



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Álvaro Formoso Pelegrin

**Influência da inalação do concentrado de partículas ambientais no processo
inflamatório crônico periodontal em camundongos**

Araraquara

2022



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Álvaro Formoso Pelegrin

**Influência da inalação do concentrado de partículas ambientais no processo
inflamatório crônico periodontal em camundongos**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araraquara, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Periodontia

Orientador: Luís Carlos Spolidorio
Coorientadora: Thais Mauad

Araraquara

2022

P381i

Pelegrin, Álvaro Formoso

Influência da inalação do concentrado de partículas ambientais no processo inflamatório crônico periodontal em camundongos / Álvaro Formoso Pelegrin. -- Araraquara, 2022
56 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara

Orientador: Luís Carlos Spolidorio

Coorientadora: Thais Mauad

1. Doenças periodontais. 2. Inflamação. 3. Material particulado. 4. Poluentes atmosféricos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Álvaro Formoso Pelegrin

**Influência da inalação do concentrado de partículas ambientais no processo
inflamatório crônico periodontal em camundongos**

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Leila Santana Coimbra

Araraquara, 23 de março de 2022.

DADOS CURRICULARES

Álvaro Formoso Pelegrin

NASCIMENTO: 21/10/1996 – Santa Rita do Passa Quatro – São Paulo

FILIAÇÃO: Carlos Roberto Pelegrin
Rita de Cássia Formoso Pelegrin

2015 – 2019

Graduação em Odontologia

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Araraquara, São Paulo

2020-2022

Mestrado em Odontologia – Área de Concentração: Periodontia

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores brasileiros, que, bravamente, enfrentam as adversidades em prol da geração de conhecimento e verdade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu-me chegar até aqui, com saúde, sabedoria e amor, protegendo-me em toda a minha trajetória.

Aos meus pais, Carlos Roberto Pelegrin e Rita de Cássia Formoso Pelegrin, pela confiança, amor e por me proporcionarem as melhores condições para viver, crescer, estudar e progredir profissionalmente. Esta dissertação é fruto de vocês.

Ao meu irmão e melhor amigo, Guilherme Formoso Pelegrin, que, apesar de mais novo, sempre foi uma inspiração para mim, especialmente por tão lindamente expressar seu amor à ciência.

Aos meus avós, Francisco de Assis Formoso, Maria Aparecida Godoy Formoso, João Pelegrin e Marília Formoso Pelegrin. Sinto-me honrado em tê-los como avós. Obrigado por tudo o que proporcionaram em minha vida.

À minha prima, Denyse Godoy dos Santos, que, generosamente, me acolheu em sua casa, permitindo a execução deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Carlos Spolidorio, por todas as oportunidades e pela confiança em meu trabalho. Sou muito grato pela amizade, pelos ensinamentos, pela paciência e pelo carinho. Obrigado por abrir tantas portas para meu futuro e por me fazer um profissional melhor a cada dia. Cada ensinamento seu sempre estará presente comigo. Ser seu orientado foi uma honra.

À Prof.^a Dr.^a Thais Mauad e Prof.^a Dr.^a Mariana Matera Veras. Muito obrigado pela acolhida no Laboratório de Patologia Ambiental e Experimental. A execução deste trabalho seria inviável sem a brilhante colaboração de vocês. Sou muito grato por tudo o que aprendi com vocês e por me apresentarem um tema tão fascinante e importante.

Ao meu amigo, Jhonatan de Souza Carvalho, que, desde o início, esteve ao meu lado. Obrigado por todo o conhecimento passado a mim, por sempre me acalmar e auxiliar prontamente. Obrigado pela companhia em São Paulo, pelas risadas, pelas conversas e por sempre me guiar perante aos desafios.

Ao meu amigo, Victor Yuji Yariwake, pela fundamental ajuda na execução deste trabalho e pelo conhecimento compartilhado comigo. Você é para mim um grande exemplo de paciência, concentração e sabedoria.

Aos amigos de laboratório e pós-graduação, Vinícius de Paiva Gonçalves, Patricia Milagros Maquera Huacho, Flávia Theresa Soares de Castro Bione, Luana Bassetti, Maria Júlia Mancim Imbriani, Vinícius Manzoli, Dunia Waked, Ana Clara Bastos Rodrigues, Thamires Moraes Silva, Angelo Constantino Camilli, Bruno Luís Graciliano Silva, Bárbara Roque da Silva, Angélica Letícia Reis Pavanelli e Pedro Henrique Fiorin de Souza. Obrigado pelos bons momentos, ensinamentos e amizade.

Ao meu querido amigo, Danilo Paschoal Ferrarezi, pela amizade e pelo exemplo de ser humano que você é. Obrigado por estar comigo em todos os meus passos, sempre torcendo por mim. Tenho uma admiração imensa por você, meu irmão araraquarense.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Prof. Dr. Paulo Sérgio Cerri, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Prof.^a Dr.^a Rosemery Adriana Chiéri Marcantonio, Prof. Dr. Carlos Rossa Júnior, Prof.^a Dr.^a Daniela Leal Zandim Barcelos, Prof.^a Dr.^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili pela amizade, formação profissional, competência e sucesso.

À Prof.^a Dr.^a Amanda Martins Baviera, Prof.^a Dr.^a Renata Pires de Assis e Prof.^a Dr.^a Denise Madalena Palomari Spolidorio pela fundamental contribuição para a execução deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia José Antônio Zuanon e Juliana Pirola. Obrigado por toda ajuda na execução das etapas laboratoriais deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr-UNESP).

À Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCFAR-UNESP).

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2019/27272-7) pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Somos comparáveis a anões encavalitados sobre os ombros de gigantes: vemos, portanto, mais coisas do que eles viram e vemos mais longe do que eles. Qual a razão disto? Não é nem a acuidade do nosso olhar, nem a superioridade da nossa altura, mas porque somos transportados e elevados pela alta estatura dos gigantes”

Bernardo de Chartres (1130-1160)*

* Salisbury J. Metalogicon. Trad. Daniel D. McGarry. Berkeley: University of Carolina Press; 1955. p. 167.

Pelegrin AF. Influência da inalação do concentrado de partículas ambientais no processo inflamatório crônico periodontal em camundongos [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

Emissões veiculares e industriais destacam-se entre as principais responsáveis pelas altas concentrações de poluentes do ar nos grandes centros urbanos. A exaustão de gases provenientes motores a combustão, por exemplo, é constituída por uma mistura de compostos gasosos e material particulado (MP), que, ao serem inalados, podem levar a diversos impactos na saúde humana. O processo de combustão, gerado naturalmente ou por ação humana, acarreta na liberação de altas quantidades de material particulado, que se acumula na atmosfera. Dentre os tipos de material particulado presentes no ar, a maior preocupação dos pesquisadores é o fino (MP_{2,5}), cujo diâmetro é inferior a 2,5 μm e acarreta em respostas locais e sistêmicas em indivíduos expostos a esta categoria de partícula, seja de forma aguda ou, principalmente, crônica. Os níveis ambientais de MP têm sido associados a um aumento da morbidade, hospitalização e mortalidade por doenças cardiovasculares e doenças respiratórias, assim como com câncer e cognição prejudicada. O MP associado à exaustão e combustão, especialmente por ações antrópicas, causa danos oxidativos ao DNA e lipídios, disfunção do processo imunoinflamatório, aceleração de doenças crônicas relacionadas a idade, reabsorção óssea e genotoxicidade. A proposta geral do trabalho foi avaliar o impacto do concentrado de partículas atmosféricas sobre a resposta imunoinflamatória e na perda óssea alveolar, em modelo de periodontite induzida por LPS de *Escherichia coli*. Para este fim, propusemos os seguintes objetivos específicos: avaliar o impacto da inalação dos gases e material particulado sobre os tecidos periodontais normais e submetidos à doença periodontal. A abordagem experimental envolveu grupos de camundongos que foram expostos ao ar poluído ou expostos ao ar filtrado. A partir do início das exposições, os animais foram submetidos à periodontite induzida pela injeção bilateral de *Escherichia coli* 3x/semana por 4 semanas. Após a eutanásia, foram coletadas amostras de pulmão e maxila. A análise histológica descritiva destes tecidos demonstrou a ocorrência de processo inflamatório crônico nos pulmões de camundongos que foram expostos aos poluentes atmosféricos, além de alterações na microestrutura pulmonar, afetando bronquíolos e alvéolos pulmonares. Os resultados obtidos também demonstraram influência da inalação de material particulado no processo inflamatório periodontal e perda óssea alveolar. Através da investigação proposta pelo presente estudo, conclui-se que a respiração crônica de material particulado fino influencia na ocorrência de periodontite experimental, potencializando os efeitos inflamatórios no periodonto.

Palavras chave: Doenças periodontais. Inflamação. Material particulado. Poluentes atmosféricos.

Pelegrin AF. Influence of concentrated ambient particles inhalation on periodontal chronic inflammatory process in mice [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Vehicle and industrial emissions are the main responsible for the high pollutants concentration in urban centers. The gas exhaustion from internal combustion engines, for example, is composed by a mixture of gaseous compounds and particulate matter (PM), and, when inhaled, leads to several impacts on human health. The combustion process, naturally or by human action generated, provokes the release of high amounts of particulate matter, which accumulates in the atmosphere. Among the different types of particulate matter present in the air, the greatest concern of investigators are the fine particles (PM_{2.5}), whose diameter is less than 2.5 μm and leads to local and systemic responses in those exposed to this category of particle, either in short-term or long-term exposures. Environmental levels of PM have been associated with increased morbidity, hospitalization and mortality from cardiovascular and respiratory diseases, as well as cancer and impaired cognition. PM associated with exhaustion and combustion, especially by anthropic actions, causes oxidative damage to DNA and lipids, immunoinflammatory process dysfunction, age-related chronic diseases acceleration, bone resorption and genotoxicity. The main purpose of this study was to evaluate the atmospheric particles concentration impact on the immunoinflammatory response and on alveolar bone loss, using a model of *Escherichia coli* LPS-induced periodontitis. For this purpose, we proposed the following specific objectives: to evaluate the impact of inhaling gases and particulate matter on healthy periodontal tissues and those submitted to periodontal disease. The experimental approach involved groups of mice exposed to polluted air or exposed to filtered air. From the beginning of the investigations, the animals were discovered to have periodontitis induced by bilateral injection of *Escherichia coli* 3 times per week, for 4 weeks. After euthanasia, lung and maxilla samples were collected. Descriptive histological analysis of these tissues demonstrated the occurrence of a chronic inflammatory process in the lungs of mice that were exposed to atmospheric pollutants, in addition to alterations in the pulmonary microstructure, affecting bronchioles and pulmonary alveoli. The results obtained also demonstrated the influence of the inhalation of particulate material on the periodontal inflammatory process and alveolar bone loss. Through the investigation proposed by the present study, it is concluded that the chronic breathing of fine particulate matter influences the occurrence of experimental periodontitis, enhancing the inflammatory effects in the periodontium.

Keywords: Periodontal diseases. Inflammation. Particulate matter. Air pollutants.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 PROPOSIÇÃO	19
2.1 Hipótese	19
2.2 Objetivo geral	19
2.3 Objetivos específicos.....	19
3 PUBLICAÇÃO	20
3.1 Publicação 1	20
4 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE.....	42
ANEXOS	52

1 INTRODUÇÃO

A etimologia da palavra “poluição” nos revela sua origem na língua latina, cujo termo *poluere* verbalizava o ato de sujar. Embora este termo não seja mais comumente empregado para referendar a simples ação de enodoar, é inegável que poluir não represente sua ação de origem, de forma mais abrangente e impactante. Pode-se definir poluição, sucintamente, como a introdução de substâncias prejudiciais à saúde humana e de demais seres vivos no ambiente¹. Por sua vez, estas substâncias são oriundas de fenômenos naturais e, majoritariamente, das atividades humanas, acarretando em transformações na biosfera como um todo. Um dos exemplos mais conhecidos e debatidos na atualidade é a ocorrência do “efeito estufa”, ocasionado pela liberação de dióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄), óxido nitroso (N₂O) e clorofluorcarbonetos (CFCs) gera um fenômeno conhecido como “efeito estufa”. Este efeito é gerado por conta da atuação das partículas gasosas presentes na atmosfera, especialmente de CO₂, que agem como uma barreira. Esta barreira impede a liberação de radiação infravermelha, proveniente da luz solar, para o espaço, culminando no aumento da temperatura terrestre^{2,3}. Em decorrência de fatores como a grande industrialização promovida pela sociedade contemporânea, dependência de fontes não renováveis de energia e intensa atividade agropecuária, a emissão e o depósito de poluentes crescem progressivamente, contribuindo para a diminuição da qualidade de vida e sustentabilidade. Por sua forte influência na dinâmica de toda a vida terrestre, independentemente do meio em que se apresenta, a ciência estuda cada modalidade de poluição de forma particular, ainda que geradas por fatores em comum. Este fato se deve à particularidade inerente à litosfera, atmosfera e hidrosfera⁴. A disseminação de poluentes, portanto, afeta direta e indiretamente os seres humanos, uma vez que nossa espécie povoa e tem grande controle e influência em praticamente todas as regiões da Terra. Ademais, a sobrevivência humanal depende de uma série de fatores derivados destas esferas, as nos fornecem água, ar, alimentos e matérias-primas para a viabilização de nossa existência, prolongamento e melhoramento da qualidade de vida. Logo, em detrimento da presente dependência, o acúmulo de produtos adventícios da busca de nosso conforto e existência implica, paradoxalmente, em importante piora nestes segmentos. No âmbito da saúde pública, a poluição representa a maior causa ambiental de doenças e mortes prematuras, afetando principalmente populações

mais pobres e vulneráveis⁵. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a poluição atmosférica, por exemplo, é responsável por uma média de 7 milhões de mortes anuais, em todo o mundo⁶. A respeito da poluição hídrica, a liberação de produtos químicos, orgânicos e inorgânicos, por parte de indústrias, tratamento inadequado da água e a irrigação agrícola associada a agrotóxicos representam grande ameaça devido à neurotoxicidade de poluentes diversos, como chumbo (Pb), alumínio (Al), cobre (Cu), arsênio (As), dentre outros⁷. Ainda considerando a atividade agrícola, é importante ressaltar que os mesmos poluentes, liberados na irrigação e pulverização de culturas, atingem o solo e, conseqüentemente, impactam diretamente na qualidade da alimentação populacional, seja atingindo lençóis freáticos, verduras e legumes ou os próprios animais e os produtos por eles fornecidos. Exemplos como estes evidenciam o poder de disseminação da poluição sobre a Terra em sua totalidade, não só acarretando em danos à saúde de nossa espécie, mas de inúmeras outras que compartilham do mesmo planeta. Dados alarmantes, que simbolizam a importância da adoção de práticas mais limpas e conscientes, que garantam o bem-estar socioambiental.

