhor de vocês em todos os momentos de alegria e felicidade, que passamos juntos ontem, hoje e sempre. Gratidão!

Aos amigos e a amiga de longa data, Adriana F. Paisano (Dri), José L. H. Guimarães (Zé), Kleber K. T. Carvalho, Luís Guilherme B. Lauretti (Guigo), Luiz M. Mansi, nós que já passamos mais tempo juntos do que em nossas casas, com as nossas famílias, formando uma nova família, *A FAMÍLIA ENDODÔNTICA*. Conviver com vocês ao longo desses 35 anos tem sido sensacional. Grato por toda forma de ajuda, pela companhia durante os cafés, viagens, almoços e jantares, pelas inúmeras conversas e risadas. Vocês são muito especiais e tornam o trabalho e a vida muito mais agradável. Arigatô!

Agradecimento especial aos professores dos cursos de especialização de endodontia e amigos Denis Y. Yoshida, Keiji Nishikawa, Nilton C. Cunha, Paula C. A. Cardoso, Ricardo Massud e Roberto T. Misuno, por toda a dedicação aos cursos, as viagens e momentos de descontração e alegria, me incentivaram permitindo a conclusão desta pós. Grato!

As minhas ex-alunas e amigas da UMESP, Karina Brajato (Ka) e Veridiana Delle (Veri) pela contribuição, elaboração e execução da fase experimental. Muito agradecido.

Agradeço as amigas e colegas de laboratório Alana, Aurileia, Caren, Karine, Stephanie, Tawany, Vanessa, que contribuíram para a finalização do projeto de pesquisa. Gratidão.

RESUMO

Introdução: A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais doenças pulmonares da população mundial, acometendo desde crianças, adolescentes e adultos dos sexos masculino e feminino. Na literatura há descrição da inter-relação de doenças sistêmicas como as cardiovasculares e as doenças periodontais infecciosas, o índice de placa dos pacientes e correlação entre a perda de inserção periodontal e a diminuição da função pulmonar, porém não há descrição, na literatura, da inter-relação de doenças respiratórias como a DPOC e de doença endodôntica (periodontite apical assintomática - PAA). A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) tem a capacidade de eliminar microrganismos por meio da combinação adequada de luz e corante, na presença de oxigênio. Desse modo, tanto para o tratamento da DPOC como para o tratamento endodôntico se utiliza o LASER com a finalidade de modular a inflamação e reduzir a infecção. Objetivo: Avaliar o efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na periodontite apical assintomática em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), através da contagem de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA pulmão; quantificar os níveis de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ e TNF- α no LBA e no soro e analisar morfometricamente o alargamento alveolar. Materiais e Métodos: Foram utilizados 64 camundongos divididos em 8 grupos experimentais: I-Basal (Sem indução de doenças), II-PAA (Indução da periodontite apical assintomática), III-PAA+TTO (Indução da PAA e tratamento endodôntico), IV-PAA+TTO+aPDT (Indução da PAA, Tratamento endodôntico e terapia fotodinâmica antimicrobiana), V-DPOC (Indução de doença pulmonar obstrutiva crônica), VI-DPOC+PAA (Indução de DPOC, PAA), VII-DPOC+PAA+TTO (Indução de DPOC, PAA e tratamento endodôntico), VIII-DPOC+PAA+TTO+aPDT (Indução de DPOC, PAA; tratamento endodôntico e terapia fotodinâmica antimicrobiana). Resultados: Na contagem total e diferencial de células inflamatórias no lavado bronco alveolar houve o aumento de número de células nos grupos PAA e DPOC. O número de macrófagos foi menor no grupo DPOC+PAA, que receberam o tratamento endodôntico e a terapia fotodinâmica também. Quanto ao número de linfócitos os grupos DPOC+PAA, após o tratamento endodôntico e a terapia fotodinâmica mostraram diminuição no número de células. Quanto ao número de neutrófilos, os grupos das doenças PAA e DPOC, que receberam o tratamento endodôntico associado ou não a terapia, houve uma queda do número de células em

relação ao respectivo grupo PAA. A citocina IL-6 no soro e no LBA apresentaram redução em relação às doenças PAA e a DPOC, exceto no grupo DPOC+PAA+TTO teve um número estatisticamente igual no material retirado do LBA. A quantidade de IL-10 no soro apresentou uma queda quando as doenças PAA e DPOC estavam associadas. Os resultados no LBA mostraram que houve um aumento de TNF- α em relação ao grupo basal. E no soro aumento de TNF- α na associação das doenças DPOC e PAA submetidas ao tratamento endodôntico complementadas pela terapia fotodinâmica antimicrobiana. Conclusão: Nossos dados demonstraram que a doença endodôntica *per se* pode provocar o aumento dos marcadores da inflamação pulmonar, sem a destruição alveolar do pulmão. Entretanto a associação da DPOC e da PAA levou a uma redução na inflamação pulmonar podendo assim, inferir um efeito supressor sobre a inflamação da DPOC. Além disso, o tratamento endodôntico associado ou não à aPDT manteve esse efeito inibitório da resposta inflamatória pulmonar em modelo experimental de DPOC.

Palavras-chave: doença pulmonar obstrutiva crônica, periodontite apical assintomática, aPDT.

ABSTRACT

Introduction: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the main pulmonary diseases in the world population, affecting children, adolescents and adults, male and female. In the literature, there is a description of the interrelationship of systemic diseases such as cardiovascular and infectious periodontal diseases, the patients' plaque index and correlation between loss of periodontal insertion and decreased lung function, but there is no description in the literature. interrelation of respiratory diseases such as COPD and endodontic disease (asymptomatic apical periodontitis - PAA). **Objective:** To evaluate the effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) on asymptomatic apical periodontitis in an experimental model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), by counting macrophages, neutrophils and lymphocytes in lung BAL; quantify the levels of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, INF- γ and TNF- α in BAL and serum and morphometrically analyze alveolar enlargement. **Materials and Methods:** Thus, both for the treatment of COPD and endodontic treatment, LASER is used in order to modulate inflammation and reduce infection. 64 mice were used, divided into 8 experimental groups: I-Basal (No disease induction), II-PAA (Asymptomatic apical periodontitis induction), III-PAA + TTO (PAA induction and endodontic treatment), IV-PAA + TTO + aPDT (PAA induction, endodontic treatment and antimicrobial photodynamic therapy), V-COPD (chronic obstructive pulmonary disease induction), VI-COPD + PAA (COPD induction, PAA), VII-COPD + PAA + TTO (induction of COPD, PAA and endodontic treatment), VIII-COPD + PAA + TTO + aPDT (COPD induction, PAA; endodontic treatment and antimicrobial photodynamic therapy). **Results:** In the total and differential count of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage there was an increase in the number of cells in the PAA and COPD groups. The number of macrophages was lower in the COPD + PAA group, which received endodontic treatment and photodynamic therapy as well. As for the number of lymphocytes, the COPD + PAA groups, after endodontic treatment and photodynamic therapy, showed a decrease in the number of cells. As for the number of neutrophils, the groups of diseases PAA and COPD, who received endodontic treatment associated or not with therapy, there was a decrease in the number of cells in relation to the respective PAA group. The cytokine IL-6 in serum and in BAL showed a reduction in relation to PAA and COPD diseases, except in the COPD + PAA + TTO group had a statistically equal number in the material removed from BAL. The amount

of IL-10 in the serum decreased when PAA and COPD were associated. The results in the LBA showed that there was an increase in TNF- α in relation to the baseline group. And in the serum an increase in TNF- α in the association of COPD and PAA diseases submitted to endodontic treatment complemented by antimicrobial photodynamic therapy. Conclusion: Our data demonstrated that endodontic disease “per se” can cause pulmonary inflammation, without alveolar destruction in the lung. However, the association of COPD and PAA led to a reduction in pulmonary inflammation, thus being able to infer a protective effect on COPD. In addition, endodontic treatment associated or not with aPDT maintained this inhibitory effect of the pulmonary inflammatory response in an experimental model of COPD.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, asymptomatic apical periodontitis, aPDT.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

aPDT - Terapia foto dinâmica antimicrobiana

CD4 - Diferenciação de grupo 4

CD8 - Diferenciação de grupo 8

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

cm - Centímetros

EFC – extrato de fumaça de cigarro

ELISA - acrônimo de *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FS - Fotossensibilizador

g - Gramas

HE - Hematoxilina-eosina

IFN- γ - Interferon gama

i.m. - Intramuscular

i.t. - Intra traqueal

IL-1 β - Interleucina 1 beta

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

J - Joules

LBA - Lavado Broncoalveolar

LBI - Laser de Baixa Intensidade

Lm - Intercepto linear médio

LPS - Lipopolissacarídeo

LSS - Lauril sulfato de sódio

LTB4 - Leucotrieno B4

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos 1

MEC - Matriz extracelular

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MMP-9 - Metalopeptidase 9

MMP-12 -Metalopeptidase 12

mg - Miligrama

min - Minutos

mL ou ml - Mililitro

mm - Milímetro

mM - MiliMol

mW – MiliWatt

NETs - armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF- κ B - Fator nuclear kapa beta

nm - Nanômetro

PAA - Periodontite apical assintomática

PAS - Ácido periódico-Schiff

PAMP - Padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Tampão fosfato salino

PRR - receptores de reconhecimento de padrões

PDT - Terapia foto dinâmica

RANTES - Reguladora na ativação de células T normais expressas e segregadas

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

rpm - Rotações por minuto

s - Segundos

s.c. - Subcutâneo

TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta

Th1 - T helper tipo 1

Th2 - T helper tipo 2

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

TLRs - Toll-like - receptores do tipo Toll

μ g - Micrograma

μ m - Micrômetro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bronquite e enfisema na DPOC	2
Figura 2 - Alargamento aveolar.	3
Figura 3 - Citocinas e quimiocinas envolvidas na fisiopatologia da DPOC.....	4
Figura 4 - Células e citocinas, imunoglobulinas e o processo de reabsorção óssea na PAA.....	12
Figura 5 - Diagrama de Jablonski.....	19
Figura 6 - Esquema representativo dos grupos experimentais.....	23
Figura 7 - Torneira de fluxo de 3 vias, tubo Falcon	24
Figura 8 - Suporte para imobilização do animal.....	25
Figura 9 - Acesso com a broca LN.	26
Figura 10 - Imagem da PAA por radiografia digital	28
Figura 11 - Ilustração de mensuração do intercepto linear médio (Lm).....	29
Figura 12 - Análise do número de células totais do LBA	32
Figura 13 - Análise de macrófagos (A), linfócitos (B) e neutrófilos (C) do LBA. As células foram quantificadas a partir de citocentrifugados do LBA.....	34
Figura 14 - Quantificação de IL-6 no soro (A) e no LBA (B).....	36
Figura 15 - Quantificação de IFN- γ no soro (A) e no LBA (B).....	38
Figura 16 - Quantificação de TNF- α no soro (A) e no LBA (B).....	40
Figura 17 - Quantificação de IL-1 β no soro (A) e no LBA (B).....	42
Figura 18 - Quantificação de IL-4 no soro (A) e no LBA (B).....	44
Figura 19 - Quantificação de IL-10 no soro (A) e no LBA (B).....	46
Figura 20 - Avaliação do sobre diâmetro alveolar médio (Lm)	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bronquite e enfisema na DPOC.	22
Tabela 2 - Parâmetros dosimétricos utilizados na terapia fotodinâmica	27

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	15
1. CONTEXTUALIZAÇÃO	1
1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)	1
1.2. Fisiopatologia da DPOC	2
1.2.1. Macrófagos	4
1.2.2. Linfócitos	6
1.2.3. Neutrófilos	8
1.3. Fisiopatologia da Periodontite Apical Assintomática (PAA)	10
1.3.1. Leucócitos polimorfonucleares	12
1.3.2. Linfócitos B, plasmócitos, imunoglobulinas (Ig) e outros fatores plasmáticos	12
1.3.3. Linfócitos T	13
1.3.4. Macrófagos	13
1.3.5. Mediadores inflamatórios na PAA	14
1.3.6. Osteoclastos e osteoblastos	15
1.4. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	17
1.4.1. Mecanismos da PDT e a físico-química do azul de metileno	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Gerais	21
2.2. Objetivos específicos <i>in vivo</i>	21
2.2.1. Avaliar o número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA	21
2.2.2. Quantificar os níveis de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , e IFN- γ no sobrenadante do LBA e no soro	21
2.2.3. Analisar morfometricamente o alargamento alveolar	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais	22
3.2. Delineamento experimental	22
3.3. Cronograma experimental	23
3.4. Modelo experimental de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) por extrato de cigarro	23
3.5. Indução da periodontite apical assintomática	24
3.6. Tratamento endodôntico e terapia fotodinâmica	25
3.7. Eutanásia dos animais	27
3.8. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado bronco alveolar (LBA)	28
3.9. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA	28
3.10. Avaliação morfométrica alveolar	28
3.11. Análise estatística	29

4. RESULTADOS	30
4.1. Análise das células do lavado broncoalveolar (LBA).....	30
4.2. Análise das células diferenciais do LBA.....	32
4.3. Quantificação de IL-6 no soro (A) e no LBA (B)	34
4.4. Quantificação de IFN- γ no soro (A) e no LBA (B).....	36
4.5. Quantificação de TNF- α no soro (A) e no LBA (B).....	38
4.6. Quantificação de IL-1 β no soro (A) e no LBA (B).	40
4.7. Quantificação de IL-4 no soro (A) e no LBA (B)	42
4.8. Quantificação de IL-10 no soro (A) e no LBA (B).	44
4.9. Avaliação do sobre diâmetro alveolar médio (Lm).	46
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1. Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC)

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é atualmente a quarta principal causa de morte no mundo e com projeção para ser a terceira principal causa de morte até 2020 e que pode aumentar mais ainda nas próximas décadas devido à exposição contínua aos fatores de risco para a DPOC e ao envelhecimento da população. Mais de 3 milhões de pessoas morreram da DPOC em 2012, representando 6% de todas as mortes em todo o mundo. A DPOC representa um importante desafio de saúde pública, que é evitável e tratável e é uma das principais causas de morbidade crônica e mortalidade em todo o mundo; muitas pessoas sofrem desta doença há anos e morrem prematuramente dela ou de suas complicações (Gold, 2019).

De acordo com dados do Projeto Latino Americano de Investigação Pulmonar, a prevalência de DPOC no Brasil é de 15,8% nas pessoas acima de quarenta anos de idade, sendo que representa elevados custos de tratamento quando comparada com outras doenças. Além disso, dados nacionais identificam a DPOC como a quinta maior causa de internamento no sistema público de saúde, com uma prevalência estimada de 12% nos indivíduos acima de quarenta anos. Apesar de todos os esforços para se aumentar o seu diagnóstico, ela ainda continua sendo uma doença complexa, desde sua fisiopatologia até o seu tratamento (Menezes, 2005).

A DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo, sem total reversibilidade, em geral progressiva independentemente do tratamento instituído, com manifestações respiratórias e sistêmicas. 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 mineração (Gold, 2019).

A DPOC pode ter diferentes apresentações clínicas e muitos pacientes são diagnosticados como portadores de enfisema pulmonar ou bronquite crônica (Figura 1). Os agentes irritantes presentes no fumo tais como os aldeídos, elementos fenólicos, cetonas, álcoois e amônia promovem alterações nos brônquios, denominado ciliostase. Tal processo, verificado experimentalmente em animais, ocorre no homem ao fumar em torno de cinco cigarros por dia, resultando na diminuição e parada dos movimentos ciliares. Com a continuidade do fumar, os cílios

acabam por cair, desnudando extensas áreas da luz brônquica gerando uma série de alterações como edema e inflamação da mucosa, hipersecreção de muco, aumento do número de células caliciformes e que também produzem muco (Peron et al., 2015). Com o tempo, surgem a hipertrofia dos músculos lisos, fibrose da parede brônquica e destruição alveolar, característica do enfisema, resultando na obstrução das vias aéreas (Lange, 2015).

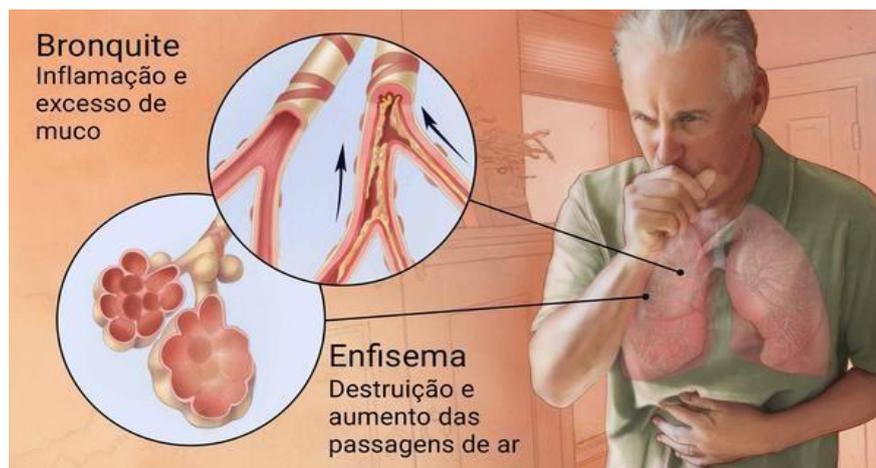


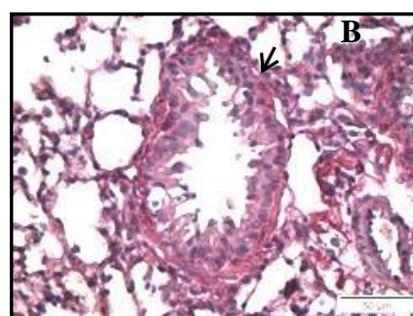
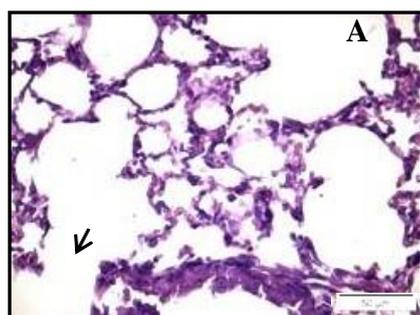
Figura 1 - Bronquite e enfisema na DPOC. fonte <http://google.com>

1.2. Fisiopatologia da DPOC

A fisiopatologia da DPOC, segundo Rovina et al. 2013, está relacionada com a inalação da fumaça de cigarro e outros irritantes os quais recrutam células inflamatórias para o parênquima pulmonar. Dentre estas, os mais relevantes são neutrófilos, macrófagos e linfócitos. A presença de neutrófilos e da elastase neutrofílica são importantes para o desenvolvimento do enfisema. As respostas inflamatórias e imunológicas crônicas desempenham papéis-chave no desenvolvimento e progressão da DPOC. Dados recentes fornecem evidências da função do inflamassoma NLRP3 na inflamação das vias aéreas observada na DPOC.

A teoria da protease/antiprotease no enfisema induzido por fumaça de cigarro é baseada em uma resposta inflamatória crônica no trato respiratório inferior, onde as células inflamatórias liberam uma grande variedade de proteases que se sobrepõem às defesas antiproteolíticas, com subsequente degradação de tecido conjuntivo. A perda do movimento elástico e a evidência histológica de dano das fibras elásticas implicam necessariamente em degradação de elastina como um fator chave na patogênese do enfisema (Barnes et al., 2015).

A fumaça do cigarro ativa as células imunes inatas, acionando os receptores de reconhecimento (PRRs) para liberar o sinal de alerta. Estes sinais atuam como ligantes dos receptores Toll-like (TLRs), desencadeando a produção de citocinas e induzindo inflamação inata. Entre os fumantes que desenvolvem a DPOC, parece haver um padrão específico de inflamação nas vias aéreas e no parênquima como resultado de respostas imunes inatas e adaptativas, com predominância de células CD8⁺ e CD4⁺, e na doença mais grave, com a presença de linfócitos B e células T. Além disso, infecções virais e bacterianas interferem na inflamação crônica observada na DPOC instalada e exacerbações por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Franciosi et al., 2006; Barnes et al., 2008). Finalmente, autoimunidade é outro aspecto novo que pode desempenhar um papel crítico na patogênese da DPOC. (Figura 2).



