KAREN TIAGO DOS SANTOS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NQ SOBRE A
RESPOSTA IMUNE INATA E ADQUIRIDA DE CAMUNDONGOS:
PAPEL DOS RECEPTORES TOLL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de doutor em Ciências.

São Paulo
2013

KAREN TIAGO DOS SANTOS

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NQ SOBRE A
RESPOSTA IMUNE INATA E ADQUIRIDA DE CAMUNDONGOS:
PAPEL DOS RECEPTORES TOLL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Katia Pereira Costa

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Karen Tiago dos.

Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata e adquirida de camundongos: papel dos receptores toll / Karen Tiago dos Santos. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Poluentes e inflamação alérgica.

Versão do título para o inglês: Effect of early exposition to the air pollutant 1,2-NQ under innate immunity and adaptive response of mice: role of toll-like receptor.

1. Asma 2. Inflamação 3. Poluição I. Costa, Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0177/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Tiago dos Santos.

Título da Tese: Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata e adquirida de camundongos: papel dos receptores toll.

Orientador(a): Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **170** nas fls. **80** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Soraia Kátia Pereira Costa, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata e adquirida de camundongos: papel dos receptores toll** do qual participou(aram) o(s) alunos **Karen Tiago dos Santos, Juliana Florenzano, Eduardo Ekundi Valentin e os pesquisadores Marcelo Nicolas Muscará, Jean Pierre S. Peron**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **02.03.10**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 02 de março de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 011.13

São Paulo, 21 março de 2013.

REF.: Protocolo nº 170/09.

"Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata e adquirida de camundongos: papel dos receptores toll"

Prezada Professora,

Informo que a sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 02.03.2016.**

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilma.Sra.
Profa Dra. Soraia Kátia Pereira Costa
Departamento de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Aos meus pais, meus heróis e mestres. Obrigada por me ensinarem desde sempre a importância do conhecimento e o respeito a todos os seres, sem distinção. Agradeço o apoio e amor incondicional, sem vocês eu não chegaria ao final, aliás, eu nem teria começado a jornada.

Ao irmão Felipe, meu grande filósofo.

Ao amor, Thiago, meu eterno companheiro. Obrigada por estar ao meu lado e me ajudar a ver o mundo de outra forma. És minha inspiração.

A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À **Deus e a querida mãezinha**, por andarem ao meu lado durante esta caminhada, mesmo nos momentos em que duvidei da existência de ambos e coloquei a ciência acima de tudo. Sei que entendem minhas indagações e hoje nossa conversa é mais sincera.

À minha querida orientadora, Profa. **Dra. Soraia K. P. Costa**, pela qual possuo grande carinho e admiração. Depois de 6 anos relembando de tudo que aprendi com você, vejo que seus ensinamentos me fizeram crescer como pessoa e como cientista. Agradeço a orientação, as conversas, o incentivo e, principalmente, a credibilidade depositada em meu trabalho. Fizemos um grande time e a prova viva se traduz na conclusão deste estudo.

Ao meu co-orientador, Prof. **Dr. Jean Pierre S Peron**, Jeanzitcho, você é o cara. Obrigada pela oportunidade de conhecer essa mente plugada no 220 volts. Você é literalmente uma grande figura, um grande cientista.

Ao Prof. **Dr. Marcelo Nicolás Muscará**, pelas diversas críticas e sugestões que me fizeram fosforilar inúmeras vezes. Obrigada pelos ensinamentos e pela constante exigência por uma ciência de qualidade, guiada por pesquisadores igualmente comprometidos.

À Profa. **Dra. Telma Maria Tenório Zorn**, por colaborar em diversas avaliações do presente estudo e, em particular, ao **colega Dr. Rodrigo Fávaro**, que pacientemente auxiliou-me-se na avaliação histológica deste trabalho.

Ao grande amigo prof. **Dr. Cristóforo Scavone**. “E aí moça tudo bem?” Sim Cris, tudo ótimo, graças também a você e aos seus aconselhamentos. Obrigada pelas conversas sempre abertas e humanas.

Um especial agradecimento à minha querida amiga **Lidia Mitiko Yshii** (Japa), pelo grande auxílio neste trabalho nos ensaios moleculares/celulares. Mesmo distante, pude contar contigo. Carinho muito especial! Pode acreditar.

À Profa. **Dra. Carolina Demarchi Munhoz** e à sua aluna e minha amiga, **Dielly Lopes**, pelo grande auxílio em diversas análises moleculares e discussões científicas que contribuíram grandemente para a realização deste estudo.

Agradeço à Profa. **Dra. Angelina Zanesco** (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP) pela oportunidade de conhecer a Profa. **Dra. Pamela Pam Lucchesi** (Instituto de pesquisa Nationwide Childrens Hospital) na Ohio State University, que me proporcionou um período inesquecível de aprendizado em seu laboratório, onde além de aprender ciência, estabeleci grandes parcerias como, o amigo **Dr. Aaron J. Trask**, **Dra. Mary Cismo**, **Dra. Maria Andréia Delbin**, **Kathryn Halleck**, **Sunshine** e a querida **Solange Busarello**. Vocês se tornaram minha segunda família científica.

Aos grandes amigos do laboratório de Farmacoregulação da inflamação Neurogênica e Dor – **Dr. Eduardo Ekundi**, **Marco Aurélio** e **Leandro Rodrigues**. A vida não é tão difícil, tão amarga, tão impossível quando você está cercada de amigos. Obrigada por aquecerem meu coração e minha alma quando estava nas terras do tio Sam.