Métodos de avaliação da qualidade do ar tem sofrido importantes aprimoramentos durante os últimos anos, consequência do impacto negativo dos poluentes atmosféricos na saúde humana. Tal impacto é tamanho que é a literatura especializada refere-se a eles como “matadores invisíveis”⁸. Através de informações mais apuradas, é possível programar e executar ações para diminuir a emissão de poluentes. No estado de São Paulo, por exemplo, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) é o órgão responsável pelo monitoramento da qualidade do ar. Estações de medição, instaladas principalmente na capital paulista, fornecem dados horários sobre a concentração de alguns dos principais poluentes, disponibilizados para toda a população. Monóxido e dióxido de nitrogênio (NO e NO₂), monóxido e dióxido de carbono (CO e CO₂), dióxido e trióxido de enxofre (SO₂ e SO₃), ozônio (O₃) e material particulado (MP) fazem parte do rol de principais agentes poluidores do ar^{1,8,9}. Cada um destes possui características físico-químicas próprias, que acarretam em diferentes efeitos maléficos à população e ao ambiente. Considerando-se as origens como critério de classificação, os poluentes atmosféricos são divididos em dois grandes grupos: poluentes primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos por alguma fonte, enquanto os secundários são formados na própria atmosfera, como oxidação de

gases e vaporização de materiais¹⁰⁻¹². O dióxido de nitrogênio, por exemplo, derivado do óxido nítrico (NO), concentra-se na atmosfera em decorrência da exaustão de veículos automotores, sendo um importante marcador da qualidade do ar¹³. Cerca de 90% da poluição do ar da região metropolitana de São Paulo é gerada pelos meios de transporte que circulam em suas dependências¹⁴. No entanto, é importante destacar que compreender o fenômeno da poluição atmosférica demanda de conhecimentos multidisciplinares, uma vez que diversos fatores estão envolvidos na manutenção dos níveis de poluidores e sua dissipação pelo ar. A precipitação atmosférica, por exemplo, promove uma “limpeza” atmosférica^{14,15-18}, diminuindo as quantidades de MP, NO₂, SO₂, efeito este referido como *washout effect*. Portanto, em meses mais chuvosos, a frequência de períodos de boa qualidade do ar é maior^{14,17}, melhorando a qualidade de vida da população da área, especialmente a de indivíduos mais sensíveis à poluição. A velocidade e direção do vento também devem ser levadas em consideração, uma vez que partículas aerodinâmicas, como o material particulado, são facilmente transportadas para regiões mais afastadas de suas fontes de emissão¹⁹. Outros fenômenos, como a inversão térmica, estagnação atmosférica e ondas de calor também viabilizam maior concentração de poluentes atmosféricos^{20,21}. Um clássico episódio, que exemplifica o impacto da inversão térmica na qualidade do ar, foi o conhecido *Great Smog of London* ou, em tradução livre, o Grande Nevoeiro de Londres, ocorrido em dezembro de 1952. Documentado por Logan (1953), a ocorrência do grande nevoeiro, provocado por excesso de queima de carvão e combustíveis fósseis, ocasionou cerca de 4 mil mortes, especialmente de indivíduos com bronquite, pneumonia e de idade superior a 45 anos²². A topografia também assume um papel importante no processo. Cidades localizadas em vales podem apresentar menor qualidade do ar, se comparadas a cidades inseridas em outras regiões, reflexo do aprisionamento do concentrado atmosférico nas encostas^{14,23,24}. Dentre a gama de poluentes encontrados no ar, o material particulado destaca-se por suas implicações à saúde, em decorrência de suas características favoráveis. Caracterizado por partículas líquidas ou sólidas suspensas na atmosfera, o MP, de origem primária e secundária, é considerado um dos principais poluentes atmosféricos, estando relacionado a diversos efeitos nocivos à saúde humana^{1,5,9,25}. Os ambientes urbanos são fontes de emissão de MP, considerando a grande combinação de fatores neles presentes. A estas fontes, representadas principalmente pela combustão de combustíveis fósseis,

atividade industrial e deslocamento urbano motorizado, nomeamos como fontes antropogênicas (derivadas da ação do homem). O óleo diesel, por exemplo, é o combustível fóssil mais utilizado no planeta. Veículos movidos a diesel são responsáveis pela maior quantidade de emissão de MP, óxidos de nitrogênio (NO_x) e SO_2 , fortemente associados a doenças pulmonares²⁶⁻²⁸. Em termos gerais, pode-se dizer que processos de combustão geram MP, que é liberado diretamente na atmosfera, absorvendo e adsorvendo produtos químicos tóxicos, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e compostos orgânicos, contribuindo para seus efeitos tóxicos à saúde²⁹. Residentes de cidades, e, principalmente, profissionais que trabalham no trânsito ou moram perto de estradas, sofrem mais intensamente os efeitos adversos da inalação das partículas, contribuindo para a ocorrência de várias doenças, especialmente cardiovasculares e respiratórias²⁹. Em oposição às antropogênicas, existem também as fontes naturais, decorrentes de incêndios florestais, erupções vulcânicas e tempestades de areia³⁰. Além de diferirem entre si por sua origem, estas partículas também são distinguíveis pelo tempo de permanência no ar, e, principalmente, pelo diâmetro que possuem. A classificação baseada no diâmetro categoriza o material particulado em: MP_{10} (partículas com diâmetro entre 10 μm e 2,5 μm), $\text{MP}_{2,5}$ (fino – partículas com diâmetro igual ou inferior a 2,5 μm e superior a 0,1 μm) e $\text{MP}_{0,1}$ (ultrafino – partículas com diâmetro inferior a 0,1 μm). A classificação do diâmetro das partículas é fundamental, uma vez que esta interfere no transporte atmosférico e também no poder de penetração pelas vias aéreas, podendo alcançar outros sistemas do nosso organismo e desencadear reações adversas e comprometimento sistêmico^{29,30}.

O diâmetro das partículas suspensas é primordial para compreendermos os danos gerados por estes ao corpo humano. Embora todas as categorias de material particulado desencadeiem reações adversas, as maiores preocupações dos especialistas são as partículas com diâmetro igual ou inferior a 2,5 μm ($\text{MP}_{2,5}$ e $\text{MP}_{0,1}$), por penetrarem mais profundamente nas vias aéreas, alcançando os alvéolos e a corrente sanguínea³¹⁻³⁴. Desta forma, alterações decorrentes da exposição ao MP atmosférico são visualizadas não apenas no sistema respiratório, mas em diversos outros sistemas do corpo humano^{31,35}. A poluição do ar em ambientes urbanos provoca danos ao sistema nervoso central (SNC), prejudicando o desenvolvimento congênito pueril, modificando o processo de envelhecimento, além

de risco de acidente vascular cerebral e doença da artéria carótida³¹, contribuindo também para ocorrência de síndrome metabólica e obesidade³⁶ e hiperplasia epitelial³⁷⁻³⁹. Também há evidências da interferência do MP_{2,5} no metabolismo do tecido ósseo. Prada *et al.*⁴⁰ (2017) identificaram correlação entre maiores taxas de material particulado atmosférico com maior incidência de fraturas, processo que pode ser explicado pela ação direta e indireta das partículas sobre o osso. Os efeitos diretos são desencadeados pela modulação da resposta inflamatória e indução de estresse oxidativo sistêmico provocada pela exposição ao concentrado de partículas ambientais⁴¹⁻⁴⁴. Visando suavizar os efeitos do particulado sobre a saúde populacional, organizações como a OMS¹² recomendam que a média de concentração diária de MP_{2,5} não exceda 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, e, a anual, 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. De fato, evidencia-se cada vez mais alterações provocadas pela exposição aos poluentes atmosféricos em todo o organismo, embora os mecanismos de ação destes agentes nos sistemas constituintes do corpo humano ainda não sejam muito esclarecidos. A carência de estudos envolvendo o material particulado atmosférico e o sistema digestório, por exemplo, limita a compreensão do impacto da exposição crônica ao ar poluído na saúde de seus componentes. Carência esta que se deve às recentes descobertas dos mecanismos de ação do material particulado no organismo, uma vez que, embora os efeitos provocados ao sistema respiratório sejam amplamente estudados, as ações diretas e indiretas do MP em outras regiões, bem como as vias que o levam até elas ainda são pouco conhecidas. Chu *et al.*⁴⁶ (2018) correlacionaram a ocorrência de câncer oral e a exposição a altas concentrações diárias de MP_{2,5}, destacando o potencial carcinogênico de seus componentes, principalmente HPAs, e a presença do particulado na cavidade oral⁴⁵. Além de maior incidência de câncer oral em indivíduos expostos às altas taxas de particulado fino atmosférico, modificações na microbiota oral foram observadas em populações infantis residentes em Xangai.

O desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), em células e tecidos, e as defesas antioxidantes é chamado de estresse oxidativo^{47,48}. As EROs são produzidas a partir de reações enzimáticas e não-enzimáticas, estando as enzimáticas relacionadas à cadeia respiratória, síntese de prostaglandinas e fagocitose^{47,49,50}. Por intermédio de reações redox ou excitação de elétrons, as EROs são formadas, podendo ser novamente classificadas em radicais livres ou não-radicais⁵¹. São exemplos de não-radicais peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), oxigênio molecular singleto ($^1\text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl) e ozônio (O_3), enquanto os radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e peroxil ($\text{ROO}\cdot$) simbolizam os radicais livres^{47,51}. Embora grandes quantidades de EROs sejam danosas às estruturas celulares, são essenciais para síntese de componentes celulares, sistema de defesa do hospedeiro e vias de sinalização celular. Neutrófilos, células polimorfonucleares (PMNs), desempenham atividade antimicrobiana pela geração de espécies reativas, através da catalisação promovida por enzimas, como a mieloperoxidase (MPO). A MPO, uma hemoproteína localizada em grânulos azurófilos de neutrófilos e, de maneira menos expressiva, nos lisossomos primários de monócitos, desempenha sua ação nos fagolisossomos, catalisando reações que resultam na formação de HOCl e destruição de micro-organismos fagocitados^{50, 52-54}. Um dos principais efeitos adversos da exposição ao MP atmosférico, especialmente às ultrafinas, é a geração de EROs e, conseqüentemente, o estresse oxidativo^{48, 55, 56}. A marcação da atividade de enzimas, como NADPH oxidase-4 (NOX_4) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARS*) evidenciam o processo de estresse oxidativo tecidual^{37,57,58}. Compostos químicos e metais (Fe , Ni , Cu , Cr), associados ao MP, também contribuem para o processo, gerando efeitos pró-inflamatórios no sistema respiratório⁵⁶. É conhecido o poder modulador do estresse oxidativo sobre doenças inflamatórias, podendo influenciar na doença periodontal⁵⁹⁻⁶¹.

Diversos estudos demonstram que a qualidade do ar interfere diretamente na saúde e bem-estar, tanto das vias respiratórias quanto no organismo como um todo^{35,62,63}. A exposição ao particulado de diesel, por exemplo, tem impacto na inflamação das vias aéreas e na inflamação sistêmica⁶⁴. Residentes de ambientes urbanos, diariamente afetadas pela emissão de poluentes, estão sujeitas a maior expressão sistêmica e local de marcadores inflamatórios (citocinas), como interleucinas 6, 8 e 10 (IL-6 , IL-8 e IL-10 , respectivamente) e fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$)^{56,65-68}. Estas citocinas, por sua vez, são proteínas capazes de modular respostas inflamatórias através de ativação celular, proliferação, diferenciação, adesão, migração e síntese de proteínas alterando o processo imunoinflamatório de forma geral. Em especial, populações com algum comprometimento prévio, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e com incompleto desenvolvimento ou função do sistema imunológico (crianças, idosos e imunocomprometidos), são mais vulneráveis aos efeitos da poluição

atmosférica^{31,56,69}. Além de alterar a expressão de citocinas, também foram evidenciados aumentos na quantidade de mastócitos, neutrófilos e linfócitos-T em paredes brônquicas humanas, quando expostos ao particulado proveniente da exaustão de diesel^{70,71}. A exposição ao MP_{2,5} gera aumento na expressão de células PMNs, evidenciada, por exemplo, pela investigação de lavados broncoalveolares⁵⁶. Porém, é importante ressaltar que as concentrações e o tempo de exposição das células ou animais ao material particulado atmosférico são pertinentes a cada estudo, bem como a região de interesse. A literatura carece de estudos que relacionem os componentes atmosféricos com a saúde dos tecidos da boca, especialmente os periodontais.

