



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

Veridiana Dellê

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) NA PERIODONTITE
APICAL CRÔNICA EM MODELO DE EXPERIMENTAL DE ASMA INDUZIDA
POR OVALBUMINA (OVA)**

São Paulo, SP

2019



VERIDIANA DELLÊ

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT) NA
PERIODONTITE APICAL CRÔNICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ASMA INDUZIDA POR OVALBUMINA (OVA)**

Dissertação apresentada à
Universidade Nove de Julho, para
obtenção do título de mestre em
Biofotônica Aplicada às Ciências da
Saúde.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula
Ligeiro de Oliveira

São Paulo, SP

2019

Dellê, Veridiana.

Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) na periodontite apical crônica em modelo de experimental de asma induzida por ovalbumina (OVA). / Veridiana Dellê. 2019.

80 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2019.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira.

1. Asma. 2. Inflamação pulmonar. 3. Periodontite apical. 4. Laser de Baixa Potência. 5. Terapia fotodinâmica.

I. Oliveira, Ana Paula Ligeiro de.

II. Título

CDU 615.831

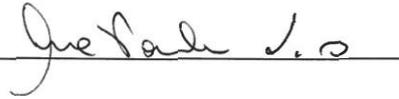
São Paulo, 26 de fevereiro de 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Aluno (a): Veridiana Dells

Título da Dissertação: "Efeito da terapia fotodinâmica (PDT) na periodontite apical crônica em modelo experimental de cárie induzida por ovalbumina (OVA)"

Presidente: PROF. DR. AM PAUTA LIGEIRO DE OLIVEIRA



Membro: PROF. DR. MARIA FERNANDA SETUBAL DESTRO RODRIGUES



Membro: PROF. DR. BEATRIZ SARAIVA MANGUEIRA ROMAN



Agradecimentos

Agradeço primeiramente minha família, minha mãe Simone por me incentivar e me direcionar para o melhor caminho, agradeço meus irmãos Humberto e Isabela, por serem meus companheiros, meus melhores exemplos e por ser meu porto seguro. Agradeço meu namorado Pedro por ser companheiro, por ter tido toda paciência, por sempre me incentivar e por ser compreensivo nas horas que estive ausente.

Agradeço à minha orientadora Ana Paula Ligeiro, por todos os ensinamentos, pela orientação, pela amizade e por mostrar que no final tudo dá certo. Meu obrigado a Léia e a Caren, por me ensinar e ajudar com os experimentos, Vanessa e Núria do biotério, que tiveram todos os cuidados com os meus camundongos.

Aos professores da pós, meu agradecimento por cada ensinamento, em especial à professora Anna Carolina, por toda atenção, paciência, ensinamento e orientação ao meu trabalho.

À Uninove pela oportunidade e por toda estrutura onde consegui construir meu projeto, e que me deu a oportunidade de conhecer pessoas incríveis, que de colegas de sala se tornaram amigos especiais para o resto da vida. Ellen Perim, Felipe Silva, Andréia La Selva, Thalita Molinos, Marcelo Alves, Marlon Cruz, Rodrigo Fernando, Marcia Makabe, Elza Ferri, Christiane Pavani, vocês tiveram papel fundamental nessa jornada. Amizade incrível para todas as horas.

Meu ultimo agradecimento e especial, vai para minha amiga Karina Brajato, que simplesmente foi companheira desde o primeiro contato, você se tornou muito mais que uma amiga, uma confidente, uma amizade pura de outras vidas, esteve comigo em todos os momentos, seja eles ruins ou bons e com certeza vai estar em todos os outros. Teremos boas historias para contar, obrigada, obrigada e obrigada por aparecer na minha vida.

Resumo

Hoje a asma afeta aproximadamente 300 milhões de indivíduos, trazendo como consequência um problema sócio econômico para a população. A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, caracteriza-se por crises agudas de obstrução das vias aéreas inferiores provocando dificuldades respiratórias. A Periodontite Apical é causada por agentes etiológicos que produzem no dente condições anatomo clínicas que conduzem a perda tecidual, com consequente envolvimento pulpar por meio de situações inflamatórias agudas e crônicas. A influência da PA em alterações sistêmicas tem sido amplamente estudada. Tendo em vista que alguns tratamentos convencionais da PA, não são 100% bem sucedidos, a terapia fotodinâmica (PDT) surge como um tratamento coadjuvante. Não se sabe ainda sobre a relação entre asma e periodontite apical. Esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da terapia fotodinâmica associada ao tratamento endodôntico e a inflamação pulmonar em modelo experimental de asma. Sessenta e quatro camundongos machos Balb/c, onde foram divididos em 8 grupos (n=8), Basal, Endo, Endo + Tratamento, Asma + Endo + Tratamento, Asma + Endo, Endo + Tratamento + PDT, Asma + Endo + Tratamento + PDT. A periodontite apical (PA) foi induzida com a abertura coronária e o dente permaneceu 21 dias aberto. A asma foi induzida por ovalbumina (OVA) e hidróxido de alumínio, via subcutâneo (dias 0 e 14) o desafio por via oro traqueal, três vezes na semana por seis semanas. O tratamento da PA foi realizado com hidróxido de cálcio e/ou PDT com azul de metileno (0,005%) associado com laser de diodo vermelho irradiado 660 nm, com energia de 287 J/ cm², com 9 J no ponto, entregue em 90 s. Foram analisados após a eutanásia, contagem total e diferencial de células no lavado bronco alveolar (LBA) e fosfatase alcalina no soro. Nos resultados observamos aumento do número de células totais, quando associamos as duas doenças, por outro lado, quando realizamos o tratamento endodôntico padrão, associado ou não a PDT, verificou-se a redução do número de células recuperadas do lavado broncoalveolar. Ainda, verificou-se aumento da reabsorção óssea (fosfatase alcalina) nos grupos Endo e Endo+Asma, porém com os tratamentos, apenas os grupos sem asma é que reduziram esse parâmetro. Conclui-se que a Periodontite Apical pode aumentar a inflamação pulmonar. A associação da Asma com a Periodontite Apical piora os parâmetros de inflamação pulmonar. Porém, após o tratamento padrão associado ou não a PDT da periodontite apical diminuiu a inflamação pulmonar nos camundongos asmáticos, chegando próximo aos níveis basais.

Palavras-Chave: Asma, inflamação pulmonar, periodontite apical, Laser de Baixa Potência, terapia fotodinâmica.

Abstract

Today, asthma affects approximately 300 million individuals, resulting in a socioeconomic problem for the population. Asthma is a chronic inflammatory disease of the airways, characterized by acute attacks of obstruction of the lower airways causing respiratory difficulties. Apical Periodontitis is caused by etiologic agents that produce in the tooth anatomical clinical conditions that lead to tissue loss, with consequent pulp involvement through acute and chronic inflammatory conditions. The influence of BP on systemic alterations has been widely studied. Since some conventional BP treatments are not 100% successful, photodynamic therapy (PDT) appears as a coadjuvant treatment. It is not yet known about the relationship between asthma and apical periodontitis. This study aims to evaluate the effect of photodynamic therapy associated with endodontic treatment on pulmonary inflammation in an experimental model of asthma. Sixty-four male Balb / c mice were divided into 8 groups (n = 8). Basal, Apical Periodontitis, Apical Periodontitis + Treatment, Asthma + Apical Periodontitis + Treatment, Asthma + Apical Periodontitis, Apical Periodontitis + Treatment + PDT, Asthma + Apical Periodontitis + Treatment + PDT. Apical periodontitis (AP) was induced with the coronary opening and the tooth remained open for 21 days. Asthma was induced by ovalbumin (OVA) and aluminum hydroxide, subcutaneously (days 0 and 14) challenge via tracheal oro, three times a week for six weeks. The treatment of PA was performed with calcium hydroxide and / or PDT with methylene blue (0.005%) associated with red diode laser irradiated 660 nm, with energy of 287 J / cm², with 9 J at the point, delivered in 90 s . Total and differential counts of alveolar bronchial lavage (BAL) and serum alkaline phosphatase were analyzed after euthanasia. On the other hand, when we performed standard endodontic treatment, associated or not with PDT, we observed a reduction in the number of cells recovered from the bronchoalveolar lavage. In addition, there was an increase in bone resorption (alkaline phosphatase) in the Endo and Endo + Asthma groups, but with the treatments, only the non-asthma groups reduced this parameter. It is concluded that apical periodontitis may increase pulmonary inflammation. The association of Asthma with Apical Periodontitis worsens the parameters of pulmonary inflammation. However, after the standard treatment associated or not with PDT of apical periodontitis, pulmonary inflammation decreased in the asthmatic mice, reaching near the basal levels.

Keywords: Astma, lung inflammation, apical periodontitis, Low Level Laser, Photodynamics therapy.

Tabela de Símbolos e abreviações

PA	Periodontite Apical
PDT	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
LBA	Lavado bronco alveolar
OVA	Ovalbumina
J	Joules
W	Watt
Nm	Nanometros
LBI	Laser em Baixa Intensidade
cm ²	centímetro quadrado
TP	Tratamento Periodontal
λ	comprimento de onda

Lista de figuras

Figura 1: Eventos celulares envolvidos da periodontite apical.	03
Figura 2: Espectro visível da luz.....	09
Figura 3: Fisiopatologia da asma	12
Figura 4: Fluxograma de Indução da periodontite apical e indução da asma	17
Figura 5: Indução do modelo de asma por Ovalbumina	18
Figura 6: Indução do modelo de Periodontite Apical.	19
Figura 7: Tratamento Endodôntico e Terapia Fotodinâmica.....	20
Figura 8: Validação da metodologia da Endodontia Periapical.....	24
Figura 9: Análise do número de células Totais e Fotomicrografia representativa.....	26
Figura 10: Análise do número de macrófagos no lavado Broncoalveolar.	27
Figura 11: Análise do número de linfócitos no lavado Broncoalveolar.....	28
Figura 12: Análise do número de neutrófilos no lavado Broncoalveolar.	29
Figura 13: Análise do número de eosinófilos no lavado Broncoalveolar.....	30
Figura 14: Quantificação sérica de fosfatase alcalina	31

Lista de Tabelas

Tabela 1: Delineamento experimental.....	16
Tabela 2: Parâmetros dosimétricos para a realização da Terapia Fotodinâmica.....	20

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Periodontite Apical	1
1.2 Laser em Baixa Intensidade (LBI)	6
1.3 Terapia Fotodinâmica.	9
1.4 Asma.....	11
2. Objetivos	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. Materiais e Métodos.....	15
3.1 Animais	15
3.2 Delineamento Experimental	16
3.3 Fluxograma	17
3.4 Indução do modelo de asma crônica usando Ovalbumina (OVA)	17
3.5 Indução do modelo da Doença Periapical crônica.....	18
3.6 Tratamento endodôntico e terapia fotodinâmica.....	19
3.7 Eutanásia dos animais	21
3.8 Coleta e avaliação da inflamação pulmonar no LBA	21
3.9 Microtomografia (micro-CT).....	21
3.10 Quantificação de Fosfatase alcalina no soro.....	22
3.11 Análise Estatística	23
4. Resultados	24
4.1 Validação da metodologia da Endodôntia Experimental.....	24
4.2 Células totais e diferenciais do lavado Broncoalveolar.	25
4.3 Contagem de Macrófagos.	27
4.4 Contagem de Linfócitos.....	28
4.5 Contagem de Neutrófilos.....	29
4.6 Contagem de Eosinófilos.....	30
4.7 Quantificação da fosfatase alcalina em soro	31
5. Discussão	32
6. Conclusão.....	37
7. Referência Bibliográfica.	38
8. Anexos.....	55

1. Introdução

1.1 Periodontite Apical

As infecções endodônticas, também conhecidas como periodontite apical, são sempre polimicrobianas, e podem induzir uma intensa resposta inflamatória do hospedeiro, levando a pulpite e conseqüentemente a necrose pulpar. As doenças endodônticas são comuns, com estimativas de prevalência ao longo da vida de 20% a 100% por indivíduo (ARISTSUNI et al., 2015).