À minha querida amiga, **Juliana Florenzano**, meu braço direito e minha perna esquerda. Meu auxílio nos momentos mais difíceis. Acredite, aprendi muito contigo. E sim, seremos eternas amigas.

À Dra. **Simone Aparecida Teixeira**, meu muito obrigada, por seu incansável auxílio técnico sempre bem humorado. Grande ser, grande mulher, você alegra o ambiente, sorria sempre.

E como não poderia esquecer, agradeço a amizade e companhia diária dos amigos **Cristiane Zaroni, Filipe Mesquita, Flávia de Jesus, Elly Amaral Neto, Flávia Batista** e as queridas ICs **Bruna Caetano, Ágatha da Silva e Tuanny Schmidt**, que fizeram nosso convívio ímpar. Às queridas técnicas, **Maria Alice Barreto e Irene Maria Gouvea**, pela ajuda imprescindível nos protocolos experimentais, além dos sábios ensinamentos no manejo animal. Vocês foram minhas grandes mãezinhas.

Aos demais **funcionários e professores do Departamento de Farmacologia da USP** que, de formas distintas, contribuem para a evolução e excelência desta instituição.

A toda **família e amigos**, obrigada pelas oportunidade de me encontrar em vocês em diversos momentos. Perdoem-me pela ausência, mas estive trabalhando em prol do avanço da ciência brasileira.

À **Zara** e ao **Chico**, meus pequeninos. Vocês adoçam a minha vida. Obrigada por sempre me receberem com aquele sorriso canino simples e sincero.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro, indispensável para o sucesso e conclusão deste estudo

Sonhe com aquilo que você quiser. Seja o que você quer ser, porque você possui apenas uma vida e nela só se tem uma chance de fazer aquilo que se quer.

Tenha felicidade bastante para fazê-la doce. Dificuldades para fazê-la forte. Tristeza para fazê-la humana. E esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos.

A felicidade aparece para aqueles que choram. Para aqueles que se machucam. Para aqueles que buscam e tentam sempre. E para aqueles que reconhecem a importância das pessoas que passam por suas vidas.

Clarice Lispector

RESUMO

Santos KT. Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata e adquirida de camundongos: papel dos receptores toll [tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

As variações diárias da poluição atmosférica, principalmente por materiais particulados relacionados ao tráfego (MP_{2,5}), constitui um dos problemas mundial de saúde pública, pois têm sido consistentemente associadas ao aumento das taxas de mortalidade e ao agravamento de doenças respiratórias em indivíduos susceptíveis, como as crianças. A contribuição científica deste grupo no âmbito dos efeitos de um dos contaminantes do MP_{2,5}, a 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), revelou que a exposição de camundongos C57BL/6 neonatos, mas não adultos à 1,2-NQ aumentou a susceptibilidade destes à inflamação alérgica pulmonar na fase adulta. Todavia, pouco se sabe sobre os mecanismos desse efeito aditivo da 1,2-NQ *in vivo*, muito embora recentes evidências têm sugerido que o MP eliminado na exaustão do diesel (PED) pode atuar como ligante de receptores *toll* 4 (TLR4). O objetivo deste estudo consistiu em investigar o envolvimento de células e mecanismos moleculares de receptores (ex.: TLR4) envolvidos na imunidade inata/adaptativa sobre o aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica em camundongos expostos à 1,2-NQ na fase neonatal. Avaliou-se ainda a população de células (e moléculas) 24 h após o contato com a 1,2-NQ. No timo de camundongos neonatos selvagens, mas não TLR4^{-/-}, a exposição à 1,2-NQ aumentou a população de linfócitos T CD8⁺ e do ligante do receptor de morte celular programada 1 (PDL-1). Em esplenócitos de camundongos neonatos selvagens, mas não TLR4^{-/-}, a 1,2-NQ elevou a população de CD11c⁺ e moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86. A exacerbação da inflamação alérgica pulmonar, caracterizada por eosinofilia no pulmão (lavado broncoalveolar; LBA), sangue periférico e medula óssea, concomitantemente à níveis elevados de IgE plasmática e citocinas Th2 (IL-4 e IL5) no LBA (sem alteração significativa na responsividade das vias aéreas; *penh*), foi evidente em camundongos selvagens expostos à 1,2-NQ na fase neonatal em relação ao respectivo grupo alérgico. Tanto nos camundongos deficientes de TLR4, quanto nos TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}, essa resposta inflamatória foi abolida em relação aos respectivos grupos de animais alérgicos. No pulmão dos animais selvagens, o contato precoce com a 1,2-NQ aumentou a expressão (RNAm) dos TLRs (2, 4 e 7) e da molécula acessória TRIF, bem como dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet; todavia, nos animais TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ, a expressão (RNAm) de TRIF não diferiu dos selvagens, mas a expressão de GATA3 e T-bet foi reduzida. No pulmão dos camundongos neonatos selvagens, o contato precoce com a 1,2-NQ aumentou a expressão proteica da HSP70 e a translocação nuclear da subunidade p50 do NF-κB; mas, reduziu a ativação AP-1. Este estudo demonstrou, pela primeira vez, que os TLR4 (e possivelmente os TLR2 e TLR7), via mecanismo molecular de sinalização dependente de MyD88 (TLR4-MyD88), apresentam importante papel no mecanismo de susceptibilidade aumentada à inflamação alérgica pulmonar em camundongos expostos precocemente à 1,2-NQ. Ainda, na fase neonatal, a 1,2-NQ afetou a maturação e função das células do sistema imunológico. Conclui-se que os indivíduos susceptíveis, tais como neonatos, apresentam maior risco ao impacto tóxico da 1,2-NQ. Isto, possivelmente, explica por que crianças que vivem em grandes metrópoles (ex.: São Paulo) ou próximos à rodovias, onde há maior concentração de PED, são mais susceptíveis às doenças respiratórias.