A literatura também evidencia alterações no metabolismo do tecido ósseo provocadas pela exposição crônica ao material particulado fino^{40,72-74}. A incidência de fraturas ósseas em populações expostas diariamente a taxas mais elevadas de MP_{2,5} é maior, por exemplo, se comparada a indivíduos residentes da zona rural, além de afetar, principalmente, aqueles previamente diagnosticados com osteoporose ou que possuam algum comprometimento ósseo^{40,72}. Além da interferência da poluição *outdoor*, indivíduos expostos cronicamente à fumaça gerada pelo ato de cozinhar, especialmente através do uso de biomassa, são igualmente afetados pelos efeitos do material particulado fino⁷³. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos nesta condição, acredita-se que o particulado fino incite a síntese e liberação de mediadores inflamatórios (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α), além de provocar estresse oxidativo, alterações diretas e indiretas nas taxas de vitamina D e aumento na circulação de células inflamatórias^{72,73}. Em crianças diariamente expostas à poluição atmosférica, observou-se aumento na quantidade de marcadores de atividade osteoclástica, como osteocalcina e telopeptídeo C-terminal (CTX), evidenciando o processo de reabsorção, e consequente remodelação óssea⁷⁴. As taxas de CTx e osteocalcina aumentam em situações de rápida e agressiva perda óssea, influenciando diretamente no processo de *turnover* ósseo, podendo ser utilizados como marcadores da atividade de remodelação tecidual. A osteocalcina (ácido γ -carboxiglutâmico) é um hormônio sintetizado exclusivamente pelos osteoblastos, cujas funções são abrangentes, influenciando na secreção muscular de IL-6, cognição, produção de insulina e fertilidade masculina^{75,76}, condições também relacionadas com a exposição ao particulado atmosférico. Como discutido previamente, a exposição crônica ao material particulado atmosférico

culmina na geração exacerbada EROs e estresse oxidativo^{48,55,56}. Com a ocorrência deste processo, há a estimulação de fatores relacionados com o processo de reabsorção óssea, como o NF- κ B^{77,78}. Saha *et al.*⁷³ (2016) correlacionaram a exposição ao MP₁₀ e MP_{2,5} com aumento na quantidade sérica de ligante do receptor do ativador do fator nuclear κ B (RANKL) e diminuição dos níveis de osteoprotegerina (OPG), resultando em aumento na susceptibilidade de ocorrência de reabsorção óssea e doenças relacionadas, como a osteoporose. Independentemente dos mecanismos envolvidos nas alterações teciduais ósseas, é factual a influência da poluição atmosférica neste processo.

A influência do MP_{2,5} no metabolismo de tecido ósseo pode influenciar também, por exemplo, no agravamento da perda óssea resultante de periodontite. A periodontite é caracterizada por um crônico processo inflamatório, mediada pelo hospedeiro, e associada a micro-organismos, resultando na perda da inserção periodontal⁷⁹. De forma mais abrangente, Papapanou *et al.*⁸⁰ (2018) definem a periodontite como “doença inflamatória crônica multifatorial associada com biofilme disbiótico e caracterizada pela destruição progressiva do aparato de inserção dental”. Devido à permanência do agente etiológico periodontal, a resposta do hospedeiro frente a este estímulo resulta em sinais e sintomas clinicamente detectáveis, como a perda de inserção clínica, decorrente da inflamação crônica dos tecidos moles, degradação das fibras colágenas e reabsorção óssea^{79,81}. Afetando até 50% da população mundial, a periodontite é considerada um problema de saúde pública de grande relevância, sendo a doença oral mais prevalente^{82,83}. Quando considerado apenas o estágio severo da doença, cerca de 10% da população global encontra-se nesta condição, que culmina na perda de elementos dentários⁸⁴. A patogênese da doença periodontal, de maneira sucinta, inicia-se através da colonização da superfície dentária por bactérias, principalmente Gram-negativas, na região cervical. Bactérias colonizadoras primárias, Gram-positivas, permitem a colonização de outras espécies, tornando o biofilme, nome dado à comunidade microbiana, mais complexo e prejudicial ao periodonto. Espécies bacterianas se sobressaem na ocorrência deste processo, como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia*, classificadas, em complexos, por Socransky *et al.*⁸⁵ (1998) de acordo com o impacto destas no desenvolvimento das doenças periodontais. Pela ação de fatores de virulência nelas presentes, como

lipopolissacarídeos (LPS), a resposta imunomediada do hospedeiro acontece, culminando na reabsorção óssea patológica e destruição do aparato de inserção dental⁸². Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), anexados às células epiteliais, iniciam a resposta inflamatória mediante ao desafio microbiano imposto, resultando em respostas das imunidades inata e adaptativa. Uma classe de PRRs destaca-se na ocorrência da inflamação periodontal, a dos TLRs ou receptores do tipo Toll (*Toll-like receptors*, em inglês). Dentre os membros da família de TLRs, o TLR-4 assume um importante papel na resposta do hospedeiro, uma vez que este receptor se liga ao LPS bacteriano, desencadeando o processo inflamatório^{82,86,87}. Através da liberação de citocinas, como interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, fagócitos são ativados e recrutados, com o objetivo de eliminar os patógenos periodontais^{82,88,89}. Os fibroblastos, abundantes nos tecidos conjuntivos, também são afetados pela ação das citocinas e outros fatores pró-inflamatórios, como prostaglandina E₂ (PGE₂), resultando no remodelamento tecidual por alterações na deposição e degradação de colágeno, associadas à atividade de metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas que degradam proteínas da matriz extracelular^{82,90,91}. O comprometimento dos tecidos moles, desencadeado por micro-organismos, e reflexo das ações imunomediadas, ocasiona o aparecimento de sinais e sintomas, como a mobilidade dentária, agravada pela reabsorção óssea decorrente. IL-1 β , IL-6, IL-17, TNF- α , PGE₂ e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) estimulam a atividade osteoclástica, por aumento na síntese e liberação de RANKL e diminuição dos níveis de OPG, gerando perdas ósseas detectadas, principalmente, por meio de exames de imagem. A doença periodontal inflamatória crônica pode estar única e exclusivamente associada ao biofilme dental ou modificada por fatores de riscos sistêmicos e locais. Dentre os fatores de risco sistêmicos (fatores modificadores) lista-se o tabagismo, hiperglicemia, fatores nutricionais, agentes farmacológicos (prescritos, não prescritos e recreativos), hormônios esteroides sexuais (puberdade, ciclo menstrual, gravidez e contraceptivos orais), condições hematológicas e fatores genéticos⁹²⁻⁹⁴. Os fatores de risco locais (fatores predisponentes) incluem os fatores de retenção de biofilme dental (por exemplo, margens de restaurações proeminentes) e secura bucal⁸¹. Devido à influência de diversos fatores de risco, o processo inflamatório periodontal pode ser severamente modulado, modificando a resposta do hospedeiro frente ao biofilme disbiótico. Portanto, esta forte influência caracteriza a periodontite como uma doença

multifatorial. Embora vários fatores de risco já tenham sido relacionados à progressão e suscetibilidade à periodontite, ainda existe uma gama de outros fatores que possam modificar, em algum grau, a ocorrência do processo. Dentre eles, a poluição atmosférica candidata-se a um potencial fator modificador, uma vez que não apenas afeta o metabolismo das vias aéreas, mas também o de demais órgãos e sistemas do corpo humano, direta ou indiretamente.

Através dos objetivos propostos pelo presente estudo, a visualização dos efeitos do $MP_{2,5}$ sobre os tecidos periodontais torna-se mais evidente, tanto na presença quanto na ausência de estímulos inflamatórios concomitantes, possibilitando também a investigação das alterações da poluição atmosférica sobre o processo inflamatório e metabolismo ósseo.

2 PROPOSIÇÃO

A principal hipótese do presente estudo, o objetivo geral e os objetivos específicos encontram-se abaixo.

2.1 Hipótese

A exposição à poluição atmosférica interfere nas reações imunoinflamatórias e, conseqüentemente, na reabsorção óssea induzida por estímulo infeccioso no periodonto, maximizando o estabelecimento da doença periodontal.

2.2 Objetivo geral

Utilizar um modelo experimental de doença periodontal, em murinos, para avaliar o impacto da inalação de concentrado de partículas atmosféricas sobre o desenvolvimento desta condição.

2.3 Objetivos específicos

Avaliar o impacto da inalação de material particulado fino (MP_{2,5}) sobre o processo inflamatório crônico periodontal em camundongos submetidos ao modelo de periodontite experimental estabelecido por microinjeções de LPS de *Escherichia coli* sobre os seguintes parâmetros:

- Análise microscópica do tecido pulmonar;
- Análise microscópica dos tecidos periodontais.

3 PUBLICAÇÃO

O presente estudo gerou o artigo científico apresentado a seguir.

3.1 Publicação 1*

Original Paper: Fine particulate matter exposure intensifies experimental chronic periodontitis in mice

Brazilian Oral Research

Álvaro Formoso Pelegrin^a, alvaro.f.pelegrin@unesp.br
 Jhonatan de Souza Carvalho^a, jscodontologia@gmail.com
 Victor Yuji Yariwake^b, victoryuji.13@gmail.com
 Mariana Matera Veras^b, verasine@usp.br
 Thais Mauad^b, tmauad@usp.br
 Luís Carlos Spolidorio^c, lspolidorio@gmail.com

^aDepartment of Diagnosis and Surgery, Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.
 St. Humaitá, 1680 – Center, 14801-903, Araraquara – SP, Brazil.

^bDepartment of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, USP, São Paulo, SP, Brazil.
 Av. Dr. Arnaldo, 455 – Cerqueira César, 01246 903, São Paulo – SP, Brazil.

^cDepartment of Physiology and Pathology, Araraquara School of Dentistry, University of São Paulo State, UNESP, Araraquara, SP, Brazil.
 St. Humaitá, 1680 – Center, 14801-903, Araraquara – SP, Brazil.

ABSTRACT

The emission of pollutants into the atmosphere, as a result of the exercise of various daily activities of the world population, directly and indirectly affects human health. Although the respiratory system is the most affected by the presence of environmental micro particles, the size and characteristics of atmospheric particulate matter (PM_{2.5}) allow its dissemination in the human body, affecting diverse organs and tissues. Even with several studies involving PM_{2.5} and the occurrence of the most varied diseases, the literature lacks studies that correlate the impact of air pollution on oral health. The aim of this study was to evaluate the influence of the inhalation of concentrated ambient particles (CAP) on periodontal inflammatory

* Artigo formatado segundo as normas do periódico *Brazilian Oral Research* para o qual pretende-se submeter.

process. Eighty BALB/c mice were used, submitted to daily exposure to filtered air or polluted air, in periods of 30 and 60 days. Forty animals were submitted to 30 days of LPS-induced experimental periodontitis, allowing the evaluation of the periodontal inflammatory process through descriptive microscopic analysis of the maxilla, and the impact of PM_{2.5} inhalation on this disease. Mice lungs were also evaluated. The results suggest that air pollution contributes to the exacerbation of the periodontal inflammatory response, increasing the lymphocytic inflammatory infiltrate and causing greater bone destruction and resorption.

INTRODUCTION

The industrialization process, the dependence on fossil-fuel-powered vehicles and intense agricultural activity promote an exacerbated deposit of harmful products, reducing life quality and sustainability. Various pollutants, such as nitrogen dioxide, carbon dioxide, ozone, and particulate matter (PM) represent the main air pollutants^{1,2,3}, and those pollutants trigger multiple effects on individuals exposed to them, either directly or indirectly^{1,2,4,5}. Cities residents, especially road workers or those who live near highways are more intensely affected by inhaling particles adverse effects, contributing to the occurrence of various diseases, especially in cardiovascular and respiratory systems⁶. Particles with ≤ 2.5 μm diameter (PM_{2.5} and PM_{0.1}) spread through different body tissues and regions, as they penetrate the airways and reach alveoli and bloodstream^{7,8}. Air pollution provokes pathological modifications in airways, circulation, skeleton, central nervous system, and immunity, impairing physiological development and triggering health problems^{8,9,10}. According to World Health Organization (WHO), atmospheric pollutants cause about 7 million deaths per year worldwide¹¹. Due to the absorption and adsorption feature of PM, products such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organic compounds contribute to their toxic health effects and carcinogenicity⁶. Changes in systemic and local expression of inflammatory cytokines modulate inflammatory responses by leukocytes activation, proliferation, differentiation, and migration, which can modify, for example, the periodontal inflammatory process^{12,13}. The maintenance of the pathological stimulus near the cervical region of the teeth, through the action of specific microorganisms and their virulence factors (lipopolysaccharides) results in loss of clinical attachment, degradation of collagen fibers and bone resorption, resulting from chronic periodontal tissues inflammation^{14,15}. In addition, particulate matter chronic exposure is related to increased release of reactive oxygen species (ROS), causing oxidative stress and impairment of cellular structures^{16,17}. Although

PM spreading ability in human body is known, various mechanisms of action on immunoinflammatory modulation are still unknown, as well as the level of involvement of multiple organs and systems. Through the objectives proposed by the present study, the visualization of the effects of PM_{2.5} on periodontal tissues becomes more evident, both in the presence and in the absence of concomitant inflammatory stimuli, also enabling the investigation of changes in atmospheric pollution on the inflammatory process and bone metabolism.