Alargamento alveolar → **Enfisema**

Deposição de colágeno → **Fibrose**

Figura 2. Remodelação pulmonar. Fotomicrografia A - destruição da parede alveolar e a B - deposição das fibras colágenas nas vias aéreas (40X), indicados pelas flechas (→). Fonte própria.

O processo inflamatório crônico se correlaciona com o aumento da expressão

de múltiplos genes associados às reações inflamatórias. Muitos destes genes são regulados pelo fator nuclear de transcrição, o NF- κ B (NF-Kapa Beta), e que está aumentado em pacientes com DPOC e fumantes, ativados por citocinas pró-inflamatórias e pelo estresse oxidativo. Ocorrem também um aumento da ativação de NF- κ B em macrófagos alveolares pulmonares, durante as exacerbações da DPOC, interligando infecções, estresse oxidativo e a expressão aumentada de genes inflamatórios. Assim as exacerbações da DPOC parecem ser devido à exacerbação do processo inflamatório (Barnes et al., 2014).

Estas células são responsáveis pela secreção de proteases, como a MMP-9 e 12, que causam a degradação da elastina, proteína que reveste o parênquima, causando o enfisema. A elastase dos neutrófilos aumenta a secreção de muco causando a bronquite. Os macrófagos também secretam TGF- β , que estimulam a proliferação dos fibroblastos, causando a fibrose. (Hogg, Timens, 2009). (Figura 3).

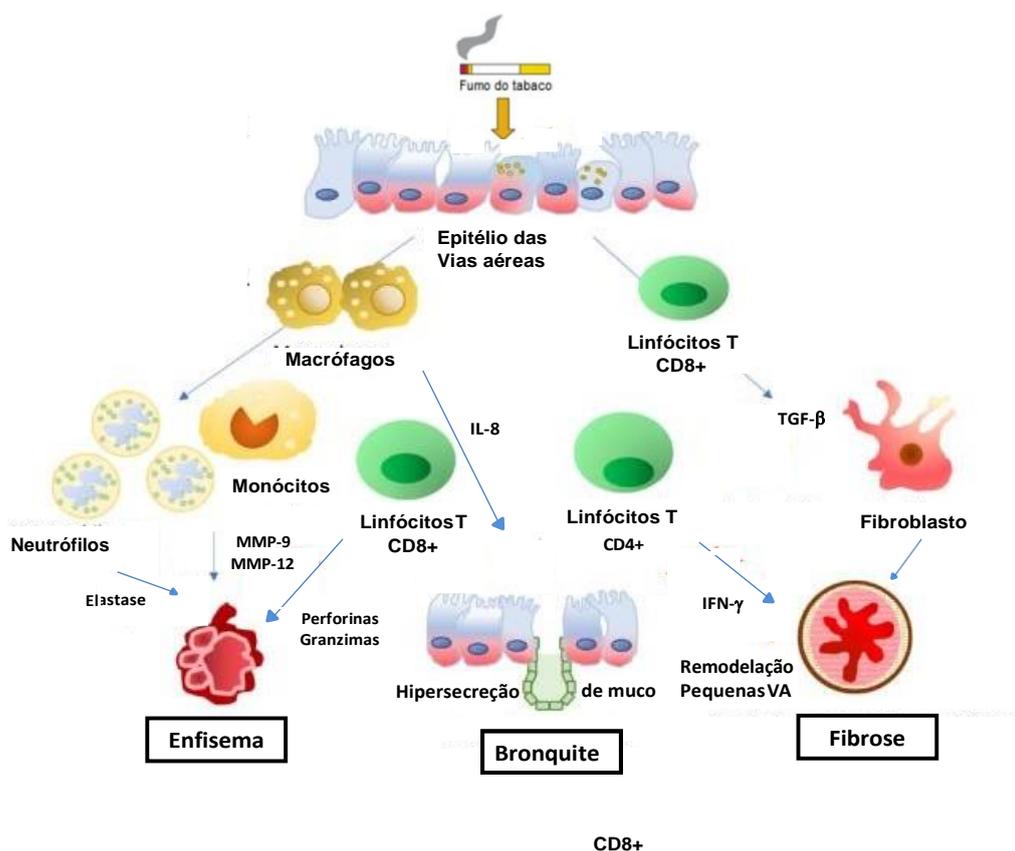


Figura 3 – Células e citocinas envolvidas na fisiopatologia da DPOC. Adaptado de Sapey et al. 2019.

1.2.1. Macrófagos

Os macrófagos são encontrados frequentemente em pacientes com DPOC, sendo apontado como a célula principal no desenvolvimento da doença. Ativados por substâncias presentes no cigarro, os macrófagos podem secretar TNF- α , MCP-1, LTB₄, IL-8 e ERO. Assim estas células podem ser consideradas reagentes do processo inflamatório e efectoras da lesão pulmonar. A liberação desses mediadores ativa as células epiteliais e macrófagos alveolares a liberar mais fatores quimiotáticos como CCL2, CXCL1 e CXCL8, que atraem os neutrófilos e monócitos, aumentando o

processo inflamatório. Também ocorre liberação de CXCL9, 10 e 11, que vão atrair os linfócitos Th1 e Tc1 (Hogg, Timens, 2009).

Os macrófagos são células inflamatórias derivadas de leucócitos mononucleares, cujo número aumenta nas vias aéreas, LBA, áreas alveolares e no escarro de pacientes com a DPOC, correlacionada com a resposta inflamatória e a destruição da parede alveolar na DPOC. Eles produzem mediadores inflamatórios da DPOC, como IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), IL-8, monócito proteína quimioatraente-1 (MCP-1), espécies reativas de oxigênio e MMPs. (Arora et al. 2018; Barnes 2014).

A IL-8 é um membro da família de quimiocinas CXC (cisteína-aminoácido-C) e é secretada por macrófagos, células epiteliais e até células endoteliais. É um importante fator inflamatório no escarro e LBA em pacientes com DPOC. A IL-8 pode melhorar a expressão de mucina 5AC direta ou indiretamente, induzindo a secreção de NE de neutrófilos, levando à superprodução de mucina e obstrução das vias aéreas. As citocinas IL-1 β e TNF- α são citocinas pró-inflamatórias que são secretadas principalmente por macrófagos (Jundi, Greene 2015; Simpson et al. 2014; Lerner et al. 2016).

Além disso, a produção persistente da IL-1 β regula positivamente a expressão de citocinas neutrofílicas e MMPs, incluindo MMP-9 e MMP-12 em camundongos e resulta em inflamação das vias aéreas e aumento alveolar (Lappalainen et al., 2005; Ji et al., 2015).

A remodelagem alveolar e da parede das vias aéreas no camundongo ocorre na sobre expressão de TNF- α (SPS-TNF- α) de enzimas degradadoras de elastina e consequente remodelamento da matriz. Esse efeito foi atribuído à estimulação induzida por TNF- α de MMPs e NE e a ativação do CD8+, Linfócitos T, todos os quais contribuem para a destruição dos tecidos pulmonares. Existem diferentes isoformas de TGF- β , incluindo TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3. Entre eles, o TGF- β 1 está implicado na progressão da patogênese da DPOC (Reynaert, 2015; Di Stefano et al., 2018; Michaeloudes et al., 2017).

Em relação à DPOC, TGF- β induz a secreção de MEC, proliferação de células musculares lisas e transição do fenótipo epitélio-mesênquima. A exposição à EFC (extrato de fumaça de cigarro) aumenta a produção de TGF- β a partir de células epiteliais e inflamação das células, que estava ligado à lesão pulmonar induzida por EFC e remodelação das vias aéreas na DPOC (Gohy et al., 2015; Hoang et al., 2016).

Isso pode fornecer parcialmente um mecanismo para obstrução de pequenas vias aéreas induzida por CS. Os macrófagos são uma fonte importante de MMPs tanto

quanto neutrófilos. A ativação de macrófagos nos pulmões desempenha um papel crítico na produção de MMP que contribui para a destruição da parede alveolar. Os pesquisadores descobriram que a perda de tirosina fosfatase 2 em camundongos, um regulador de ativação de macrófagos, resultou na ativação do TGF- β , regulando positivamente a expressão da MMP-12 em macrófagos, levando a lesão progressiva semelhante ao enfisema nos pulmões de camundongos. Além disso, recentemente um estudo sugeriu que desidratação da superfície das vias aéreas também pode ativar macrófagos produzir MMP-12 e desencadear enfisema dependente de MMP-12 independente da CS 9 (Xu et al 2017; Trojanek et al. 2014).

Esses achados podem fornecer algumas pistas para explorar o enfisema não-induzido por CS. MCP-1 é uma quimiocina de monócitos que pode ser produzida por macrófagos, células epiteliais, células musculares lisas e mesmo células endoteliais. Embora alguns estudos tenham mostrado que o nível de proteína da MCP-1 não estava correlacionado com número de macrófagos, instilação intratraqueal de MCP-1 em camundongos knockout para elastase de macrófagos resultou em aumento da infiltração de macrófagos nas vias aéreas (Yoshimura 2018; Hautamaki et al. 1997).

A capacidade do MCP-1 de acumular macrófagos pode ajudar a acelerar o processo de obstrução das vias aéreas. A autofagia desempenha um papel crítico no desenvolvimento de muitas células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos, e linfócitos, que desempenham papéis críticos no desenvolvimento e patogênese da inflamação da DPOC. In vivo estudos em ratos mostraram que a superexpressão do miR-34/449 leva à diminuição da remodelação das vias aéreas induzida pela ovalbumina suprimindo a inflamação das vias aéreas relacionada à autofagia e fibrose (Qian et al. 2017; Yin et al. 2017).

No geral, os macrófagos são as principais células inflamatórias em Pulmão de DPOC. Eles estão diretamente envolvidos no processo de remodelação das vias aéreas secretando enzimas e agentes inflamatórios fatores que atuam direta e indiretamente na estrutura estrutural das vias aéreas células para modular a função das células epiteliais e estromais (Hautamaki et al. 1997).

1.2.2. Linfócitos

O sistema imunológico adaptativo é ativado na DPOC, com infiltração de células T, células B, auxiliar Th17, juntamente com uma diminuição das células T reguladoras dentro de ratos sem células B ou células T não provocam remodelação

das vias aéreas, ilustrando a importância da adaptação resposta imune no remodelamento das vias aéreas.

Existem dois padrões de resposta das células T CD4: T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). O primeiro, como ocorre na DPOC, está relacionado com a liberação de IL-2, interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alpha (TNF- α); enquanto que o segundo está associado à secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, à produção de imunoglobulina (Ig) E e IgG4. Do mesmo modo, as células T CD8 também apresentam dicotomia de expressão, neste caso, sendo chamadas de Tc1 (células T citotóxicas do tipo 1) e Tc2 (células T citotóxicas do tipo 2). No primeiro padrão, observa-se produção de IFN- γ , mas não de IL-4, como observado na DPOC. No segundo, as células liberam IL-4, mas não INF- γ (Maeno et al., 2007; Barnes, 2008).

Na DPOC, o interesse está voltado para o padrão Tc1 das células CD8, pois vários artigos demonstram o predomínio dessas células no escarro, no LBA e na biópsia dos pacientes, quando comparado aos tabagistas sem limitação do fluxo aéreo e aos voluntários não tabagistas. No entanto, os linfócitos T CD4 também estão aumentados no parênquima de pacientes com DPOC, especialmente naqueles com doença mais grave. Nesse sentido, é possível que essas células tenham importância na manutenção da memória imunológica que perpetuaria o processo mesmo após a suspensão do tabagismo (Cosio et al., 2002).

Os linfócitos T estão aumentados no parênquima pulmonar e vias aéreas de fumantes quando comparados com nunca fumantes se eles desenvolvem DPOC ou não. Existe um maior aumento de CD8⁺ em comparação com CD4⁺ (Aurora et al. 2005; Mikko et al. 2013).

A polarização da inflamação pulmonar da DPOC em favor do tipo 1 resulta na produção e liberação de um determinado tipo de citocinas, especialmente o IFN- γ , liberado pelos linfócitos CD4 e CD8 e capazes de ativar os macrófagos, que, por sua vez, passam a produzir uma série de citocinas, incluindo IL-12, que mantém a diferenciação de linfócitos desviada para o fenótipo (Shapiro, 1999).

O Linfócito Th17, responsável pelo recrutamento de neutrófilos, também está presente na patogenia da DPOC. Além de seu papel gerador de inflamação, o Th17 também está relacionado com o remodelamento das vias aéreas, presente na DPOC (Barker, Brightling, 2013).

Na DPOC, os Linfócitos T reguladores (Treg) contribuem para a disfunção da célula T efetora, mediante a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador-beta (TGF- β). Alguns autores relatam aumento de células Th17 e redução das células T reguladoras nas vias aéreas de pacientes com DPOC (Barker e Brightling, 2013; Sales et al., 2017).

1.2.3. Neutrófilos

Os neutrófilos são células inflamatórias essenciais na patogênese da DPOC, sendo a neutrofilia no escarro e no sangue uma característica de todos os pacientes com DPOC. Eles também foram relatados como um marcador da gravidade da DPOC, foi constatado que pacientes com maior porcentagem de neutrófilos no escarro apresentaram maior escore de dispneia na DPOC. (Singh et al. 2010, Mendy et al. 2018; Bartoli et al. 2016).

Na DPOC, os neutrófilos são recrutados para as vias aéreas e secretam várias proteases, incluindo elastase do neutrófilo (NE), metaloproteinase da matriz (MMP), bem como a mieloperoxidase (MPO), que contribuem para a destruição alveolar Além disso, algumas quimiocinas derivadas de neutrófilos, como IL-1 e CXCL8 / IL-8, estão comprovadamente envolvidas na lesão tecidual e remodelação (Aimbire et al., 2008; Baek et al. 2013).

As MMPs são uma família de proteases dependentes de zinco que podem ser secretados por células estromais, neutrófilos e macrófagos. Eles são geralmente classificados de acordo com os substratos que degradam. A maioria das MMPs implicadas na patogênese do enfisema incluem a colagenase MMP-1, a gelatinase MMP-9, e a metaloelastase MMP-12. (Hendrix, Kheradmand, 2017).

Os estudos mostraram MMPs aumentadas no líquido do lavado broncoalveolar (LBA) e no plasma de pacientes com enfisema e contribuem para a obstrução das vias aéreas, destruindo os componentes estruturais dos tecidos extracelulares (D'Armiento et al. 2013, Ostridge et al. 2016).

A elastase de neutrófilo (NE) é uma serina proteinase derivada do neutrófilo que possui comprovadamente envolvimento no dano e na remodelação tecidual (Polverino et al. 2017) e ainda em um estudo descobriu-se que a deficiência de NE em camundongos resultou na proteção contra o enfisema, após a exposição ao fumo de cigarro (Guyot et al. 2014).

O mecanismo subjacente depende, em grande parte, do fato da NE ter uma capacidade semelhante à MMPs em causar danos aos tecidos. (Lerman, Hammes, 2018).

Além disso, a NE pode cooperar com MMPs e amplificam o efeito da degradação da MEC (matriz extracelular). Além da degradação da matriz, a NE também pode promover fibrose peribrônquica, aumentando a proliferação de fibroblastos. A NE é um potente estimulante da secreção de muco de glândulas submucosas e células caliciformes, envolvidas em obstrução das vias aéreas (Gregory et al. 2015; Guo et al. 2016).

MPO é um produto de neutrófilos e macrófagos e armazenado principalmente nos grânulos primários dos neutrófilos. É um mediador inflamatório que é supra regulado e pode acelerar a resposta inflamatória (Arai, 2010; Naussef 2018).

Esse achado sugere um possível papel protetor MPO na remodelação das vias aéreas. As armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) são liberadas por neutrófilos ativados e cobertos com histonas e enzimas como NE e MPO que capturam bactérias; no entanto, a formação excessiva de NETs pode contribuir para a lesão do órgão. Foram observadas grandes quantidades de NETs nas vias aéreas de pacientes com DPOC e associadas à gravidade da doença e frequência de exacerbação (Qiu et al. 2017).

A infecção bacteriana e o tabagismo são tipicamente considerados como principais fatores de risco para DPOC (Scannapieco, 2001; Scannapieco, 2003; Hymman, 2004; Katancik, 2005).

A periodontite que é então caracterizada por uma doença inflamatória e é frequentemente associada a outras doenças crônicas, condições sistêmicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e asma (Erazo, Whetstone 2019; Folwaczny et al. 2019). Um mecanismo que tem sido proposto para periodontite crônica, como fator de risco para outras doenças, compreende a disseminação sistêmica de bactérias orais e mediadores inflamatórios. Sendo a boca um reservatório para patógenos do trato respiratório e aspirando uma grande quantidade de contaminantes virulentos no pulmão, poderia causar pneumonia ou exacerbação aguda da DPOC (Ramos et al., 2011).

Os poucos trabalhos existentes na literatura, correlacionam a doença periodontal com a DPOC (Cullinan et al. 2009, Falcón, Bullón 2019) sugerem que o tratamento periodontal está associado com menor risco de eventos respiratórios adversos na

DPOC. Assim, concluíram que o estabelecimento e manutenção de saúde bucal para pacientes com doença periodontal e DPOC, torna-se uma questão importante para ser avaliada (Armitage 2011, Horliana et al. 2014). De fato, recentemente tem havido um maior interesse na associação da DPOC com a doença periodontal, embora os mecanismos desta associação ainda não estejam completamente elucidados (Cotti et al, 2014). Assim, a ampliação do conhecimento acerca das interações entre a DPOC e a periodontite apical, possibilitaria um aperfeiçoamento da prevenção e do tratamento com conseqüente redução da morbidade e mortalidade decorrentes da doença.

1.3. Fisiopatologia da Periodontite Apical Assintomática (PAA)

Clinicamente, a periodontite apical começa como uma inflamação aguda do ligamento periodontal apical e da esponjosa circundante, acompanhada de sintomas iminentes bem conhecidos, como dor, sensibilidade à percussão e imagem radiográfica de reabsorção óssea. O agente causador, geralmente, são as bactérias, seus antígenos e toxinas do sistema de canais radiculares, saturando a capacidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro, a lesão apical progride, a formação de abscesso ocorrendo com ou sem fistulação e se espalhando para o osso. Se a presença de substâncias irritantes tiver duração prolongada, a lesão pode se tornar crônica (assintomática) sem causar sintomas clínicos dramáticos ao paciente. A periodontite apical assintomática representa um equilíbrio dinâmico entre os agentes irritativos exógenos e os mecanismos de defesa do hospedeiro, nos quais os últimos não são capazes de destruir e eliminar completamente os fatores patogênicos, mas, formam uma barreira circunscrita, para conter eficazmente uma nova invasão (Sundqvist et al., 1998).

Há consenso de que a periodontite apical persistente após o tratamento do canal radicular apresenta uma situação etiológica e terapêutica mais complexa do que a periodontite apical que afeta os dentes que não foram submetidos ao tratamento endodôntico. O espectro etiológico e as opções de tratamento da periodontite apical persistente são mais amplos do que aqueles dos dentes que não foram submetidos a tratamento endodôntico prévio (Nair, 2004).

Antígenos bacterianos derivados do canal radicular infectado são capturados por células apresentadoras de antígenos (APC), processados e apresentados aos linfócitos Th. Um sinal duplo de apresentação de antígeno com IL-1 β ativa os linfócitos

1.3.1. Leucócitos polimorfonucleares

Nas áreas necróticas e exsudativas da inflamação perirradicular, os neutrófilos fornecem a primeira linha de defesa contra a invasão bacteriana do canal radicular infectado. Na zona granulomatosa da lesão eles podem ser encontrados intercalados entre linfócitos, plasmócitos, macrófagos e elementos fibrovasculares. A produção induzida por lipopolissacarídeos (LPS) de IL-1 β e IL-6 por neutrófilos em lesões perirradiculares sugere que essas células podem participar ativamente da expressão gênica em ciclos positivos de auto estimulação, como ativação sinérgica de explosão oxidativa e citotoxicidade, bem como em processos reguladores protetores e destrutivos, como o recrutamento e maturação de osteoclastos (Bando et al., 1993; Miller et al., 1996; Euler et al., 1998).