Palavras-chave: Asma. Inflamação. Poluição. Camundongos neonatos. Receptor toll. Imunidade inata.

ABSTRACT

Santos KT. Effect of early exposure to the air pollutant 1,2-NQ under innate immunity and adaptive response of mice: role of toll-like receptors [PhD thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Daily variations of air pollution, mainly particulate matter (PM_{2.5}) related to traffic, is one of the global public health problems, as they have been consistently associated with increased mortality and respiratory diseases aggravation in susceptible individuals, such as children. The previous scientific contribution of this group on the effects of 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), a PM_{2.5} contaminant, showed that exposure of C57BL/6 neonate, but not adult, mice to 1,2-NQ significantly increased susceptibility to allergic lung inflammation at adulthood; however, little is known about the involved mechanisms *in vivo*. Interestingly, evidences have suggested that diesel exhaust particles (DEP) a ligand of toll 4-like receptors (TLR4). The aim of this study was to investigate the involvement of cell and receptors (e.g.: TLR4) involved in innate/adaptive immunity on the increased susceptibility to allergic inflammation in mice exposed to 1,2-NQ as neonate. We also evaluated impact of 1,2-NQ in both cell population and inflammatory molecules 24 h after exposure to 1,2-NQ. In the thymus of neonate wild-type (WT) mice, but not the TLR4^{-/-}, exposure to 1,2-NQ markedly increased T CD8⁺ population and the programmed death ligand 1 (PDL-1). In the WT neonate mice splenocytes, but not the TLR4^{-/-}, the exposure to 1,2-NQ significantly increased CD11c⁺ cell population and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86). The *in vivo* exacerbation of allergic inflammation in the airways, characterized by lung eosinophilia (bronchoalveolar lavage; BAL), peripheral blood and bone marrow, concomitantly with elevated levels of plasmatic IgE and increased lung Th2 cytokines (IL-4 and IL5), without changes in the airway responsiveness (*penh*), was observed in allergic WT mice exposed to 1,2-NQ when compared to group exposed to antigen ovalbumin only (OVA). In both TLR4^{-/-} and MyD88^{-/-} mice, the increased lung inflammatory response was abolished as compared to its matched allergic group. In the lung of WT mice, the early contact with 1,2-NQ increased mRNA expression of TLRs (2, 4 and 7) and the adapter molecule TRIF, and the transcription factors GATA3 and T-bet. In TLR4^{-/-} mice exposed to 1,2-NQ, TRIF expression did not change as compared to WT mice exposed to 1,2-NQ; however, the MyD88 mRNA expression increased, while GATA3 and T-bet mRNA expression were abolished. In the lung of neonate WT mice, the early exposure to 1,2-NQ increased HSP70 protein expression and p50 subunit of NF-κB nuclear translocation concomitantly with decreased AP-1 activation. This study showed, for the first time, that early contact with 1,2-NQ induces innate immune responses, partly via TLR4 (and possibly TLR2 and TLR7) pathway dependent on MyD88. This may change the adaptive response at adulthood and contribute to pulmonary illnesses in children in heavy polluted areas.

Keywords: Asthma. Inflammation. Pollution. Neonatal mice. Receptor toll . Innate immunity.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2-NQ	- 1,2-Naftoquinona
Al(OH) ₂	- Hidróxido de alumínio
AM	- Macrófago alveolar
AP-1	- Fator de transcrição ativador de proteína 1
APC	- Célula apresentadora de antígeno
ATF	- <i>Activating transcription factors</i>
BSA	- Albumina de soro bovino
CAMs	- Moléculas de adesão
CO	- Monóxido de carbono
COX	- Enzima cicloxigenase
CREB	- <i>cAMP-response element binding protein</i>
CTLA4	- Receptor de membrana das células T citotóxicas
DC	- Célula apresentadora de antígeno
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	- Dimetilsulfóxido
ERK1/2	- Proteína quinase ativada por sinais extracelulares 1 e 2
EROs	- Espécies reativas de oxigênio
GAPDH	- Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GATA-3	- <i>GATA-binding protein 3</i>
GM-CSF	- Fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito
GPI	- Glicofosfatidil inositol
GPx	- Glutational peroxidase
GR	- Glutational redutase
GSH	- Glutational trasferase
HB	- Hiperresponsividade brônquica
HSP	- Proteína de choque térmico
ICAM	- Moléculas de adesão intracelular
IKK	- Complexo I Kappa B Kinase
IgE	- Imunoglobulina E
IL	- Interleucina
IM	- Macrófago intersticial

INF- γ	- Interferon-gama
IRAK	- <i>IL-1R-associated kinase</i>
IRF-3	- Regulador de interferon do tipo 3
KC	- Queratinócito quimioatraente
LBA	- Lavado broncoalveolar
LBP	- Proteína ligadora de LPS (LBP)
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
LTC ₄	- Cisteinil-leucotrieno 4
LTD ₄	- Leucotrieno D ₄
MAPK	- Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MAPKK	- MAP-quinase-quinase
MCh	- Metacolina
MCP-1	- Proteína quimiotática de monócitos/macrófagos 1
MD-2	- Proteína de diferenciação mielóide 2
MDA5	- <i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEK	- MAP/ERK quinase
MEK1/2	- MAP/ERK quinase 1/2
MHC- II	- Complexo de histocompatibilidade maior classe II
MIP-1 α	- Proteína inflamatória do tipo 1-alfa
MKK3/6	- MAP quinase-quinase 3/6
MMP	- Metaloproteinase de matriz celular
MO	- Medula óssea
MP	- Material particulado
MyD88	- <i>Myeloid differentiation primary-response protein 88</i>
NF- κ B	- Fator nuclear kappa B
NK	- células exterminadoras naturais - Célula Natural killer
NLR	- Receptores (NOD)- <i>like</i>
NO ₂	- Dióxido de nitrogênio
NO _x	- Óxidos de nitrogênio
O ₃	- Ozônio
OVA	- Ovalbumina
PAF	- Fator ativador de plaquetas