A integridade das estruturas dentais, tais como esmalte e cimento, atua como verdadeira barreira ao ingresso dos microrganismos às estruturas endodônticas. Assim, quando esmalte e/ou cimento são perdidos por cárie, restaurações deficientes, traumatismo ou doença periodontal, o tecido pulpar se não protegido, evolui para necrose e os microrganismos ganham a oportunidade de invadir o sistema endodôntico, via túbulos dentinários, ou mesmo por exposição direta da região desprovida de defesas (ARISTSUNI et al., 2015; FERRARI et al., 2010).

Na cavidade bucal, estima-se a presença de mais de 700 diferentes espécies cultiváveis e muitas outras não cultiváveis de microrganismos. Teoricamente qualquer microrganismo da cavidade bucal pode colonizar o espaço endodôntico sem tecido vital, porém em um grupo restrito de 400 espécies distintas tem sido identificado nos canais radiculares infectados. A razão para tal ocorrência é o próprio ambiente endodôntico, que é extremamente seletivo em função de fatores ecológicos ali existentes, tais como disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio e interações bacterianas (FERRARI et al., 2010).

Quando o tecido pulpar se torna necrótico, perde sua circulação e sua capacidade responsiva à agressão biológica. Assim, microrganismos que conseguem ali chegar, não encontram resistência imunológica e sim nutriente, resultando em um ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Ainda que leveduras e vírus já tenham sido detectados dentro dos canais radiculares, bactérias e seus subprodutos são os principais agentes envolvidos nas alterações pulpares e periapicais (FERRARI et al., 2010) O desenvolvimento da

periodontite apical faz-se em decorrência não apenas da tentativa de microrganismos desejarem avançar além do endodonto, mas também pela liberação de produtos bacterianos intra e extracelulares, tais como enzimas, toxinas ou restos celulares lançados nos tecidos periapicais (FERRARI et al., 2010). Merece destaque, o lipopolissacarídeo (LPS), constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas, de alta prevalência em casos de periodontite apical sintomática. O LPS é considerado uma endotoxina, que causa lesões no organismo do hospedeiro, e capaz de produzir lesão apical sem necessidade de outros estímulos antigênicos. A patogênese da periodontite apical caracteriza-se por processo inflamatório agudo em resposta aos microrganismos. Na região afetada as células como plasmócitos, linfócitos e macrófagos são atraídos. Observa-se um aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e produção de TNF- α por macrófagos, acontecendo a destruição do tecido conjuntivo adjacente e a atividade de osteoclastos. (figura 1)

Não há dúvidas de que o desenvolvimento da lesão periapical é uma resposta de defesa do hospedeiro na tentativa de recrutar células e elementos de defesa, impedindo a disseminação da infecção para outros sítios.

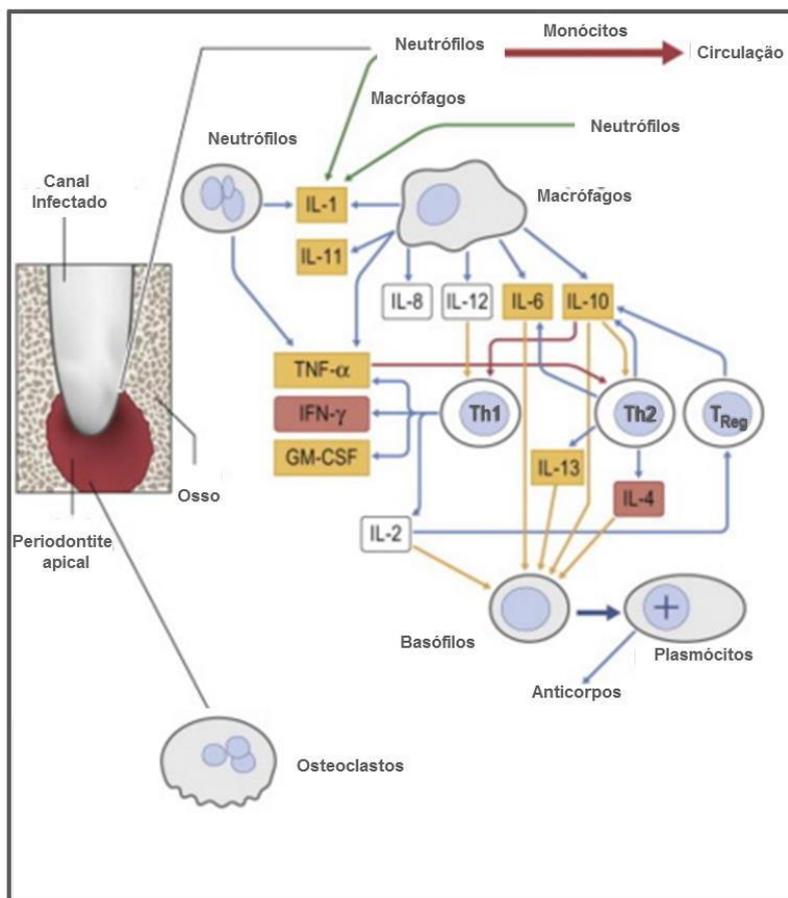


Figura 1: Diagrama Esquemático representando a dinâmica da Lesão Periapical
 Fonte: Biological and Clinical rationale for root canal treatment and management of its failure, (Grelabivola, et al 2014)

As doenças endodônticas envolvem principalmente neutrófilos, sendo a principal defesa contra patógenos bacterianos. Os mecanismos de resposta do hospedeiro a esses agentes infecciosos foram elucidados através do uso de modelos de roedores. Nos modelos de infecção endodôntica, a polpa de dentes molares de camundongos é tipicamente exposta e inoculada com espécies bacterianas associadas a infecções endodônticas humanas (ARISTSUNI et al., 2015). Camundongos tem um potencial abscessogênico de culturas puras e misturadas de anaeróbios orais associados a infecções de origem endodôntica. Cepas de *Fusobaeterium nucleatum*, *Peptostreptococcus anaerobius* e *Veillonetla Parvula* foram patogênicos em cultura pura (BAUMGARTNER et al., 1992).

De acordo com diferentes situações clínicas, desenvolvem-se diferentes tipos de infecção endodôntica. Dependendo da localização na estrutura

endodôntica, no momento em que as bactérias se estabelecem no canal radicular, e a composição da microbiota, a infecção é classificada como primária e secundária (LOPES et al., 2015).

A periodontite apical primária é uma infecção onde o dente encontra-se com a polpa necrosada e com imagem radiográfica de perda óssea na região apical. Esses dentes ainda não foram submetidos ao tratamento endodôntico (MATSUSHITA et al., 1999). A cavidade endodôntica pode estar exposta ou não ao meio bucal, a infecção nesse caso pode atingir até 12 espécies de bactérias por canal quando as amostras são avaliadas por métodos de cultura. Em quadros sintomáticos tem-se uma predominância de anaeróbias estritas Gram-negativas (LPS) e em casos assintomáticos anaeróbias estritas Gram-positivas (sem LPS) (SASSONE et al., 2007).

Alguns estudos conseguiram identificar aproximadamente 500 espécies em infecções endodônticas, podendo ser mista e podendo atingir de 10 a 30 espécies por canal, quando a lesão perirradicular tem maior diâmetro, a microbiota fica mais complexa e com maior número de espécies, assim como quando está associado a fistula, pode atingir até 17 espécies (SIQUEIRA et al., 2000). Infecções endodônticas primárias têm espécies como *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*. Bacilos como *Provetella* e *Porphyromonas* também são detectadas, das *Porphyromonas* apenas as *Porphyromona endodontias* e a *Porphyromona gingivalis* parecem estar envolvidas com lesões Peri radiculares, inclusive abscessos (SIQUEIRA et al., 2001).

As espécies de *Enterococcus* são reconhecidas como principais patógenos de infecção hospitalar, infecções intra-abdominais, bacteremia e endocardite (ROÇAS et al., 2001). São anaeróbios facultativos, habitam o intestino humano, trato genital e cavidade bucal. Existem aproximadamente 23 espécies de *Enterococcus* descritas (PORTENIER et al., 2003).

Estudos que utilizavam apenas métodos dependentes de cultura achavam um percentual pequeno ou às vezes inexistente de *Enterococcus faecalis* na periodontite apical primária (KAYAOGLU et al., 2004; GOMES et al., 2006).

Nas infecções secundárias, algumas espécies que não são membros da microbiota oral, como a *Pseudomonas aeruginosa*, *Escheria Coli*,

Staphylococcus aureus e *Enterococcus faecalis* são mais comumente encontradas, sendo introduzidas no canal durante o tratamento endodôntico. A quebra da cadeia asséptica através do isolamento absoluto deficiente, instrumento contaminados, dentes mantido abertos para drenagem, cárie remanescente, fratura ou perda do material restaurador constituem fatores responsáveis para este tipo de infecção (KAYAOGLU et al., 2004; GOMES et al., 2006). O tratamento endodôntico deve ser iniciado no intervalo de 7 a 10 dias depois da primeira sessão de penetração desinfetante ou pulpectomia. Nos casos em que o tratamento endodôntico sofre atraso de uma ou duas semanas ou há sinais de reabsorção em evidências radiográfica deve-se tratar com hidróxido de cálcio em longo prazo antes da obturação (FERRARI et al., 2010). Não existem chances de revascularização destes dentes e o tratamento endodôntico deve ser iniciado em 7 a 10 dias depois da consulta de emergência. A pasta de Hidróxido de Cálcio tem como propriedades derivadas da dissociação iônica em íon cálcio e íons hidroxila, e a ação destes íons sobre os tecidos e os microrganismos explicam as propriedades biológicas e antimicrobianas desta substância (FERRARI et al., 2010). O tratamento endodôntico para casos que consiste no controle de uma infecção, o preparo químico-cirúrgico do conduto é realizado por substâncias químicas como hipoclorito de sódio em concentrações variadas dependendo do grau de patogenicidade, ação mecânica de instrumentos manuais e/ou rotatórios. A medicação intracanal se faz necessária para eliminar microrganismos que sobreviveram ao preparo químico-cirúrgico, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou reinfecção por microrganismos da saliva, reduzir a inflamação perirradicular e conseqüente sintomatologia, inativar produtos microbianos, controlar a reabsorção dentária inflamatória externa, estimular a reparação por tecido mineralizado (FERRARI et al., 2010). Quando falhas ocorrem no tratamento endodôntico, normalmente se refaz o tratamento, removendo o material obturador o canal e usando-se substâncias químicas diversas no intuito de eliminar ou reduzir as bactérias presentes no interior do canal. A literatura nos mostra que em longo prazo e dependendo dos fatores envolvidos, como a presença de lesão periapical e do tamanho desta lesão, o índice de sucesso do retratamento não passa de 74% (SIQUEIRA et al., 2001).

Com o objetivo de evitar a disseminação da infecção e o risco de uma infecção sistêmica, diversos antibióticos têm sido administrados aos pacientes e isso tem levado ao aumento da resistência microbiana aos antibióticos. Bactérias como o *Enterococcus faecalis*, descritas como sendo originalmente resistentes e de difícil eliminação, tornando-se resistente a diversos antibióticos como eritromicina, ampicilina, clindamicina, tetraciclina (SUNDE et al., 2002; SUNDQVIST et al., 1998) assim como resistente também a diversos antimicrobianos como o hidróxido de cálcio, paramonoclorofenol canforado, clorexidina e hipoclorito de sódio (DISTEL et al., 2002; DAHLEN et al., 2000).

A eliminação dos micro-organismos patogênicos nem sempre é atingida na prática clínica, gerando o insucesso do tratamento endodôntico. Acredita-se que o insucesso da terapia em casos de polpa mortificada esta atribuído a ineficiência das soluções irrigadoras, anatomia dos canais radiculares, e patogenicidade das bactérias (SIQUEIRA et al., 1996). Estes fatores podem se apresentar como causa de reincidência de infecções. Tendo em vista que alguns tratamentos convencionais da PA, não são 100% bem sucedidos, outros métodos de tratamentos coadjuvantes estão sendo empregados para evitar o insucesso dos tratamentos.