1.3.2. Linfócitos B, plasmócitos, imunoglobulinas (Ig) e outros fatores plasmáticos

Um papel significativo na imunidade antibacteriana local é atribuído a altas concentrações de IgG e IgA no corpo dos granulomas periapicais, nas paredes e fluidos dos cistos periapicais, bem como nos exsudatos dos canais radiculares (Greening, Schonfeld 1980; Johannessen et al., 1983; Keudell et al., 1981; Torres et al., 1994).

Os linfócitos B e plasmócitos produtores de IgG e IgA, estão em grandes números no tecido de granulação perirradicular em humanos e em modelos animais experimentais (Kawashima et al. 1999; Márton, Kiss 1993; Sol et al. 1998; Stern et al. 1981).

Além das imunoglobulinas produzidas localmente, outras proteínas plasmáticas, originadas pela transudação de vasos sanguíneos dilatados que penetram na lesão, como componentes do complemento, proteínas dos sistemas de coagulação entre outros, os quais interagem com as Igs e células do infiltrado imunoinflamatório periapical (Johannessen et al. 1983; Lerner 1994; Sundqvist, Lerner 1994).

1.3.3. Linfócitos T

Embora os linfócitos B e as células plasmáticas representem uma população importante do infiltrado inflamatório perirradicular, a determinação quantitativa das subpopulações de linfócitos demonstrou consistentemente um excesso de células T sobre os linfócitos B, indicando que os granulomas periapicais são predominantemente lesões do tipo célula T em humanos e em lesões experimentais induzidas em ratos (Bergenholtz et al. 1983; Pulver et al. 1978; Torabinejad, Kettering 1985).

Os linfócitos T CD4⁺ respondem aos antígenos em conexão com as moléculas do MHC classe II apresentados na superfície das APCs e podem mediar a produção de Igs, bem como para os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T CD8⁺ são células restritas ao MHC classe I e tornam-se citotóxicos após a estimulação com o complexo antígeno-MHC (Croft, Swain 1991; Reinherz, Schlossman 1980).

Estudos em lesões periapicais induzidas em ratos demonstraram que as lesões agudas vs crônicas, possuíam uma composição diferente de linfócitos T, sendo as células T CD4⁺ predominando na fase inicial do desenvolvimento da lesão seguida por sua diminuição gradual na fase crônica, enquanto as células T CD8⁺ aumentam superando a subpopulação de células T auxiliares (Kawashima et al. 1996; Stashenko, Yu, 1989).

Esse fato, pode significar que o infiltrado de células perirradiculares em pacientes com lesões relativamente precoces é caracterizado pelo excesso de células T auxiliares/indutoras, enquanto nas lesões mais avançadas as células T citotóxicas/supressoras são mais proeminentes (Geratz 1995; Mielke et al. 1997).

1.3.4. Macrófagos

A presença de macrófagos é crucial na periodontite apical crônica, bem como ao desenvolvimento da lesão e à perpetuação de reações inflamatórias, embora sua frequência no infiltrado inflamatório celular tenha sido espalhada entre amplas faixas de 4% a mais de 50%. Os macrófagos desempenham um papel altamente complexo entre os membros celulares do infiltrado inflamatório perirradicular. Verificou-se recentemente que, nos granulomas periapicais experimentais induzidos pela exposição da polpa molar de rato não selada à microbiota oral, um dos primeiros eventos é o forte influxo de macrófagos para a tecido periapical (Bergenholtz et al. 1983; Kontiainen, Ranta 1986; Kopp, Schwarting 1989; Tani et al. 1992).

Isso indica que o hospedeiro monta rapidamente a primeira linha de defesa local composta por fagócitos na tentativa de eliminar estímulos nocivos que progridem da câmara pulpar afetada em direção ao espaço periapical. A escassez dessas células no ligamento periodontal normal e seus marcadores de superfície celular indicam que os macrófagos exsudativos, caracterizados pela expressão de antígenos do MHC, são a subpopulação dominante de macrófagos, tanto em lesões periféricas humanas quanto em ratos (Márton et al. 1998, Okiji et al. 1994; Yu, Stashenko 1987).

Os macrófagos recrutados para a linha de defesa são ativados ao se depararem com os microrganismos invasores e seus produtos. Eles fagocitam e na maioria dos casos eliminam com sucesso as bactérias que atingem o espaço periapical. Bactérias intracelulares em macrófagos adjacentes ao forame apical foram identificadas repetidamente em lesões periapicais. No entanto, os macrófagos não estão restritos a executar os mecanismos efetores de vital importância da fagocitose e da morte. Eles apresentam os antígenos estranhos digeridos nos linfócitos T em conexão com as moléculas do MHC, seguidos pela ativação das células T (Walton, Ardjmand 1992; Weiss 1993).

1.3.5. Mediadores inflamatórios na PAA

As citocinas mais relevantes em relação à proteção do hospedeiro e formação de granuloma são IL-1 β e TNF- α . A expressão de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α estava restrita a macrófagos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, leucócitos polimorfonucleares, osteoblastos e osteoclastos, mas não a linfócitos em lesões periapicais humanas e experimentais, tanto em níveis de proteína e como na sua expressão. Assim, citocinas e quimiocinas liberadas pelas células epiteliais e endoteliais residentes, induzidas por LPS, desempenham um papel fundamental na proteção do hospedeiro e no desenvolvimento de formação de tecido de granulação em lesões inflamatórias periapicais (Bando et al. 1993; Takeishi et al. 1996; Tani-Ishii et al. 1995; Wang et al. 1997).

No tecido periodontal a IL-1 β é produzida por macrófagos/monócitos e PMNs. A sua ação é essencialmente induzir a quimiotaxia dos PMNs, a resposta de fase aguda, fagocitose e estimular a produção de IL-6 e IL-8. (Graunaite et al. 2011; Kayal 2013). No caso da IL-6 a sua ação, é ativar os PMNs e a resposta de fase aguda, promove também a diferenciação dos linfócitos B e, a produção de anticorpos

(Graunaite et al., 2011; Kayal, 2013). Ainda, a IL-17 é produzida por uma linhagem de linfócitos Th17. A presença desta citocina nos tecidos periapicais mostrou uma forte relação com a indução da destruição óssea. A IL-17 mais do que induzir a resposta inflamatória, amplifica a inflamação induzida por uma lesão tecidual pré-existente (Graunaite et al., 2011; Kayal, 2013). Já, o TNF- α é produzido por macrófagos, PMNs e linfócitos Th1, sendo a sua produção potencialmente estimulada por LPS; tem como função ativar linfócitos e macrófagos e induzir a resposta de fase aguda (Graunaite et al., 2011; Kayal, 2013). Por fim, o IFN- γ tem como principal função a ativação dos macrófagos, e a indução de citotoxicidade pelas células NK; induz a diferenciação Th1e é produzido por linfócitos ativados, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais. (Graunaite et al., 2011; Kayal, 2013).

1.3.6. Osteoclastos e osteoblastos

Para exercer sua função reabsortiva óssea, os osteoclastos requerem a cooperação dos osteoblastos formadores de ossos. Um equilíbrio fisiológico entre esses dois tipos de células em interação de funções opostas resulta no equilíbrio dinâmico do osso saudável que está em remodelamento permanente. Enquanto isso, a quantidade de osso reabsorvido é substituída por nova formação óssea (Hausmann et al 1972; Thomson et al 1986).

Algumas substâncias perturbam esse equilíbrio, levando ao excesso de perda óssea. Isso inclui componentes bacterianos, principalmente (LPS) e ácidos graxos de cadeia curta, além de substâncias derivadas do hospedeiro, como citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α e IL-6), derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), e complexo antígeno-anticorpo (Stashenko 1989; Torabinejad, Kiger 1980).

A presença e produção *in situ* de IL-1 β , TNF- α e IL-6 por fagócitos, células endoteliais e epiteliais em resposta aos estímulos extracelulares de ativação têm sido repetidamente demonstradas em lesões periapicais. Os resultados do modelo extensivamente estudado de granuloma periférico de rato indicam que a reabsorção óssea estimulada pela infecção pulpar é principalmente mediada por IL-1 α . Ao contrário dos ratos, a forma predominante de IL-1 expressa em lesões periapicais de seres humanos é a IL-1 β . Além do efeito da IL-1, a reabsorção óssea induzida por

altos níveis de IL-6 pode contribuir para o crescimento de cistos radiculares (Wang, Stashenko, 1993).

No rato, a perda óssea rápida nas lesões inflamatórias periapicais precoces pode ser evitada pelo inibidor da cicloxigenase indometacina. Os resultados do modelo de rato mais sofisticado demonstraram que as prostaglandinas pareciam atuar principalmente indiretamente como cofatores permissivos de citocinas reabsorvidas pelos ossos (Stachenko et al., 1994).

Segundo Kerekes e Tronstad (1979), cerca de 85% a 90% dos pacientes com lesões periapicais podem ser satisfatoriamente tratados através dos métodos endodônticos convencionais não-cirúrgicos. Estudos mostram que o tratamento endodôntico apropriado, além de eliminar as bactérias, interfere na ecologia complexa da microbiota dos canais radiculares, privando os microrganismos restantes de sua fonte nutricional (Sundqvist, 1992; Maalouf, Gutmann, 1994). As causas de falhas do tratamento endodôntico convencional podem ser por fatores biológicos e/ou técnicos. Entre elas, a incapacidade de erradicar todos os microrganismos dos canais radiculares durante o tratamento endodôntico, a complexidade anatômica dos canais radiculares, as fraturas radiculares, as rachaduras, os canais não localizados, entre outras (Wayman et al., 1992; Abou-Rass, 1993; Ray e Trope, 1995; Abou-Rass, Bogen, 1998).

Com intuito de elevar os índices de sucesso do tratamento convencional de canais radiculares, evitando a cirurgia periapical, o uso de hidróxido de cálcio, como um material preenchedor intermediário ou definitivo dos canais radiculares, faz parte da rotina da terapêutica endodôntica (Heithersay, 1975; Sjögren et al., 1991), o qual possui ação antibacteriana e anti-inflamatória, inibição da reabsorção óssea e estimulação da remineralização (Maalouf, Gutmann, 1994).

A terapia fotodinâmica (PDT) tem sido recomendada como método auxiliar ao procedimento endodôntico convencional no tratamento de lesões periapicais. AZIM et al., (2001) mostraram que a PDT, conjuntamente ao tratamento endodôntico pode promover a regeneração óssea nas lesões periapicais (Silva et al., 2012).

1.4. Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Há mais de 100 anos foi descoberto que a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês antimicrobial Photodynamic Therapy) tem a capacidade de eliminar microrganismos por meio da combinação adequada de luz e corante, na presença de oxigênio. A descoberta de que aPDT poderia ser utilizada como terapêutica para infecções locais é recente e suas aplicações clínicas estão sendo desenvolvidas, incluindo tratamento de infecções orais, infecções bacterianas dermatológicas, infecções bacterianas em abscessos cerebrais e dentais, úlceras infectadas células cancerígenas. Entre as vantagens de se adotar o aPDT como terapia antimicrobiana podemos citar a eficácia independente do padrão de resistência das espécies microbianas e amplo espectro de ação, tendo em vista que o fotossensibilizador pode agir em bactérias, vírus, fungos, leveduras e protozoários parasitas (Chiniforush et al., 2016).

Os biofilmes microbianos estão envolvidos em quase todas as patologias da estrutura dental e da cavidade oral. Pesquisas mostraram que a aPDT constituída por azul de metileno e um laser de diodo de 670 nm (potência de saída 280 mW, 30 s) ou azul de toluidina e uma luz LED de 628 nm (potência de saída 1000 mW durante 30 s) induziu danos graves, incluindo lise de células aos biofilmes de *E. faecalis*, com o primeiro também causando importante aumento da rugosidade superficial. Entretanto comparado ao uso de NaOCl a 2,5% a aPDT é menos eficiente para eliminar microrganismos (Zenus et al., 2016).

Recentemente, vários estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram resultados promissores sobre o uso de métodos fotodinâmicos e evidenciaram o potencial antimicrobiano da terapia fotodinâmica na endodontia durante a desinfecção do sistema radicular. A morte microbiana por aPDT depende da interação de três fatores: uma fonte de luz, um fotossensibilizador e um substrato. No entanto, não há consenso sobre um protocolo durante o tratamento do canal radicular (Sivieri-Araujo et al. 2013).

A terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) parece ser um método adjuvante eficaz no tratamento endodôntico, uma vez que os relatórios demonstraram um grau adicional de redução microbiana *in vitro* e *in vivo* quando a aPDT é usada após a preparação quimio-mecânica. Esta abordagem envolve a combinação de um fotossensibilizador (PS) e uma fonte de luz (geralmente um laser de baixa intensidade) para inibir um amplo espectro de microrganismos através da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). A absorção da luz excita o PS, que reage com o oxigênio

para produzir ERO que é tóxico para os microrganismos. A aPDT antimicrobiana é reconhecida como uma estratégia de tratamento minimamente invasiva e minimamente tóxica (Chrepa et al., 2014; Garcez, Hamblin, 2017).

A sua indicação como excelente adjunta à terapia endodôntica convencional está bem documentada, no entanto. Os dados sugerem a necessidade de ajustes de protocolo ou novas formulações de fotossensibilizador para melhorar a previsibilidade da terapia fotodinâmica em endodontia. Essa técnica é minimamente invasiva e não tem efeito colateral às células do hospedeiro, dentro de parâmetros adequados, auxiliando na recuperação. Pode ser considerada economicamente viável e pode ser executada em diferentes sessões (Sivieri-Araújo et al., 2015).

1.4.1. Mecanismos da aPDT e a físico-química do azul de metileno

A bioestimulação é um fenômeno fotobiológico e os foto receptores primários são componentes da cadeia respiratória fato que explica a universalidade dos efeitos do laser de baixa potência. Os componentes da cadeia respiratória podem ser os foto receptores no caso de estimulação do metabolismo celular, bem como inibição dependendo da dose de luz. Em doses baixas, a irradiação causa regulação redox de metabolismo celular; em doses elevadas de dano fotodinâmico prevalece. A luz quântica é apenas um gatilho para a regulação do metabolismo celular. Isso explica as baixas doses e intensidades necessárias e a magnitude do efeito da bioestimulação depende do estado fisiológico da célula antes da irradiação. Isso explica por que o efeito de bioestimulação não é sempre possível (Karu, 1989; Chen et al., 2011). Os processos envolvidos no mecanismo que descreve a ação da luz em combinação com o fotossensibilizador são bem ilustrados por meio do diagrama de Jablonski (Fig. 5).

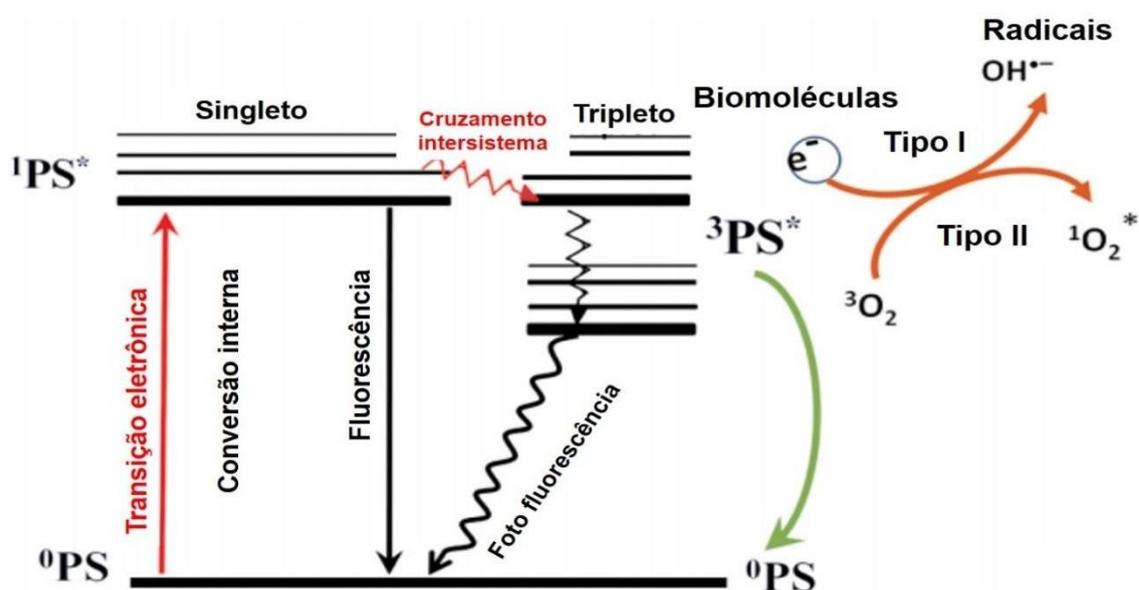


Figura 5 - Figura 1 diagrama de Jablonski. A absorção inicial de um fóton pelo estado fundamental do FS (fotossensibilizador) dá origem ao estado singlete animado de curta duração. Este estado pode perder energia por fluorescência, conversão interna em calor ou por cruzamento inter sistema para o estado tripleto de longa duração. Os estados tripletos do FS são extinguidos pela transferência de energia para o oxigênio molecular (um estado tripleto) para fornecer oxigênio singlete (Tipo 2), por transferência eletrônica de oxigênio ou biomoléculas para resultar em superóxido e radical hidroxila (Tipo 1) (Sadasivan et al. 2013).

O fotossensibilizador (FS) azul de metileno (AM) possui características, que conferem a essa molécula um grande potencial para aplicação em aPDT, pois absorve a luz intensivamente; tem uma fotoquímica bem caracterizada e eficaz, que aciona os mecanismos de fotossensibilização; isso danifica biomoléculas e induz com eficiência a morte em várias células, tecidos e organismos-alvo (Tardivo et al. 2005).

A concentração de azul de metileno influencia o seu estado de agregação, isto é, quanto maior a concentração, maior a quantidade de dímeros. A presença de tensoativos, como o lauril sulfato de sódio (LSS), também é capaz de modular a relação entre a quantidade de dímeros e monômeros em solução. Enquanto baixas concentrações de (LSS, da ordem de 1 mM, favorecem a formação de dímeros, elevadas concentrações de LSS (50 mM) resultam na monomerização. Da mesma forma, a ureia se mostrou eficaz em desestabilizar interações soluto-soluto de modo que a solução de azul de metileno na presença de ureia apresenta menor

concentração de dímeros. Conhecendo diferentes meios que possam reduzir a formação de dímeros, e com a possibilidade das reações do tipo II (mediadas por oxigênio singlete) serem mais efetivas na inativação de microrganismos do que as reações do tipo I. Neste sentido, o uso de azul de metileno na forma de uma formulação que possa manter uma elevada concentração de monômeros durante a aplicação clínica surge como uma possibilidade interessante (Tardivo et al. 2005; Abrahamse, Hamblin 2016).

O lauril sulfato de sódio acrescentado à fórmula é o agente surfactante, cuja ação redutora de tensão superficial facilita a limpeza das superfícies dos dentes bem como a dispersão dos materiais acumulados. A presença deste agente modula a agregação do azul de metileno, controlando a relação entre monômeros e dímeros. Além disso, o próprio lauril sulfato de sódio já apresenta certa ação antimicrobiana, dependendo da concentração utilizada (Sivieri-Araujo 2013; Tardivo et al. 2005).

Desta forma, o presente estudo partiu da hipótese de que pacientes com doença periapical possuem uma condição mais susceptível à DPOC. Além disso, a falta de estudos que abordem esses assuntos, o estudo tem o intuito de investigar se a periodontite apical é capaz de influenciar no curso da doença pulmonar, onde foi avaliado o efeito da terapia fotodinâmica na periodontite apical assintomática em modelo experimental de DPOC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) na periodontite apical assintomática (PAA) em modelo experimental de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC).

2.2. Objetivos específicos *in vivo*

2.2.1. Avaliar o número de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA;

2.2.2. Quantificar os níveis de IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α , e IFN- γ no sobrenadante do LBA e no soro;

2.2.3. Analisar morfometricamente o alargamento alveolar.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com as normas do Conselho Canadense de cuidados com animais (2018) e do Congresso Nacional Brasileiro (2008), sendo submetido ao Comitê de Ética em animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE) com o número do CEUA: AN0010/2017 aprovado no dia 12/09/2017.

3.1. Animais

Os camundongos (C57BL/6) foram obtidos e criados no biotério de criação da Universidade Nove de Julho, em caixas plásticas apropriadas sob temperatura constante de 22 a 25°C, luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro), ventilação controlada artificialmente, umidade relativa de 50 a 60%. Foram incluídos 64 camundongos (C57BL/6) saudáveis machos, adultos com peso médio de 25 a 30g.