OBJECTIVE

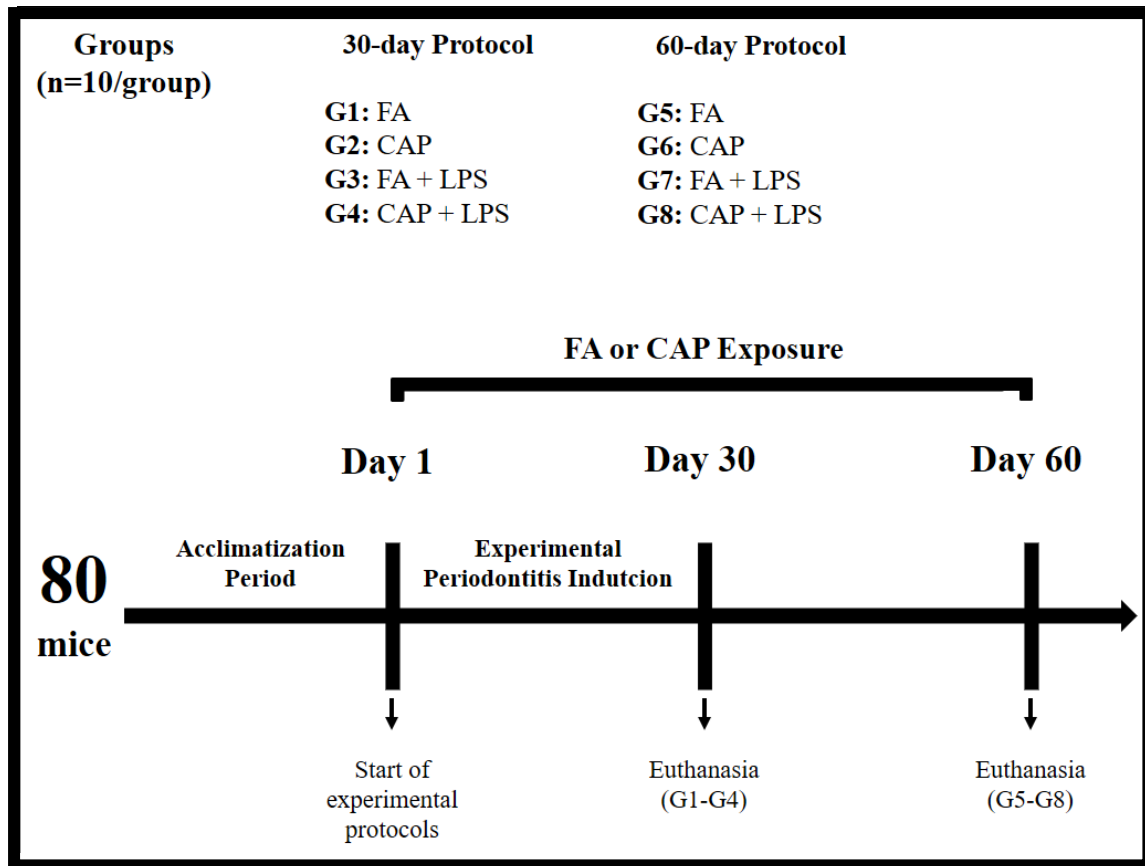
The aim of the study was to evaluate the impact of fine particulate matter (PM_{2.5}) inhalation on chronic periodontal inflammatory process in mice using an experimental periodontitis model established by *Escherichia coli* LPS microinjections.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Animal procedures were conducted in compliance with Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments (ARRIVE) guidelines. The USP School of Medicine Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA-FMUSP #1528/2020) approved the experimental protocol. Eighty 4-week-old specific pathogen free BALB/c mice (*Mus musculus*) were divided in eight experimental groups, according to each established protocol. The mice were housed in a vivarium with controlled conditions (food and water *ad libitum*, 21±1 °C temperature, 65% - 75% humidity, and 12hr light and dark cycles). Mice were not submitted to any protocol in the first week in the vivarium, allowing the adaptation to the new environment and stress levels reduction. Animals were weighed once per week. Urine, feces, food and water quantities were observed daily, such as signs of stress or illness. Experimental groups and design were shown in **Figure 1**.

Figure 1. Experimental design. Eighty mice were distributed into eight groups (n=10/group). Groups 1 to 4 were subjected to 30 days of experimental period, while groups 5 to 8 were subjected to a 60-day protocol. 1) FA (filtered air); 2) CAP (concentrated ambient particles); 3) FA + LPS (FA + LPS injection); 4) CAP + LPS; 5) FA (60 days); 6) CAP (60 days); 7) FA + LPS (60 days); 8) CAP + LPS (60 days). Air exposures were performed on day 1 until euthanasia (day 30 or day 60), and the experimental periodontitis induction was performed 3 times/week, in a 30-day period.



Atmospheric air exposure system

All mice were exposed once per day, 5-time-week, to atmospheric air (filtered or polluted air), through the Harvard Ambient Particle Concentrator (HAPC)^{18,19,20}. Briefly, the concentrator captures the atmospheric air, using a system composed of vacuum pumps and high efficiency particulate arrestance filters (HEPA filters), aiming at the release of concentrated ambient particles (CAP) and filtered air (FA) in two inhalation chambers ("dirty" and "clean" chambers, respectively), installed immediately after the last stage of the concentrator. HEPA filters eliminate air particles, conceding filtered air to the "clean" chamber. CAP corresponds to PM_{2.5} concentration. Animals were acclimatized to the HAPC for 3 days to reduce distress. FA and CAP groups were exposed at the same time and conditions (pressure (0.99 atm), air flow (10 L/min), temperature and noise). The determined PM_{2.5} exposure dose was 600 µg/m³. This dose represents the mean conditions that São Paulo residents are exposed daily^{21,22} (**Figure 2**). São Paulo State Environmental Company (CETESB) provided hourly air quality index (AQI) of the region (23°33'16.7"S 46°40'20.7"W), allowing the calculation of exactly time required to reach the determined PM_{2.5} dose. To calculate the exposure time, the follow formula was used:

$$T = \frac{FC}{CF \times HC}$$

Where:

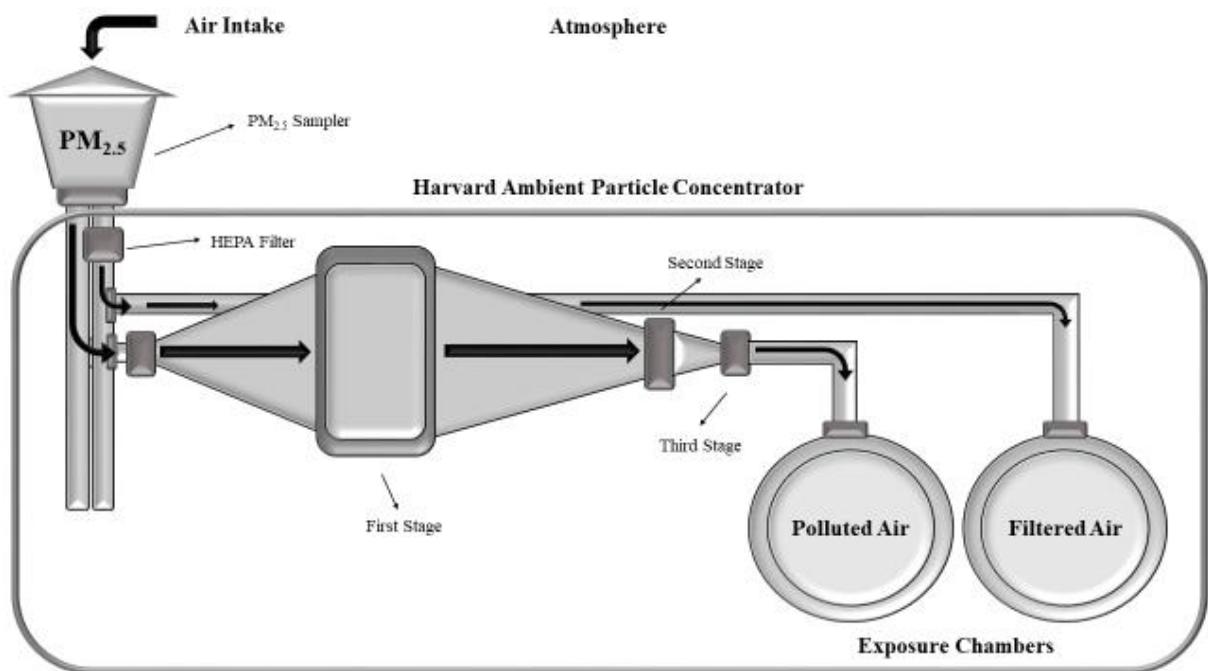
T: time (hours)

FC: final concentration ($PM_{2.5}$ 600 $\mu g/m^3$)

CF: HAPC concentration factor (20)

HC: hourly $PM_{2.5}$ local concentration

Figure 2. Schematic illustration of the Harvard Ambient Particle Concentrator (HAPC). Atmospheric air was captured by the air intake and fine particulate matter ($PM_{2.5}$) was conducted to first, second, and third virtual impactors (stages), allowing the correct particles concentration. Mice were kept in filtered air or polluted air chambers for a predetermined time, at the same pressure.



Induction of experimental periodontitis

Animals were anesthetized with 4% isoflurane (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda., Itatiaia, Brazil) in 100% oxygen, in an acrylic chamber. After 5 minutes in the chamber, mice were kept anesthetized using a respiratory mask to allow periodontal inflammation induction. Periodontitis was induced through microinjections (3 μL) of a 10 mg/mL *Escherichia coli* lipopolysaccharides solution (*E. coli* O111:B4, Merck/Millipore Sigma, Burlington, USA). Injections were performed in the gingival tissue adjacent to the palatal surface of maxillary first molars^{23,24}. A single trained operator performed this protocol 3 times per week, during 30 days.

Euthanasia and sample collection

After experimental periods closure (30th or 60th day), mice were anesthetized with isoflurane, allowing euthanasia by anesthetic overdose. Lungs and maxillae were removed and fixed with 4% paraformaldehyde solution. After 48hr fixation, samples were stored in alcohol 70% solution.

Respiratory system commitment evaluation

Lung samples were embedded in paraffin, and 5 µm thick semi-serial slides were obtained. Slides were stained by hematoxylin and eosin (H&E) technique to allow descriptive analysis of bronchioles, alveoli and pulmonary blood vessels. A single calibrated examiner evaluated lung architecture, vascularization and inflammation signs. Inflammatory infiltrated cells, bronchioles and alveoli thickness, and endothelial morphological alterations were observed.

Periodontal tissues descriptive analysis

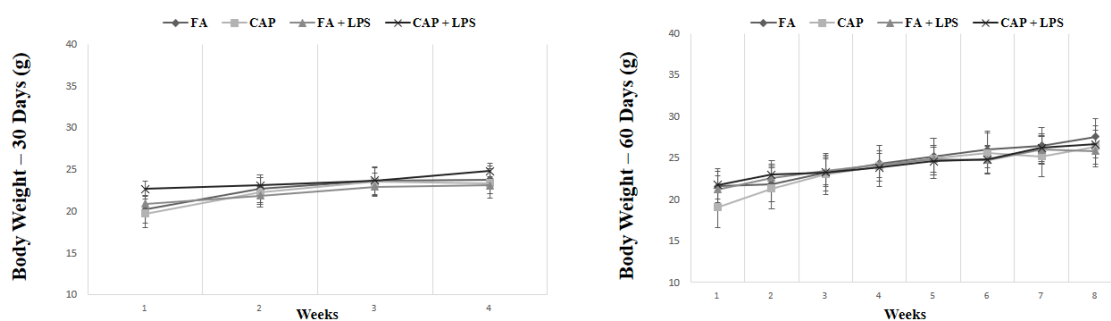
Maxillae were decalcified in EDTA solution (pH 7.2) for 4 weeks and embedded in paraffin with standard orientation to obtain semi-serial sections of 5 µm thick in the buccolingual direction. Slides were stained by H&E technique. A single pathologist performed the analysis. Descriptive histological analysis encompassed the area corresponding to the palatal periodontal tissues of the upper first molar, once LPS injections were performed in this region. Presence of inflammatory infiltrate in sub-epithelial regions, close to gingival sulcus, and alveolar bone loss were analyzed. Polymorphonuclear and mononuclear leukocytes, osteoclasts, fusiform cells, extracellular matrix and blood vessels quantities were observed in the region of interest.

RESULTS

Mice health assessment

All animals survived the experimental periods and executed protocols. Exposure to filtered or polluted air, as well as LPS injection, did not affect body weight. However, mice exposed to PM_{2.5} demonstrated more aggressive behavior when manipulated, and presented mild isoflurane anesthesia resistance. No changes were observed in animal urine or feces. Water and food consumption were similar in all groups (**Figure 3**).

Figure 3. Mice body weight in experimental periods. No statistical differences were detected in 30 days or 60 days. FA (filtered air); CAP (concentrated ambient particles); LPS (lipopolysaccharides injection).



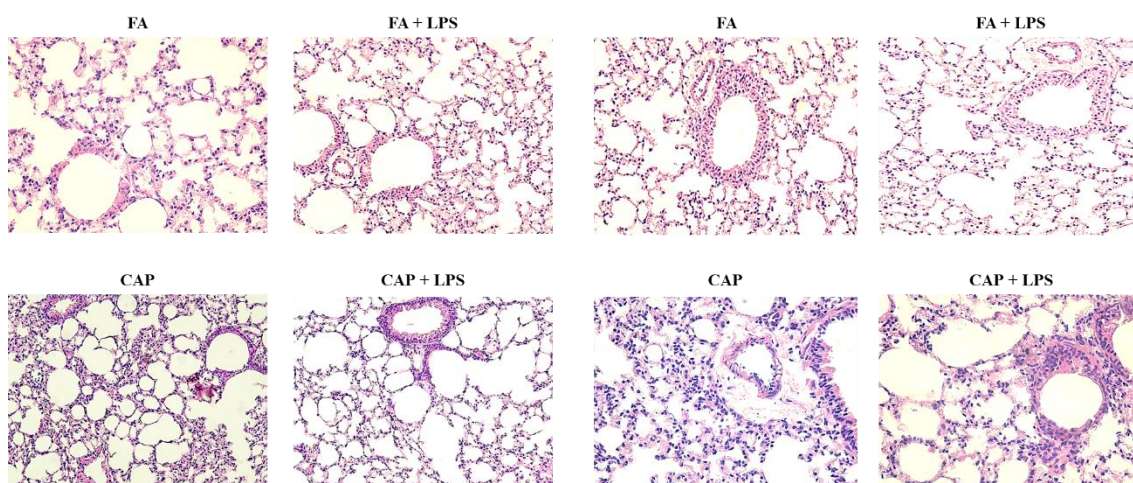
PM_{2.5} caused lung inflammation

Animal exposure to particulate material provoked an inflammatory response in the lung tissue, evidenced by the histological analysis of the lung. PM_{2.5} respiration triggered an immune response mediated by lymphocytes, mainly located in the alveolar septa and perivascular regions. Chronic inflammation was considered mild to moderate. Activity of polymorphonuclear and mononuclear cells was also observed to a lesser extent. Changes in the architecture of the bronchioles and pulmonary alveoli were also evidenced as a result of atmospheric pollution. The histo-morphological evaluation showed an increase of alveoli lumen, irregularities in the alveolar walls (alveolus anatomy loss), and thickening of bronchioles walls were observed. These changes were present in both 30 and 60-day period, being clearer in the animals exposed to CAP for 60 days. The induction of experimental periodontitis did not interfere with the pulmonary histological findings (**Figure 4**).

Figure 4. Pulmonary tissue microscopic analysis (40x – H&E stain). Superior images illustrate healthy lungs, with preservation of alveoli and bronchioles architecture and inflammation absence. Inferior images demonstrate the influence of CAP exposure on lung health. Images show increased inflammatory cells influx, alveolar disorganization and peribronchial inflammatory infiltrate. FA (filtered air); CAP (concentrated ambient particles); LPS (lipopolysaccharides injection).