PAMPs	- Padrões moleculares associados a patógeno
PBS	- Tampão fosfato de sódio
PDL-1	- Ligante do receptor de morte celular programada 1
PED	- Partícula de exaustão do diesel
Penh	- <i>Pause enhanced</i>
PGE e D2	- Prostaglandina E2 e D2
PMSF	- <i>Fenil-metil-sulfonil-fluoridro</i>
PRR	- Receptor de reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno
RANTES	- Quimiocina reguladora secretada por célula T
RIG-I	- Acido-retinóicos induzíveis
ROFA	- <i>Residual oil fly ash</i>
SAPK/JNK	- Proteína C-jun NH2- terminal quinase/proteína quinase ativada por estresse
SARM	- <i>Sterile α- and armadillo-motifcontaning protein</i>
SO ₂	- Dióxido de enxofre
SOD	- Superóxido dismutase
STAT-6	- <i>Signal transduction-activated transcription 6</i>
TAB	- Quinases dependente de TGF- β
TAK1	- <i>Transforming-growth-factor-β-activated kinase</i>
TCR	- Receptor de superfície celular de células T
TGF- β	- Fator transformador de crescimento beta
Th	- Célula T auxiliar
TICAM1	- <i>Toll-like receptor adaptor molecule 1</i>
TICAM2	- <i>Toll-like receptor adaptor molecule 2</i>
TIRAP	- <i>TIR-domain-containing adaptor molecule</i>
TLR	- Receptores do tipo toll
TNF- α	- Fator de necrose tumoral-alfa
Tpl2	- <i>Tumor Progression Locus 2</i>
TRAF6	- <i>Tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor</i>
TRAM	- <i>TRIF-related adaptor molecule</i>
Treg	- Célula T reguladora
TRIF	- <i>TIR-domain-containing adapter molecule-inducing interferon β</i>
VCAM	- Moléculas de adesão vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Naftaleno e seu derivado 1,2-Naftoquinona. Alquilação e ciclo redox na geração de semi-quinonas e EROs.....	25
Figura 2 - Ilustração simplificada da cascata de sinalização iniciada após ativação de TLRs.....	31
Figura 3 - Representação esquemática da fisiopatologia da asma	36
Figura 4 - Ilustração esquemática dos protocolos experimentais utilizados no estudo....	44
Figura 5 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T, NK-1 e PDL-1 no timo de camundongos C57BL/6 selvagens.....	60
Figura 6 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no timo de camundongos TLR4 ^{-/-}	61
Figura 7 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no baço de camundongos C57BL/6 selvagens.....	63
Figura 8 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no baço de camundongos TLR4 ^{-/-}	64
Figura 9 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de células CD11c ⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos C57BL/6.....	66
Figura 10 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de células CD11c ⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos TLR4 ^{-/-}	67
Figura 11 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes e TLR4 ^{-/-} ou MyD88 ^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade no LBA) na fase adulta.....	70
Figura 12 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes de TLR4 e TLR4 ^{-/-} ou MyD88 ^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade no sangue periférico) na fase adulta.....	72
Figura 13 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes e nocautes de TLR4 ou MyD88) ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade na MO) na fase adulta.....	74
Figura 14 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de camundongos selvagens e TLR4 ^{-/-} expostos à 1,2-NQ na idade neonatal na vigência do estímulo alérgico na idade adulta.....	76
Figura 15 - Efeito da exposição neonatal de camundongos C57BL/6, selvagens, TLR4 ^{-/-} ou MyD88 ^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade na MO) na fase adulta.....	78