3.2. Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em 08 grupos experimentais. A eutanásia de todos os animais foi realizada após 57 dias do início do experimento. A tabela 1 descreve os procedimentos que foram realizados em cada grupo do estudo:

GRUPO (N=8)	DESCRIÇÃO
Basal	Sem indução de doença
PAA	Indução da periodontite apical assintomática
PAA + TE	Indução da PAA + Tratamento endodôntico
PAA + TE + PDT	Indução da PAA + Tratamento endodôntico + terapia fotodinâmica
DPOC	Indução de doença pulmonar obstrutiva crônica
DPOC + PAA	Indução de DPOC + Indução da PAA
DPOC+ PAA + TE	Indução de DPOC + Indução da PAA + Tratamento endodôntico
DPOC + PAA + TE + PDT	Indução de DPOC + Indução Da PAA + Tratamento endodôntico + terapia fotodinâmica

Tabela 1 - Descrição dos grupos do estudo

3.3. Cronograma experimental

Os tempos (dias) de desenvolvimento do experimento estão descritos na figura

6.

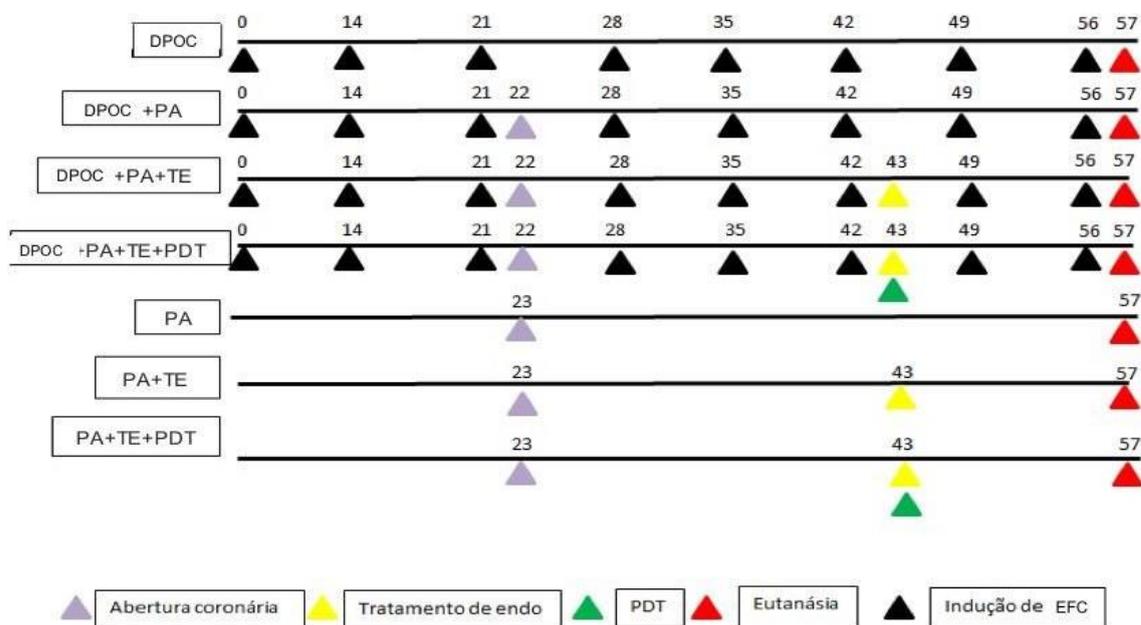


Figura 6 -. Cronograma dos grupos experimentais.

3.4. Modelo experimental de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) por extrato de cigarro.

O extrato de fumaça de cigarro foi preparado utilizando-se uma seringa de 20 mL de plástico adaptada a uma torneira de 3 vias ligadas à tubos plásticos unidirecionais e um tubo plástico Falcon de 50 mL (Figura 7), para borbulhar o fumo de 2 cigarros através de 4,0 mL de solução tampão PBS 1x.

A



B



Figura 7 - Torneira de fluxo de 3 vias (A), tubo Falcon (B) utilizado para obtenção do extrato de fumaça de cigarro.

Para a indução da DPOC usando o extrato de cigarro, os animais foram submetidos à imobilização adequada em uma posição que permitiu a aplicação da anestesia com injeção intramuscular (i.m.) de xilazina 2% (0,06ml/100g) + ketamina 10% (0,08ml/100g) e o acesso apropriado a via de administração, intra traqueal (i.t.). Foram administrados 30 μ L do extrato de cigarro por via orotraqueal, 2 vezes por semana durante 7 semanas.

3.5. Indução da periodontite apical assintomática

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com ketamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg com seringa para insulina (5 μ l). Para a abertura da cavidade oral do camundongo foram utilizados materiais desenvolvidos para a pesquisa, dois suportes metálicos verticais e uma linha de algodão nº 5 entre eles, onde os incisivos centrais superiores do camundongo foram gentilmente encaixados, de forma que a mandíbula ficasse livre (Figura 8A), a língua foi gentilmente tracionada para que a abertura bucal fosse adequada para o acesso a região do dente posterior(Figura 8B).

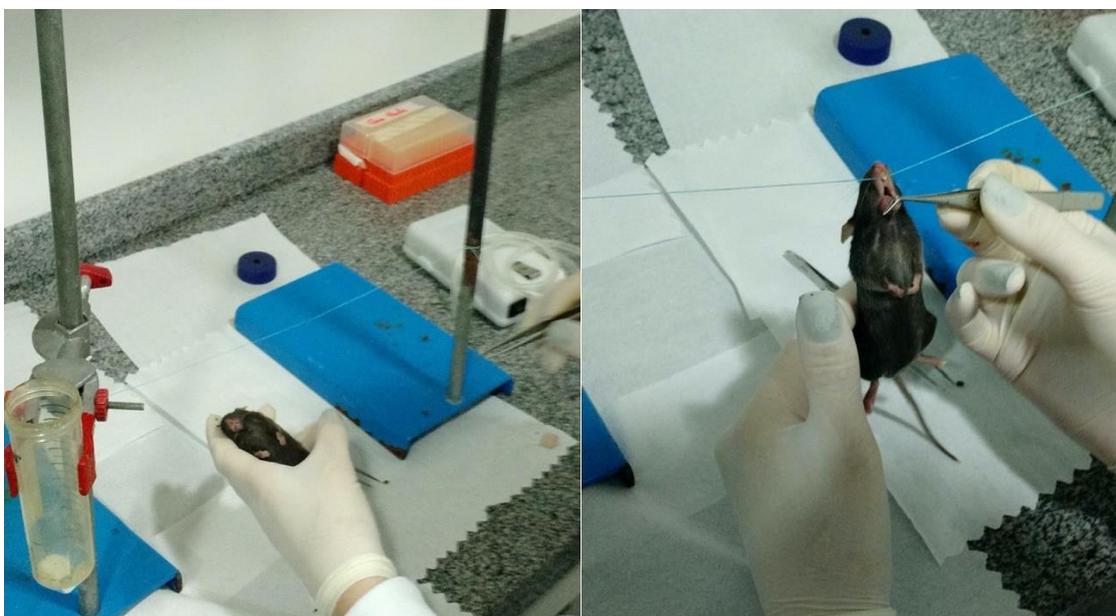


Figura - 8. Suporte para imobilização do animal usado na administração orotraqueal.

A abertura da cavidade coronária do primeiro molar inferior direito foi realizada com broca #1/4 de aço carbono LN (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça) (Figura 9) acionada pelo motor elétrico Endo Pro (Driller®, São Paulo, Brasil) com velocidade de 6000 rpm e torque 3,5 N/cm.

Irrigação com seringa de insulina (3 μ L) de solução de cloreto de sódio a 0,9% e aspiração feita com um suctor endodôntico (Angelus®, Paraná, Brasil) acoplada a uma bomba aspiradora à vácuo (5005BRS Nevoni®, São Paulo, Brasil) e a verificação da abertura e acesso aos canais radiculares com limas endodônticas #8 e #10 (Dentsply Maillefer®, Suiça), (Sato, Antoniazzi; 1993). Após a realização da abertura coronária, aguardaram-se 21 dias com os dentes abertos, para que a infecção endodôntica pudesse se instalar e a confirmação foi realizada pelo exame radiográfico (Figura 9).

Em caso de sofrimento, o animal era medicado com um analgésico (tramadol), retirado do estudo e eutanasiado, através da administração de CO pelas vias respiratórias. Não foram administrados antibióticos nem anti-inflamatórios para não influenciar nos resultados.

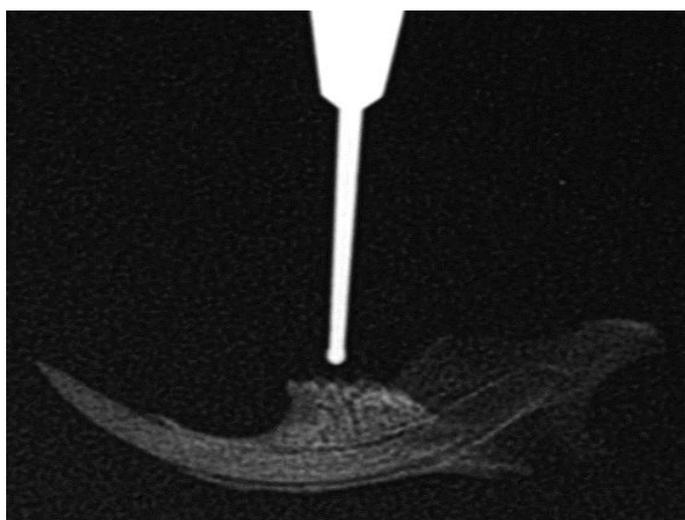


Figura 9 -. Acesso à câmara pulpar com broca esférica LN.

3.6. Tratamento endodôntico e terapia fotodinâmica

Após 21 dias de indução da doença periodontite apical assintomática foi realizado o tratamento endodôntico nos grupos PAA, DPOC + PAA, PA + TE, PAA + TE + PDT, DPOC + PAA + TE e DPOC + PAA + TE + PDT.

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com Ketamina 100mg/kg e Xilazina 10 mg/kg com seringa para insulina (5 μ L). O tratamento endodôntico foi realizado no primeiro molar inferior direito nos dentes portadores da periodontite apical assintomática, inicialmente se realizou a irrigação e aspiração com uma substância química auxiliar, o hipoclorito de sódio a 1%, o preparo dos canais com as limas da

primeira série #8, #10, #15, #20 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça), nova irrigação e aspiração com a substância química auxiliar de hipoclorito de sódio a 1%, secagem do canal com cone de papel absorvente de acordo com o número do último instrumento utilizado (Tanari, Tanariman Industrial Ltda, AM, Brasil). Foi realizado o preenchimento dos canais radiculares com a medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio Ultracal (Ultradent, Utah, EUA) auxiliada por uma lima #15 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Suíça). A cavidade coronária foi vedada com resina ortodôntica Natural Ortho (Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil). Nos grupos com terapia fotodinâmica, após a instrumentação, foi feita a secagem do canal com cones de papel absorvente #20 (Tanari, Tanariman Industrial Ltda, Amazonas, Brasil), aplicação de azul de metileno com concentração 0,005% (Chimiolux 5, DMC, São Paulo, Brasil) com tempo de espera de 3 minutos e foi feita a aplicação de laser vermelho, Garcez, Hamblin (2017). As irradiações foram realizadas, em uma única aplicação com o laser de diodo Therapy EC (DMC, São Paulo) no comprimento de onda vermelho ($\lambda = 660$ nm) por 90 segundos (Tabela 2). Lavagem do azul de metileno com soro fisiológico, secagem do canal com papel absorvente #20 (Tanari, Tanariman Industrial Ltda, AM, Brasil). Todos os dentes tiveram o fechamento da cavidade coronária com resina ortodôntica Natural Ortho (Nova DFL, Rio de Janeiro, Brasil) com a finalidade de manter o canal radicular o mais asséptico e fechado possível.

PARÂMETROS	
Comprimento de onda [nm]	660
Modo de operação	Contínuo
Potência radiante média [mW]	100
Irradiância no alvo [W/cm^2]	3
Área do feixe no alvo [cm^2]	0,03
Tempo de exposição [s]	90
Energia radiante [J]	9
Número de pontos irradiados	1
Técnica de aplicação	Contato
Número e frequência das sessões	Sessão única
Energia total [J]	9
Fotossensibilizador	Azul de metileno 0,005%

Tabela - 2: Parâmetros dosimétricos utilizados na terapia fotodinâmica

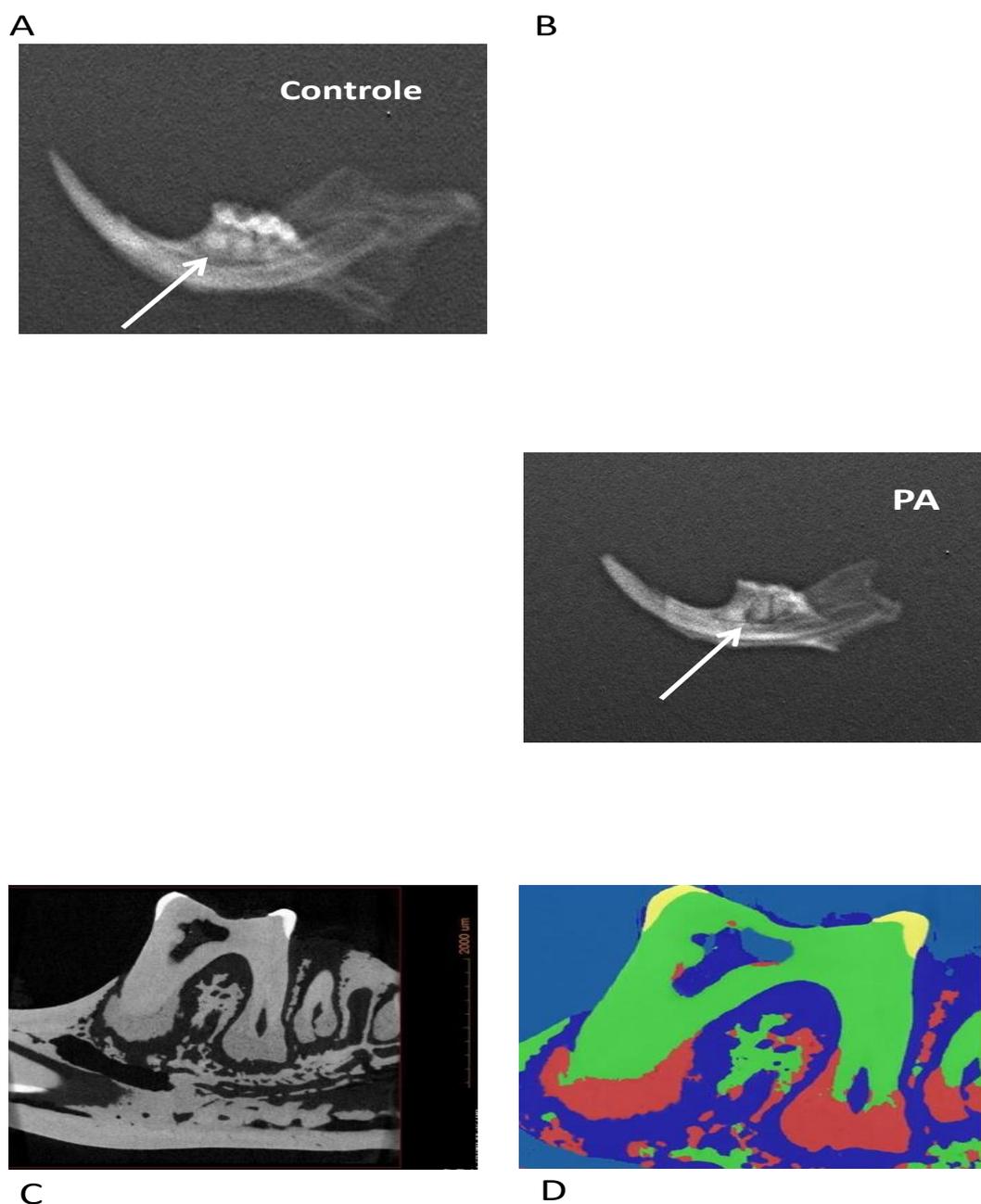


Figura 10. Imagem da PAA por radiografia digital. (A) Imagem radiográfica digital de hemiarcada mandibular de camundongo do grupo Basal; (B) Imagem radiográfica digital de hemiarcada mandibular de camundongo do grupo PAA; (C e D) Imagem contraste de radiografia digital de hemiarcada mandibular do camundongo do grupo PAA.

3.7. Eutanásia dos animais

O fluxograma representativo dos procedimentos experimentais encontra-se na figura 01. Os animais de todos os grupos foram eutanasiados nos dias 57 e 58 após a indução da DPOC. Foi realizada a exsanguinação da artéria aorta abdominal e os pulmões foram retirados. Cada grupo foi submetido à aplicação da anestesia com

injeção intramuscular (i.m.) de xilazina 2% (0,06ml/100g) + ketamina 10% (0,08ml/100g), comumente utilizada na experimentação com roedores. A substância foi administrada minutos antes da exsanguinação, utilizando uma seringa de 1mL e agulha hipodérmica 25x5 mm. Após as coletas, todos foram acondicionados e descartados como lixo hospitalar (ou resíduo de serviço de saúde).

3.8. Avaliação da inflamação pulmonar no lavado bronco alveolar (LBA)

Após anestesia os animais foram traqueostomizados e canulados e os pulmões lavados com 3 x 0,5 ml de tampão fosfato salino (PBS).

O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1600 rpm a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi armazenado a -70°C para análise das citocinas por meio de *ELISA*. O botão celular foi ressuspensionado em 1ml de tampão fosfato salino (PBS) e utilizado para a determinação do número de células totais no LBA realizado por meio de contagem na Câmara de Neubauer. O restante do material ressuspensionado foi utilizado para preparação de lâminas de *Cytospin* (Biolab, Brasil). Foram utilizados 200 µL de amostra de cada animal para contagem diferencial das células, centrifugadas por 10 minutos, 450 rpm no equipamento de modelo Cytospin-2 (Shandon Instruments Sewickley, PA, EUA).

As lâminas foram coradas através da técnica de coloração Instant Prov I: (1) as lâminas foram colocadas na cuba corante Instant Prov I, deixadas por 10 segundos, retiradas e deixadas escorrer por 5 segundos. (2) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov II, deixadas por 10 segundos, retiradas e deixadas escorrer por 5 segundos. (3) Colocar as lâminas na cuba corante Instant Prov III, deixadas por 20 segundos, retiradas, deixadas para escorrer por 5 segundos e lavadas as lâminas em água corrente. Após a coloração 300 células foram contadas para a determinação da contagem diferencial, aumento de 400X.

3.9. Avaliação dos níveis de citocinas no LBA por ELISA.

Foi realizado as análises de citocinas: IL-4, IL-6, IL-10, IL-1β, INF-γ e TNF-α no LBA e no soro; foram avaliados pelo método ELISA, dosados segundo as recomendações do fabricante através dos kits Biolegends e R&D Systems.

3.10. Avaliação morfométrica alveolar

Mensurou-se o intercepto linear médio (Lm), que é um índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Assim, os pulmões esquerdos foram coletados, fixados em formalina a 10% e embebidos em parafina, cortados com 4 µm de espessura e submetidos ao processo histológico de rotina. As lâminas foram coradas com HE e a quantificação do alargamento alveolar realizada.

Foram contados 15 campos por lâmina, em microscópio óptico Olympus BX 43, (Japan) com aumento de 400X. Utilizando um retículo aferido, por meio de uma régua

da fabricante Zeiss (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) sobreposto ao parênquima pulmonar nas regiões mais periféricas do parênquima, contou-se o número de vezes que os interceptos cruzavam as paredes dos alvéolos. Foi feita uma média dos quinze campos para cada lâmina e calculado o Lm através da seguinte equação: $Lm = 2500 \mu\text{m}/\text{média do número de vezes que os interceptos cruzaram as paredes dos alvéolos}$. (Figura 11). O valor do somatório de todos os segmentos resultou no valor de 2500 μm .