30-day Protocol

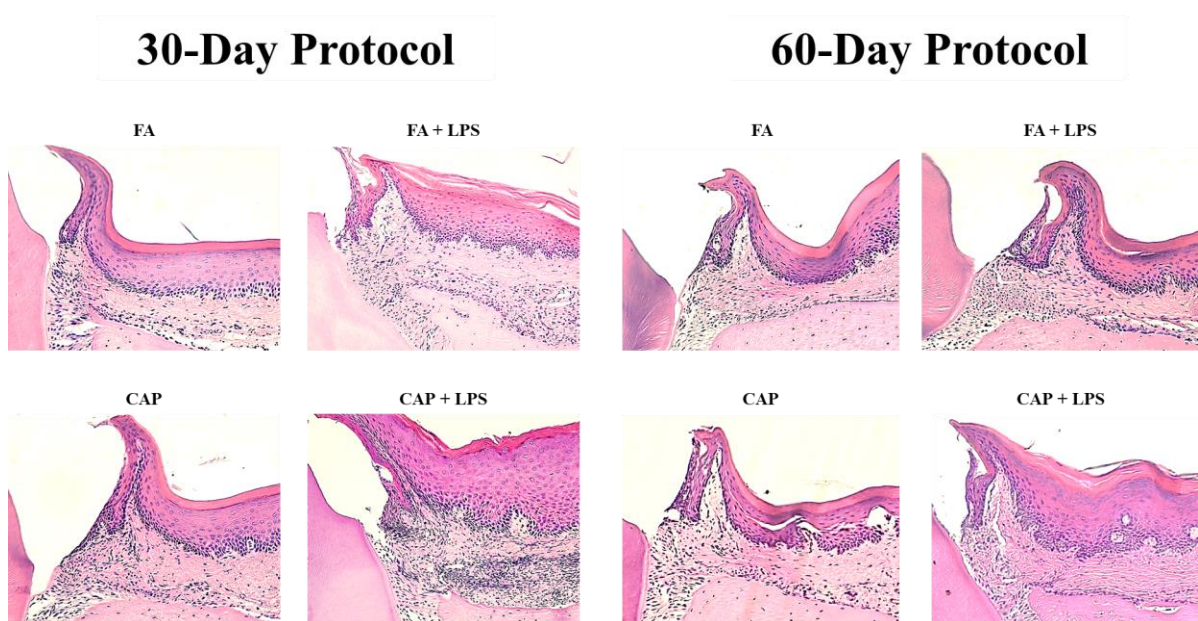
60-day Protocol



Air pollution potentiated periodontal inflammation

Lipopolysaccharides injection induced periodontal inflammation, resulting on polymorphonuclear and mononuclear inflammatory cells, extracellular matrix destruction, and alveolar bone resorption. Lymphocytes predominated in periodontal inflammatory infiltrate, characterizing a chronic inflammatory process occurrence. Inflammation process was more severe in animals exposed to PM_{2.5}, evidenced by increased quantity of lymphocytes, higher osteoclastic activity and bone loss, more intense ECM degradation, and endothelial dysfunction. Thirty days after experimental periodontitis protocol cessation (60th day), periodontal inflammatory infiltrate disappeared, remaining reduced periodontium. Mice subjected to palatal LPS injections had an increase on collagen fibers deposition, contributing to extracellular matrix gain, vascular remodeling, and gingival restructuring. FA or CAP exposure did not influence on post-inflammation periodontium remodeling, since mice exposed to air pollution or filtered air did not presented differences in periodontal tissues repair. Exposure to CAP did not provoke periodontal inflammation or tissue alterations.

Figure 5. Periodontal tissues microscopic descriptive analysis (20x – H&E stain). Filtered air or polluted air did not interfered on periodontium microstructure in absence of pathological stimulus. Mice subjected to LPS-induced periodontitis showed inflammatory infiltrate, bone resorption, and, in consequence, periodontal attachment loss. Animals exposed to air pollution showed increased periodontal chronic inflammation and alveolar bone resorption. In 60 days, no inflammation signs were observed in any group. Mice that received LPS injections on first 30 days showed bone and conjunctive tissue repair and remodeling. FA (filtered air); CAP (concentrated ambient particles); LPS (lipopolysaccharides injection).



DISCUSSION

Various external and internal factors influence on immuno-inflammatory processes, modifying the tissue response to the noxious stimulus. Despite being widely studied, periodontitis, a chronic inflammatory process associated with the presence of dental biofilm, is still the focus of several scientific investigations, since external, systemic and local conditions interfere directly and/or indirectly in the periodontal inflammatory course^{25,26}. Since the microbial challenge is the primary etiological factor of periodontitis, the establishment of this disease in animal models is possible and well supported by scientific literature^{24,27,28}. The experimental periodontitis model adopted for this study has, as a principle, regular injections of bacterial LPS (*Escherichia coli*) in the palate of BALB/c mice. *E. coli* lipopolysaccharides, constituents of gram-negative bacteria cell wall, bind to Toll-like receptors (TLR4), culminating in the activation of immune system cells and their manifestations^{24,29}. The mouse strain chosen, BALB/c, is widely used to induce periodontal inflammation, and, in addition, this strain is widely used in studies that seek to understand the health effects of inhaling pollutants^{19,21,28}. In order to avoid pathogen-mediated experimental interferences, SPF animals were adopted to protocols accomplishment. Free-pathogen mice reduced the chances of unexpected illness occurrence, avoiding the commitment of investigation results. The survival of all animals to their respective treatments confirmed the correct choice of strain. In addition, simultaneous execution of the periodontal inflammation induction and CAP exposure protocols was a successful choice, as there was no further compromise of animal health, once every animal maintained a similar weight throughout the experiment, dialoguing with the non-observation of changes in food consumption and waste. Mice exposed to air pollution developed signs of stress, more aggressive behavior and agitation, and were more resistant to inhalational anesthesia. Ambient particles breathing is related with increased stress symptoms and signs. Air pollutants are stress agents, once they increase stress hormones levels, compromising systemic health of large cities residents^{30,31,32}. Behavior changes of animals exposed to PM_{2.5} identify the effects caused by inhalation particulate matter inhalation at systemic level, although the main harmful effects occur in the lungs. CAP exposure provoked inflammatory response in pulmonary tissue. Bronchioles and alveoli histological analysis showed chronic inflammation signs in animals exposed to air pollution, mainly in 60 days of CAP exposure. PM_{2.5} presence in respiratory system triggered a chronic immune response, mediated by cytokines and lymphocytes. Presence of PM_{2.5} in the lungs causes damage through different pathways, such as free radical peroxidation and inflammatory injury³³. PM_{2.5} components such as free radicals (hydroxyl ·OH), metals, and

organic compounds induce the formation of reactive oxygen species (ROS), leading to lung cells oxidation and DNA damage³³. Oxidative stress occurrence, highlighted by reactive species analysis and/or antioxidant enzymes quantifications (catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase), is related with air pollution effects. Cytokines expression, increased number of mast cells, neutrophils and T-lymphocytes in human bronchial walls were also observed when exposed to particulate matter from diesel exhaust particles^{34,35}. CAP exposure triggered inflammation response in lungs, and corroborates to increased periodontal inflammation in mice simultaneously subjected to LPS injections. PM_{2.5} increases expression of inflammatory markers (cytokines), such as interleukins 6, 8 and 10 (IL-6, IL-8 and IL-10, respectively) and tumor necrosis factor (TNF- α), potentiating periodontal inflammation and bone resorption^{12,13,28,30}. The evident interference of air quality in experimental periodontitis progression supports another important finding: the impairment of oral health mediated by particulate matter action. Scientific literature lacks studies involving these two factors, and this pioneer study demonstrates, in animal model, that populations in large urban centers must be subject to oral alterations triggered or potentiated by improper air breathing. Dentists should be alert to the occurrence of these events, and should guide patients to check hourly air quality in the regions they live in, avoiding outdoor activities in periods of higher concentration of pollutants.

CONCLUSION

The results of the present study suggests inhalation of fine particulate matter (PM_{2.5}) provokes lung inflammation, exacerbates chronic periodontal inflammation, resulting on extensive lymphocyte inflammatory infiltrate and more severe alveolar bone loss. However, thirty or sixty days of CAP inhalation does not influence on periodontal tissues metabolism in absence of concomitant inflammation.

CONFLICTS OF INTEREST

There are no conflicts of interest to declare.

ACKNOWLEDGEMENTS

To São Paulo Research Foundation (FAPESP) [grant #2019/27272-7], which provided financial support for this work. The authors also are grateful to Mr. José Antonio Sampaio Zuanon and Miss Juliana Pirola Garcia, who helped with histological processing and execution of this work.

REFERENCES

- 1-Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and health impacts of air pollution: a review. *Front Public Health*. 2020; 8: 14.
- 2-Moshhammer H, Poteser M, Kundi M, Lemmerer K, Weitensfelder L, Wallner P et al. Nitrogen-dioxide remains a valid air quality indicator. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(10): 3733.
- 3-Atkinson RW, Butland BK, Anderson HR, Maynard RL. Long-term concentrations of nitrogen dioxide and mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Epidemiology*. 2018; 29(4): 460-72.
- 4-Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*. 2018; 391(10119): 462-512.
- 5-Li C, Fang D, Xu D, Wang B, Zhao S, Yan S, Wang Y. Main air pollutants and diabetes-associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2014; 171(5): R183-90.
- 6-Pizzorno J, Crinnion W. Particulate matter is a surprisingly common contributor to disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2017; 16(4): 8-12.
- 7-Babadjouni RM, Hodis DM, Radwanski R, Durazo R, Patel A, Liu Q et al. Clinical effects of air pollution on the central nervous system; a review. *J Clin Neurosci*. 2017; 43: 16-24.
- 8-Pei Y, Jiang R, Zou Y, Wang Y, Zhang S, Wang G et al. Effects of fine particulate matter (PM_{2.5}) on systemic oxidative stress and cardiac function in ApoE(-/-) mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13(5): 484.
- 9-Liang R, Zhang B, Zhao X, Ruan Y, Lian H, Fan Z. Effect of exposure to PM_{2.5} on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2014; 32(11): 2130-40; discussion 2141.
- 10-Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ*. 2000; 249(1-3): 85-101.
- 11-World Health Organization: Ambient (outdoor) air pollution. Geneva: WHO; 2021. [access 2021 set 24]. Available in: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health).

- 12-Gruzieva O, Merid SK, Gref A, Gajulapuri A, Lemonnier N, Ballereau S et al. Exposure to traffic-related air pollution and serum inflammatory cytokines in children. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(6): 067007.
- 13-Tsai DH, Amyai N, Marques-Vidal P et al. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9: 24.
- 14-Steffens JP, Marcantonio RAC. Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: guia prático e pontos-chave. *Rev Odontol UNESP.* 2018; 47(4): 189-97.
- 15-Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol.* 2018; 89 Suppl 1:S159-S172.
- 16-Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21(7): 363-83.
- 17-Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8416763.
- 18-Di Domenico M, Benevenuto SGM, Tomasini PP, Yariwake VY, de Oliveira Alves N, Rahmeier FL et al. Concentrated ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure induce brain damage in pre and postnatal exposed mice. *Neurotoxicology.* 2020; 79: 127-41.
- 19-Lopes TBM, Groth EE, Veras M, Furuya TK, de Souza Xavier Costa N, Ribeiro Júnior G et al. Pre- and postnatal exposure of mice to concentrated urban PM_{2.5} decreases the number of alveoli and leads to altered lung function at an early stage of life. *Environ Pollut.* 2018; 241: 511-20.
- 20-De Oliveira AAF, de Oliveira TF, Dias MF, Medeiros MHG, Di Mascio P, Veras M et al. Genotoxic and epigenotoxic effects in mice exposed to concentrated ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) from São Paulo city, Brazil. *Part Fibre Toxicol.* 2018; 15(1): 40.
- 21- De Brito JM, Macchione M, Yoshizaki K, Toledo-Arruda AC, Saraiva-Romanholo BM, Andrade MF et al. Acute cardiopulmonary effects induced by the inhalation of concentrated ambient particles during seasonal variation in the city of São Paulo. *J Appl Physiol.* 2014; 117(5): 492-9.
- 22-Andreão WL, Albuquerque TTA, Kumar P. Excess deaths associated with fine particulate matter in Brazilian cities. *Atmospheric Environment.* 2018; 194: 71-81.
- 23-Boivin GP, Bottomley MA, Schiml PA, Goss L, Grobe N. Physiologic, behavioral, and histologic responses to various euthanasia methods in C57BL/6NTac male mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017 Jan 1; 56(1): 69-78.
- 24-Lopes DEM, Jabr CL, Dejana NN, Saraiva AC, de Aquino SG, Medeiros AI et al. Inhibition of 5-lipoxygenase (5-Lo) attenuates inflammation and bone resorption in lipopolysaccharide (LPS)- induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2017: 1–18.
- 25-De Paiva Gonçalves V, Ortega AAC, Steffens JP, Spolidorio DMP, Rossa C, Spolidorio LC. Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model. *J Periodontol.* 2018; 89(4): 466-75.