A terapia fotodinâmica em endodontia é utilizada como um método coadjuvante na eliminação de micro-organismos resistentes ao preparo químico cirúrgico, reduzindo comprovadamente a microbiota endodôntica. É uma intervenção não invasiva, não desenvolve resistência microbiana, não provoca danos teciduais e não causa efeitos sistêmicos. Os fotossensibilizadores derivados das fenotiazinas têm sido amplamente empregados na endodontia (BARATTO et al., 2009; POLY et al., 2010)

1.2 Laser em Baixa Intensidade (LBI)

Einstein (1915 – 1916) postulou sua teoria sobre a emissão estimulada de luz, baseada na teoria quântica proposta por Plank (1900) que analisava as relações entre a quantidade de energia liberada por processos atômicos. Ao mensurar a interação de átomos, íons e moléculas com a radiação

eletromagnética em termos de absorção e emissão espontânea de radiação, Einstein concluiu que o terceiro processo de interação, a emissão estimulada, deveria existir, e nela, a radiação eletromagnética deveria ser produzida por um processo atômico (PINHEIRO et al., 1998).

A geração do raio laser ocorre dentro de uma cavidade conhecida como cavidade de Perot-Fabry, que consiste de uma câmara contendo um meio ativo. O meio ativo consiste em um material que pode ser sólido, líquido, gasoso ou semiconductor. No instante em que o meio ativo é excitado, ele faz com que os elétrons contidos na cavidade óptica ganhem e liberem energia para formação da radiação laser. O tamanho e a forma da câmara variam de acordo com o meio ativo e a potência do aparelho laser. A emissão contínua é resultante da excitação contínua de um meio ativo por uma descarga elétrica, como nos casos dos lasers gasosos, ou por uma fonte contínua de bombeamento óptico. A emissão pulsátil é resultante do bombeamento pulsátil do meio ativo, o qual é progressivamente bombeado até chegar a um nível de excitação suficiente para produzir emissão laser (BASFORN et al., 1995; MALUF et al., 2006).

A origem da luz ocorre através dos fótons, que são desenvolvidos quando os elétrons que circulam em torno do núcleo atômico mudam seu curso. Isso ocorre quando uma energia extra é aplicada ao átomo, é armazenada pelos elétrons quando são excitados e isso leva a mudança desses elétrons para um nível energético superior ao seu estado natural. Cada órbita está associada a um nível de energia, sendo o mais baixo deles conhecido como estado fundamental, neste estado os elétrons estão mais próximos do núcleo. O fenômeno da absorção ocorre quando a estrutura atômica estável reage com um fóton, passando a um estado mais energizado. O estado estável corresponde ao nível mínimo de energia; e a transferência para o estado excitado se dá pela absorção de energia externa ao sistema atômico. O átomo retorna ao estado de repouso, liberando espontaneamente a energia. A passagem a um estado de repouso se dá através da liberação de fótons de luz. Esta liberação fotônica caracteriza a emissão espontânea de radiação (BASFORN et al., 1995; MALUF et al., 2006). (Figura 2)

A palavra LASER ("light Amplification by Stimulated Emission Radiation") é um acrônimo o qual significa "amplificação da luz por emissão

estimulada de radiação”^{24 25}. O que difere uma luz laser de uma luz de lâmpada é a sua monocromaticidade, colimação e coerência, características as quais não estão presentes na luz de uma lâmpada (KARU et al., 1987).

Devido à capacidade do laser de proporcionar ao organismo uma melhor resposta inflamatória, através da modulação do processo inflamatório, reduzindo o edema, a sintomatologia dolorosa e realizando a bioestimulação celular, o efeito do laser operando em baixa intensidade vem sendo estudado desde os anos sessenta por diversos pesquisadores. O alvo da laserterapia é um tecido alterado, onde a radiação tem por função, restabelecer a homeostase energética fazendo com que as células voltem a se proliferar, se diferenciar e secretar citocinas. Além de se apresentar como uma alternativa nos processos de reação inflamatória, como descritos acima (KARU et al., 1987; AIMBIRE et al., 2006; ALBERTINI et al., 2014).

O LBI tem sua função baseada no processo fotobiológico e seu efeito fotoquímico ocorre devido a presença de moléculas sensíveis a determinados comprimentos de onda. A absorção desses fótons por moléculas intracelulares específicas permite um aumento do metabolismo celular, caracterizado pela estimulação de fotoceptores na cadeia respiratória mitocondrial, síntese de colágeno, aumento de ATP intracelular e liberação de fatores de crescimento ou até mesmo, pode levar a uma inibição de atividade enzimática e de reações fotoquímicas. Contudo, essas alterações no processo fisiológico possuem conotação terapêutica (KARU et al., 2004; KREISLER et al., 2003).

Alguns trabalhos, afirmou que o laser terapêutico não possui efeito diretamente curativo, ele atua como um agente antálgico, fazendo com que o organismo tenha uma melhor resposta frente a um processo inflamatório, favorecendo a reparação tecidual da região lesada mediante a biomodulação celular (MALUF et al., 2006; LIMA et al., 2010; KARU et al., 1999).

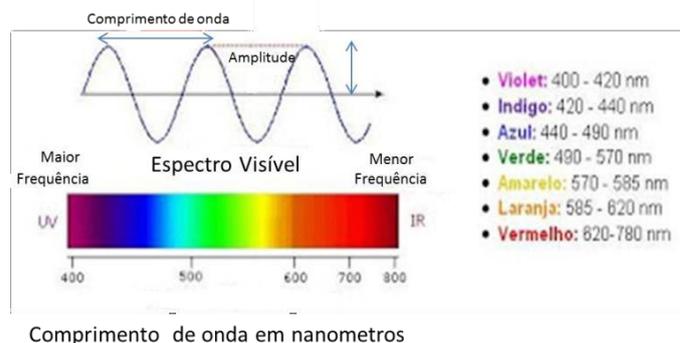


Figura 2. Espectro visível da luz, Fonte: <http://www.infoescola.com/fisica/espctroeletromagnetico>

1.3 Terapia Fotodinâmica (PDT)

A terapia fotodinâmica (PDT) antimicrobiana é uma nova alternativa para diminuir a carga de microrganismos da região subgengival em infecções tóxicas localizadas, pois não há relatos de resistência bacteriana, ausência de efeitos colaterais, preservação da microbiota oral e baixa toxicidade em humanos diferentemente do tratamento com antibióticos ou bochechos com clorexidina (GROSSI et al., 1994). A PDT consiste na associação de um fotossensibilizador (FS) à luz laser na presença de oxigênio. As moléculas de oxigênio no FS são excitadas e geram espécies reativas de oxigênio, em especial o oxigênio no estado singlete que leva à morte bacteriana seletiva. Entre os vários corantes utilizados, o azul de metileno é o mais utilizado, além de ser o único aprovado pela ANVISA. Os corantes azuis de toluidina e de metileno são ativados a 630 nm e a 660nm, respectivamente (BARATTO et al., 2009; POLY et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2015). Ambos os comprimentos de onde estão dentro do espectro visível, na faixa do vermelho. Apesar das vantagens da PDT, são necessários estudos bem delineados sobre esse assunto (GROSSI et al., 1994). A doença periodontal, (DP), mais especificamente a periodontite, é uma doença de origem infecciosa que desencadeia um processo inflamatório nos tecidos de proteção e sustentação do elemento dental (osso alveolar, cemento, ligamento periodontal e gengival). A prevalência de periodontite severa na população brasileira adulta é de 19% e de 27% na população americana com idade de 55-74 anos (FRIEDRICH et al., 2006).

A periodontite que é então caracterizada por uma doença inflamatória e de um perfil de liberação de citocinas, conhecida como Th1. Entre as citocinas com perfil Th1, podemos citar IL-1 β , IL-6 e TNF- α . A doença periodontal é frequentemente associada a outras doenças crônicas, condições sistêmicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e asma. A asma com perfil Th2, também foi descrito como envolvido na progressão da periodontite. Alguns estudos ligando periodontite e asma foram propostos (CARD et al., 2010).

Em um estudo recente houve uma associação positiva entre a periodontite e a asma, enquanto há uma associação inversa quando os pacientes têm tomado medicação antiasmática. Alergias têm sido negativamente associadas com apego clínico, tendo uma hipótese de que uma patogênia periodontal de uma cavidade oral poderia ter efeito protetor em uma doença alérgica. Outros estudos encontraram uma associação inversa entre uma perda de inserção clínica e asma. Corroborando com estudos em humanos, alguns autores avaliaram o mecanismo regulatório da asma durante uma periodontite. Houve uma redução das células inflamatórias, bem como citocinas, após uma infecção por *P. Gengivalis*, antes de uma sensibilização alérgica com ovalbumina (OVA) (CARD et al., 2010; CANDEO et al.).

Para explicar a associação inversa da periodontite e das doenças alérgicas alguns autores se basearam na teoria da higiene (CANDEO et al., 2017; FRIEDRICH et al., 2006; RIVERA et al., 2016; CARD et al., 2010). Essa teoria foi descrita pela primeira vez em 1989 por Strachan. Segundo o autor, essa teoria postula que doenças alérgicas poderiam ser prevenidas por infecções na primeira infância, transmitidas pelo contato não higiênico de irmãos mais velhos ou adquiridas na fase pré-natal pela mãe infectada pelo contato com seus filhos mais velhos. Este estudo mostrou que a infecção tardia ou reinfecção dos irmãos mais novos pode conferir proteção adicional contra a rinite. Ao longo do século passado, a diminuição do tamanho das famílias, a melhoria das comodidades domésticas e padrões mais elevados de higiene pessoal reduziram a possibilidade de infecção cruzada entre os membros das famílias. Embora não haja consenso sobre essa teoria, muitos autores acreditam que a regulação do equilíbrio Th1/Th2 é desviada para promover respostas Th1 quando há histórico de maior contato com agentes infecciosos na primeira infância, reduzindo os eventos alérgicos mediados por Th2. No

entanto, esta parece ser uma visão simplista, pois provavelmente outros fatores contribuem para o fenótipo alérgico: composição genética do hospedeiro, tempo de exposição ao agente infeccioso e microbiota do hospedeiro (CANDEO et al., 2017; CARD et al., 2010). Tendo em vista a falta de estudos que abordem esses assuntos e a necessidade de entender se a doença periapical crônica é capaz de influenciar o curso da doença pulmonar, e ainda, se o tratamento convencional ou associado a PDT é capaz de atuar nos parâmetros inflamatórios da asma, pretende-se avaliar a inflamação pulmonar associado à indução da periodontite apical crônica e após seu tratamento convencional e ou com a PDT.

1.4 Asma

Hoje a asma é uma das principais causas de morte da população mundial, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Hoje existem cerca de 300 milhões de pessoas com asma. Podendo ter implicações socioeconômicas consideráveis se levarmos em consideração os custos com internações, medicamentos, diminuição na qualidade de vida e morte prematura. A asma pode ser definida como uma inflamação crônica das vias aéreas, ocorrer rigidez torácica, tosse e sibilância com episódios recorrentes de dispneia. Na crise asmática o sistema respiratório encontra-se em um estado hiperresponsivo e hiperreativo e a principal consequência é a obstrução mecânica reversível das vias aéreas. O desencadeamento está relacionado a alguns tipos de fatores, como predisponentes, causais e de contribuição. Os fatores predisponentes se referem aos indivíduos sintetizarem quantidades exacerbadas de imunoglobulinas do tipo E (IgE). Os fatores causais se associam à exposição à alérgenos ambientais, como ácaros, pólenes e fungos e os fatores de contribuição são representados pela poluição atmosférica, fumaça do cigarro, infecção viral e alterações hormonais femininas (DELFINO, 2002).