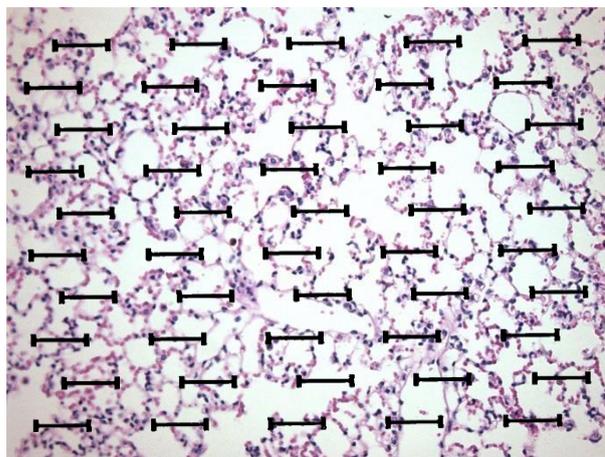


Figura 11. Mensuração do intercepto linear médio (Lm)

A análise quantitativa foi realizada através da técnica morfométrica. Os parâmetros morfológicos foram avaliados através do software *Image Pro Plus* versão 4.5 (NIH, Maryland, EUA).

3.11. Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foram utilizadas técnicas não paramétricas com o pacote estatístico *Prism* versão 8.3.1 (*GraphPad Software*, California, EUA). Os dados foram digitados no programa *Prism* para análise estatística. Os dados foram submetidos ao teste *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Student-Newman-Keuls para comparação entre os grupos. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos e a análise estatística foram elaborados utilizando-se o software *Prism* 8.3.1

4. RESULTADOS

4.1. Análise das células do lavado broncoalveolar (LBA)

De maneira a avaliar a contagem das células inflamatórias no LBA, quantificamos o número total de células e diferenciais, bem como fotos realizadas a partir de citocentrifugados do LBA, com aumento de 40x (Figura 12 B).

Na figura 12 A, podemos observar que o grupo PAA e o grupo DPOC aumentaram o número de células totais em comparação com o grupo Basal. Com relação ao grupo DPOC, verificamos redução do número de células totais no grupo DPOC+PAA, do mesmo modo houve redução dessas células nos grupos tratados (DPOC + PAA +TTO e DPOC + PAA + TTO + PDT). Ainda, observamos diminuição do número de células totais, quando comparamos os grupos tratados, PAA + TTO e PAA + PDT +TTO em relação ao grupo PAA.

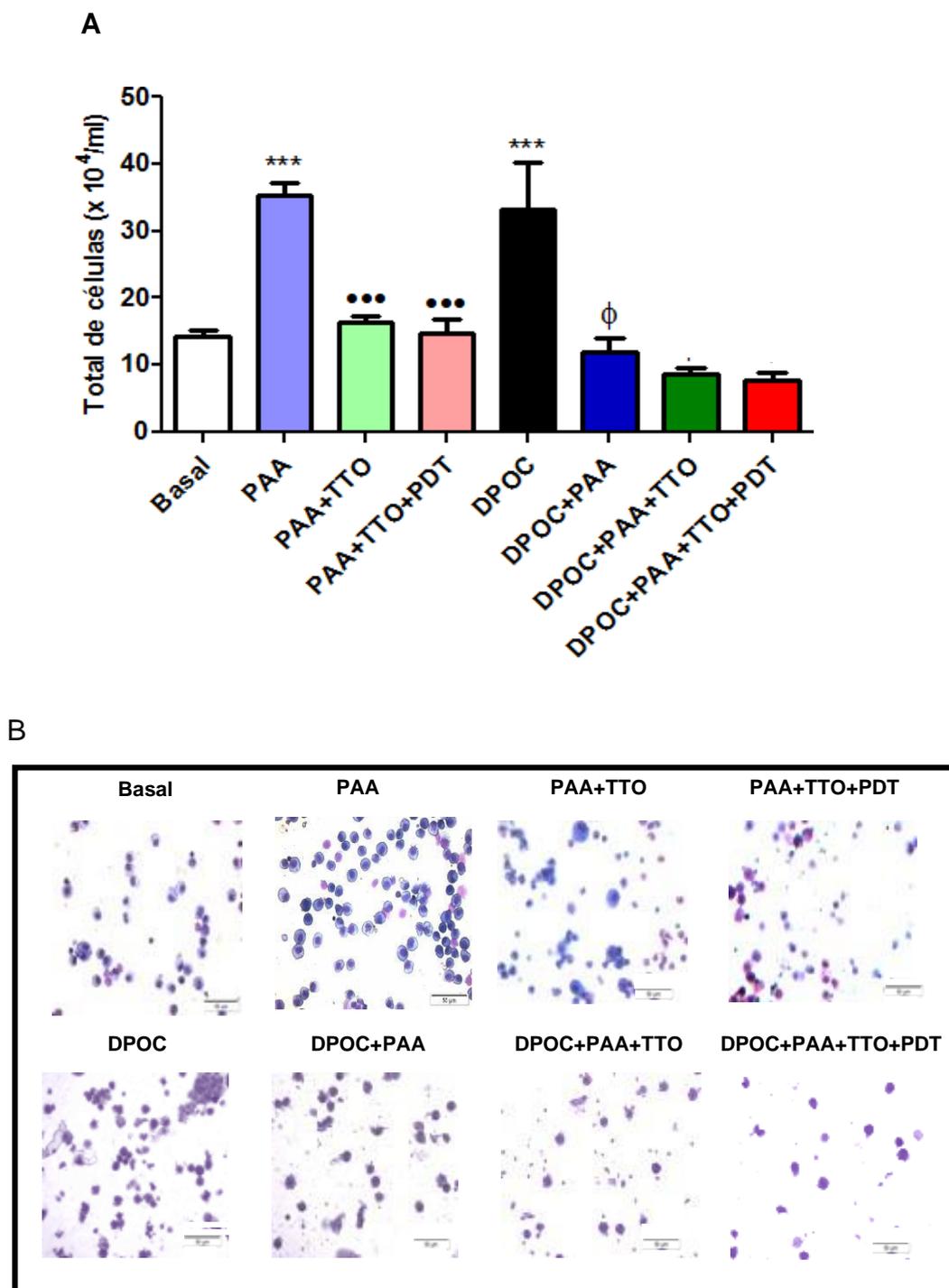


Figura 12. Análise do número de células totais do LBA. Em (A) quantificação do total de células e em (B) fotos representativas dos citocentrifugados do LBA com aumento de 40x em cada grupo estudado. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *p<0,05; em relação ao grupo basal; Δ P<0,05; ϕ p<0,001 em relação ao grupo DPOC; $\bullet\bullet\bullet$ p < 0,001 em relação ao grupo PAA. Painel B: Foto micrografia representativa das células recuperados do lavado bronco alveolar.

4.2. Análise das células diferenciais do LBA

Os resultados de números de macrófagos estão no painel A, os linfócitos no painel B e os neutrófilos no C (Figura 13). Na figura 13A observa-se que nos grupos DPOC + PAA +TTO e DPOC + PAA + TTO + PDT houve queda no número de macrófagos em comparação ao grupo DPOC+PAA.

Na figura 13 B observou-se que o número de linfócitos aumentou nos grupos PAA e DPOC em relação ao grupo Basal. Ainda, verificamos redução do número de linfócitos nos grupos PAA + TTO e PAA + PDT +TTO em relação ao grupo PAA. No grupo DPOC+PAA observamos redução dessas células em relação ao grupo DPOC.

Na figura 13 C os neutrófilos estavam aumentados nos grupos PAA e DPOC em comparação ao grupo Basal. O tratamento endodôntico reduziu o número de neutrófilos nos grupos PAA+TTO e PAA+TTO+PDT em comparação ao grupo PAA. Também o grupo DPOC+PAA apresentou queda no número de linfócitos em relação ao grupo DPOC.

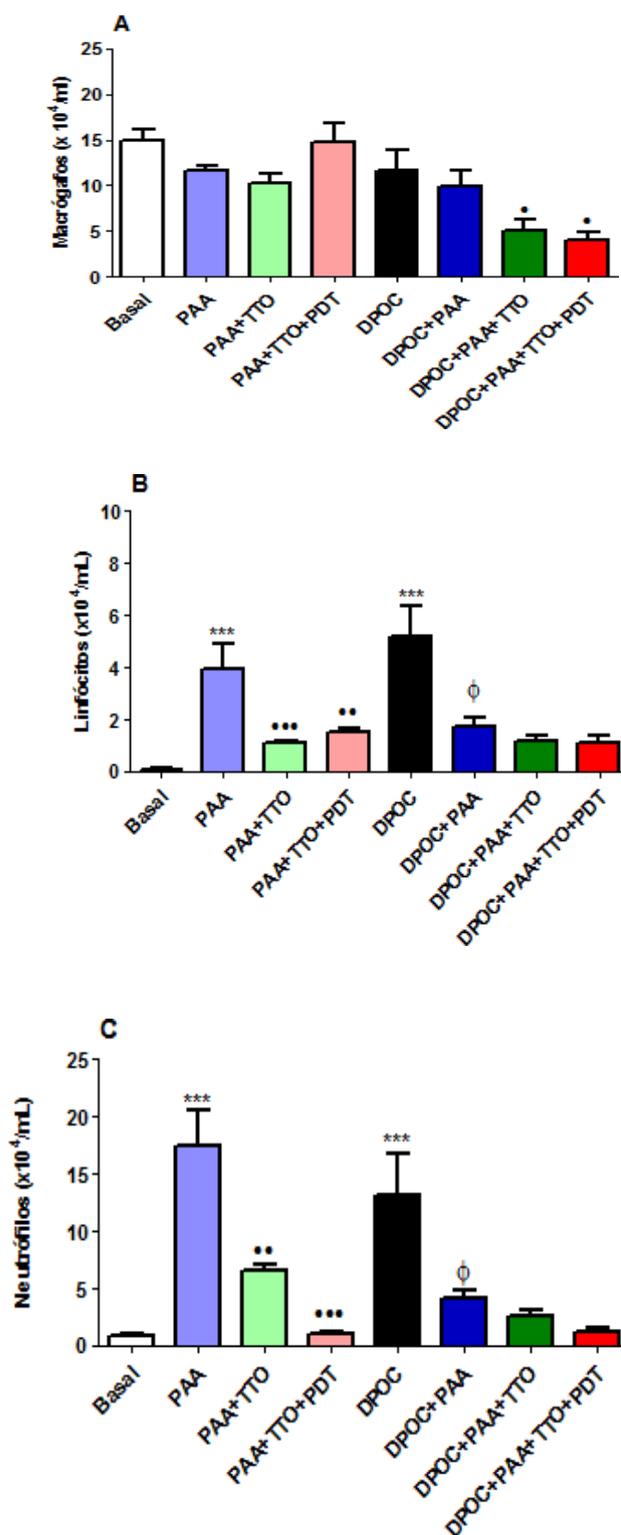


Figura 13. Análise de macrófagos (A), linfócitos (B) e neutrófilos (C) do LBA. As células foram quantificadas a partir de citocentrifugados do LBA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo DPOC; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$ em relação ao respectivo grupo PAA.

4.3. Quantificação de IL-6 no soro (A) e no LBA (B)

Na figura 14 A, a quantificação de IL-6 no soro mostrou que houve diminuição significativa no grupo DPOC+PAA em comparação ao grupo DPOC.

Ainda, a figura 14 B apresentou aumento no grupo PAA e DPOC em comparação ao grupo basal dos níveis de IL-6 no LBA. Já nos grupos PAA+TTO e PPA+TTO+PDT houve diminuição dos níveis de IL-6 em relação ao grupo PAA. A mesma redução dessa citocina foi observada no grupo DPOC+PAA em comparação ao grupo DPOC.

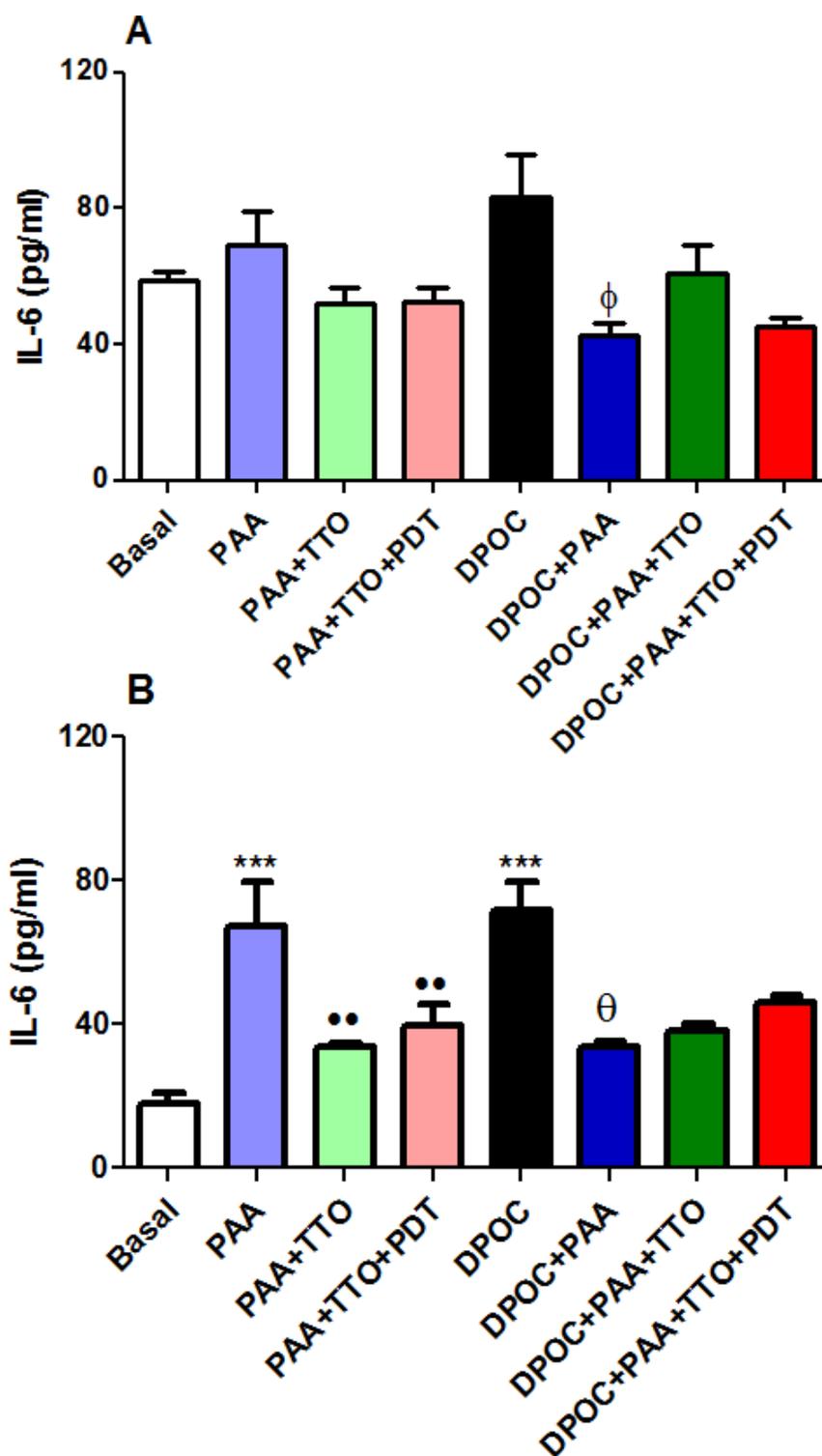


Figura 14. Quantificação de IL-6 no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; θ $p < 0,01$; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo DPOC; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA.

4.4. Quantificação de IFN- γ no soro (A) e no LBA (B)

Na figura 15 A, não verificamos diferenças significativas na quantificação de IFN- γ no soro em nenhum dos grupos estudados.

Observamos na Figura 15 B aumento significativo dos níveis dessa citocina no LBA no grupo PAA e no DPOC em comparação ao grupo basal. Já no grupo DPOC+PAA+TTO+PDT verificamos redução dos níveis de IFN- γ em relação ao grupo DPOC+PAA.

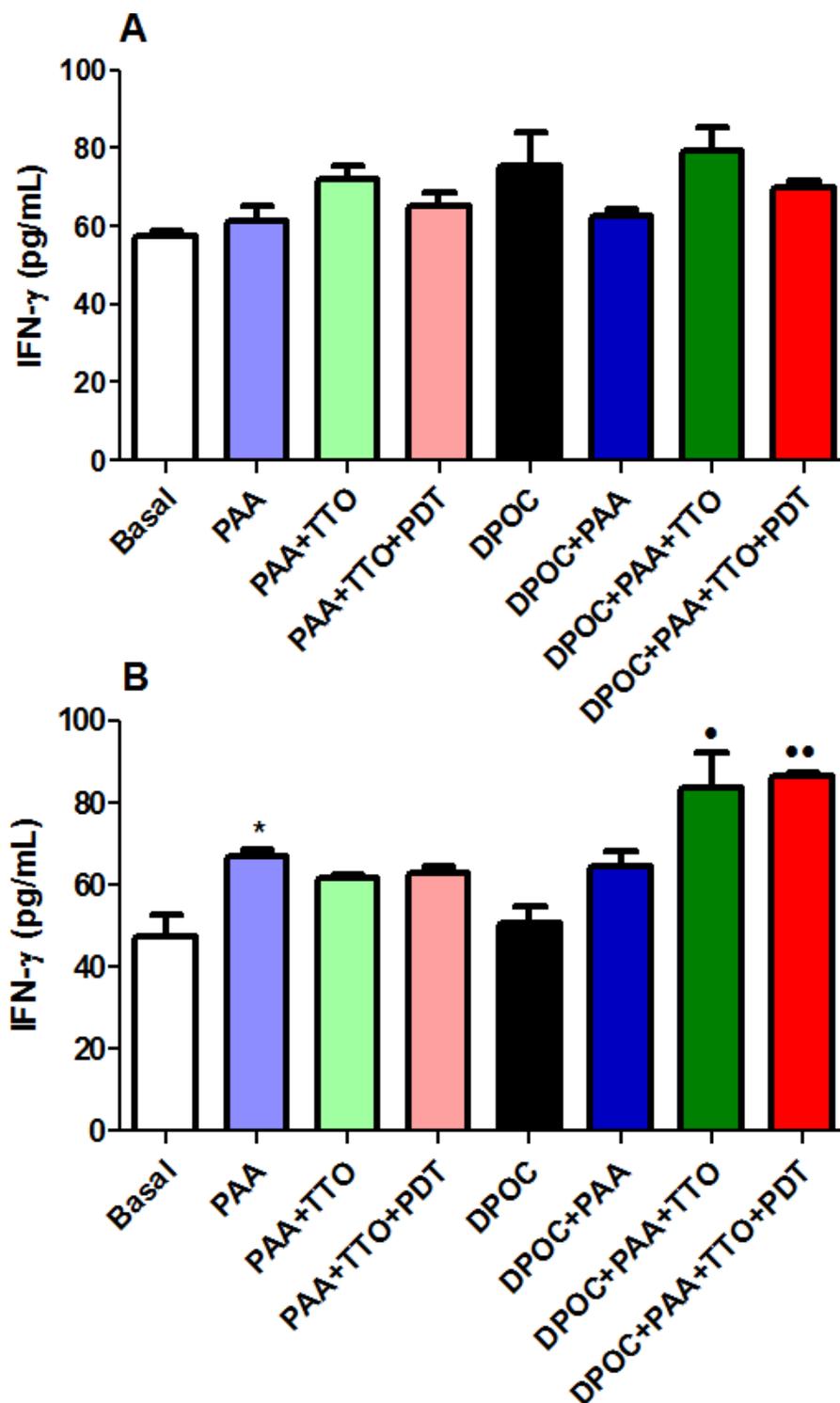


Figura 15. Quantificação de TNF- α no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$ em relação ao grupo basal; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA.

4.5. Quantificação de TNF- α no soro (A) e no LBA (B).

Na figura 16 A, observamos no soro que houve um aumento dos níveis de TNF- α no grupo DPOC em relação ao grupo basal. Ainda, observamos diminuição dessa citocina nos grupos DPOC+PAA em relação ao grupo DPOC. Por outro lado, verificamos aumento dos níveis de TNF- α nos grupos DPOC+PAA+TTO e DPOC+PAA+TTO+PDT em comparação ao grupo DPOC+PAA.