- 26-Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations between sex hormone levels and periodontitis in men: results from NHANES III. *J Periodontol*. 2015 Oct; 86(10): 1116-25.
- 27-Souza JAC, Nogueira AVB, Souza PPC, Oliveira GJPL, Medeiros MC, Garlet GP et al. Suppressor of cytokine signaling 1 expression during LPS-induced inflammation and bone loss in rats. *Braz Oral Res*. 2017; 31: e75.
- 28-Carvalho JS, Ramadan D, Gonçalves VP, Maquera-Huacho PM, Assis RP, Lima TFO et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food & Function*. 2021; 12: 5007-17.
- 29-Graves DT, Li J, Cochran DL. Critical review in oral biology & medicine: inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*. 2011; 90: 143–53.
- 30-Thomson EM, Christidis T, Pinault L, Tjepkema M, Colman I, Crouse DL et al. Self-rated stress, distress, mental health, and health as modifiers of the association between long-term exposure to ambient pollutants and mortality. *Environ Res*. 2020; 191: 109973.
- 31-Hajat A, Hazlehurst MF, Golden SH, Merkin SS, Seeman T, Szpiro AA et al. The cross-sectional and longitudinal association between air pollution and salivary cortisol: evidence from the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Environ Int*. 2019; 131: 105062.
- 32-Li H, Cai J, Chen R, Zhao Z, Ying Z, Wang L et al. Particulate matter exposure and stress hormone levels. *Circulation*. 2017; 136: 618–27.
- 33-Xing YF, Xu YH, Shi MH, Lian YX. The impact of PM_{2.5} on the human respiratory system. *J Thorac Dis*. 2016; 8(1): E69-E74.
- 34-Frew AJ, Salvi SS. Diesel exhaust particles and respiratory allergy. *Clinical and Experimental Allergy*. 1997, 27: 237-9.
- 35- Salvi SS, Frew A, Holgate S. Is diesel exhaust a cause for increasing allergies? *Clinical and Experimental Allergy*. 1999; 29: 4-8.

4 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a inalação de material particulado fino (MP_{2,5}) provoca inflamação pulmonar, exacerba a inflamação periodontal crônica, resultando em extenso infiltrado inflamatório linfocitário e perda óssea alveolar mais severa. No entanto, trinta ou sessenta dias de inalação de concentrado de partículas ambientais não influenciaram no metabolismo dos tecidos periodontais na ausência de inflamação concomitante.

REFERÊNCIAS*

1. Manisalidis I, Stavropoulou E, Stavropoulos A, Bezirtzoglou E. Environmental and health impacts of air pollution: a review. *Front Public Health*. 2020; 8: 14.
2. Anderson TR, Hawkins E, Jones PD. CO₂, the greenhouse effect and global warming: from the pioneering work of Arrhenius and Callendar to today's Earth System Models. *Endeavour*. 2016; 40(3): 178-87.
3. Çelikler D, Kara F. Determining the misconceptions of pre-service chemistry and biology teachers about the greenhouse effect. *Procedia Soc Behav Sci*. 2011; 15: 2463–70.
4. Ukaogo PO, Ewuzie U, Onwuka CV. 21 - Environmental pollution: causes, effects, and the remedies. In: Chowdhary P, Raj A, Verma D, Akhter Y. *Microorganisms for sustainable environment and health*. Amsterdam: Elsevier; 2020. p. 419-29.
5. Landrigan PJ, Fuller R, Acosta NJR, Adeyi O, Arnold R, Basu NN et al. The Lancet Commission on pollution and health. *Lancet*. 2018; 391(10119): 462-512.
6. World Health Organization: Ambient (outdoor) air pollution. Genebra: WHO; 2021. [acesso 2021 set 24]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health);
7. Bondy SC, Campbell A. Water quality and brain function. *Int J Environ Res Public Health*. 2017; 15(1): 2.
8. Kelly FJ, Fussell JC. Air pollution and public health: emerging hazards and improved understanding of risk. *Environ Geochem Health*. 2015; 37(4): 631-49.
9. Moshhammer H, Poteser M, Kundi M, Lemmerer K, Weitensfelder L, Wallner P et al. Nitrogen-dioxide remains a valid air quality indicator. *Int J Environ Res Public Health*. 2020; 17(10): 3733.
10. Cao X, Tian Y, Shen Y, Wu T, Li R, Liu X et al. Emission variations of primary air pollutants from highway vehicles and implications during the COVID-19 pandemic in Beijing, China. *Int J Environ Res Public Health*. 2021; 18(8): 4019.
11. Dockery DW. Health effects of particulate air pollution. *Ann Epidemiol*. 2009; 19(4) :257-63.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

12. Air Quality Guidelines, Global Update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. World Health Organization. Copenhagen, 2005;
13. Atkinson RW, Butland BK, Anderson HR, Maynard RL. Long-term concentrations of nitrogen dioxide and mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Epidemiology*. 2018; 29(4): 460-72.
14. Vieira-Filho M, Lehmann CMB, Fornaro A. Influence of local sources and topography on air quality and rainwater composition in Cubatão and São Paulo, Brazil. *Atmospheric Environment*. 2015; 101: 200-8.
15. Borge R, Requía WJ, Yagüe C, Jhun I, Koutrakis P. Impact of weather changes on air quality and related mortality in Spain over a 25 year period [1993-2017]. *Environ Int*. 2019; 133(Pt B): 105272.
16. Guo LC, Zhang Y, Lin H, Zeng W, Liu T, Xiao J et al. The washout effects of rainfall on atmospheric particulate pollution in two Chinese cities. *Environ Pollut*. 2016; 215: 195-202.
17. De Brito JM, Macchione M, Yoshizaki K, Toledo-Arruda AC, Saraiva-Romanholo BM, Andrade MF et al. Acute cardiopulmonary effects induced by the inhalation of concentrated ambient particles during seasonal variation in the city of São Paulo. *J Appl Physiol*. 2014; 117(5): 492-9.
18. Elperin T, Fominykh A, Krasovitev B, Vikhansky A. Effect of rain scavenging on altitudinal distribution of soluble gaseous pollutants in the atmosphere. *Atmospheric Environment*. 2010; 45. doi:10.1016/j.atmosenv.2011.02.008;
19. Coccia M. How do low wind speeds and high levels of air pollution support the spread of COVID-19? *Atmos Pollut Res*. 2021; 12(1): 437-45.
20. Trinh TT, Trinh TT, Le TT, Nguyen TDH, Tu BM. Temperature inversion and air pollution relationship, and its effects on human health in Hanoi City, Vietnam. *Environ Geochem Health*. 2019; 41(2): 929-37.
21. Hou P, Wu S. Long-term changes in extreme air pollution meteorology and the implications for air quality. *Sci Rep*. 2016; 6: 23792.
22. Logan WP. Mortality in the London fog incident, 1952. *Lancet*. 1953; 1(6755): 336-8.
23. Cisneros R, Brown P, Cameron L, Gaab E, Gonzalez M, Ramondt S et al. Understanding public views about air quality and air pollution sources in the San Joaquin Valley, California. *J Environ Public Health*. 2017; 2017: 4535142.
24. Sierra-Vargas MP, Guzman-Grenfell AM, Blanco-Jimenez S et al. Airborne particulate matter PM_{2.5} from Mexico City affects the generation of reactive oxygen species by blood neutrophils from asthmatics: an in vitro approach. *J Occup Med Toxicol*. 2009; 4: 17.

25. Li C, Fang D, Xu D, Wang B, Zhao S, Yan S et al. Main air pollutants and diabetes-associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2014; 171(5): R183-90.
26. Timmerman T, de Brito JM, de Almeida NM, de Almeida FM, Arantes-Costa FM, Guimarães ET et al. Inflammatory and functional responses after (bio) diesel exhaust exposure in allergic sensitized mice. A comparison between diesel and biodiesel. *Environmental Pollution*. 2019; 253: 667–79.
27. De Brito JM, Mauad T, Cavaleiro GF, Yoshizaki K, de André PA, Lichtenfels AJFC et al. Acute exposure to diesel and sewage biodiesel exhaust causes pulmonary and systemic inflammation in mice. *Sci Total Environ*. 2018; 628-29:1223-33.
28. Akopian AN, Fanick ER, Brooks EG. TRP channels and traffic-related environmental pollution-induced pulmonary disease. *Semin Immunopathol*. 2016(3): 331-8.
29. Pizzorno J, Crinnion W. Particulate matter is a surprisingly common contributor to disease. *Integr Med (Encinitas)*. 2017; 16(4): 8-12;
30. Kim KH, Kabir E, Kabir S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ Int*. 2015 ;74: 136-43.
31. Babadjouni RM, Hodis DM, Radwanski R, Durazo R, Patel A, Liu Q et al. Clinical effects of air pollution on the central nervous system; a review. *J Clin Neurosci*. 2017; 43: 16-24.
32. Pei Y, Jiang R, Zou Y, Wang Y, Zhang S, Wang G et al. Effects of fine particulate matter (PM_{2.5}) on systemic oxidative stress and cardiac function in ApoE(-/-) mice. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13(5): 484.
33. Liang R, Zhang B, Zhao X, Ruan Y, Lian H, Fan Z. Effect of exposure to PM_{2.5} on blood pressure: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2014; 32(11): 2130-40.
34. Harrison RM, Yin J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? *Sci Total Environ*. 2000; 249(1-3): 85-101.
35. Dehghan A, Khanjani N, Bahrampour A, Goudarzi G, Yunesian M. The relation between air pollution and respiratory deaths in Tehran, Iran- using generalized additive models. *BMC Pulmonary Medicine*. 2018; 18(1): 1–9.
36. Wei Y, Zhang JJ, Li Z, Gow A, Chung KF, Hu M et al. Chronic exposure to air pollution particles increases the risk of obesity and metabolic syndrome: findings from a natural experiment in Beijing. *FASEB J*. 2016 Jun; 30(6): 2115-22.

37. Lasagni Vitar RM, Hvozda Arana AG, Janezic NS, Marchini T, Tau J, Martinefski M et al. Urban air pollution induces redox imbalance and epithelium hyperplasia in mice cornea. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2019; 384: 114770.
38. Yang HM, Ma JY, Castranova V, Ma JK. Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res.* 1997; 23(3): 269-84.
39. Li W, Wilker EH, Dorans KS, Rice MB, Schwartz J, Coull BA et al. Short-term exposure to air pollution and biomarkers of oxidative stress: the Framingham heart study. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5(5): e002742.
40. Prada D, Zhong J, Colicino E, Zanobetti A, Schwartz J, Dagincourt N et al. Association of air particulate pollution with bone loss over time and bone fracture risk: analysis of data from two independent studies. *Lancet Planet Health.* 2017; 1(8): e337-e347.
41. Peters A, Nawrot TS, Baccarelli AA. Hallmarks of environmental insults. *Cell.* 2021; 184(6): 1455-68.
42. Rao X, Zhong J, Brook RD, Rajagopalan S. Effect of particulate matter air pollution on cardiovascular oxidative stress pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2018; 28(9): 797-818.
43. Shao J, Wang Z, Yang T, Ying H, Zhang Y, Liu S. Bone regulates glucose metabolism as an endocrine organ through osteocalcin. *Int J Endocrinol.* 2015; 2015: 967673.
44. Chuang KJ, Chan CC, Su TC, Lee CT, Tang CS. The effect of urban air pollution on inflammation, oxidative stress, coagulation, and autonomic dysfunction in young adults. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(4): 370-6.
45. Chu YH, Kao SW, Tantoh DM, Ko PC, Lan SJ, Liaw YP. Association between fine particulate matter and oral cancer among Taiwanese men. *J Investig Med.* 2019; 67(1): 34-8.
46. Wu W, Jin Y, Carlsten C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter. *J Allergy Clin Immunol.* 2018; 141(3): 833-44.
47. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M et al. Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8416763.
48. Lodovici M, Bigagli E. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol.* 2011; 2011: 487074.
49. Dupré-Crochet S, Erard M, Nüße O. ROS production in phagocytes: why, when, and where? *J Leukoc Biol.* 2013; 94(4): 657-70.
50. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000; 109(1): 33-44.

51. Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020; 21(7): 363-83.
52. Davies MJ, Hawkins CL. The role of myeloperoxidase in biomolecule modification, chronic inflammation, and disease. *Antioxid Redox Signal.* 2020; 32(13): 957-81.
53. Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys.* 2018; 640: 47-52.
54. Gomes DA, Pires JR, Zuza EP, Muscara MN, Herrera BS, Spolidorio LC et al. Myeloperoxidase as inflammatory marker of periodontal disease: experimental study in rats. *Immunol Invest.* 2009; 38(2): 117-22.
55. Aztatzi-Aguilar OG, Uribe-Ramírez M, Arias-Montaña JA, Barbier O, De Vizcaya-Ruiz A. Acute and subchronic exposure to air particulate matter induces expression of angiotensin and bradykinin-related genes in the lungs and heart: angiotensin-II type-I receptor as a molecular target of particulate matter exposure. *Part Fibre Toxicol.* 2015; 12: 17.
56. Li C, Fang D, Xu D, Wang B, Zhao S, Yan S et al. Main air pollutants and diabetes-associated mortality: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol.* 2014; 171(5): R183-90.
57. Montes-Nieto R, Insenser M, Murri M, Fernández-Durán E, Ojeda-Ojeda M, Martínez-García MA et al. Plasma thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in young adults: obesity increases fasting levels only in men whereas glucose ingestion, and not protein or lipid intake, increases postprandial concentrations regardless of sex and obesity. *Mol Nutr Food Res.* 2017; 61(11). doi: 10.1002/mnfr.201700425;
58. Tsai MC, Huang TL. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) is a state biomarker of oxidative stress in bipolar patients in a manic phase. *J Affect Disord.* 2015; 173: 22-6.
59. Carvalho JS, Ramadan D, Gonçalves VP, Maquera-Huacho PM, Assis RP, Lima TFO et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. *Food & Function.* 2021; 12: 5007-17.
60. Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. *Front Physiol.* 2017; 8: 910.
61. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(7): 1126-67.
62. Liu Y, Yan S, Poh K, Liu S, Iyoriobhe E, Sterling DA. Impact of air quality guidelines on COPD sufferers. *International Journal of COPD.* 2016; 11(1): 839–72.