Figura 16 - Concentração plasmática de IgE nas diferentes linhagens de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	80
Figura 17 - Concentração plasmática de IgE anti-OVA em camundongos selvagens e TLR4 ^{-/-} expostos a 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal.....	81
Figura 18 - Avaliação da reatividade das vias aéreas de camundongos selvagens, deficientes e TLR4 ^{-/-} ou MyD88 ^{-/-} expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ.....	83
Figura 19 - Efeito da exposição precoce do poluente sobre a expressão (RNAm) e/ou protéica de TLRs e das moléculas adaptadoras nos pulmões de camundongos selvagens e TLR4 ^{-/-}	85
Figura 20 - Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ na expressão (RNAm) dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet nos pulmões de camundongos C57BL/6, selvagens, TLR4 ^{-/-} e MyD88 ^{-/-}	87
Figura 21 - Efeito do estímulo <i>in vitro</i> em células esplênicas de camundongos neonatos selvagens e TLR4 nocautes previamente expostos a 1,2-NQ sobre o perfil de linfócitos T.....	90
Figura 22 - Análise temporal da expressão proteica total e da forma fosforilada de ERK1/2 em explante pulmonar de camundongos neonatos selvagens e TLR4 ^{-/-} submetidos ao estímulo dual com 1,2-NQ.....	92
Figura 23 - Análise temporal da expressão proteica total e da forma fosforilada de SAPK/JNK em explante pulmonar de camundongos neonatos selvagens e TLR4 ^{-/-} submetidos ao estímulo dual com 1,2-NQ.....	93
Figura 24 - Efeito da 1,2-NQ na ativação do NF-κB em pulmão de camundongos neonatos selvagens.....	95
Figura 25 - Efeito do tratamento com 1,2-NQ na ativação de AP-1 em pulmão de camundongos neonatos selvagens.....	96
Figura 26 - Ensaio de competição realizado por gel shift em extrato nuclear de pulmão do grupo 1,2-NQ e ensaio de <i>supershift</i>	97
Figura 27 - Avaliação da expressão proteica das HSP60, HSP70 e HSP90 no pulmão de camundongos neonatos selvagens expostos a 1,2-NQ.....	98
Figura 28 - Hipótese da sinalização desencadeada após exposição da 1,2-NQ em camundongos neonatos.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da composição química da atmosfera natural antes da revolução industrial (anterior ao século 18).....	22
Tabela 2 - Relação dos grupos experimentais e respectivos tratamentos.....	43
Tabela 3 - Sequências de <i>primers</i>	52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Poluição atmosférica: considerações gerais	21
1.2	Quinonas e efeitos biológicos	24
1.3	Imunologia pós-natal e impacto da poluição atmosférica	27
1.4	Receptores da imunidade inata (<i>Toll like receptors - TLR</i>)	29
1.5	Sinalização intracelular dos TLRs	31
1.6	Poluição atmosférica e TLRs	33
1.7	Inflamação alérgica pulmonar (asma)	34
1.8	Hipótese e justificativa do projeto	40
1.9	Objetivos e estratégias	41
2	MATERIAL E MÉTODOS	42
2.1	Animais	42
2.2	Exposição ao poluente 1,2-NQ e delineamento experimental	42
2.3	Determinação da concentração de 1,2-NQ no interior da câmara	43
2.4	Indução da inflamação alérgica com OVA	43
2.5	Determinação da pureza do composto 1,2-NQ via teste cromogênico cinético	45
2.6	Avaliação dos parâmetros funcionais, inflamatórios e bioquímicos	45
2.6.1	Medida da função pulmonar (hiperresponsividade das vias aéreas) “in vivo”	45
2.6.2	Quantificação celular do lavado broncoalveolar, sangue e medula óssea	46
2.6.3	Avaliação histopatológica	47
2.6.4	Obtenção e preparo de células esplênicas e timócitos	48
2.6.5	Avaliação da expressão das moléculas de superfície no baço e timócitos	48
2.6.6	Avaliação de citocinas/quimiocinas no LBA	48
2.6.7	Determinação da concentração de IgE plasmática total	49
2.6.8	Determinação da concentração de IgE OVA-específica	49
2.6.9	Extração, quantificação do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa)	50
2.6.10	Purificação / transcrição reversa do RNA total e análise da expressão gênica (qPCR)	51
2.6.11	Avaliação da expressão protéica pulmonar da molécula MyD88 via Western Blot	52
2.7	Avaliação dos mecanismos moleculares	53
2.7.1	Estimulação dual de células esplênicas e análise da população de linfócitos	53

2.7.2	<i>Cultura de tecido pulmonar (explante)</i>	54
2.7.3	<i>Expressão proteica de HSP (60, 70 e 90) e papel das quinases (ERK1/2 e SAPK/JNK) em explante pulmonar via Western Blot</i>	55
2.7.4	<i>Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (Gel-shift) para o NF-κB e AP-1</i>	56
2.8	Análise estatística	57
3	RESULTADOS	58
3.1	Avaliação da contaminação do composto 1,2-NQ por endotoxina bacteriana	58
3.2	Avaliação das populações celulares de camundongos neonatos expostos a 1,2-NQ	58
3.2.1	<i>Análise comparativa das populações de linfócitos T, células NK1 e da molécula PDL-1 no timo de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ</i>	58
3.2.2	<i>Análise comparativa das populações de linfócitos T e NK1 no baço de camundongos neonatos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos ao poluente 1,2-NQ</i>	62
3.2.3	<i>Análise das populações celulares CD11c⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal</i>	65
3.3	Avaliação dos parâmetros funcionais, celulares/inflamatórios e bioquímicos na fase adulta de animais expostos precocemente (fase neonatal) a 1,2-NQ	68
3.3.1	<i>Análise comparativa da inflamação alérgica pulmonar em camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} expostos precocemente ao poluente 1,2-NQ</i>	68
3.3.2	<i>Análise comparativa da resposta inflamatória alérgica no sangue periférico de camundongos selvagens, deficientes ou TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} expostos precocemente a 1,2-NQ</i>	71
3.3.3	<i>Análise comparativa da celularidade na MO de camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal</i>	73
3.3.4	<i>Análise histopatológica pulmonar de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ na fase neonatal</i>	75
3.3.5	<i>Análise comparativa das citocinas/quimiocinas no LBA de camundongos selvagens e ambos TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} expostos precocemente a 1,2-NQ</i>	77
3.3.6	<i>Concentração sérica de IgE total em camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ</i>	79
3.3.7	<i>Análise comparativa da concentração plasmática de IgE OVA-específica entre camundongos selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal</i>	81
3.3.8	<i>Efeito comparativo da exposição precoce do poluente 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos selvagens, deficientes e nocautes (TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-})</i>	82
3.3.9	<i>Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na expressão RNAm e protéica pulmonar dos TLRs e moléculas adaptadoras</i>	84