A asma pode ser dividida em 3 fases. A fase inicial, também chamada sensibilização, fase imediata e fase tardia. Na fase de sensibilização o alérgeno é apresentado pelas células dendríticas aos linfócitos T CD4+ auxiliares (células T *naïve*) que produzem IL-2, com efeito, autócrino. Então se

diferenciam em linfócitos Th0 (em inglês - *helper*) e de acordo com as citocinas do meio podem se subdividir em duas categorias fenotípicas, o tipo 1 T *helper* (Th1) que está relacionado a uma resposta celular e o tipo 2 T *helper* (Th2) que está relacionada a resposta humoral (LIGEIRO DE OLIVEIRA, 2004).

A presença de IL-4 no meio circundante, estimula as células T helper a desenvolver um padrão Th2 com expressão de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (HYYPÄ et al., 1981; HUJOEL et al., 2008). A IL-4 e IL-13 estimulam a maturação dos linfócitos B. A IL-5 estimula a diferenciação dos eosinófilos e a IL-9, estimula o desenvolvimento dos mastócitos. Quando a IgE se liga aos receptores dos mastócitos e eosinófilos, através da ligação cruzada com o antígeno há degranulação de histamina, leucotrienos (C₄, D₄ e E₄), IL-4, IL-5, IL-13, TNF α , prostaglandinas D₂ e proteases, que causam bronco constrição, obstrução do fluxo aéreo, aumento na produção de muco, aumento da permeabilidade e edema. Todo esse processo ocorre por causa da sensibilização ao antígeno. Em um segundo contato as células de memória (Th2) se tornam ativadas gerando uma resposta mais rápida e efetiva, denominada fase imediata da asma. Nesta fase, os mastócitos estão presentes na musculatura lisa das vias aéreas são rapidamente ativados, levando à hiperresponsividade. Na evolução da doença, segue-se a reação de fase tardia, caracterizada por uma reação inflamatória progressiva caracterizada por infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos, no qual o linfócito Th2 exerce um papel fundamental. Os eosinófilos ativados vão liberar proteína catiônica de eosinófilo. Essas proteínas causam dano e perda do epitélio brônquico, causando hiperreatividade brônquica pois as fibras C ficam mais expostas aos estímulos irritantes (BARNES et al., 2008). (figura3)

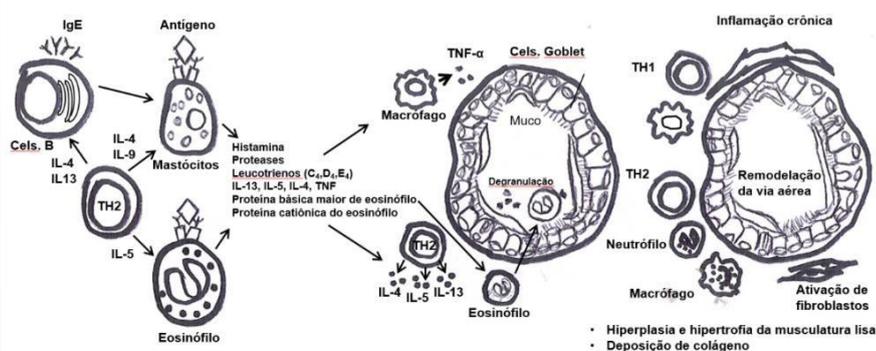


Figura3:Fisiopatologia da asma. Adaptado segundo Nature Reviews Immunology, 2002.

Nesta fase observa-se inflamação das vias aéreas, hiperresponsividade e hiperreatividade brônquica, obstrução do fluxo de ar e aumento da produção de muco. Outra característica do epitélio pulmonar do paciente asmático é a maior quantidade de células de Goblet, responsáveis pela produção de muco. Nessa fase ocorre a liberação de vários fatores de crescimento e citocinas e remodelamento das vias aéreas de modo irreversível com deposição de colágeno na matriz extracelular, neovascularização, hipertrofia epitelial, diferenciação dos miofibroblastos, comprometendo a elasticidade do pulmão (BARNES et al., 2008).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar o efeito da Terapia Fotodinâmica (PDT) na Periodontite Apical Crônica em modelo de asma experimental induzida por Ovalbumina (OVA)

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o padrão da lesão do periodonto através da reabsorção de crista alveolar e validação do modelo de periodontite apical,
- Avaliar a contagem total e diferencial, de células inflamatórias no lavado broncoalveolar;
- Analisar a reabsorção óssea da mandíbula pela dosagem de Fosfatase alcalina no soro.

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 (1993) e do Congresso Nacional Brasileiro, (1995) sendo submetido ao Comitê de Ética em animais da Universidade Nove de Julho (UNINOVE). **CEUA: AN0010.2017**

3.1 Animais

Os camundongos (Balb/C) foram obtidos e criados no biotério de criação da Universidade Nove de Julho, em caixas plásticas apropriadas sob temperatura constante de 22 -25 graus °C, com a luminosidade controlada com ciclo de 12h (claro/escuro), ventilação controlada artificialmente e a umidade relativa de 50-60%. Foram utilizada ração para camundongos (NUTRILAB CR-1®) e água *ad libitum*. Foram utilizados 64 camundongos machos, saudáveis adultos com peso médio de ~25 à 30 gramas.

3.2 Delineamentos Experimentais

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em oito grupos experimentais.

Tabela 1: Descrição dos procedimentos realizados em cada grupo do estudo:

Grupo (n=9)	Descrição
Basal	Sem indução de doença
Endo	Indução da doença periodontite Apical
Endo+TTO	Indução da doença periodontite Apical+ Tratamento Endodôntico
Endo+TTO+PDT	Indução da Periodontite Apical + Tratamento Endodôntico + terapia fotodinâmica
Asma	Indução da asma
Asma + Endo	Indução da asma + Indução de Periodontite Apical
Asma+ DP+TTO	Indução da asma + Indução de Periodontite Apical+ Tratamento Endodôntico
Asma+ Endo+TTO+PDT	Indução da asma + Indução de Periodontite Apical + Tratamento Endodôntico + terapia fotodinâmica

3.3 Fluxograma de indução da periodontite apical e asma

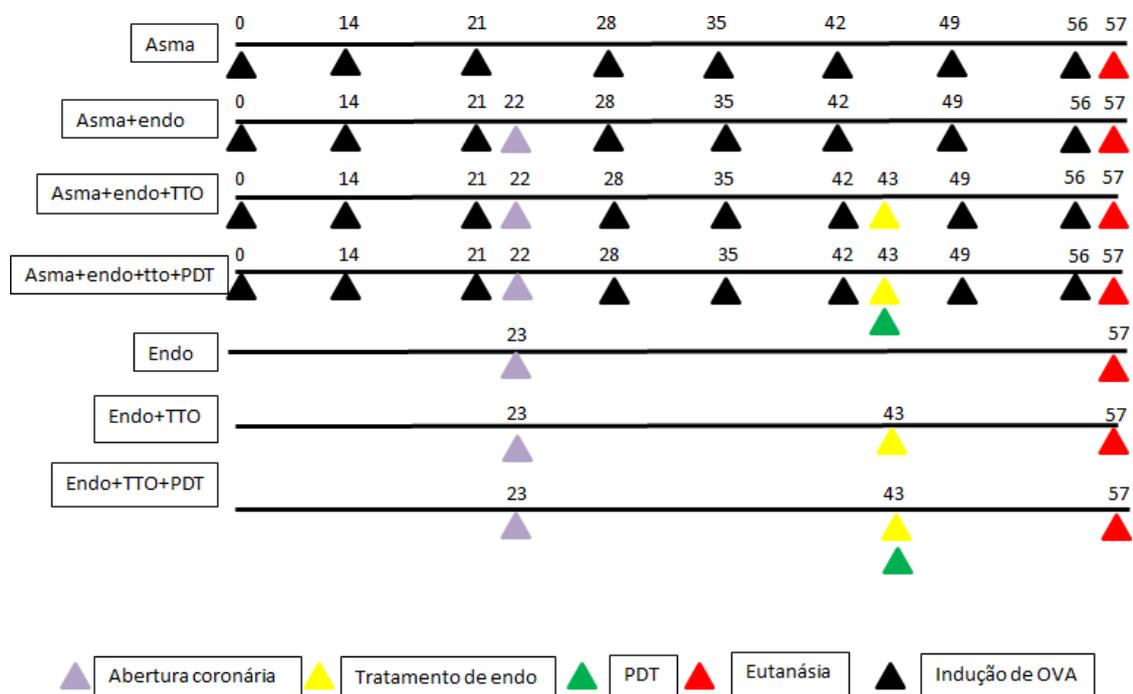


Figura 4 : Fluxograma de indução da periodontite apical e asma

3.4 Modelo da indução de asma com Ovalbumina (OVA)

A sensibilização dos animais foi feita com injeção subcutânea de 4 μ g de OVA (Sigma) juntamente com solução de hidróxido de alumínio nos dias 0 e 14^o. O desafio nos camundongos foi feita posteriormente a anestesia. Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). O Preparo anestésico: Ketamina 750 μ l, Xilazina 500 μ l, diluídas em 3.750 μ l de PBS. – Administração: 0,04ml, Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna).

Para a indução da Asma o camundongo foi suspenso pelos incisivos centrais em um fio de algodão fixado a duas hastas metálicas. Então a língua foi deslocada para a esquerda com uma pinça e com auxílio de uma pipeta, foi introduzido por via orotraqueal 20 μ l de OVA (diluição de 1600 μ l de PBS com 800 de OVA). O nariz tampado para que aspirasse todo o líquido e aguardando

o camundongo retomar a respiração usual (sem ruídos) e acomodado em sua caixa novamente. A indução ocorreu três vezes na semana por oito semanas.

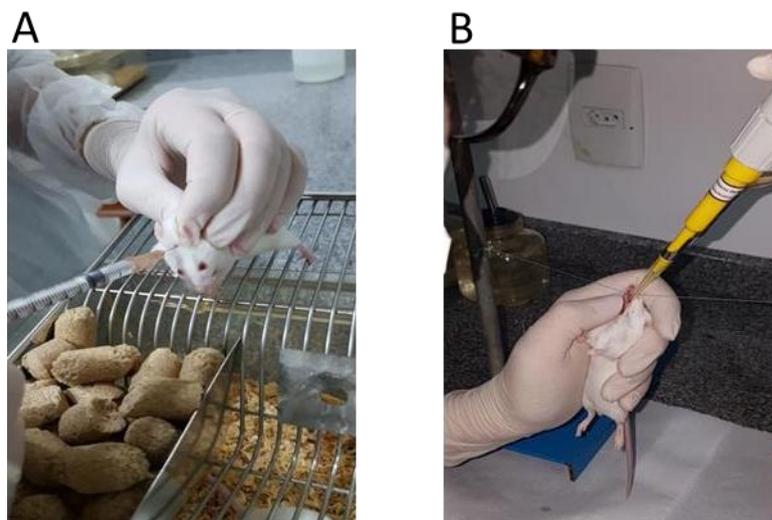


Figura 5: (A) Sensibilização da asma com OVA, (B) Desafio com da asma com OVA

3.5 Indução do modelo de Periodontite Apical Crônica

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Ketamina 750 μ l, Xilazina 500 μ l, diluídas em 3.750 μ l de PBS. – Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) foi aplicada 0,05ml da solução anestésica com Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7x0.33 – 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna). Para a abertura bucal do camundongo foi utilizado materiais desenvolvidos para a pesquisa. Dois suportes metálicos contendo uma linha de algodão nº 5 envolvendo os incisivos centrais superiores e a mandíbula foi apoiada com fio dental e uma régua endodôntica (‘‘peso’’) presa nos incisivos inferiores para a abertura bucal. Afastando a língua para o lado direito. A abertura do primeiro molar inferior direito foi feita com broca $\frac{1}{4}$ de carbono LN com motor K Drillerendo Pro com velocidade 6000 rpm e torque 3,5. Irrigação e aspiração inicial com soro e a verificação da abertura de canais com limas #8, #10. Após a realização da abertura coronária, foi aguardado por 21 dias com os dentes sem nenhum curativo de demora ou restauração da coroa, para que a infecção endodôntica possa se estabelecer.