63. Limaye VS, Knowlton K, Sarkar S, Ganguly PS, Pingle S, Dutta P et al. Development of ahmedabad's air information and response (air) plan to protect public health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2018; 15(7).
64. Ghio AJ, Smith CB, Madden MC. Diesel exhaust particles and airway inflammation. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2012; 18(2): 144–50.
65. Gruzieva O, Merid SK, Gref A, Gajulapuri A, Lemonnier N, Ballereau S et al. Exposure to traffic-related air pollution and serum inflammatory cytokines in children. *Environ Health Perspect*. 2017; 125(6): 067007.
66. Tsai DH, Amyai N, Marques-Vidal P et al. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Part Fibre Toxicol*. 2012; 9: 24.
67. Thompson AM, Zanobetti A, Silverman F, Schwartz J, Coull B, Urch B et al. Baseline repeated measures from controlled human exposure studies: associations between ambient air pollution exposure and the systemic inflammatory biomarkers IL-6 and fibrinogen. *Environ Health Perspect*. 2010; 118(1): 120-4.
68. Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM₁₀). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(5): 826-30.
69. Gao N, Xu W, Ji J, Yang Y, Wang ST, Wang J et al. Lung function and systemic inflammation associated with short-term air pollution exposure in chronic obstructive pulmonary disease patients in Beijing, China. *Environ Health*. 2020; 19(1): 12.
70. Frew AJ, Salvi SS. Diesel exhaust particles and respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*. 1997; 27(3): 237-9;
71. Salvi SS, Frew A, Holgate S. Is diesel exhaust a cause for increasing allergies? *Clinical and Experimental Allergy*. 1999; 29: 4-8;
72. Prada D, López G, Solleiro-Villavicencio H, Garcia-Cuellar C, Baccarelli AA. Molecular and cellular mechanisms linking air pollution and bone damage. *Environ Res*. 2020; 185: 109465.
73. Saha H, Mukherjee B, Bindhani B, Ray MR. Changes in RANKL and osteoprotegerin expression after chronic exposure to indoor air pollution as a result of cooking with biomass fuel. *J Appl Toxicol*. 2016; 36(7): 969-76.
74. Liu C, Fuertes E, Flexeder C, Hofbauer LC, Berdel D, Hoffmann B et al. Associations between ambient air pollution and bone turnover markers in 10-year old children: results from the GINIplus and LISAplus studies. *Int J Hyg Environ Health*. 2015; 218(1): 58-65.

75. Moser SC, van der Eerden BCJ. Osteocalcin - a versatile bone-derived hormone. *Front Endocrinol*. 2019; 9: 794.
76. Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*. 2016; 82: 42-9.
77. Udagawa N. Mechanisms involved in bone resorption. *Biogerontology*. 2002; 3(1-2): 79-83.
78. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000; 289(5484): 1504-8.
79. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1: S159-S172.
80. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *J Periodontol*. 2018; 89 Suppl 1: S173-S182.
81. Steffens JP, Marcantonio RAC. Classificação das doenças e condições periodontais e peri-implantares 2018: guia Prático e pontos-chave. *Rev Odontol UNESP*. 2018; 47(4): 189-97.
82. Ramadan DE, Hariyani N, Indrawati R, Ridwan RD, Diyatri I. Cytokines and chemokines in periodontitis. *Eur J Dent*. 2020; 14(3): 483-95.
83. Nazir MA. Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2017; 11(2): 72-80;
84. World Health Organization: Oral health. Geneva: WHO; 2021. [acesso 2021 set 24]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>;
85. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*. 1998; 25(2): 134-44.
86. Nie L, Cai SY, Shao JZ, Chen J. Toll-like receptors, associated biological roles, and signaling networks in non-mammals. *Front Immunol*. 2018; 9: 1523.
87. Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2014; 64(1): 57-80.
88. Graves DT, Li J, Cochran DL. Critical review in oral biology & medicine: inflammation and uncoupling as mechanisms of periodontal bone loss. *J Dent Res*. 2011; 90: 143-53.

89. Kinane DF, Preshaw PM, Loos BG. Host-response: understanding the cellular and molecular mechanisms of host-microbial interactions - consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011; 38: 44–8.
90. Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*. 2015; 67(3): 145-59.
91. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Dis*. 2004; 10(6): 311-8.
92. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013; 62(1): 59-94.
93. Trinh TT, Trinh TT, Le TT, Nguyen TDH, Tu BM. Temperature inversion and air pollution relationship, and its effects on human health in Hanoi City, Vietnam. *Environ Geochem Health*. 2019; 41(2): 929-37.
94. Van Dyke TE, van Winkelhoff AJ. Infection and inflammatory mechanisms. *J Clin Periodontol*. 2013; 40 Suppl 14: S1-7.

APÊNDICE A – MATERIAL E MÉTODOS

Animais

O protocolo experimental proposto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São Paulo (CEUA – FMUSP – protocolo de pesquisa número 1528/2020). Foram utilizados 80 (oitenta) camundongos (*Mus musculus*) isogênicos da linhagem BALB/c padrão sanitário do tipo *Specific Pathogen Free (SPF)*, com 4 semanas de idade, procedentes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), sendo divididos em 8 grupos experimentais. Os camundongos foram mantidos no biotério do Laboratório de Poluição Ambiental e Experimental (LPAE – LIM 5) da Faculdade de Medicina de São Paulo (USP), sob temperatura de 21 ± 1 °C, umidade de 65%-75% e ciclos de luz controlado (12h claro - 12h escuro), de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com padrões éticos que cumprem as recomendações da *ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments)*. Os animais foram divididos em caixas (Mini Isolador Ventilife, Alesco ALBR Indústria e Comércio Ltda., Monte Mor, Brasil), disponibilizando um total de 5 (cinco) animais cada, de acordo com a recomendação da CEUA-FMUSP. As caixas (mini isoladores) possuíam tampas com filtros, que evitam a entrada de partículas que, eventualmente, poderiam chegar às vias aéreas dos animais e interferirem na execução do experimento. As caixas ficavam acopladas a um sistema de ventilação de ar (Ventilife, Alesco ALBR Indústria e Comércio Ltda., Monte Mor, Brasil), que impedia a inalação de gases tóxicos, removia a umidade, odores e micro-organismos, reduzia o estresse e proporcionava trocas de ar controladas (40 trocas por minuto - insuflação de ar controlada por filtros e exaustão por calhas dispostas nos mini isoladores). Água e ração padrão foram disponibilizados *ad libitum*. O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nos dados histomorfométricos de estudos com desenho experimental semelhante a de Paiva Gonçalves *et al.*¹ (2018). Foi verificada a diferença mínima entre as médias dos dados histomorfométricos de 16,42% com desvio padrão aproximado de 8,00. Portanto, ao se aplicar o teste ANOVA levando-se em consideração um poder β do estudo de 0,8 e o poder α de 0,05, determinou-se uma amostra mínima de 7 animais por grupo. Entretanto, devido à possibilidade de eventuais perdas dos animais, foram utilizados 3 animais a mais por grupo. Os

períodos experimentais definidos foram 30 e 60 dias, visando possibilitar a investigação da interferência do MP_{2,5} em dois momentos distintos: durante a presença de processo inflamatório crônico periodontal e após a retirada do estímulo (resolução da inflamação). Todos os animais foram levados, 1 vez ao dia, 5 dias por semana, ao concentrador de partículas ambientais, sendo os animais de quatro grupos expostos ao ar filtrado e os demais, expostos ao concentrado de partículas ambientais (CPA). Durante o período experimental, metade dos animais foi submetida ao protocolo de indução de inflamação periodontal, por meio de injeção de lipopolissacarídeos, concomitantemente à exposição ao ar filtrado ou poluído. As injeções de LPS foram realizadas durante as quatro primeiras semanas do experimento, correspondendo a todo o período experimental estipulado para os camundongos destinados ao protocolo de 30 dias e metade do estabelecido para os animais do protocolo de 60 dias. Sinais clínicos, como apatia, fraqueza, anorexia e peso dos animais foram observados durante todo período experimental. Os animais foram pesados uma vez por semana para determinar o ganho de massa corporal, calculado pela diferença entre o peso final e o peso inicial. Após os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados por meio de aprofundamento anestésico por isoflurano (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda., Itatiaia, RJ, Brasil). A disposição dos animais em seus respectivos grupos experimentais foi disponibilizada no Quadro 1.

Quadro 1 - Distribuição dos animais por grupo, de acordo com os protocolos experimentais

Grupos (n=10/grupo)	Inflamação Periodontal	Exposição Diária	Período de Exposição
G1 (AF30)	Não	Ar Filtrado	30 Dias
G2 (AP30)	Não	Ar Poluído	30 Dias
G3 (AF30 + LPS)	Sim	Ar Filtrado	30 Dias
G4 (AP30 +LPS)	Sim	Ar Poluído	30 Dias
G5 (AF60)	Não	Ar Filtrado	60 Dias
G6 (AP60)	Não	Ar Poluído	60 Dias
G7 (AF60 + LPS)	Sim	Ar Filtrado	60 Dias
G8 (AP60 + LPS)	Sim	Ar Poluído	60 Dias

Inflamação Periodontal: indução de periodontite experimental por injeção de LPS nos primeiros 30 dias. Exposição: exposição diária dos animais ao ar filtrado (AF) ou ar poluído (AP).

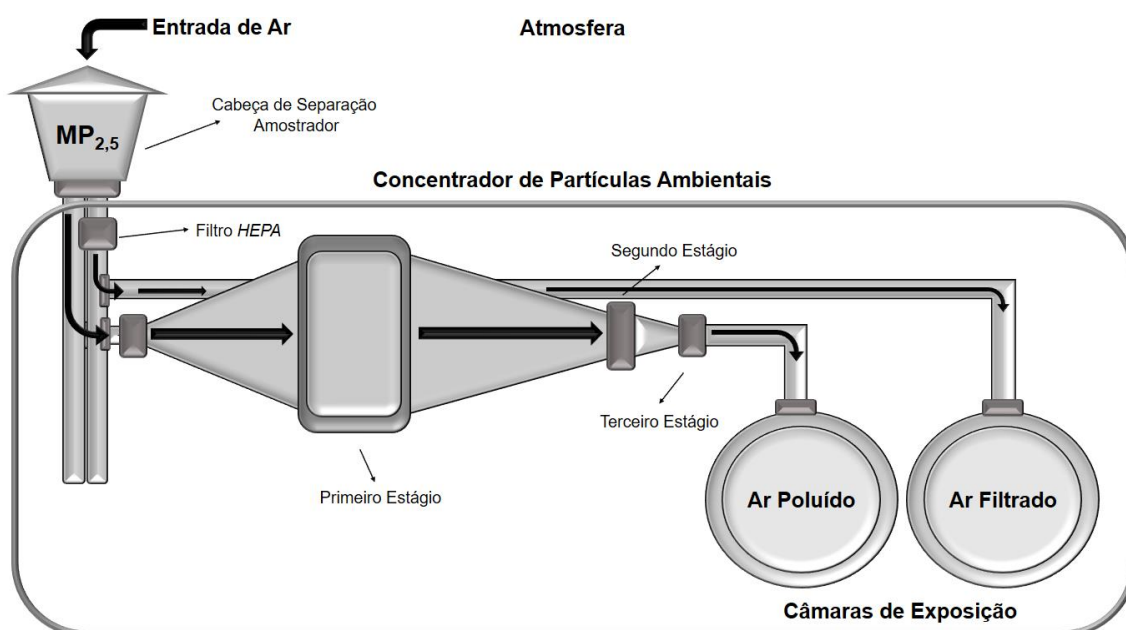
Fonte: Elaboração própria.

Sistema de exposição ao concentrado de partículas ambientais

Estudos prévios²⁻⁶ preconizam a utilização do concentrador de partículas ambientais, aparelho instalado na Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP) e desenvolvido pela Universidade de Harvard, para simular condições controladas de exposição ao material particulado. Sioutas *et al.* (1995; 1997)^{7,8} elaboraram um sistema de emissão de partículas finas (0,15 μm a 2,5 μm), que mimetiza dos efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde humana. O equipamento proporciona condições para estudar os efeitos da poluição atmosférica sobre diversos tecidos e células de vários tipos de animais de laboratório. Resumidamente, o concentrador opera através da sucção de ar atmosférico, por intermédio de um sistema composto por bombas à vácuo e filtros, visando a liberação de ar poluído e ar filtrado em duas câmaras de inalação (câmaras “suja” e “limpa”, respectivamente), instaladas imediatamente após o último estágio do concentrador. Devido à captação do próprio ar atmosférico metropolitano, os resultados obtidos em experimentos realizados através de exposições animais ao concentrador são mais fidedignos ao que é usualmente encontrado nas grandes cidades. A localização do aparelho (23°33'16.7"S 46°40'20.7"W), próxima à intersecção de duas vias de intenso tráfego

de veículos da cidade de São Paulo, permite a captação de grandes quantidades de material particulado e demais poluentes, emitidos, principalmente, pela combustão e exaustão de combustíveis fósseis. O aerossol é submetido a uma série de filtros que removem quaisquer partículas com diâmetro superior a $2,5 \mu\text{m}$, permitindo a concentração das partículas restantes através da passagem por três impactadores virtuais (vazão de ar captada de 5.000 L min^{-1} reduzida a 40 L min^{-1}) e a liberação deste concentrado nas câmaras de inalação⁹. Nas câmaras, os animais ficam alojados durante um período de tempo previamente calculado, suficiente para atingir a concentração diária pré-determinada. É importante salientar que o concentrador de partículas ambientais mantém as características físico-químicas do material particulado em suspensão. O concentrador de partículas ambientais foi esquematizado na Figura 1.

Figura 1- Ilustração esquemática do concentrador de partículas ambientais da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP)



O ar atmosférico é capturado e levado para o interior do concentrador, onde uma série de três impactadores virtuais concentram o material particulado fino e o despejam na câmara “suja” (ar poluído). O ar atmosférico, filtrado, direciona-se à câmara “limpa” (sem poluição), nas mesmas condições de pressão, fluxo e temperatura da câmara poluída.

Fonte: Elaboração própria.