Já na figura 16 B, está representado a quantidade de TNF- α no BAL, e verificamos aumento de TNF- α no grupo DPOC + PAA + TTO + PDT em comparação ao grupo DPOC+PAA. Além disso, verificamos aumento dessa citocina no grupo PAA+TTO+PDT em relação ao grupo PAA+TTO.

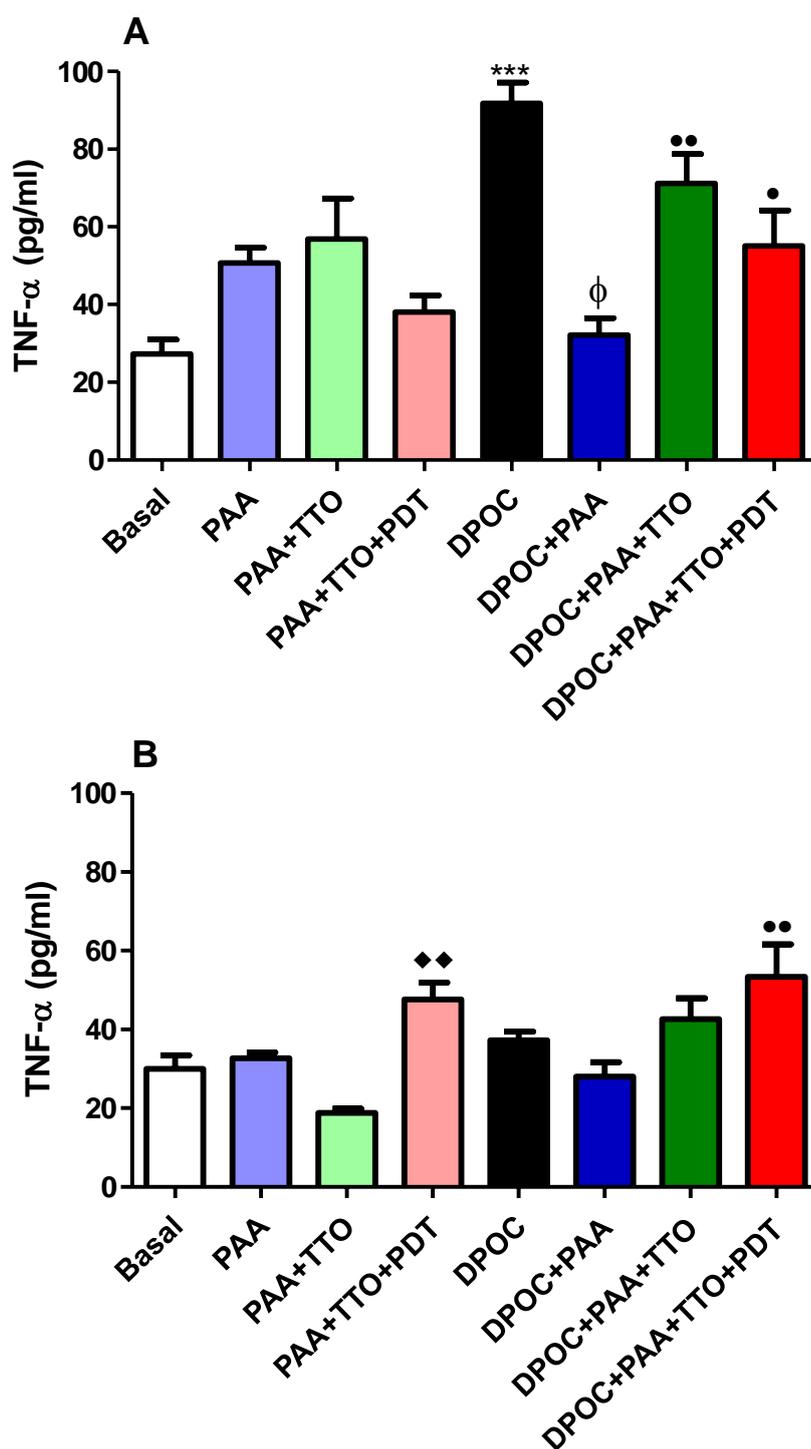


Figura 16. Quantificação de TNF- α no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo DPOC; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA; •♦ $p < 0,01$ em relação ao grupo PAA+TTO.

4.6. Quantificação de IL-1 β no soro (A) e no LBA (B).

No soro a quantidade de IL-1 β dos grupos PAA e DPOC estavam aumentadas em comparação ao grupo basal (figura 17 A). Por outro lado, o grupo DPOC+PAA+TTO apresentou diminuição dessa citocina em comparação ao grupo DPOC+PAA.

Na figura 17 B observou-se que os grupos PAA e DPOC apresentaram aumento de IL-1 β no LBA em comparação ao grupo basal. No grupo DPOC+PAA+TTO+PDT também houve um aumento dos níveis de IL-1 β em relação ao grupo DPOC+PAA.

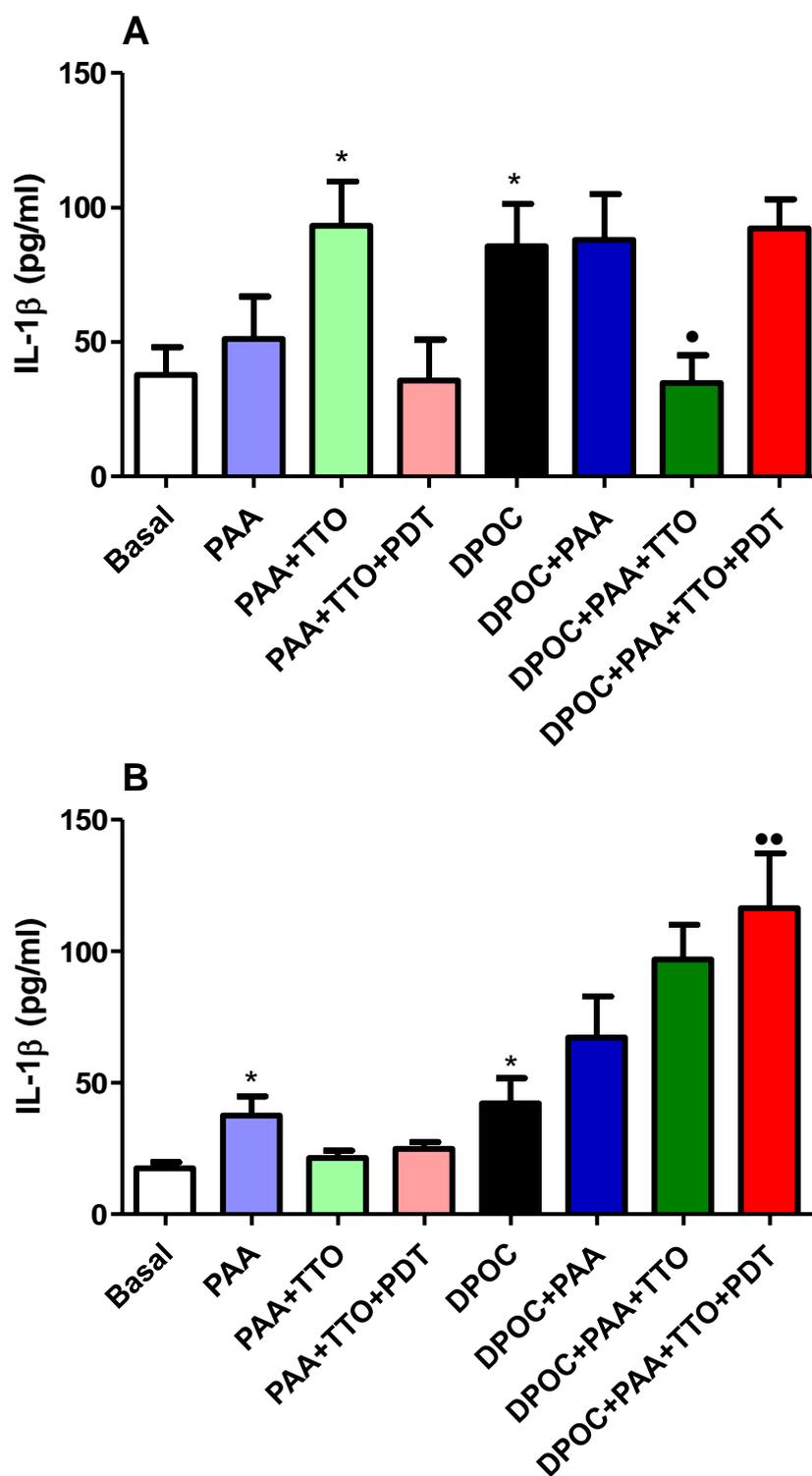


Figura 17. Quantificação de IL-1 β no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); ** $p < 0,01$ em relação ao grupo basal.; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA.

4.7. Quantificação de IL-4 no soro (A) e no LBA (B)

Na figura 18 A, a quantificação de IL-4 no soro apresentou aumento apenas no grupo DPOC em comparação ao grupo basal.

Observamos na Figura 18 B aumento significativo dos níveis de IL-4 no LBA nos grupos PAA e DPOC em comparação ao grupo basal. Já no grupo PAA+TTO houve redução desses níveis em comparação ao grupo PAA. Já nos grupos DPOC+PAA+TTO e DPOC+PAA+TTO+PDT verificamos aumento nos níveis de IL-4 em relação ao grupo DPOC+PAA. Ainda, no grupo DPOC+PAA observamos diminuição dessa citocina em comparação ao grupo DPOC.

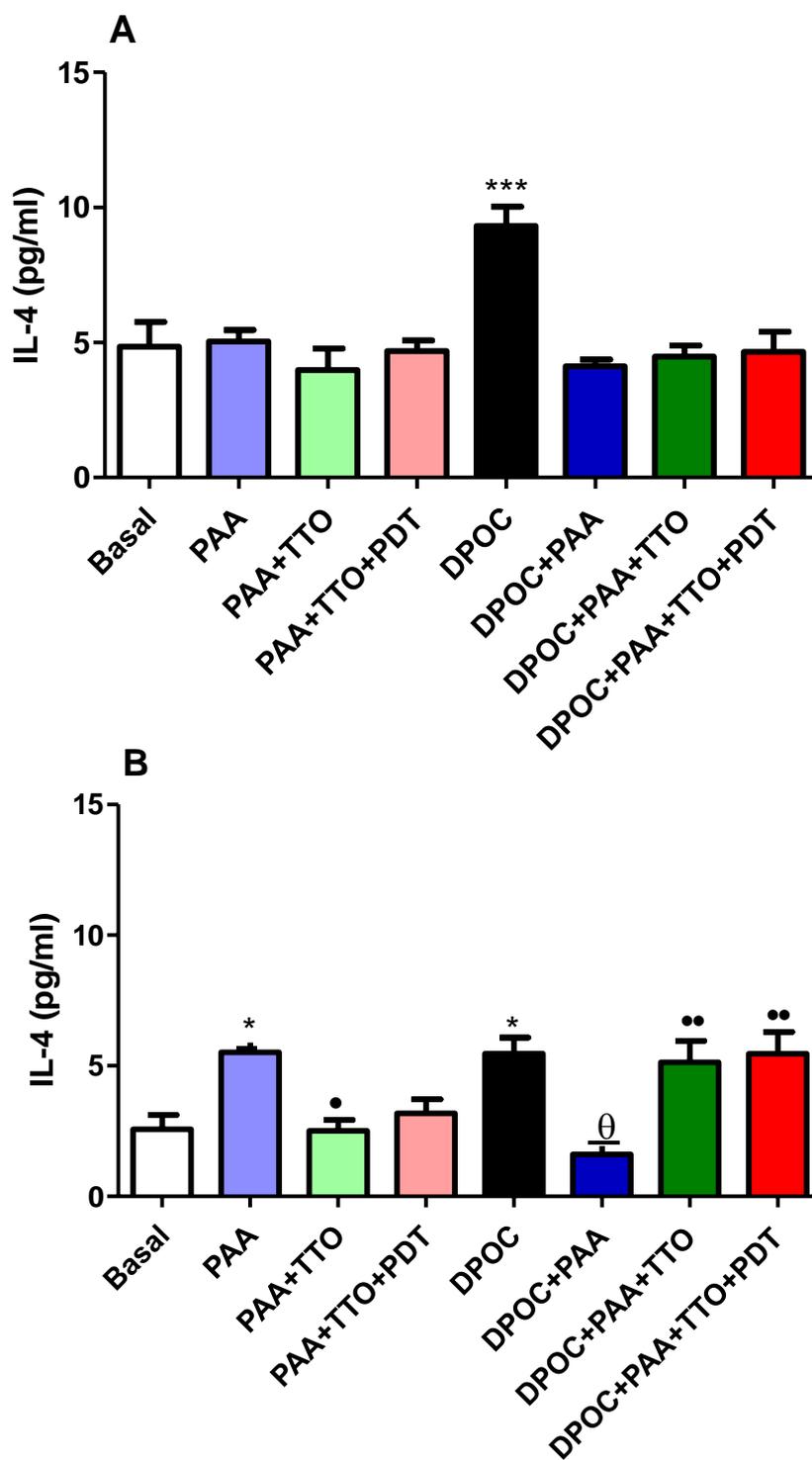


Figura 18. Quantificação de IL-4 no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal; θ $p < 0,01$ em relação ao grupo DPOC; • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA.

4.8. Quantificação de IL-10 no soro (A) e no LBA (B).

A figura 19 A mostra a quantificação de IL-10 no soro, e observamos que não houve diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados.

Na figura 19 B, essa citocina quantificada no LBA, observa-se que houve aumento de IL-10 nos grupos PAA e DPOC em comparação ao grupo basal. Por outro lado, no grupo DPOC+PAA houve uma diminuição dos níveis de L-10 em comparação ao grupo DPOC.

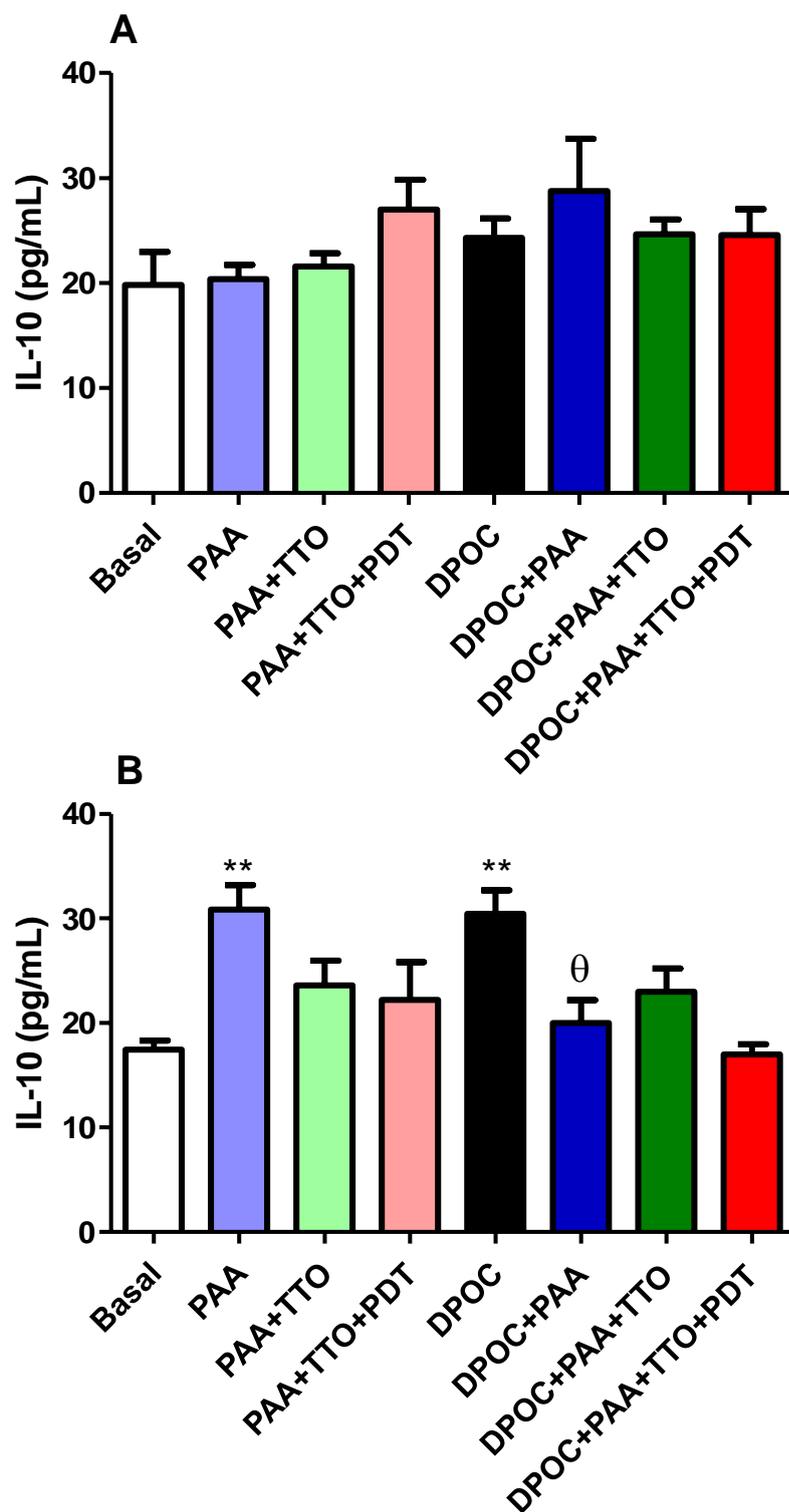


Figura 19. Quantificação de IL-10 no soro (A) e no LBA (B). As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8). ** $p < 0,01$ em relação ao grupo basal; θ $p < 0,01$ em relação ao grupo DPOC.

4.9. Avaliação do sobre diâmetro alveolar médio (L_m).

O alargamento alveolar do grupo DPOC apresentou-se com diâmetro maior em comparação ao grupo Basal. No grupo DPOC+PAA observamos diminuição do diâmetro alveolar em comparação ao grupo DPOC. Já no grupo PAA+TTO+PDT verificamos aumento do alargamento alveolar em relação ao grupo PAA (Figura 20 A). Já na figura 20 B encontra-se fotos representativas do alargamento alveolar em cada grupo estudado.