3.3.10	<i>Expressão RNAm e protéica dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet no pulmão de camundongos selvagens e nocautes expostos precocemente a 1,2-NQ.....</i>	86
3.4	Avaliação dos mecanismos moleculares	88
3.4.1	<i>Análise comparativa das populações de linfócitos Th17, Th1 e Th2 no baço de camundongos selvagem e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ e re-estimulados in vitro</i>	88
3.4.2	<i>Efeito do poluente 1,2-NQ na ativação (fosforilação) das proteínas-quinases em explante pulmonar de camundongos neonatos C57BL/6, selvagens e TLR4^{-/-}</i>	91
3.4.3	<i>Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na ativação dos fatores de transcrição nuclear NF-κB e AP-1 em pulmão de camundongos C57BL/6 neonatos selvagens.....</i>	94
3.4.4	<i>Caracterização do NF-κB – ensaio de competição e Supershift</i>	97
3.4.5	<i>Efeito da exposição a 1,2-NQ na expressão protéica das proteínas de choque térmico (HSP) no pulmão de camundongos neonatos selvagens</i>	98
4	DISCUSSÃO.....	99
5	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS.....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição atmosférica: considerações gerais

Define-se poluição atmosférica qualquer introdução na atmosfera de várias formas de matéria (ex.: químicos, partículas ou materiais biológicos), cuja intensidade, concentração, tempo e características estão em desacordo com os níveis estabelecidos pela legislação, podendo tornar o ar impróprio ou prejudicial à saúde humana, além de causar danos a outros organismos vivos e danificar o ambiente natural ou construído (Dally, Zannetti, 2007). Embora complexa, a definição de "poluição do ar" pode ser, para alguns, muito simplista dependendo do contexto. Por exemplo, o termo "prejudicial", poderia significar um efeito adverso sobre a saúde dos seres vivos, mas também uma redução na visibilidade do ar. Ainda, um produto químico pode não causar efeitos nocivos significativos a curto prazo; todavia, ao acumular-se na atmosfera provoca efeitos lesivos de longa duração (Dally, Zannetti, 2007).

Na atmosfera, a concentração e dispersão dos poluentes variam de acordo com suas interações físico-químicas, tráfego, absorção e condições meteorológicas, como o vento, precipitações, umidade relativa do ar, inversões térmicas e localização geográfica (Boubel et al., 1994). Em termos de composição química, é fato que o ar ambiente atual é bem diferente do ar atmosférico que existia antes da Revolução Industrial (Tabela 1; Builtjes, 2003). Isto significa sugerir que um ambiente natural considerado como "atmosfera limpa" pode não ser encontrado em nenhum local onde habitamos (Dally, Zannetti, 2007).

Os poluentes ambientais classificam-se em primários e secundários e, ainda, de acordo suas origens (naturais ou provocadas pelo homem), composição química, tamanho, formas (partículas sólida, líquidos ou gases) e locais de liberação: ambientes internos e externos (Bernstein et al., 2004).

Os poluentes primários são oriundos de processos naturais diretos, como as cinzas liberadas de erupção vulcânica ou o gás monóxido de carbono (CO). Em contrapartida, os poluentes secundários são emitidos indiretamente, a partir de outros poluentes primários, tal como a liberação de ozônio (O₃) do solo, formado através de reações fotoquímicas entre óxidos de nitrogênio (NO_x) e compostos orgânicos voláteis (VOCs) (Builtjes, 2003). Nesse contexto, dentre os poluentes secundários encontrados em concentrações suficientemente elevadas na atmosfera e capazes de causar danos celulares, destacam-se o dióxido de

nitrogênio (NO_2) e o ácido nítrico (HNO_3), além do O_3 e as gotículas de ácido sulfúrico (H_2SO_4) formado a partir do dióxido de enxofre (SO_2) (Dally, Zannetti, 2007). No tocante aos principais poluentes primários em concentrações significativas na atmosfera e, portanto, capazes de causar lesões ou danos em organismos vivos, estão os compostos derivados de carbono (CO , CO_2 , CH_4 e VOCs), nitrogênio (óxido nítrico $[\text{NO}]$, óxido nitroso $[\text{N}_2\text{O}]$ e amônia $[\text{NH}_3]$), enxofre (sulfeto de hidrogênio $[\text{H}_2\text{S}]$ e dióxido de enxofre $[\text{SO}_2]$), halogenados (fluoretos, cloretos e brometos) e particulados (ex.: material particulado $[\text{MP}]$). O diâmetro do MP determina sua classificação, a saber: grosso ou bruto ($<10\ \mu\text{m}$), fino ($<2,5\ \mu\text{m}$) e ultrafino ou nanoparticulado ($<1\ \mu\text{m}$) (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA, 2003).

Tabela 1: Estimativa da composição química da atmosfera natural antes da revolução industrial (anterior ao século 18).

<i>Gás</i>	<i>Símbolo</i>	<i>Volume na atmosfera (%)</i>	<i>Atmosfera natural (ppm)</i>	<i>Atmosfera pós-revolução industrial (ppm)</i>
Nitrogênio	N_2	78,1		
Oxigênio	O_2	20,9		
Argônio	Ar	0,92		
Neon	Ne		18,2	
Hélio	He		5,2	
Xenônio	Xe		0,09	
Dióxido de Carbono	CO_2		280	370
Metano	CH_4		0,750	1,77
Óxido nitroso	N_2O		0,270	0,318

Adaptado: Builtjes, 2003.