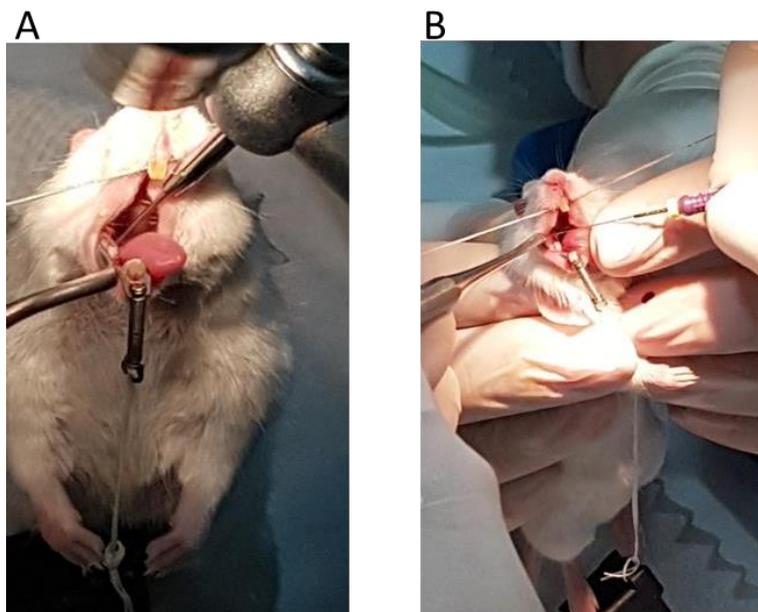


Figura 6: (A) Indução da Endo com abertura coronária, (B) Acesso ao canal com lima

3.6 Tratamento Endodôntico e terapia fotodinâmica

Os animais foram anestesiados com a solução anestésica de Ketamina 750 µl, Xilazina 500 µl, diluídas em 3.750µl de PBS. – Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Foi aplicada 0,05ml a solução anestésica com a Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7 x 0.33 – 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna). Após 21 dias de indução da doença periapical crônica, foi feito o tratamento dos grupos com doença periapical crônica, asma e tratamento com PDT. Os animais já anestesiados inicialmente, e assim feitos à irrigação e aspiração com soro fisiológico, instrumentação com limas da primeira serie, #8, #10, #5, #20, secagem do canal com papel absorvente, aplicação de ultracal (ultradent) com lima #15. Fechamento do canal com Ortobite. Os grupos com PDT após a instrumentação,foi feita a secagem do canal com cones de papel absorvente, aplicação de azul de metileno com concentração 0,005 (Chimiolux 10, DMC®, São Paulo, Brasil) esperado 3 minutos e feita a aplicação de laser. As irradiações foram realizadas com o laser de diodo, no comprimento de onda vermelho ($\lambda = 660$ nm) 9J por 10 segundos. Lavagem do azul de metileno com soro fisiológico,

secagem do canal com papel absorvente, aplicação de ultracal (ultradent) com lima #15. Fechamento do canal com Orbite.

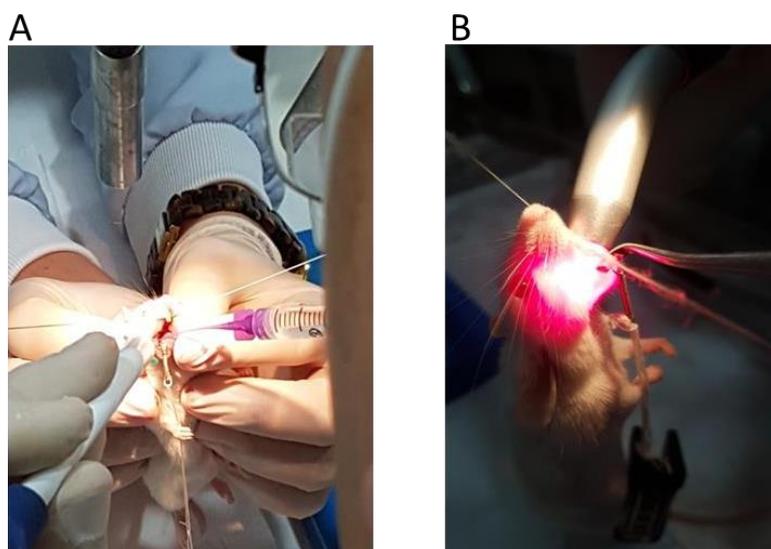


Figura 7: (A) Medicação Intra canal com hipoclorito de sódio, (B) Aplicação de laser.

Tabela 2: Parâmetros dosimétricos utilizados para a realização da terapia fotodinâmica

PARÂMÊTROS	Vermelho
Comprimento de onda [nm]	660
Modo de funcionamento	Contínuo
Potência [mW]	100
Irradiância no alvo [W/cm ²]	3
Área do feixe [cm ²]	0,03
Tempo de exposição [s]	90
Energia radiante [J]	9
Número de pontos irradiados	1
Técnica de aplicação	Contato
Número de sessões e frequência	sessão única
Energia total irradiada [J]	9

3.7 Eutanásia dos animais

Todos os animais foram eutanasiados no 57^o dia, 35 dias após a indução da periodontite apical. Utilizando overdose de anestésico – Ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg). Ketamina e Xilazina aplicada 0,05ml da solução anestésica com a Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7 x 0.33 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna)

3.8 Coleta do LBA para avaliação da inflamação pulmonar

Na eutanásia, os animais foram anestesiados com ketamina (100mg/kg) e Xilazina (10mg/kg) Ketamina e Xilazina aplicada 0,05ml da solução anestésica com a Ultrafine Seringa de Insulina® 1,0ml, agulha 12.7 x 0.33 29G, via intramuscular, terço médio da coxa (na porção interna) e na eutanásia faremos a traqueotomia. Os animais foram canulados e os pulmões lavados com 1,5 mililitros (ml) de Tampão fosfato-salino (PBS) (3 x de 0,5ml). O volume do lavado recuperado foi centrifugado a 1000 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 5 minutos. O botão celular ressuspendido em 1 ml de PBS e a determinação do número de células totais no LBA foi realizada por meio de contagem na Câmara de Neubauer.(LIGEIRO et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2010; VIEIRA et al., 2011) Alíquotas do material suspenso foram utilizadas para preparação de lâminas de cytopspin as quais foram coradas com May-Grunwald-Giemsa para a contagem diferencial das células. (LIGEIRO et al., 2004; DE OLIVEIRA et al., 2010)

3.9 Microtomografia (Micro-CT)

A hemi arcada do camundongo foi fixada no formol. Foi adaptada a um porta – amostra de um elevado aparelho de micro-CT de energia (SkyScan 1173). Cada digitalização foi realizado a 70 kV e 114 mA com um resolução isotrópica de 14,16 μm . Um alumínio de 1 mm de espessura filtro foi usado para reduzir artefatos e cada projeção foi adquirida em 250 ms, a cada 0,5 ° passo através de rotação de 360 °. Média de frames de 5 e movimentos aleatórios de 20 foram também aplicado na fase de aquisição para aumentar a relação sinal-ruído e reduzir os artefatos do anel. As imagens de projeção adquiridas foram reconstruídas em fatias de seção transversal usando software proprietário (NReconv.1.6.9; Bruker micro-CT) com parâmetros padronizados para endurecimento do feixe (40%), correção do artefato do anel de 10, como bem como limites mínimos e máximos de contraste. O volume de interesse foi escolhido estendendo-se da mesial do primeiro molar inferior á distal do mesmo. (CARDOSO et al., 2013)

3.10 Quantificações de Fosfatase Alcalina no soro

Antes da eutanásia dos animais, foi coletado sangue sem o uso de anticoagulante através da punção cardíaca nos ratos. Após 10 minutos da coleta, contendo a amostra de sangue foi então centrifugado a 5.000rpm por 03 minutos para a separação do sobrenadante do soro, foi inserido em um eppendorf e armazenando à temperatura de -80°C até sua utilização. Foi utilizado o método de ELISA (kit Biolegend™) (San Diego –Califórnia, EUA) conforme instrução do fabricante.

3.11 Análise estatística

Os dados foram analisados através do software GraphPadPrism 5 (EUA). Os dados com distribuição paramétrica foram submetidos ao teste Two-way ANOVA seguido pelo teste Newman-Keuls. Os níveis de significância foram ajustados para 5% ($p < 0.05$). Os gráficos foram elaborados utilizando-se o software GraphPadPrism 5 (EUA).

4 Resultados

4.1 Validação da metodologia da Endodontia Experimental

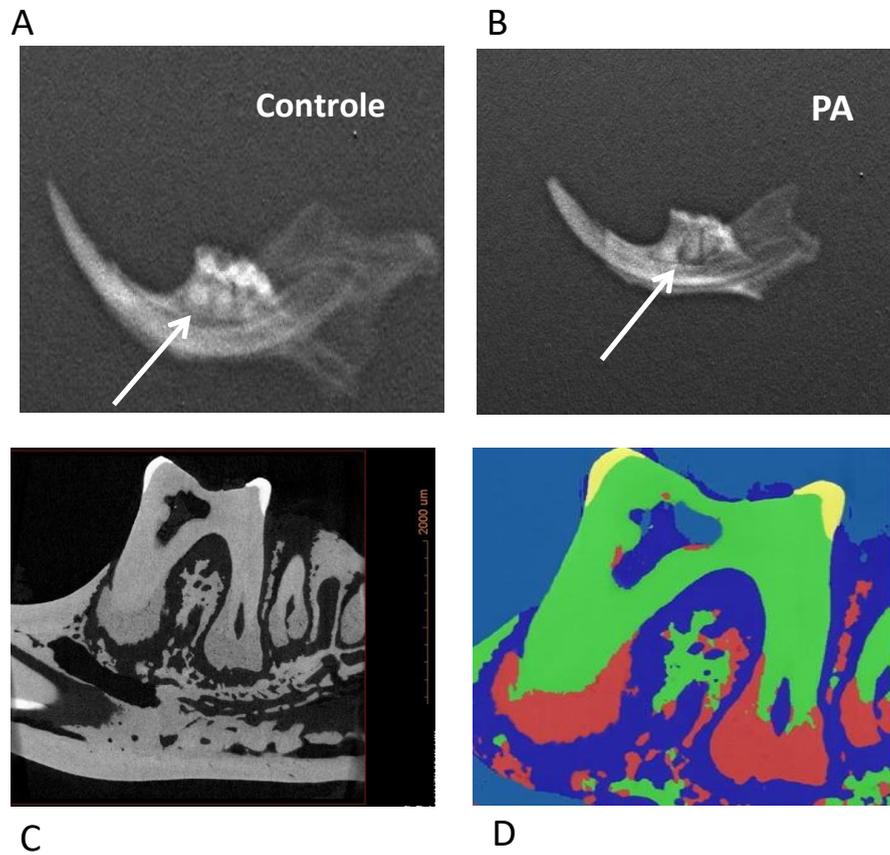


Figura 8: (A) Imagem radiográfica de hemi arcada mandibular de camundongo do grupo Basal. (B) imagem radiográfica de hemi arcada mandibular de camundongo do grupo Endo com lesão periapical. (C e D(contraste)) imagem de microtomografia (micro-CT) de hemi arcada mandibular do camundongo do grupo Endo com lesão periapical.

4.2 Quantificação das células do lavado Broncoalveolar

De maneira a avaliar a contagem total e diferencial de células inflamatórias no lavado broncoalveolar, quantificamos o número de células nas lâminas de cytospin.