Foram realizadas 5 exposições semanais dos camundongos ao concentrado atmosférico, com dose pré-determinada de $\text{MP}_{2,5}$ igual a $600 \mu\text{g/m}^3$, durante período

de 30 ou 60 dias (Quadro 1). Esta concentração representa a dose acumulada de poluentes a qual a população de São Paulo está exposta diariamente^{2,6,10}. Os animais não expostos à poluição receberam ar filtrado simultaneamente à exposição aos poluentes, com as mesmas condições experimentais. Considerando o fator de concentração médio de partículas, estipulado a partir dos estudos iniciais sobre o concentrador, calcula-se o tempo necessário para que a exposição atinja a concentração predefinida. O fator de concentração médio considerado para o experimento foi 20. Por meio de análises da qualidade do ar, realizadas de hora em hora pela CETESB, é possível obter dados sobre a concentração de diversos poluentes atmosféricos distribuídos na região onde o aparelho encontra-se, além dos parâmetros meteorológicos, dados fundamentais para o acionamento seguro do sistema. Outra fonte para obtenção de dados sobre as taxas de material particulado é através da utilização de um centro de monitoramento de dados (DataRAM 4, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA), o qual permite o acompanhamento em tempo real, durante as exposições. A partir de dados fornecidos pelas estações de monitoramento da CETESB, realizou-se um cálculo para definir o tempo necessário para obter-se a exposição à concentração diária de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$. O cálculo é realizado através da fórmula abaixo:

$$T = \frac{CF}{FC \times CH}$$

T = tempo (horas);

CF = concentração final ($\text{MP}_{2,5}$ $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$);

FC = fator de concentração médio do concentrador;

CH = concentração local horária ($\text{MP}_{2,5}$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Através do monitoramento em tempo real, também é possível realizar o cálculo da taxa de concentração⁹, utilizando-se a fórmula abaixo:

$$TC = \frac{CC}{CE}$$

TC = taxa de concentração (%);

CC = concentração na câmara suja ($\text{MP}_{2,5}$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$);

CE = concentração externa ($\text{MP}_{2,5}$ $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Com estes valores, disponibiliza-se outro cálculo para definição do tempo de exposição diário⁹:

$$T = [CA/CC] \times 60 \text{ minutos}$$

T = tempo de exposição (horas);

CA = exposição dos animais ($MP_{2,5}$ 600 $\mu g/m^3$);

CC = concentração dentro das câmaras ($MP_{2,5}$ $\mu g/m^3$).

Outro fator que deve ser analisado é a umidade relativa do ar, bem como as condições meteorológicas gerais. Uma vez que o concentrador capta partículas atmosféricas, capta também gotículas de água. Horários de umidade relativa do ar acima de 75% impedem o correto funcionamento do aparelho. Outro fator limitante do concentrador é a dificuldade de uso em períodos de chuva, devido à diminuição das quantidades de poluentes atmosféricos^{6,11,12}. Portanto, decidiu-se executar o experimento no mês de junho, época de menor volume de chuvas em São Paulo. Em decorrência do período de quarentena generalizada em resposta à pandemia de COVID-19, optou-se também por evitar períodos de maior isolamento social, uma vez que a diminuição no uso de transportes motorizados acarreta em menor liberação de poluentes na atmosfera e inviabiliza a exposição dos animais. As exposições foram realizadas nos períodos do dia com maiores concentrações de $MP_{2,5}$ atmosférico (a partir das 12h), com umidade relativa do ar favorável (abaixo de 75%). A média dos picos de concentração de $MP_{2,5}$ e demais poluentes, bem como a média da umidade relativa do ar e temperatura, durante o período experimental, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização dos principais poluentes e condições climáticas do ar ambiente no local das exposições

Parâmetro	Média	Desvio-Padrão	Recomendação
MP ₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	40	17	45 (média 24h)
MP _{2,5} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	22	9	15 (média 24h)
CO (ppm)	0,46	0,05	9 (média 8h)
NO ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	21	4	-
NO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	41	4	25 (média 24h)
SO ₂ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	3	0,5	40 (média 24h)
O ₃ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	48	16	100 (média 8h)
Temperatura (°C)	23	3	-
Umidade Relativa do Ar (%)	47	14	-

MP₁₀: partículas com diâmetro entre 10 μm e 2,5 μm . MP_{2,5}: material particulado fino. CO: monóxido de carbono. NO: monóxido de nitrogênio. NO₂: dióxido de nitrogênio. SO₂: dióxido de enxofre. O₃: ozônio. Recomendação: valores máximos recomendados pela OMS e EPA, considerando médias diárias (24h) ou de 8 horas máximas por dia (CO e O₃).

Fonte: CETESB¹³ (Estação de Medição Parque Dom Pedro II, São Paulo).

Indução de periodontite experimental

Quarenta (40) camundongos foram anestesiados por isoflurano (Instituto BioChimico Indústria Farmacêutica Ltda., Itatiaia, Brasil) 1%-4% em 100% de oxigênio em uma câmara de poliacrílico transparente. Após 15 minutos, foram transferidos para fora da câmara e mantidos anestesiados por meio de máscara respiratória, a fim de minimizar o estresse dos animais^{14,15}. Após a anestesia, foram realizadas microinjeções de 3 μL da solução contendo 10 mg/mL de lipopolissacarídeos obtidos de culturas de *Escherichia coli* (*E. coli* O111:B4, Merck/Millipore Sigma, Burlington, EUA) no tecido gengival adjacente a face palatina dos primeiros molares maxilares. Este procedimento foi realizado 3 vezes por semana, durante 4 semanas por um único operador treinado. O protocolo escolhido foi fortemente consolidado e embasado pela literatura científica¹⁶⁻¹⁹. As injeções foram realizadas utilizando microseringas Hamilton (Microliter Syringe, Hamilton Company Inc., Reno, EUA) e agulhas *gauge* 33, seguindo protocolo estabelecido por Lopes *et al.* (2017)¹⁹. Com a injeção de LPS, houve um reconhecimento deste fator via células inflamatórias, que resultou numa cascata de eventos inflamatórios,

mediados por citocinas pró-inflamatórias. Este processo ocasionou resposta tecidual contrária ao estímulo, induzindo assim a doença periodontal. Os animais de dois grupos não foram submetidos a nenhuma intervenção na cavidade oral, com a finalidade de serem utilizados como controle. (Quadro 1).

Eutanásia e coleta das amostras

No fim dos períodos experimentais (30º ou 60º dia), os animais foram submetidos a anestesia inalatória por meio de isoflurano, permitindo a realização da eutanásia por aprofundamento anestésico, conforme recomendado pela CEUA - FMUSP. Após certificada a morte do animal, foi realizada remoção dos maxilares e pulmões. As maxilas foram divididas em hemi-arcadas e foram armazenadas em paraformaldeído 4% (em álcool 70%, após período de 48h) para realização de análises microscópicas. Os pulmões também foram fixados em paraformaldeído 4% e álcool 70%, posteriormente.

Análise microscópica dos tecidos periodontais e pulmões

Os maxilares foram descalcificados em solução de *EDTA* (pH 7,2), por 4 semanas, e incluídos em parafina com orientação padrão para obtenção de cortes semi-seriados de 5 µm de espessura na direção vestibulo-lingual. Os cortes histológicos foram montados em lâminas de vidro e corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H&E). Um único patologista experiente e devidamente treinado realizou a análise microscópica descritiva da região de interesse padronizada, uma área marginal secundária nas superfícies palatina, representando o tecido conjuntivo subjacente ao sulco gengival e o osso alveolar, permitindo avaliação de atividade osteoclástica, alterações no ligamento periodontal e cemento. As seguintes figuras foram observadas: células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares), células fusiformes (fibroblastos), matriz extracelular e vasos sanguíneos.

Os cortes de pulmão foram obtidos pela mesma técnica de processamento histológico, excetuando-se a descalcificação por *EDTA*. Um único examinador devidamente calibrado realizou a análise descritiva da microestrutura pulmonar, investigando alterações nos bronquíolos e alvéolos pulmonares, além da presença de processo inflamatório pulmonar e demais achados pertinentes ao estudo.

REFERÊNCIAS

1. De Paiva Gonçalves V, Ortega AAC, Steffens JP, Spolidorio DMP, Rossa C, Spolidorio LC. Long-term testosterone depletion attenuates inflammatory bone resorption in the ligature-induced periodontal disease model. *J Periodontol*. 2018; 89(4): 466-75.
2. Di Domenico M, Benevenuto SGM, Tomasini PP, Yariwake VY, de Oliveira Alves N, Rahmeier FL et al. Concentrated ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) exposure induce brain damage in pre and postnatal exposed mice. *Neurotoxicology*. 2020; 79: 127-41.
3. Lopes TBM, Groth EE, Veras M, Furuya TK, de Souza Xavier Costa N et al. Pre- and postnatal exposure of mice to concentrated urban PM_{2.5} decreases the number of alveoli and leads to altered lung function at an early stage of life. *Environ Pollut*. 2018; 241: 511-20.
4. Yoshizaki K, Fuziwara CS, de Brito JM, Santos TMN, Kimura ET, Correia AT et al. The effects of urban particulate matter on the nasal epithelium by gender: An experimental study in mice. *Environ Pollut*. 2016; 213: 359-69.
5. De Oliveira AAF, de Oliveira TF, Dias MF, Medeiros MHG, Di Mascio P, Veras M et al. Genotoxic and epigenotoxic effects in mice exposed to concentrated ambient fine particulate matter (PM_{2.5}) from São Paulo city, Brazil. *Part Fibre Toxicol*. 2018; 15(1): 40.
6. De Brito JM, Macchione M, Yoshizaki K, Toledo-Arruda AC, Saraiva-Romanholo BM, Andrade MF et al. Acute cardiopulmonary effects induced by the inhalation of concentrated ambient particles during seasonal variation in the city of São Paulo. *J Appl Physiol*. 2014; 117(5): 492-9.
7. Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect*. 1995; 103(2): 172-7.
8. Sioutas C, Koutrakis P, Godleski JJ, Ferguson ST, Kim CS, Burton RM. Fine particle concentrators for inhalation exposures – effect of particle size and composition. *Journal of Aerosol Science*. 1997; 28(6): 1057-71.
9. Veras MM. Manual de Operação – Concentrador de Partículas Ambientais (CPA). INAIRA - Instituto Nacional de Avaliação Integrada de Risco Ambiental. São Paulo, 2011.
10. Andreão WL, Albuquerque TTA, Kumar P. Excess deaths associated with fine particulate matter in Brazilian cities. *Atmospheric Environment*. 2018; 194: 71-81.
11. Borge R, Requía WJ, Yagüe C, Jhun I, Koutrakis P. Impact of weather changes on air quality and related mortality in Spain over a 25 year period [1993-2017]. *Environ Int*. 2019; 133(Pt B): 105272.

12. Guo LC, Zhang Y, Lin H, Zeng W, Liu T, Xiao J et al. The washout effects of rainfall on atmospheric particulate pollution in two Chinese cities. *Environ Pollut.* 2016; 215: 195-202.
13. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo: Qualidade do Ar. CETESB; 2021. [acesso 2021 ago 25]. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/ar/qualar/>.
14. Boivin GP, Bottomley MA, Schiml PA, Goss L, Grobe N. Physiologic, behavioral, and histologic responses to various euthanasia methods in C57BL/6NTac male mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2017 Jan 1; 56(1): 69-78;
15. Miao H, Dong Y, Zhang Y, Zheng H, Shen Y, Crosby G et al. Anesthetic isoflurane or desflurane plus surgery differently affects cognitive function in Alzheimer's disease transgenic mice. *Mol Neurobiol.* 2017: 1–16. doi:10.1007/s12035-017-0787-9;
16. Souza JAC, Nogueira AVB, Souza PPC, Oliveira GJPL, Medeiros MC, Garlet GP, Cirelli JA, Rossa C Junior. Suppressor of cytokine signaling 1 expression during LPS-induced inflammation and bone loss in rats. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e75.
17. Guimarães MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa C Jr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. *Innate Immun.* 2012; 18(1): 155-63.
18. Aquino SG, Guimaraes MR, Stach-Machado DR, da Silva JA, Spolidorio LC, Rossa C Jr. Differential regulation of MMP-13 expression in two models of experimentally induced periodontal disease in rats. *Arch Oral Biol.* 2009; 54(7): 609-17.
19. Lopes DEM, Jabr CL, Dejani NN, Saraiva AC, de Aquino SG, Medeiros AI et al. Inhibition of 5-lipoxygenase (5-Lo) attenuates Inflammation and bone resorption in lipopolysaccharide (LPS)-induced periodontal disease. *J Periodontol.* 2017: 1–18. doi:10.1902/jop.2017.170210.

ANEXO A – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA – FMUSP / PROTOCOLO 1528/2020)



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455
Pacaembu – São Paulo – SP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificamos que a proposta intitulada "Correlação do Material Particulado Associado à Exaustão e Combustão do Diesel no Desenvolvimento da Doença Periodontal em Camundongos" registrada com o nº 1528/2020, sob a responsabilidade de Thais Mauad e Álvaro Formoso Pelegrin, apresentada pelo Departamento de Patologia - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP em 02/09/2020

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início: 01-08-2020 Término: 30-11-2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Balb/c NUDE
Nº de animais	60
Peso/Idade	4 semanas
Sexo	machos
Origem	Biotério FMUSP

A CEUA FMUSP solicita que ao final da pesquisa seja enviado Relatório com todas as atividades.

CEUA-FMUSP, 02 de setembro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br



A CEUA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 15/10/2020, **APROVOU** o documento abaixo mencionado para o protocolo de pesquisa nº 1528/2020 intitulado "Correlação do Material Particulado Associado à Exaustão e Combustão do Diesel no Desenvolvimento da Doença Periodontal em Camundongos" apresentado pelo Departamento de Patologia.

- Substituição da linhagem dos animais, de Balb/c NUDE para **BALB/C SPF**;
- Acréscimo de 80 Camundongos Balb/c machos, com 4 semanas

CEUA-FMUSP, 15 de outubro de 2020

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B – APROVAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (RELATÓRIO PARCIAL)



A **CEUA** da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 17/11/2021 **APROVOU o documento** abaixo mencionado para o protocolo CEUA nº **1528/2020** intitulado "Correlação do Material Particulado Associado à Exaustão e Combustão do Diesel no Desenvolvimento da Doença Periodontal em Camundongos" **apresentado** pelo Departamento de Patologia.

- Mudança de título para "Correlação de partículas ambientais concentradas no desenvolvimento da doença periodontal em camundongos"
- Relatório Parcial do projeto.

Pesquisador Responsável: **Thais Mauad**

CEUA-FMUSP, 17 de novembro de 2021

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Comissão de Ética no Uso de Animais da FMUSP
e-mail: ceua@fm.usp.br

Não autorizo a publicação deste trabalho pelo prazo de 1 ano após a data de defesa (prorrogado por mais dois anos a partir de 2023)

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 23 de março de 2022.

Álvaro Formoso Pelegrin