Cabe acrescentar que o tamanho do MP também determina sua distribuição no organismo, sendo o MP grosso comumente encontrado na porção superior das vias aéreas (MP_{10} grosso), enquanto o MP fino acredita-se penetrar mais facilmente na porção inferior do trato respiratório (Weichenthal et al., 2006). Por seu turno, o MP ultrafino ou nanoparticulados alcançam mais facilmente a circulação sistêmica e, assim, exercem maior toxicidade no sistema cardio-respiratório devido ao seu poder de transição de metais e indução de estresse oxidativo. Ainda, esse tipo de partícula pode formar aglomerados e, assim, transformar-se em MP fino (Valavanidis et al., 2008).

Em geral, a queima de combustível proveniente da engenharia de veículos automotores, indústrias e queimadas, dão origem, em sua grande maioria, ao MP fino.

Em geral, a queima de combustível proveniente da engenharia de veículos automotores, indústrias e queimadas, dão origem, em sua grande maioria, ao MP fino. Evidências experimentais sugerem que este tipo de MP é considerado um dos principais vilões no desencadeamento de reações inflamatórias das vias aéreas e sistêmicas, pois além de exercer seu efeito deletério local (vias aéreas), consegue translocar-se do pulmão (via alvéolos) para a corrente sanguínea e, assim, causar lesões em outros compartimentos (Nemmar et al., 2007; Zeger et al., 2008).

O MP fino liberado pela queima do diesel (PED) encontra-se amplamente disperso em áreas próximas de rodovias de alto tráfego (Tian et al., 2012) e em centros urbanos, como na região metropolitana de São Paulo, onde estima-se que as PEDs contribuem para a formação de, aproximadamente, 40% da massa total do MP fino (André et al., 2012; Companhia Ambiental do estado de São Paulo - Cetesb, 2006, 2012). No Brasil, o crescente registro da frota veículos automotores associado ao consumo anual de óleo diesel já ultrapassa 35 milhões de toneladas e, conseqüentemente, o efeito desse consumo pode ser refletido pelas ações adversas na saúde da população (Ferrari et al., 2005). Além disso, resultados interessantes do Laboratório de Poluição da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), coordenados pelo Prof. Paulo Hilário Saldiva, demonstram que o aumento da poluição do ar na região metropolitana da cidade de São Paulo está associado ao aumento de internações hospitalares ($\approx 13,1$ mil/ano) pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e, também, ao aumento concomitante de óbitos registrados (≈ 7.187 indivíduos/ano) em indivíduos com idade > 40 anos e portadores de alguma patologia respiratória ou cardiovascular (André et al., 2012; Sangiovanni, 2009). Reforçando esses achados, dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2009) revelam que a poluição ambiental responde, indiretamente, pela morte anual de 1,2 milhões de indivíduos.

Postula-se que a poluição ambiental, mesmo em níveis considerados seguros, parece afetar a saúde de indivíduos susceptíveis, incluindo os lactentes, infantes, crianças (Backes et al., 2013; Fedulov et al., 2008) e indivíduos com patologias pré-existent, incluindo as doenças respiratórias (asma, rinite) e cardiovasculares (Cambra et al., 2011; Clerisme-Beaty, Rand, 2009; Holguin, 2008; Ko et al., 2007; Lee et al., 2013; Nascimento, Moreira, 2009). Ainda, um grande corpo de evidências experimentais e epidemiológicas aponta correlações importantes entre o aumento da poluição atmosférica e os crescentes casos de parto prematuro, natimortos (Choi et al., 2012), dimorfismo (maior índice de recém-nascidos do sexo feminino) (Miraglia et al., 2013), déficits de crescimento pulmonar (Sram et al., 2013),

câncer de pulmão (Fajersztajn et al., 2013) e, em particular, o desenvolvimento ou agravamento de doenças respiratórias (ex.: asma e rinite) na idade adulta ou pré-adulta (Barraza-Villarreal et al. 2008; Santos et al., 2013).

Além dessas correlações, o aumento da poluição atmosférica desperta grande preocupação mundial pela influência direta desta nas mudanças climáticas e, também, na elevação dos custos dos Sistemas de Saúde Pública. Apesar do crescimento de programas voltados à melhoria na qualidade do ar em diversos países, a poluição ambiental, em grandes metrópoles de países desenvolvidos, como os Estados Unidos e, em desenvolvimento, como o Brasil, China, Índia, dentre outros continua elevado e impactando grandemente no clima e saúde dos indivíduos mais susceptíveis (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos – EPA, 2003; André et al., 2012; OMS, 2009).

Dada a complexa composição dos poluentes atmosféricos, incluindo das PED, em grandes centros urbanos, o mecanismo de ação de seus componentes químicos no organismo vivo torna-se de difícil compreensão, em vista da complexa mistura de mais de 100 compostos químicos orgânicos e inorgânicos (ex.: hidrocarbonetos poliaromáticos, heterocíclicos), núcleo de carbono e compostos químicos que se aderem à essas partículas, tais como as quinonas, que tornam ainda mais tóxicas (Kumagai et al., 2011; Schuetzle et al., 1981). Segundo estudo de Cho et al. (2004), para cada grama de PED existe, aproximadamente, 13,7 µg da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ).

1.2 Quinonas e efeitos biológicos

As quinonas atuam como potentes aceptores de elétrons (eletrófilos) e, assim, podem desempenhar funções tóxicas importantes visto que atuam como agentes alquilantes em sítios nucleofílicos de peptídeos e de ácidos nucleicos (Endo et al., 2007). Na estrutura das quinonas, os grupos carbonílicos α,β insaturados favorecem as ligações covalentes com diversas proteínas regulatórias, tais como a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase [GAPDH]) e grupos tióis, que pode levar à inativação de proteínas bem como modificações na integridade/função celular (Kumagai et al., 2011). Ainda, podem comprometer diversas vias de sinalização intracelular por atuarem como agentes pró-oxidantes, capazes de reduzir o oxigênio em espécies reativas de oxigênio (EROs) ou reagir com agentes nucleófilos, como a glutathione redutase (GR) e, assim, comprometer o balanço redox (Kumagai et al., 2011; Lin et al., 2007).