Na figura 9, podemos observar que o grupo Endo e o grupo Asma aumentaram o número de células totais em comparação com o grupo Basal. Com relação ao grupo Asma verificamos aumento do número de células totais no grupo Asma + Endo, por outro lado houve redução dessas células nos grupos tratados (Asma + Endo +TTO e Asma + Endo + PDT + TTO). Ainda, observamos diminuição do número de células totais, quando comparamos o grupo Asma + Endo com os grupos Asma +Endo + TTO e Asma + Endo +PDT +TTO.

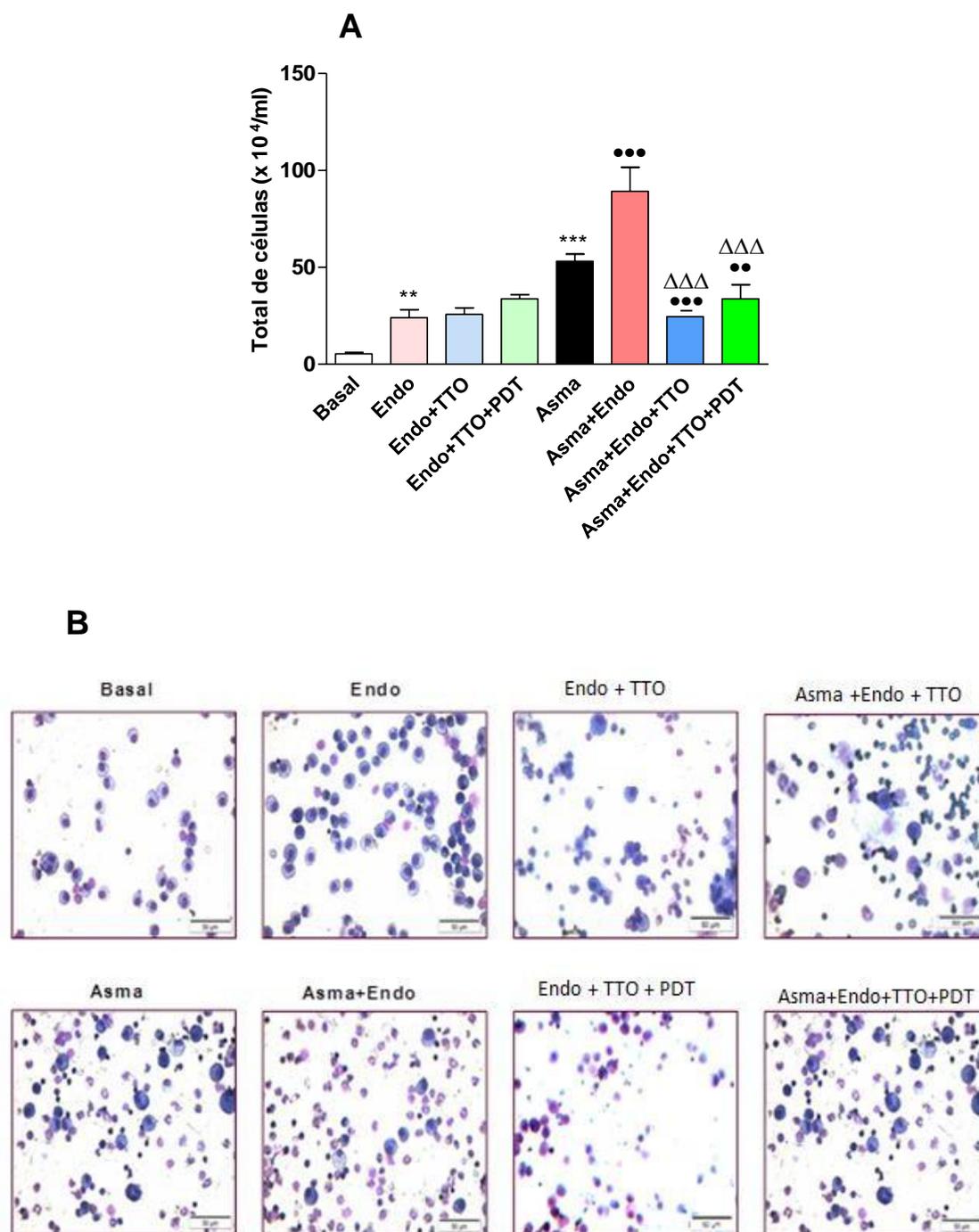


Figura 9: Análise do número de células totais (A) e fotomicrografia representativa (B) dessas células do lavado broncoalveolar. As células foram quantificadas na câmara de Neubauer e as fotos foram realizadas a partir de citocentrifugados do LBA, com aumento de 40x. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal. • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$ em relação ao grupo asma; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ em relação aos animais Asma+Endo. **Figura B:** Foto micrografia representativa das células recuperados do lavado bronco alveolar.

4.3 Contagem de Macrófagos no lavado Broncoalveolar

Podemos observar na figura 10, que houve um aumento no numero de macrófago nos grupos Endo e Asma em relação ao grupo basal. Com relação ao grupo asma verificamos aumento do numero de macrófagos no grupo asma + Endo, por outro lado houve redução dessas células nos grupos tratados (Asma + Endo +TTO e Asma + Endo + PDT + TTO). Ainda, observamos diminuição do número de macrófagos, quando comparamos o grupo asma + Endo com os grupos Asma + Endo + TTO e Asma + Endo +PDT +TTO.

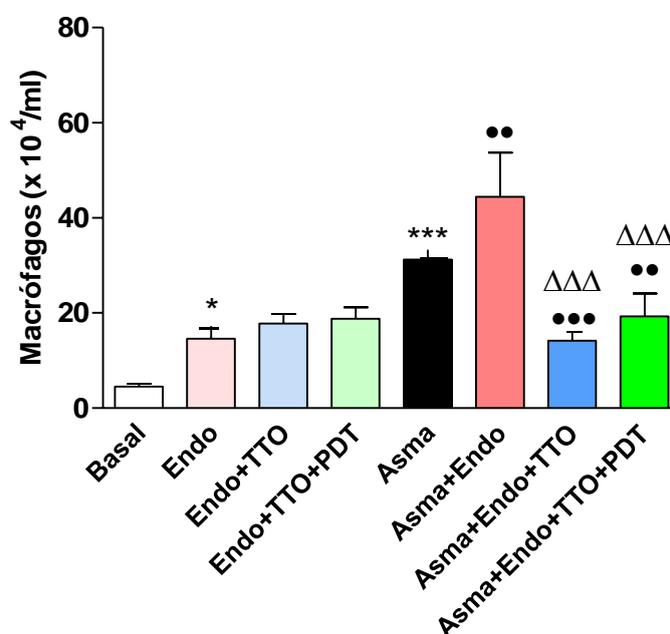


Figura 10: Análise do número de macrófagos no LBA. As células foram quantificadas e citocentrifugadas do LBA e coradas com HE. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal. • $p < 0,05$; •• $p < 0,01$; ••• $p < 0,001$ em relação ao grupo asma; $\Delta p < 0,05$; $\Delta\Delta p < 0,01$; $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ em relação aos animais Asma+Endo.

4.4 Contagem de Linfócitos no lavado Broncoalveolar

Na figura 11 podemos observar que houve um aumento no número de linfócitos nos grupos Endo e Asma em relação ao grupo basal. Da mesma forma verificamos aumento do número de linfócitos no grupo Asma + Endo, quando comparado ao grupo Asma, por outro lado houve redução dessas células nos grupos tratados (Asma + Endo +TTO e Asma + Endo + PDT + TTO). Ainda, observamos diminuição do numero de linfócitos, quando comparamos o grupo Asma + Endo com os grupos tratados (Asma + Endo + TTO e Asma + Endo +PDT +TTO).

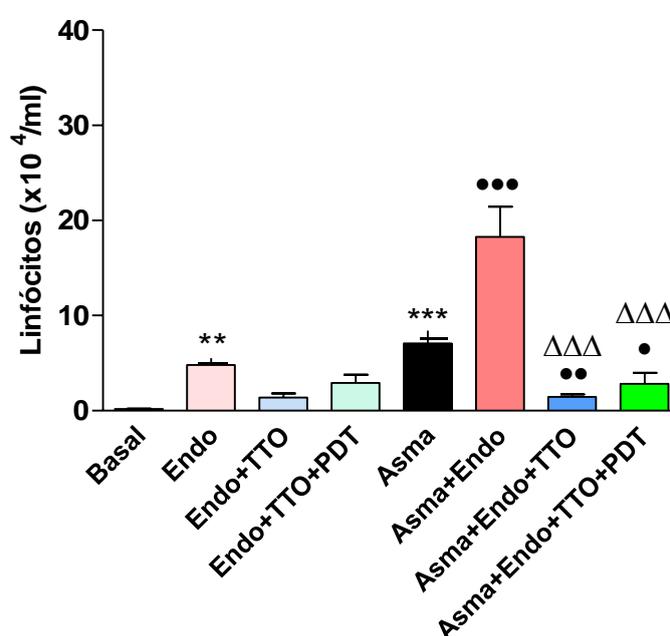


Figura 11: Análise do número de Linfócitos no LBA. As células foram quantificadas e citocentrifugados do LBA e coradas com HE. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal. • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$, ••• $p < 0,001$ em relação ao grupo asma; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ em relação aos animais Asma+Endo.

4.5 Contagem de Neutrófilos no lavado Broncoalveolar

Na figura 12 podemos observar que houve um aumento no número de neutrófilo no grupo Asma em relação ao grupo basal. Por outro lado verificamos a diminuição dessas células no grupo Asma + Endo, Asma + Endo + TTO, Asma + Endo + TTO + PDT quando comparado ao grupo Asma, da mesma forma houve redução dos neutrófilos nos grupos tratados (Asma + Endo +TTO e Asma + Endo + PDT + TTO) quando comparado ao grupo Asma + Endo.

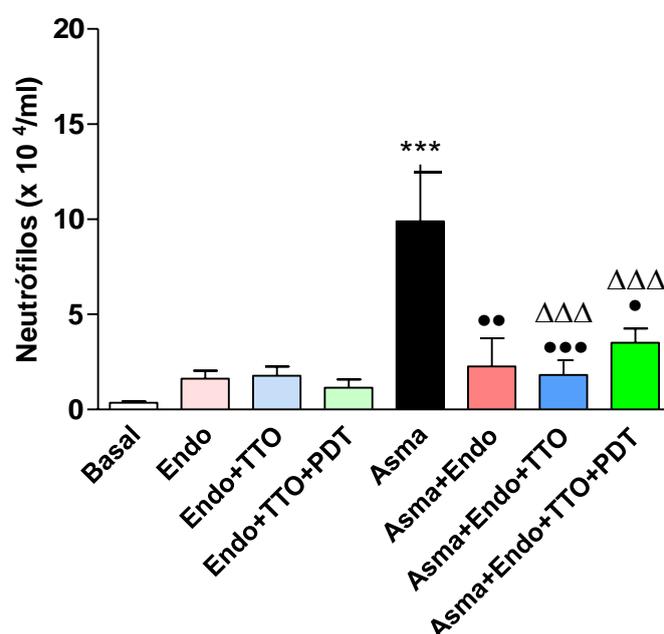


Figura 12: Análise do número de Neutrófilos no LBA. As células foram quantificadas e citocentrifugadas do LBA e coradas com HE. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo basal. • $p < 0,05$, •• $p < 0,01$, ••• $p < 0,001$ em relação ao grupo asma; $\Delta p < 0,05$, $\Delta\Delta p < 0,01$, $\Delta\Delta\Delta p < 0,001$ em relação aos animais Asma+Endo.

4.6 Contagem de Eosinófilos no lavado Broncoalveolar

Podemos observar na figura 13, que houve um aumento no número de eosinófilo nos grupos Endo e Asma em relação ao grupo basal. Com relação ao grupo Asma verificamos aumento do número de eosinófilos no grupo Asma + Endo, por outro lado houve redução dessas células nos grupos tratados (Asma + Endo +TTO e Asma + Endo + PDT + TTO). Ainda, observamos diminuição do numero de eosinófilos, quando comparamos o grupo Asma + Endo com os grupos Asma + Endo + TTO e Asma +Endo +PDT +TTO.