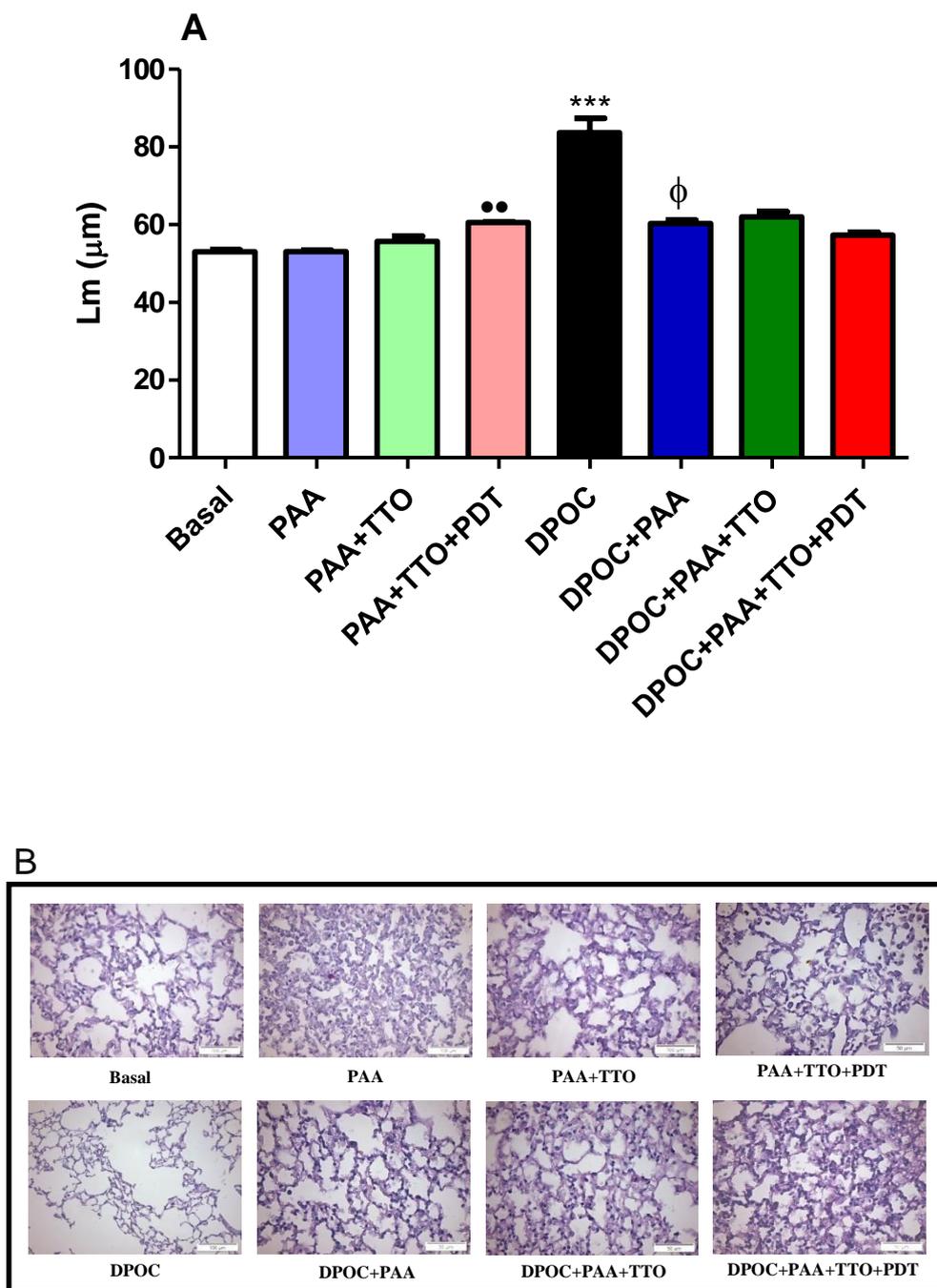


Figura 20. Avaliação do sobre diâmetro alveolar médio (Lm). Em (A) quantificação do Lm e em (B) fotos representativas do alargamento alveolar com aumento de 40x em cada grupo estudado. O alargamento alveolar foi medido pelo índice do diâmetro médio dos espaços aéreos distais. Os resultados representam média \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal.; ϕ $p < 0,001$ em relação ao grupo DPOC; •• $p < 0,01$ em relação ao respectivo grupo PAA. Painel B: Foto micrografia representativa do alargamento

alveolar.

5. DISCUSSÃO

Considerando que as doenças dentais e bucais podem modular o desenvolvimento, bem como a exacerbação de doenças pulmonares, torna-se importante compreender os mecanismos acerca da relação entre a periodontite apical assintomática e a DPOC (Falcón, Bullón; 2019). Os resultados obtidos no presente estudo, referem-se à utilização da Terapia Fotodinâmica (PDT) na periodontite apical assintomática, com e sem DPOC, avaliados em modelo experimental de DPOC induzida por extrato de fumaça de cigarro.

A periodontite apical assintomática, é reconhecida como um distúrbio crônico inflamatório neutrofílico e as enzimas dos grânulos dos neutrófilos estão envolvidas na patogênese da doença (Stockley, 2002). Do mesmo modo, além dessas células estarem aumentadas no periápice, verificamos também esse aumento no pulmão. Também, na DPOC, observamos o aumento no pulmão da quantidade total de células, constituídas por linfócitos e neutrófilos, validando assim, o modelo experimental de inflamação pulmonar já estabelecido pela literatura. Entretanto, para a doença endodôntica, o modelo foi validado pelo aparecimento da lesão periapical na região do periápice, comprovado pela radiografia digital (Cardoso et al., 2013).

Para a periodontite apical assintomática (PAA), o modelo foi validado pela evidência da rarefação óssea na região do periápice, comprovado pela radiografia digital de acordo com Stachenko et al., 1992; Lin et al., 2000. (Figuras 10). O uso de laser de baixa intensidade como fonte de luz não promove grande melhora no reparo apical radiográfico e histológico nas periodontites apicais, mas diminuem o número de células inflamatórias, fato que pode otimizar o reparo modulando o processo inflamatório. (Trindade et al., 2016).

As bactérias de origem oral podem estimular as vias aéreas, resultando na resposta inflamatória associada à doença pulmonar obstrutiva (Spellberg, Edwards, 2001). Tanto a doença periapical assintomática como a doença inflamatória pulmonar crônica estão associadas a múltiplas células inflamatórias como neutrófilos, monócitos e linfócitos T, além de mediadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α . Esse estado inflamatório crônico pode contribuir indiretamente para a inflamação pulmonar por meio de mediadores liberados na saliva e transportados para o epitélio respiratório (Armitage, 1999).

Tanto a periodontite apical assintomática quanto a DPOC têm um elemento de suscetibilidade do hospedeiro a fatores ambientais. Por exemplo, é amplamente aceito que fumar é um fator risco para o desenvolvimento de DPOC, porém a doença afeta apenas uma minoria de fumantes, implicando em fatores genéticos que podem suprimir o efeito do tabagismo (Saetta, 1999).

Esses dados demonstram claramente uma ligação entre a doença endodôntica e as doenças pulmonares, corroborando assim com os obtidos em nosso estudo.

Porém a associação das doenças endodôntica e pulmonar, mostrou redução no número total de células, tais como linfócitos e neutrófilos no LBA. Ainda, o tratamento endodôntico convencional, considerado padrão ouro para comparações, foi capaz de manter reduzido o total de células, representadas pelos neutrófilos, macrófagos e linfócitos, além dos níveis elevados de IL-4 no pulmão. Do mesmo modo, quando realizamos o tratamento endodôntico associado à PDT, também verificamos diminuição no número de neutrófilos e linfócitos, além dos macrófagos, recuperados do LBA. Entretanto, apesar da diminuição da quantidade de células, nossos resultados revelaram aumento dos níveis de IL-1- β , IL-4 e TNF- α , com redução de IFN- γ no pulmão.

Nesse sentido, Kanazawa (2007) encontrou no escarro de pacientes com exacerbação da DPOC, níveis elevados de anticorpos contra *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*. Esse estudo demonstrou que o tratamento periapical pode efetivamente reduzir a colonização bacteriana da mucosa oral. Portanto, o tratamento pode ajudar a prevenir, em parte, a inflamação das vias aéreas.

Os macrófagos são as principais células constituintes do granuloma periapical, sua ativação em granulomas periapicais é realizada por citocinas produzidas por linfócitos T ativados por antígeno, bem como por endotoxina bacteriana; ou por ambos os processos. Além disso, os macrófagos produzem metaloproteinases (MMPs) que podem degradar matriz de suporte do parênquima pulmonar, causando enfisema (Metzger, 2000). Corroborando com esses achados, apenas no tratamento convencional com ou sem PDT essas células estavam reduzidas.

Analisando nossos resultados, percebe-se que a doença endodôntica foi capaz de causar inflamação pulmonar em camundongos *per se*. No qual observamos aumento da quantidade de células totais no pulmão com presença de linfócitos e neutrófilos. A PAA também foi capaz de causar aumento na produção das citocinas

pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) no pulmão, porém não apresentou alterações na estrutura pulmonar.

É sabido que as células T são abundantes na periodontite apical, influenciando não apenas o sistema imunológico, mas também a interação com outras células, epitélio e bactérias orais (Ihan, Ihan, 2009).

Na doença periapical, de acordo com alguns estudos, os padrões de resposta Th1 e Th2 ocorrem concomitantemente (Kawashima et al. 1996; Stashenko, Yu, 1989; Cotii et al., 2014). De fato, isso é demonstrado em modelos experimentais nos quais a ausência de citocinas Th1 não altera significativamente o desenvolvimento da lesão, enquanto a falta de citocinas Th2 resulta em um aumento no tamanho da lesão (Spelberg, Edwards, 2001; Martinho et al., 2015).

Nesse sentido, acredita-se que a resposta Th1 mediada por IFN- γ , juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias como IL-1- β , IL-6 e TNF- α estão envolvidas na progressão de lesões e destruição óssea. Por outro lado, mecanismos imunossupressores mediados pelas citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-10) são responsáveis pelos processos de reparação e restrição dos mecanismos inflamatórios (Akamine et al., 1994; Kawashima, Stashenko, 1999; Lukic, 2000).

Mesmo que não tenha sido totalmente determinado, a resposta Th1 parece ser predominante nas lesões iniciais. No final a resposta parece ser do perfil Th2 (Wang, Stashenko, 1993). As diferenças na expressão de citocinas e quimiocinas, na periodontite apical, podem afetar os padrões da resposta imune, uma vez que as células Th1 e Th2 migram para diferentes tecidos através da expressão de diferentes mediadores. Nesse sentido, também há evidências que o padrão Th2 prevalece em lesões crônicas. (Wang, Stashenko, 1993; Bonecchi et al., 1998; Sallusto et al., 1998).

Esse fato vai de encontro com os resultados obtidos em nosso estudo, em que os mediadores Th2 interferem com a resposta Th1, já que o tempo total do experimento foi longo. Pois, foram necessários 21 dias para a indução da DPOC mais 21 dias para a formação da PAA e para os tratamentos endodônticos com ou sem a PDT e somente após 14 dias dos tratamentos endodônticos é que foi realizada a eutanásia, totalizando 56 dias.

Outros resultados também em modelo experimental, sugerem uma hierarquia de citocinas Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13 na modulação da periodontite apical, dado que, na presença de citocinas com perfil Th1, como IFN- γ e IL-12, a formação de

lesões periapicais é modificada (Kinane, Lappin, 2001; Carvalho Fraga et al. 2013). Sugerindo assim, um papel imunomodulador das citocinas Th2, no qual possuem um efeito inibitório, sobre a resposta com perfil de resposta Th1. Esse achado vai de encontro com os nossos resultados, onde a associação da periodontite apical com a DPOC leva a uma redução do processo inflamatório pulmonar.

Com relação aos mediadores inflamatórios, nossos dados mostram redução de IL-4, IL-6 e de IL-10, a qual é uma citocina anti-inflamatória. A persistência da agressão bacteriana leva a constante liberação de IFN- γ pelo hospedeiro, contribuindo para a permanência do quadro inflamatório (Garlet et al., 2004). A IL-10 está geralmente associada a uma significativa redução na reação inflamatória, portanto a produção de IL-10 pode prejudicar a eliminação de agentes infecciosos levando a latência de infecções (Belkaid et al., 2002, Mittrücker; Kaufmann, 2004, Sakaguchi et al., 2004).

Porém, quando realizamos o tratamento endodôntico convencional, observamos apenas aumento da quantidade de IL-4 e quando associamos a PDT além dos níveis de IL-4, verificamos também elevação nos níveis de IL-1- β , TNF- α com redução nos níveis de IFN- γ . De acordo com De Rosa et al. (2008a) estudando camundongos knockout para IFN- γ e IL-4, mostraram que o IFN- γ poderia ser um supressor endógeno no desenvolvimento da lesão periapical, enquanto a IL-4 parece ter um efeito insignificante (De Rosa et al., 2008b). Corroborando com nosso estudo, nos animais com PAA e DPOC, a quantidade de IFN- γ apresenta-se reduzida, apesar dos elevados níveis de IL-4, culminando em reduzida inflamação pulmonar.

Por outro lado, existe uma correlação negativa entre os níveis de IL-4 e macrófagos, podendo ser explicada pelo efeito inibitório da IL-4 sobre as funções dessa célula. Nossos resultados estão de acordo, onde a quantidade de IL-4 está aumentada nas duas doenças e na associação da PAA e DPOC esses níveis aparecem reduzidos, porém com os tratamentos eles voltam a aumentar, pois a completa reparação é demorada.

Com relação a inflamação sistêmica, a doença endodôntica aumentou os níveis de IL-1- β , como na DPOC, além dos níveis de TNF- α e IL-4. Quando associamos as duas doenças, verificamos redução da quantidade de IL-6 e TNF- α no soro. Já com relação aos tratamentos, apenas com o tratamento convencional observamos redução

dos níveis de IL-1 β por outro lado, quando associamos a PDT verifica-se aumento nos níveis de IL-1 β .

Acredita-se que a DPOC, principalmente o enfisema, e a periodontite apical compartilhem uma fisiopatologia semelhante, como resultado, a inflamação e a destruição do tecido conjuntivo local. Existem evidências de que o neutrófilo é uma célula chave na resposta inflamatória de ambas as doenças e que suas proteases e espécies reativas de oxigênio (ERO) podem propagar a inflamação e causar danos aos componentes desse tecido. Para causar um desequilíbrio da doença, que ocorre entre essas proteínas, que degradam o tecido e seus inibidores. Porém em nosso estudo, só observamos alargamento alveolar no grupo DPOC, e nos demais incluindo o grupo PAA, eles permanecem com o parênquima intacto.

Apesar do pouco conhecimento acerca da correlação da doença periapical com a DPOC, um estudo mais recente, sugeriu que o tratamento odontológico está associado com menor risco de eventos respiratórios adversos na DPOC (Zhou *et al.*, 2011). Assim, concluíram que o estabelecimento e manutenção de saúde bucal para pacientes com doença periodontal e DPOC, torna-se uma questão importante para ser avaliada. Entretanto, além da influência da microbioma periodontal, a fumaça de cigarro também é um fator relevante para o desenvolvimento da lesão periapical. Além disso, citocinas e enzimas induzidas a partir de tecidos inflamados pelo biofilme oral, também podem ser transferidas para os pulmões, onde estimulam processos inflamatórios que precedem a colonização de patógenos (Hajishengallis *et al.*, 2015).

No presente estudo, a eficácia da PDT foi confirmada pela ausência de células inflamatórias e reduzidos níveis de citocinas pró-inflamatórias, exceto IL1- β e TNF- α , no pulmão nos grupos submetidos a essa terapia. Além do aumento no pulmão dos níveis de IL-4, uma citocina imuno reguladora do processo inflamatório.

Talvez Reenstra *et al.* (2000), inferiram que deve haver um aumento na difusão de oxigênio através dos tecidos durante a aplicação da PDT, o que pode favorecer o processo de reparo, onde ocorre a secreção de colágeno pelos fibroblastos nos espaços extracelulares somente na presença de altas taxas de oxigênio.

A manutenção da mucosa oral saudável pode ter um impacto positivo na saúde do hospedeiro, alterando o perfil inflamatório pulmonar, podendo ser preventiva para outros distúrbios inflamatórios, além da DPOC. Inferimos aqui que ambos os tipos de lesão, PAA e DPOC, podem se encontrar em diferentes estágios da resposta

inflamatória. Portanto, para evitar a progressão da DPOC deve-se considerar a presença de outras doenças, além de estratégias terapêuticas. Nesse sentido, sugere-se a realização de mais estudos para uma melhor compreensão dos efeitos da aPDT no tratamento de periodontite apical assintomática em pacientes com DPOC.

6. CONCLUSÃO

Nossos dados demonstraram que a doença endodôntica *per se* pode provocar o aumento dos marcadores da inflamação pulmonar, sem a destruição alveolar do pulmão. Entretanto a associação da DPOC e da PAA levou a uma redução na inflamação pulmonar podendo assim, inferir um efeito supressor sobre a inflamação da DPOC. Além disso, o tratamento endodôntico associado ou não à PDT manteve esse efeito inibitório da resposta inflamatória pulmonar em modelo experimental de DPOC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abou-Rass M. Endodontic treatment finalization – a systematic endodontic restorative approach. *J Calif Dent Assoc* 1993; 21: 33–42.
2. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31: 39–47.
3. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* 473(4), 347–364, 2016.
4. Aimbire F, Oliveira APL, Albertini R, Corrêa JC, Campos CBL, Lyon JP, Silva JA Jr, Costa MS. Low Level Laser Therapy (LLLT) Decreases Pulmonary Microvascular Leakage, Neutrophil Influx and IL-1 β Levels in Airway and Lung from Rat Subjected to LPS-Induced Inflammation. *Inflammation*, Jun; 31(3):189-97, 2008.
5. Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K. A histochemical study of the behaviour of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J Endod.* Vol 20, Issue 10, October 1994, p: 474-478.
6. Arai N, Kondo M, Izumo T, Tamaoki J, Nagai A. Inhibition of neutrophil elastase-induced goblet cell metaplasia by tiotropium in mice. *Eur Respir J.* 2010; 35(5): 1164–1171.
7. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999; 4(1): 1–6.
8. Arora S, Dev K, Agarwal B, Das P, Syed MA. Macrophages: their role, activation and polarization in pulmonary diseases. *Immunobiology.* 2018; 223(4-5): 383-396.
9. Aurora AB, Baluk P, Zhang D, et al. Immune complex-dependent remodelling of the airway vasculature in response to a chronic bacterial infection. *J Immunol.* 2005; 175(10): 6319–6326.
10. Baek KJ, Cho JY, Rosenthal P, Alexander LE, Nizet V, Broide DH. Hypoxia potentiates allergen induction of HIF-1 α , chemokines, airway inflammation, TGF- β 1, and airway remodelling in a mouse model. *Clin Immunol.* 2013;147(1): 27-37.
11. Barker, BL; Brightling, C. Phenotyping the heterogeneity of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Sci. (Lond.)*, 124(6): 371-87, 2013.

12. Bando Y, Henderson B, Meghji S, Poole S, Harris M. Immunocytochemical localization of inflammatory cytokines and vascular adhesion receptors in radicular cysts. *J Oral Pathol Med* 1993; 22: 221–227.
13. Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8:183-92.
14. Barnes PJ. Cellular and molecular mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2014; 35(1): 71–86.
15. Barnes PJ, Burney PG, Silverman EK, Celi BR, Vestbo J, Wedzicha JA, Wouters EF. Chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Dis Primers*. 1:15076, 2015.
16. Bartoli ML, Costa F, Malagrino L. Sputum inflammatory cells in COPD patients classified according to GOLD 2011 guidelines. *Eur Respir J*. 2016; 47(3): 978–980.
17. Belkaid Y; Piccirillo CA; Mendez S; Shevach EM; Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*, 420 (2002), pp. 502-507.
18. Bergenholz G, Lekholm U, Liljenberg B, Lindhe J. Morphometric analysis of chronic inflammatory periapical lesions in root-filled teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1983; 55: 259–301.
19. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, D'Ambrosio D, Lang R, Borsatti A, Sozzani S, Allavena P, Gray PA, Mantovani A, Sinigaglia F. Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med.* Volume 187, Number 1, January 5, 1998 129–134.
20. Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontologica Scandinavica*. 26(12), p. 1-8, 2018.
21. Cardoso CR, Teixeira G, Provciniatto PR, Godoi DF, Ferreira BR, Milanezi CM, Ferraz DB, Rossi MA, Cunha FQ, Silva JS. Modulation of mucosal immunity in a murine model of food-induced intestinal inflammation. *Clinical & Experimental Allergy*. Volume 38, Issue 2 February 2008, Pages 338-349.
22. Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*. 2013; 39: 453–455.

23. Chen ACH, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, Saleem T, Mooney D, Yull FE, Blackwell TS, Hamblin MR. Low-Level Laser Therapy Activates NF- κ B via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. PLoS ONE, July 2011, Volume 6, Issue 7, e22453.
24. Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A. Can Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Enhance the Endodontic Treatment. J Lasers Med Sci, 7(2): 76-85, 2016.
25. Chrepa, V, Kotsakis, GA, Pagonis TC, Hargreaves KM. The Effect of Photodynamic Therapy in Root Canal Disinfection: A Systematic Review. J Endod, 40(7), 891–898, 2014.
26. Coli M, Gazivoda D, Vucevic D, Vasilijic S, Rudolf R, Lukic A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. Molecular Immunology. 47 (2009) 101–113.
27. Cosio MG, Majo J, Cosio M. Inflammation in the airways and lung parenchyma in COPD. Role of T cells. Chest. 2002; 121 (5 suppl):160S-5S.
28. Cotti E, Schirru E, Acquis E, Usai P. An Overview on Biologic Medications and Their Possible Role in Apical Periodontitis. J Endod. 40(12), p 1902-1911, 2014.
29. Croft M, Swain SL. B cell response to T helper subsets II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. J Immunol 1991; 147: 3679–3689.
30. Cullinan MP, Ford PJ, Seymour GJ: Periodontal disease and systemic health: current status. Aust Dent J, 54: S62-S69, 2009.
31. D'Armiento JM, Goldklang MP, Hardigan AA, et al. Increased matrix metalloproteinase (MMPs) levels do not predict disease severity or progression in emphysema. PLoS One. 2013; 8(2): e56352.
32. De Rosa M, Brandenburg S, Takahashi T, , Janke M, Karsten G, Muzzulini T, Orinska Z, Bulfone-Paus S, Scheffold A. IL-2 induces in vivo suppression by CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. European Journal of immunology. Volume 29, Issue 1, January 2008a, Pages 1643-1653.
33. De Rosa V, Matarese G, La Cava A. Regulatory CD4 T cells: sensing the environment. Trends in Immunology. Volume 29, Issue 1, January 2008b, Pages 12-17.

34. Di Stefano A, Sangiorgi C, Gnemmi I, et al. TGF-beta signalling pathways in different compartments of the lower airways of patients with stable COPD. *Chest*. 2018; 153(4): 851–862.
35. Erazo D; Whetstone DR. Dental infections. Stat Pearls Publishing, Treasure Island (FL), 13 Jun 2019.
36. Euler GJ, Miller GA, Hutter JW, D'Alesandro MM. Interleukin-6 in neutrophils from peripheral blood and inflammatory periradicular tissues. *J Endod* 1998; 24: 480–484.
37. Falcón A, Bullón P A. Review of the influence of periodontal treatment in systemic diseases. *Periodontology* 2000, 79(1), 117–128, 2019.
38. Folwaczny M, Bauer F, Grünberg C. Significance of oral health in adult patients with congenital heart disease. *Cardiovasc Diagn Ther* 2019; 9(Suppl 2): S377-S387.
39. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, Cazzola M, Walker MJ, Danhof M, Rabe KF, Della Pasqua OE. Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*, 7:74, 2006
40. Garcez AG, Hamblin MR. Methylene Blue and Hydrogen Peroxide for Photodynamic Inactivation in Root Canal - A New Protocol for Use in Endodontics. *Eur Endod J*. 2017; 2(1): 29.
41. Garlet, GP, Martins, W, Fonseca, BAL, Ferreira, BR, Silva, JS (2004). Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(8), 671–679.
42. Geratz JD, Pryzwansky KB, Anderle SK, Tidwell RR. Control of glucan induced systemic granulomatosis by cyclosporine A. *Inflammation* 1995; 19: 221–231.
43. Gohy ST, Hupin C, Fregimilicka C, et al. Imprinting of the COPD airway epithelium for dedifferentiation and mesenchymal transition. *Eur Respir J*. 2015; 45(5): 1258–1272.
44. GOLD, Global initiative for chronic obstructive lung disease. Global strategy for diagnosis, management and prevention of copd 2019 update. Available from: <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019 - v1.7 - FINAL-14 Nov 2018 -WMS.pdf>.

45. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of Apical Periodontitis: a Literature Review. *J Oral Maxillofac Res* 2011(Oct-Dec); 2(4): e1.
46. Greening AB, Schonfeld SE. Apical lesions contain elevated immunoglobulin G levels. *J Endod* 1980; 12: 867-869.
47. Gregory AD, Kliment CR, Metz HE, et al. Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2015; 98(2): 143–152.
48. Guo Y, Ma L, Zhang F, Sun R, Li T. Neutrophil elastase ameliorates matrix metalloproteinase-9 to promote lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice 1. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2016; 31(6): 382–388.
49. Guyot N, Wartelle J, Malleret L, et al. Unopposed cathepsin G, neutrophil elastase, and proteinase 3 cause severe lung damage and emphysema. *Am J Pathol.* 2014; 184(8): 2197–2210.
50. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 2015, 15(1): 30–44.
51. Hausmann E, Weinfeld N, Miller WA. Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. *Calcif Tissue Res* 1972; 9: 272–282.
52. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997; 277(5334): 2002–2004.
53. Heitersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc* 1975; 8: 74–93.
54. Hendrix AY, Kheradmand F. The role of matrix metalloproteinases in development, repair, and destruction of the lungs. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017; 148: 1–29.
55. Hoang LL, Nguyen YP, Aspeé R, et al. Temporal and spatial expression of TGF- β following airway remodelling to tobacco smoke in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016; 54(6): 872–881.
56. Hogg JC, Timens W, The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol.* 4, 435-459, 2009.
57. Horliana ACRT, Chambrone L, Foz AM, Artese HPC, Sousa Rabelo M de, Dissemination of periodontal pathogens in the bloodstream after periodontal procedures: a systematic review, *PLoS One* 9 (5), e98271, 2014.
58. Hyman JJ, Reid BC. Cigarette smoking, periodontal disease, and chronic obstructive pulmonary disease. *J Periodontol* 2004;75:9-15.

59. Ihan HN, Ihan AT. lymphocyte activation and cytokine expression in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2009; 54: 156–161.
60. Ji M, Wang Y, Li X, Qian Z. Up-regulation of ICAM-1mRNA and IL-1 β mRNA in lung tissues of a rat model of COPD. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):21956–21963.
61. Johannessen AC, Nilsen R, Skaug N. Deposits of immunoglobulins and complement factor C3 in human dental periapical inflammatory lesions. *Scand J Dent Res* 1983; 91: 191-199.
62. Jundi K, Greene CM. Transcription of interleukin-8: how altered regulation can affect cystic fibrosis lung disease. *Biomolecules.* 2015; 5(3): 1386-1398.
63. Karu, T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Physics* Vol. 56, 5, 691-704. 1989.
64. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular bacteria. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 129-163.
65. Kayal RA. The Role of Osteoimmunology in Periodontal Disease. *BioMed Research International.* Volume 17(9), 2013, p. 12.
66. Kanazawa H. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Med Sci Monit,* 2007; 13(11): RA189-195.
67. Katancik JA, Kritchevsky S, Weyant RJ, et al. Periodontitis and airway obstruction. *J Periodontol* 2005; 76(Suppl. 11):2161-2167.
68. Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immuno- histochemical study. *J Endod* 1996; 22: 311–316.
69. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol.* 1999; 44: 55–66.
70. Kerekes K, Tronstad L. Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique. *J Endod* 5, 83–90 (1979).
71. Keudell K, Powel G, Berry H. A review of microbial and immunologic aspects of endodontics. *J Oral Pathol Med* 1981; 36: 39–43.
72. Kinane, D. F., & Lappin, D. F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. *Acta Odontologica Scandinavica.* 2001, 59(3), 154–160.
73. Kontiainen S, Ranta H, Lautenschlager J. Cells infiltrating human periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol* 1986; 15: 544–546.

74. Kopp W, Schwarting R. Differentiation of T lymphocyte subpopulations, macrophages and HLA-restricted cells of apical granulation tissue. *J Endod* 1989; 15: 72–75.
75. Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health*, 122: 417-433, 2008.
76. Lange P, Lung function trajectories leading to chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*. 373, 111-122, 2015.
77. Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodelling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 ;32(4): 311–318.
78. Lerman I, Hammes SR. Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. *Steroids*. 2018; 133: 96–101.
79. Lerner CA, Lei W, Sundar IK, Rahman I. Genetic ablation of CXCR2 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation and injury. *Front Pharmacol*. 2016; 7: 391.
80. Lerner UH. Regulation of bone metabolism by the kallikrein-kinin system, the coagulation cascade, and the acute-phase reactants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994; 78: 481–493.
81. Lin SK, Hong CY, Chang HH, Chiang CP, Chen CS, Jeng JH, Kuo YP. Immunolocalization of macrophages and transforming growth factor- β_1 in induced rat periapical lesions. **J Endod**, v.26, n.6, p.335-40, June 2000.
82. Lukic IK, Kalajzic I, Marusic A, Grcevic D, Katavic V. Role of B Lymphocytes in New Bone Formation. *Lab Invest* 80, 1(11): 1761–1774, 2000.
83. Maeno T, Houghton AM, Quintero PA, Grumelli S, Owen CA, Shapiro SD. CD8+ T Cells Are Required for Inflammation and Destruction in Cigarette Smoke-Induced Emphysema in Mice. *J Immunol*. June 15, 2007, 178 (12) 8090-8096.
84. Maalouf EM, Gutmann JL. Biological perspectives on the non-surgical endodontic management of periradicular pathosis. *Int Endod J* 1994; 27: 154–162.
85. Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes APM, Freitas LF, Camões ICG. Clinical Influence of Different Intracanal Medications on Th1-type and Th2-type Cytokine Responses in Apical Periodontitis. *J Endod*. Volume 41, Issue 2, February 2015, Pages 169-175

86. Márton IJ, Dezső B, Radics T, Kiss C. Distribution of interleukin-2 receptor α -chain and cells expressing major histocompatibility complex class II antigen in chronic human periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 259–262.
87. Márton IJ, Kiss C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. *Int Endod J* 1993; 26: 131–136.
88. Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* Volume 15, Issue 3, June 2000, Pages 139-150.
89. Márton IJ, Kiss C. Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. *J Endod*. Volume 40, Issue 2, February 2014, Pages 155-163.
90. Mendy A, Forno E, Niyonsenga T, Gasana J. Blood biomarkers as predictors of long-term mortality in COPD. *Clin Respir J*. 2018;12(5): 1891–1899.
91. Menezes AMB, Perez-Padilla R, Jardim JRB, Muiño A, Lopez MV, Valdivia G, Oca MM, Talamo C, Hallal PC, Victora CG. Chronic obstructive pulmonary disease in five Latin American cities (the PLATINO study): a prevalence study. *Lancet*. 366(26) Nov: 1875-1881, 2005.
92. Metzger Z. Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Z. Metzger Traumatol* 2000; 16: 1–8.
93. Michaeloudes C, Kuo C-H, Haji G, et al. Metabolic re-patterning in COPD airway smooth muscle cells. *Eur Respir J*. 2017; 50(5): 170-202.
94. Mielke MEA, Peters C, Hahn H. Cytokines in the induction and expression of T-cell-mediated granuloma formation and protection in the murine model of listeriosis. *Immunol Rev* 1997; 158: 79–93.
95. Mikko M, Forsslund H, Cui L, et al. Increased intraepithelial (CD103+) CD8+ T cells in the airways of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Immunobiology*. 2013; 218(2): 225–231.
96. Miller GA, DeMayo T, Hutter JW. Production of interleukin-1 by polymorphonuclear leukocytes resident in periradicular tissue. *J Endod* 1996; 22: 346-351.
97. Mittrücker HW, Kaufmann SHE, Regulatory T cells and infection: suppression revisited. *Eur. J. Immunol*. 2004. 34: 306–312
98. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* v15, 348–81, 2004.

99. Nauseef WM. Biosynthesis of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2018; 642: 1–9.
100. Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Kobayashi C, Suda H. Distribution of Ia antigen-expressing nonlymphoid cells in various stages of induced periapical lesions in rat molars. *J Endod* 1994; 20: 27–31.
101. Ostridge K, Williams N, Kim V, et al. Relationship between pulmonary matrix metalloproteinases and quantitative CT markers of small airways disease and emphysema in COPD. *Thorax*. 2016; 71(2): 126–132.
102. Peron JP, de Brito AA, Pelatti M, Brandão WN, Vitoretto LB, Greiffo FR, da Silveira EC, Oliveira-Junior MC, Maluf M, Evangelista L, Halpern S, Nisenbaum MG, Perin P, Czeresnia CE, Câmara NO, Aimbire F, de Paula Vieira R, Zatz M, de Oliveira AP. Correction: Human Tubal-Derived Mesenchymal Stromal Cells Associated with Low Level Laser Therapy Significantly Reduces Cigarette Smoke-Induced COPD in C57BL/6 mice. *PLoS One*. 25; 10(9), 2015.
103. Polverino E, Rosales-Mayor E, Dale GE, Dembowsky K, Torres A. The role of neutrophil elastase inhibitors in lung diseases. *Chest*. 2017; 152(2): 249–262.
104. Pulver WH, Taubman MA, Smith DJ. Immune components in human dental periapical lesions. *J Endod* 1978; 23: 435–443.
105. Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med*. 2017; 6(1): 24.
106. Qiu S-L, Zhang H, Tang Q-Ya, et al. Neutrophil extracellular traps induced by cigarette smoke activate plasmacytoid dendritic cells. *Thorax*. 2017; 72(12): 1084–1093.
107. Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root canal filling and the coronal restoration. *IntEndod J* 1995; 28: 12–18.
108. Reenstra WR, Collard CD, Väkevä A, Morrissey MA, Agah A, Rollins S, Buras JA, Meri S, Stahl GL.* Complement Activation after Oxidative Stress Role of the Lectin Complement Pathway. *Am J Pathol*. 2000 May; 156(5): 1549–1556.
109. Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980; 19: 821–827.
110. Reynaert N, Eurlings I, Mercken E, et al. Involvement of JNK in TNF α driven remodelling. *Eur Respir J*. 2015; 46: A5058.

111. Rovina N, Koutsoukou A, Koulouris NG. Inflammation and Immune Response in COPD: Where Do We Stand? Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation Volume1, 2013, 1-9
112. Sadasivam M, Avci P, Gupta GK, Lakshmanan S, Chandran R, Huang YY, Kumar R, Hamblin MR. Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. *European Journal of Nanomedicine*, 5(3), 2013.
113. Saetta M. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 160: S17–S20, 1999.
114. Sales DS, Ito JT1, Zanchetta IA, Annoni R, Aun MV, Ferraz LFS, Cervilha DAB, Negri E, Mauad T, Martins MA, Lopes FDTQS. Regulatory T-Cell Distribution within Lung Compartments in COPD. *COPD*. 2017; 14(5): 533-542.
115. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology* Vol. 22: 531-562 (April, 2004).
116. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunology Today*, 19(12), 568–574, 1998.
117. Sapey E, Bafadhel M, Bolton CE, et al Building toolkits for COPD exacerbations: lessons from the past and present *Thorax* 2019;74:898-905.
118. Sato EFL, Antoniazzi JH. New method for endodontic treatment in molar of rats. *Braz Dent J*, 4(2): 73-77, 1993.
119. Scannapieco FA, Wang BY, Shiau HJ. Oral bacteria and respiratory infection: Effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Ann Periodontol* 2001;6: 78-86.
120. Scannapieco FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8:54-69.
121. Shapiro SD, "The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease," *The American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 160, no. 5, part 2, pp. S29–S32, 1999.
122. Silva LAB, Novaes AB, Oliveira RR, Nelson-Filho P, Santamaria-Jr M, Bezerra Silva RAB. Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histopathological Evaluation. *J Endod*, Vol 38(3), March 2012.

123. Silva VR, Marcondes P, Silva M, Villaverde AB, Neto HCCF, Vieira RP, Aimbire F, Ligeiro de Oliveira AP. Low-level laser therapy inhibits bronchoconstriction, Th2 inflammation and airway remodeling in allergic asthma. *Respiratory Physiology & Neurobiology*. 194: 37-48, 2014.
124. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antibacterial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119–125.
125. Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2001; 32(1): 76–102.
126. Simpson JL, Powell H, Baines KJ, et al. The effect of azithromycin in adults with stable neutrophilic COPD: a double blind randomised, placebo-controlled trial. *PLoS One*. 2014; 9(8): e105609.
127. Singh D, Edwards L, Tal-Singer R, Rennard S. Sputum neutrophils as a biomarker in COPD: findings from the ECLIPSE study. *Respir Res*. 2010; 11(1): 77.
128. Sivieri-Araujo G, Santos LMS, Queiroz IOA, Wayama MT, Yamanari GH, Martins CM, Dezan-Junior E, Cintra LTA, Gomes-Filho JE. Photodynamic therapy in Endodontics: Use of a supporting strategy to deal with endodontic infection. *Dental Press Endod*. May-Aug; 3(2): 52-8, 2013.
129. Sol MA, Tkaczuk J, Voigt JJ, Durand M, Sixou M, Maurette A. Characterization of lymphocyte subpopulations in periapical lesions by flow cytometry. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 253–258.
130. STASHENKO, P.; YU, S. M.; WANG, C-Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive response to endodontic infections. **J Endod**, v.18, n.9, p.422- 6, Sep. 1992.
131. Stashenko P, Yu SM. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. *J Dent Res* 1989; 68: 830–834.
132. Stashenko P, Wang C-Y, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994; 78: 494–502.
133. Stern MH, Dreizen S, Mackler BF, Levy BM. Antibody-producing cells in human periapical granulomas and cysts. *J Endod* 1981; 7: 447–452.

134. Stockley RA: Neutrophils and the pathogenesis of COPD. *Chest*, 121:151S-155S, 2002.
135. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992; 18: 427–430.
136. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 85, 86-93, 1998.
137. Sundqvist G, Lerner UH. Bradykinin and thrombin synergistically potentiate interleukin 1 and tumor necrosis factor induced prostanoic acid biosynthesis in human dental pulp fibroblasts. *Cytokine* 1996; 8: 168–177.
138. Takeishi O, Saito I, Tsurumachi T, Moro I, Saito T. Expression of inflammatory cytokine genes in vivo by human alveolar bone derived polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1996; 58: 244–248.
139. Tani N, Osada T, Watanabe Z, Umemoto T. Comparative immunohistochemical identification and relative distribution of immunocompetent cells in sections of frozen or formalin-fixed tissue from human periapical inflammatory lesions. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 163–169.
140. Tani-Ishii N, Wang C-Y, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 213–219.
141. Tardivo J P, Del Giglio A, de Oliveira C S, Gabrielli D S, Junqueira H C, Tada DB, Severino D, Turchiello RF, Baptista MS. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photo diagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(3), 175–191, 2005.
142. Thomson BM, Saklatvala J, Chambers TJ. Osteoblasts mediate interleukin 1 stimulation of bone resorption to rat osteoclasts. *J Exp Med* 1986; 164: 104–112.
143. Torabinejad M, Kettering JD. Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J Endod* 1985; 11: 122–125.
144. Torabinejad M, Kiger RD. Experimentally induced alterations in the periapical tissues of the cat. *J Dent Res* 1980; 59: 87–96.
145. Torres JOC, Torabinejad M, Matiz RAR, Mantilla EG. Presence of secretory IgA in human periapical lesions. *J Endod* 1994; 20: 87–89.
146. Trindade AC, Figueiredo JAP, Oliveira SD, Barth Junior VC, Gallo SW, Follmann C, Wolle CFB, Steier L, Morgental RD, Weber JBB. Histopathological,

- Microbiological, and Radiographic Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Study in Rats' Molars. *Photomedicine and Laser Surgery*. V XX, Number XX, 2017, Pp. 1–8
147. Trojanek JB, Cobos-Correa A, Diemer S, et al. Airway mucus obstruction triggers macrophage activation and matrix metalloproteinase 12-dependent emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014; 51(5): 709–720.
 148. Walton RE, Ardjmand K. Histological evaluation of the presence of bacteria in induced periapical lesions in monkeys. *J Endod* 1992; 18: 216–221.
 149. Wang C-Y, Stashenko P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. *J Endod* 1993; 19: 107–111.
 150. Wang C-Y, Stashenko P. The role of interleukin-1a in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 50–56.
 151. Wang C-Y, Tani-Ishii N, Stashenko P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 65–71.
 152. Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB. A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod* 1992; 18: 152–155.
 153. Weiss A. T lymphocyte activation. In: Paul WE, ed. *Fundamental immunology*. 3rd edn. New York: Raven Press, 1993: 467–503.
 154. Xu J, Tao B, Guo X, et al. Macrophage-restricted Shp2 tyrosine phosphatase acts as a rheostat for MMP12 through TGF- β activation in the prevention of age-related emphysema in mice. *J Immunol*. 2017; 199(7): 2323–2332.
 155. Yin H, Zhang S, Sun Y, et al. Micro RNA-34/449 targets IGFBP-3 and attenuates airway remodeling by suppressing Nur 77 mediated autophagy. *Cell Death Dis*. 2017; 8(8): e2998.
 156. Yoshimura T. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally? *Cell Mol Immunol*. 2018; 15(4): 335–345.
 157. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 535–540.
 158. Zenuz AT, Eslami H, Kafil HS, Safari E, Ghanizadeh M, Mohammadi A, The Application of Antimicrobial Photodynamic Therapy on *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis* using Heperecin and Methylene Blue Photosensitizers. *Biomed & Pharmacol J*, Vol. 9(2), 443-450, 2016.

159. Zhou X, Wang Z, Song Y, Zhang J, Wang C. Periodontal health and quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*, 105, 67-73, 2011.