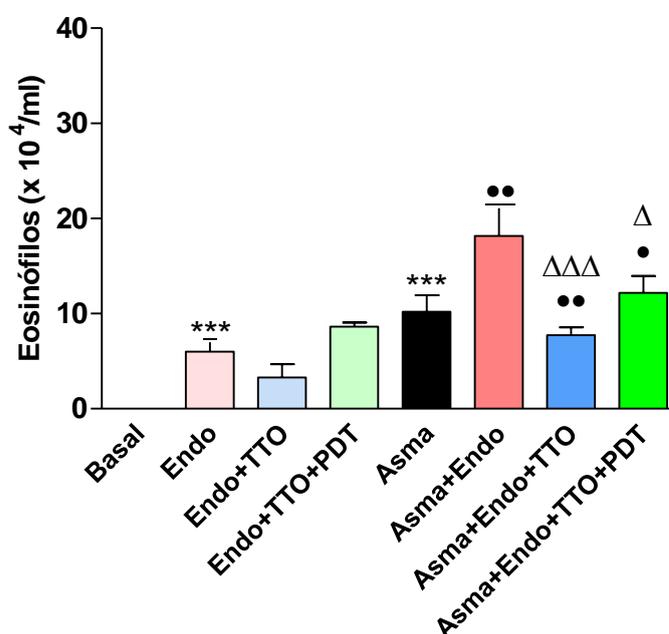


Figura 13: Análise do número de Eosinófilos no LBA. As células foram quantificadas e citocentrifugados do LBA e coradas com HE. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo basal. •p<005, ••p<0,01, ••• p<0,001 em relação ao grupo asma; Δ p<005, $\Delta\Delta$ p<0,01, $\Delta\Delta\Delta$ p<0,001 em relação aos animais Asma+Endo.

4.7 Quantificação da fosfatase alcalina no soro

Podemos verificar aumento da produção de fosfatase alcalina (U/L) (Figura 14) do grupo Endo comparado ao grupo Basal ($p < 0.01$). Por outro lado, o grupo Endo + TTO assim como o Endo + TTO + PDT, foi capaz de diminuir a produção de fosfatase alcalina ($p < 0,05$) em relação ao grupo Endo, se aproximando aos valores basais.

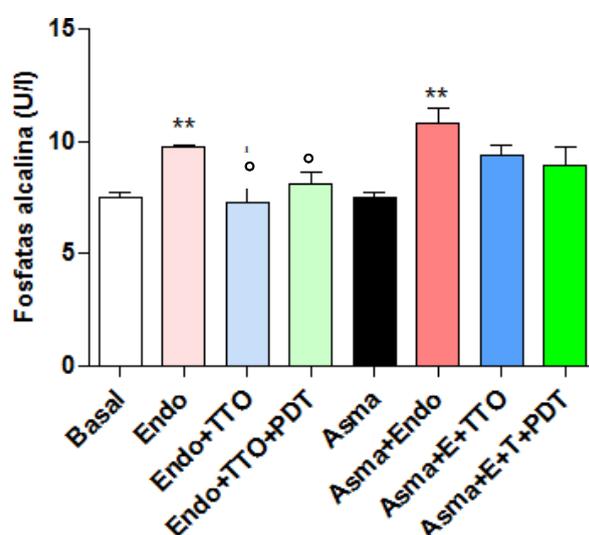


Figura 14: Quantificação sérica de fosfatase alcalina. Os resultados representam media \pm EPM de dois experimentos (N=3-8); ** $p < 0,01$ em relação ao grupo basal. ° $p < 0,05$ em relação ao grupo Endo.

5 Discussão

Considerando que doenças bucais podem modular o desenvolvimento, bem como a exacerbação de doenças pulmonares, neste sentido, a compreensão dos mecanismos acerca da relação entre a periodontite apical e a asma, ocupa lugar de destaque. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a efetividade da utilização da terapia fotodinâmica na redução do infiltrado celular inflamatório avaliado em modelo experimental da doença pulmonar alérgica induzida por ovalbumina (OVA).

Tanto a doença endodôntica, quanto a asma, foram capazes de aumentar a quantidade total de células recuperadas no lavado broncoalveolar (LBA). A indução da asma provocou um aumento de linfócitos com perfil Th2, eosinófilos e neutrófilos validando assim, o modelo experimental de inflamação alérgico pulmonar estabelecido para este estudo. Já para a doença periapical, o modelo foi validado pelo aparecimento da lesão periapical na região do periápice, comprovado pela radiografia e pela técnica de micro-CT. Quando associamos as duas doenças, observamos um aumento ainda maior no número total de células, tais como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos no LBA. Por outro lado, quando realizamos o tratamento endodôntico padrão, associado ou não à PDT, verificou-se redução no número de todas essas células recuperadas do LBA.

Embora o acúmulo e a morte dos neutrófilos, é uma das principais causas de degradação tecidual na fase aguda da periodontite apical, não observamos no pulmão esse aumento. Contrariamente, na periodontite apical, verificamos que essas células estão aumentadas, tanto na cavidade oral como no pulmão. Vale lembrar que a doença possui células e mediadores característicos da fase aguda, porém a doença periodontite apical, é caracterizada pela cronicidade e reabsorção óssea na região apical.

Com relação aos macrófagos, essas células contribuem com componentes séricos e metabólitos, como prostaglandinas e leucotrienos, que são mediadores importantes na inflamação. Células dendríticas ou apresentadoras de antígeno, também são relatadas na periodontite apical induzida em ratos (OKIJI et al., 1994). Não se sabe ao certo se elas aparecem

nas lesões periapicais pela circulação (JONTELL et al., 1998) ou se disseminam localmente a partir de polpa dentária inflamada, ou ainda ambos.

Durante a inflamação periapical, acredita-se que os restos de células epiteliais (MALASSEZ, 1884) sejam estimulados por citocinas e fatores de crescimento a sofrerem divisão e proliferação. Estas células participam na patogênese dos cistos radiculares, servindo como fonte de epitélio. No entanto, células epiteliais ciliadas também são encontradas em lesões periapicais (SHEAR, 1992; NAIR et al., 2002), particularmente em lesões que afetam os molares superiores.

Embora o papel das respostas Th1 e Th2 nas doenças inflamatórias periapicais não tenha sido totalmente determinado, a resposta Th1 parece ser predominante nas lesões iniciais (KAWASHIMA e STASHENKO, 1999), enquanto a resposta Th2 é dominante nas lesões periapicais crônicas (KABASHIMA e NAGATA, 2001). Apesar dos dados referentes à função das células e seus mediadores nas respostas imune (ZLOTNIK e YOSHIE, 2000), reabsorção óssea (WISE et al., 1999) e reparo tecidual (DIPIETRO et al., 2001), destacam a importância destes efeitos na manutenção desses processos na região periapical permanente.

Na doença periapical, a inflamação aguda pode se transformar em crônica devido à atenuação da estimulação inflamatória no local. Na periodontite apical, a destruição tecidual é causada tanto pela infecção bacteriana quanto pela resposta imune. Uma vez que o agente causador é removido, a restauração da resposta imune é ativada, a reparação e a cicatrização do tecido podem ocorrer. Entre várias respostas imunológicas, citocinas como a IL-1 β e o TNF- α demonstraram estar envolvidas na periodontite apical aguda e na destruição óssea. A lesão endodôntica ocorre devido à infecção bacteriana cediada no interior do canal que pode atingir a região além do ápice, e dessa forma causar inflamação aguda do tecido periodontal apical. A infiltração de neutrófilos e macrófagos é observada nessas lesões durante a fase aguda. Ainda, em tratamentos de canal radiculares bem-sucedidos, com remoção de estímulo, a inflamação desaparece e o processo de cicatrização inicia (MATSUSHITA et al., 1999).

Uma vez que é difícil analisar diretamente as lesões para estudar a periodontite apical em humanos, os modelos animais são frequentemente usados. O trabalho de Rossi et al. (2000) mostra que a reação inflamatória aguda foi observada nas lesões, composta principalmente de neutrófilos. A resposta atingiu o pico no dia 14, após o que foi observada na resposta inflamatória crônica das lesões, composta principalmente por linfócitos. A reabsorção óssea aumentou no dia 14, provavelmente relacionada à fase aguda da inflamação. Depois que a intensa resposta inflamatória aguda diminuiu, a formação óssea de tecido ósseo fibroso aumentou, quando a maioria dos mediadores inflamatórios e tecidos necróticos foram removidos.

De acordo com alguns estudos, os padrões de resposta Th1 e Th2 ocorrem concomitantemente. Acredita-se que a resposta imune Th1 esteja envolvida tanto na progressão da lesão quanto na destruição óssea, enquanto a Th2 envolve mecanismos imunossupressores importantes no processo de reparo, ocorrendo nos estágios mais avançados do desenvolvimento da lesão. 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. Este conceito, no entanto, precisa ser revisto, pois descobertas recentes indicam um padrão caracterizado pela presença de IL-17, uma citocina diferente das tradicionais Th1 e Th2 (MARTINHO et al., 2012).

Destaca-se novamente que a literatura é bastante escassa acerca da modulação da endodontia na inflamação alérgica pulmonar. O tratamento da periodontite pode reduzir a placa dentária e disseminação de mediadores inflamatórios. A boca é um importante reservatório para patógenos do trato respiratório. Assim, aspirando uma grande quantidade de contaminantes virulentos no pulmão, pode causar pneumonia ou exacerbação aguda da DPOC. Um estudo anterior encontrou no escarro de pacientes com uma exacerbação da DPOC, bem como níveis elevados de anticorpos contra *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*.²⁷ Além disso, o tratamento periodontal pode efetivamente reduzir a colonização bacteriana da placa e mucosa oral. Portanto, o tratamento pode ajudar a prevenir inflamações e exacerbações das vias aéreas (KANAZAWA, 2007).

Os poucos trabalhos existentes na literatura, correlacionam a doença periodontal com a DPOC, Ramos et al., 2011, sugere 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. Entretanto, além da influência do microbioma periodontal, a fumaça de cigarro também é um fator relevante subjacente ao desenvolvimento da lesão periodontal. Porém não têm trabalhos correlacionando a periodontite apical com asma

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. Há ainda, evidências de uma associação entre doença periodontal e pneumonia ou doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). A cavidade oral é um reservatório para infecção pulmonar, podendo as bactérias orais presentes na placa, serem disseminadas pela saliva e então aspiradas para o trato respiratório inferior e pulmões, causando infecção (RAMOS et al., 2011).

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).

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 (BONECCHI et al., 1998; SALLUSTO et al. al., 1998a, b, 2000). Nesse sentido, também há evidências que o padrão Th2 prevalece em lesões crônicas. Além disso, os resultados obtidos a partir de modelos experimentais sugerem uma hierarquia de citocinas Th2 na modulação da periodontite apical, dado que, na ausência de citocinas com perfil Th1, como IFN- γ e IL-12, a formação de lesões periapicais não foi modificada (LAPPIN et al., 2001).

Estudos epidemiológicos relataram que 30% a 50% dos tratamentos de canal, falham devido a infecções residuais, sugerindo assim que estratégias de desinfecção ainda são necessárias (LACERDA et al., 2016). Estudos *in vitro*,

ex vivo e *in vivo* utilizando a PDT demonstraram que esta abordagem tem potencial para elevar a desinfecção do canal radicular (LACERDA et al., 2014). No entanto, não há até agora nenhum estudo avaliando a resposta dos tecidos apicais e periapicais ao uso de PDT no tratamento endodôntico de dentes com lesão endodôntica (ou seja, com a presença de infecção tecidual no início do tratamento).

No presente estudo, a eficácia da PDT foi confirmada pela ausência de células inflamatórias nos grupos submetidos a essa terapia. Reenstra *et al* (34) especularam 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. Por outro lado, quando os canais radiculares foram tratados convencionalmente, sem a PDT, os canais e região periapical exibiu infiltrado de células inflamatórias, dissociação fibrilar e edema generalizado.

Ainda, podemos supor que, a reparação óssea dos grupos tratados com a PDT poderia ter sido observada, com a necessidade de um período maior para uma reavaliação, considerando que no início do tratamento os dentes tinham lesão periapical, observado pelo ensaio de micro-CT.

Embora nesse estudo, o fechamento apical esperado pela deposição de tecido mineralizado não foi alcançado, a ausência de fibrogênese na região periapical nos grupos tratados com a PDT indicam que isso pode ser uma terapia suplementar promissora para a preparação biomecânica do canal radicular em dentes com periodontite apical, submetidos a uma sessão tratamento endodôntico.

Desse modo, 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 asma.

6 Conclusão

Nossos dados mostraram que a Periodontite Apical pode aumentar a inflamação alérgica pulmonar com perfil de linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e macrófagos. Além disso, a associação da asma e da Periodontite Apical exacerbou a inflamação pulmonar. Porém, o tratamento da Periodontite Apical convencional ou associado à PDT causou diminuição na resposta inflamatória, sem redução da reabsorção óssea, em camundongos induzidos com OVA. Assim, este trabalho contribuiu para elucidar em parte, a relação entre Periodontite Apical e asma, porém estudos adicionais ainda são necessários para a melhor compreensão dos efeitos da PDT no tratamento de periodontite apical em pacientes com asma.

7 Referência bibliográfica

AIMBIRE F, BJORDAL JM, IVERSEN VV, ALBERTINI R, FRIGO L *et al.* Low level laser therapy partially restores trachea muscle relaxation response in rats with tumor necrosis factor alpha-mediated smooth airway muscle dysfunction. **Lasers Surgery Medicine.** 2006;38(8): 773-778.

ALBERTINI R, AIMBIRE FS, CORREA FI, RIBEIRO W, COGO JC, ANTUNES E *et al.* Effects of different protocol doses of low power gallium-aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema. **J Photochem Photobiol B.** 2014;74(2-3):101-107.

AQUINO DR, FRANCO GSN, CORTELLI JR, QUEIROZ APG, SANTOS JG, CORTELLI, RIVERA, *et al.* Relationship between periodontal disease and asthma among overweight/obese adults. **J clin periodontol** 2016: 43:566-571.

ARISTSUNI MATSUI; DANIELLE STEPHENS; ALPDOGAN KANTARCI, SUSAN R. RITTLING. Early Cytokine Response to Infection with Pathogenic vs Non – Pathogenic Organisms in a Mouse Model of Endodontic Infection. **PLOS ONE** July 14,2015

BARATTO FILHO, F.; LEONARD, D.P.; ZIELAK, J.C.; VANNI, J.R.; MAIA, S.M.A.S.; SOUSA NETO, M.D. Influence of ProTaper finishing files and sodium hypochlorite on cleaning and shaping of mandibular central incisors--a histological analysis. **Journal of appl Oral Sci**, v.17, n.3, p. 229-233, May.2009.

BARNES PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **J Clin Invest.** 2008 Nov;118(11):3546-56. doi: 10.1172/JCI36130.

BASFORD, JR. Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool.

Lasers Surg Med. 1995; 16(4), 331-342.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. SB Brasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de vigilância em saúde – Brasília: Ministério da Saúde, 2012

BRAUN A, DEHN C, KRAUSE F, JEPSEN S. Short-term clinical effects of adjunctive antimicrobial photodynamic therapy in periodontal treatment: a randomized clinical trial. **J Clin Periodontol.** 2008 Oct;35(10):877-84

CARD JW, CAREY MA, VOLTZ JW, BRADBURY JA, FERGUSON CD, COHEN EA, SCHWARTZ S, FLAKE GP, MORGAN DL, ARBES SJ JR, BARROW DA, BARROS SP, OFFENBACHER S, ZELDIN DC.

Modulation of allergic airway inflammation by the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun.** 2010 Jun;78(6):2488-96.

CARDOSO LP, OLIVEIRA CNR, ANCHIETA RB , ALMEIDA EO , JUNIOR ACF , KINA S , ROCHA EP et al, Stress distribution on dentin-cement-post interface varying root canal and glass fiber post diameters. A three-dimensional finite element analysis based on micro-CT. **J Appl Oral Sci.** 2013; 21(6):511-517

DAHLEN G, SAMUELSSON W, MOLANDER A, REIT C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. **Oral Microbiol Immunol** 2000; 15(5): 309-312

DELFINO RJ. Epidemiologic evidence for asthma and exposure to air toxics: linkages between occupational, indoor, and community air pollution research. **Environ Health Perspect.** 110 **Suppl** 4:573-89, 2002.

DE OLIVEIRA AP, PERON JP, DAMAZO AS, FRANCO AL, DOMINGOS HV, OLIANI SM., et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung E-selectin in rats. **Respir Res.** 2010 Aug 24; 11:115.

DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod** 2002; 28: 689-693.

FERRARI, PATRÍCIA HP, BOMBANA AC. A infecção endodôntica e sua resolução. São Paulo: Editora Santos. 2010; 1-20.

FRIEDRICH N, et al. Inverse association between periodontitis and respiratory allergies. 2006. **Clinical and experimental allergy**. 36, 495-502.

GARCEZ, A.S.; NUNES, S.C.; HAMBLIM, M.R.; SUZUKI, H.; RIBEIRO, M.S. Photodynamic therapy associated with conventional endodontic treatment in patients with antibiotic-resistant microorganisms: A preliminary report. **J Endod**, v.36, p.14636,2010

GOMES BPFA, PINHEIRO ET, SOUSA ELR, JACINTO RC, ZAIA AA, FERRAZ CC, SOUZA-FILHO FJ. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2006; 102: 247-53. Ou tudo maiúscula ou minúscula

GROSSI SG, ZAMBON JJ, HO AW, KOCH G, DUNFORD RG, MACHTEI EE, NORDERYD OM, GENCO RJ. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994 Mar;65(3):260-7.

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

HUJOEL PP, CUNHA-CRUZ J, MAUPOME G, SAVER B. Long-term use of medications and destructive periodontal disease. **J Periodontol**. 2008 Aug;79(8):1330-8. doi: 10.1902/jop.2008.070648

HYYPÄ T. Studies of immunologic and inflammatory factors in saliva in patients with asthma and in patients with periodontitis. **J Clin Periodontol**. 1981 Dec;8(6):500-7.

KANAZAWA M. Diseases to differentiate from COPD, with emphasis on bronchial asthma [Article in Japanese]. **Nihon Rinsho**. 2007;65(4):675-81.

KARU T, PYATIBRAT LV, AFANASYEVA NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. **Photochem Photobiol.** 2004; 80:366–372..

KAYA OGLU G, ØRSTAVIK D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med.** 2004; 15:308-20

KREISLER M, CHRISTOFFERS AB, WILLERSHAUSEN B, D'HEODT B. Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. **J. Clin. Periodontol.** 2003; 30(4): 353-358.

KUDO M, ISHIGATSUBO Y, AOKI I. **Pathology of asthma.** 2013 Sep 10;4:263. doi: 10.3389/fmicb.2013.00263.

LACERDA, Mariane Floriano Lopes Santos et al. Terapia fotodinâmica associada ao tratamento-revisão de literatura. **RFO.** Passo Fundo, 2014, v. 19, n.1, p. 115-120.

LACERDA, Mariane Floriano Lopes Santos et al. Infecção secundária e persistente e sua relação com o fracasso do tratamento endodôntico. **Rev. Bras. Odontol.** [online]. 2016, vol.73, n.3, pp. 212-217.

LAPPIN DF, MACLEOD CP, KERR A, MITCHELL T, KINANE DF. Anti-inflammatory cytokine IL-10 and T cell cytokine profile in periodontitis granulation tissue. **Clin Exp Immunol** 2001;123: 294-300. 27.

LARISSA CARBONERA CANDEO, NICOLE CRISTINE RIGONATO-OLIVEIRA, AURILEIA APARECIDA BRITO, ANNA CAROLINA RATTO TEMPESTINI HORLIANA Effects of periodontitis on the development of asthma: The role of photodynamic therapy **PLOS ONE** | November 16, 2017.

LIGEIRO DE OLIVEIRA AP, OLIVEIRA-FILHO RM, DA SILVA ZL, BORELLI P, TAVARES DE LIMA W. Regulation of Allergic Lung Inflammation in Rats: Interaction between Estradiol and Corticosterone. **Neuroimmunomodulation.** 2004;11(1):20-7.

LIMA, FM; BJORDAL, JM; ALBERTINI, R; SANTOS, FV; AIMBIRE, F. Low-level laser therapy (LLL) attenuates RhoA mRNA expression in the rat bronchi smooth muscle exposed to tumor necrosis factor- α . **Lasers Med Sci.** 2010;25: 661–668.

LOPES, HÉLIO, SIQUEIRA, JFJR. Endodontia: biologia e técnica. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015; 15-46.

MALUF AP, UGHINI GC, MALUF RP, PAGNONCELLI RM. Utilizacao de laser terapeutico em exodontia de terceiros molares inferiores. **RGO.** 2006; 54:182-4.

MARTINHO FC, CHIESA WMM, LEITE FRM, CIRELLI JA, GOMES BPFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. **Journal of endodontics**, 2012, vol 38, issue 6, 740-745.

OLIVEIRA, B.P.; AGUIAR, C.M.; CÂMARA, A.C.; ALBUERQUEQUE, M.M.; CORREIA, A.C.; SOARES, S M.F. The efficacy of photodynamic therapy and sodium hypochlorite in root canal disinfection by a single-file instrumentation technique. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v.12, n.3, p.436-43, 2015. May.

POLY, A.; BRASIL, J.F.W.; MARROIG, P.C.; BLEI, V.; RISSO, P.A. Antibacterial effect of the lasers and photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis* in the root canal system. **Rev Odontol UNESP**, v.39, n.4, p.233-239, 2010

PORTENIER I, WALTIMO TMT, HAAPASALO M. *Enterococcus faecalis* – the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. **Endod Topics.** 2003; 6:135-59.

POSTEN W, WRONE DA, DOVER JS, ARNDT KA, SILAPUNT S, ALAM M. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. **Dermatol. Surg.** 2005 Mar; 31(3): 334-339.

- RAMOS QL, ALVES CMC, PEREIRA ALA, LOPES FF, PEREIRA AFV.
Avaliação clínica da condição periodontal em fumantes e não fumantes: estudo corte transversal. **Rev Ciênc Saúde**. 2011;13(2):108-13. 16.
- RÔÇAS IN, SIQUEIRA JFJR, SANTOS KR, COELHO AM, “Red complex” (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2001; 91:468-71.
- ROSSSI D, ZLOTNIK A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol**. 2000; 18: 217-42.
- SASSONE L, FIDEL R, FIGUEIREDO L, FIDEL S, FAVERI M, FERES M.
Evaluation of the microbites of primary endodontic infections using checkerboard DNA-DNA hybridization. **Oral Microbiol Immunol**. 2007; 22:390-7.
- SIQUEIRA JFJR, RÔÇAS IN, SOUTO R, UZEDA M, COLOMBO AP.
Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 2000; 89:744-8.
- SIQUEIRA JR, JF. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. **Int Endod J** 2001; 34: 1-10
- SUNDE PT, OLSEN I, DEBELIAN GJ, TRONSTAD L. Microbiota of periapical lesion refractory to endodontic therapy. **J Endod** 2002; 28: 304-310.
- SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSON S, SJOGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcomes of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1998, 85(1): 86-93.
- VIEIRA RP, TOLEDO AC, FERREIRA SC, SANTOS AB, MEDEIROS MC, HAGE M, et al., Airway epithelium mediates the anti-inflammatory effects of exercise on asthma. **Respir Physiol Neurobiol**. 2011 Mar 15;175(3):383-9.

9. **Anexos:** Comissão de ética no uso de animais (CEUA).