Estruturalmente, as quinonas constituem uma classe de compostos químicos ambíguos, resultantes do metabolismo endógeno das catecolaminas e/ou bioquimicamente formados via metabolismo da hidroquinona, cujas propriedades pró e anti-inflamatórias foram demonstradas (Bolton et al., 2000; Hebeda et al., 2010; Kumagai et al., 2011). Nesse contexto, as naftoquinonas (NQ), como a 1,2-NQ, são produtos derivados e nomeados à partir do sistema aromático progenitor, o naftaleno, o maior hidrocarboneto aromático polinuclear presente no ar atmosférico (Figura 1). Assim, a geração da 1,2-NQ ocorre biologicamente por meio de reações enzimáticas via citocromo P450/P450 redutase e/ou da glutathione transferase [GSH]), ou via reações não enzimáticas de auto-oxidação, gerando diversos metabólitos intermediários ativos (semi-quinonas) além da 1,2-NQ (Kumagai et al., 2011). Em adição à ação contaminante química das quinonas sobre o MP em áreas urbanas (Valderrama et al., 2008), estas são encontradas na dieta (corantes alimentícios) e em algumas classes medicamentosas, como os antibióticos e quimioterápicos (Bolton et al., 2000).

Figura 1 – Naftaleno e seu derivado 1,2-Naftoquinona. Alquilação e ciclo redox na geração de semi-quinonas e EROs.

A 1,2-NQ é gerada via metabolismo de auto-oxidação e/ou enzimaticamente via ação do p450 ou GSH. O asterisco indica que a reação somente ocorre para quinonas auto-oxidáveis (Adaptada Bolton et al., 2000).

Apesar do conhecimento mais amplo no tocante aos efeitos moleculares *in vitro* das quinonas (Bolton et al., 2000; Kumagai et al., 2011), pouco se sabe sobre o potencial efeito *in vivo* ou do efeito aditivo dessa quinona sobre as PED na sensibilização ou exacerbação da inflamação pulmonar alérgica em indivíduos susceptíveis, como os neonatos. Compete acrescentar que numa investigação prévia do grupo demonstrou-se, pela primeira vez, que a

exposição de camundongos neonatos (mas não adultos) à 1,2-NQ, promoveu maior susceptibilidade destes na idade adulta à inflamação alérgica pulmonar frente à ovalbumina (OVA). Tal resposta foi caracterizada por maior influxo de células inflamatórias (linfócitos e eosinófilos) nas vias aéreas e aumento concomitante da concentração de IgE, citocinas Th1/Th2 e leucotrieno B₄ (LTB₄), bem como maior população de eosinófilos na periferia (sangue) e medula óssea (MO). Esse contato precoce com a 1,2-NQ também estimulou/aumentou a população de células CD11c⁺ e a expressão das moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86) em esplenócitos de camundongos C57BL/6 selvagens, indicando que a exposição aguda à esse poluente é suficiente para ativar células apresentadoras de antígeno (APC) e amplificar a apresentação antigênica na fase neonatal, e assim exacerbar a inflamação alérgica na fase adulta (Santos et al., 2013).

De posse desse mesmo poluente, Inoue et al. (2007a, b) demonstraram que a exposição repetida (seis semanas) da 1,2-NQ em camundongos adultos agravou a inflamação alérgica pulmonar de forma dose-dependente, a qual foi caracterizada pelo acúmulo de eosinófilos, linfócitos e células caliciformes no epitélio brônquico, além do aumento da expressão proteica da proteína quimiotática de monócitos/macrófagos 1 (MCP-1), eotaxina, citocinas Th2 (interleucinas 4 e 5 [IL-4 e IL-5]) e do queratinócito quimioatraente (KC). De fato, dados deste grupo reforçam essa sugestão e demonstram que a co-administração intra-traqueal (i. tr.) da 1,2-NQ à suspensão de PED resultou em efeito aditivo da inflamação induzido pelas PED nas vias aéreas de ratos via mecanismos neurogênicos, onde os receptores NK1 e TRPV1 participam ativamente (Teles et al., 2010). Nesse sentido, Kikuno et al. (2006) revelaram que a aplicação da 1,2-NQ numa preparação *ex vivo* de traquéia de cobaia causou contração dessa estrutura, de maneira concentração-dependente, via mecanismo regulado por receptores TRPV1.

Em estudo *in vitro*, outros autores observaram que a adição de hidroquinona em cultura primária de células endoteliais microvasculares (PMECs) de ratos afetou o mecanismo de recrutamento de leucócitos, via aumento da expressão de moléculas de adesão celular (CAMs): intracelular 1 (ICAM-1), vascular 1 (VCAM-1) e celular endotelial plaquetária 1 (PECAM-1), além de estimular a geração de interleucina 1 beta (IL-1 β) e do fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- α) (Hebeda et al., 2010).

Mais recentemente, usando o esquema de exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ semelhante ao proposto por Santos et al. (2013), membros do nosso grupo revelaram que o efeito potencializador da inflamação alérgica frente à exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ

apresenta um dimorfismo importante na fase juvenil dos animais, uma vez que somente os machos, mas não as fêmeas, exibiram potencialização da inflamação alérgica pulmonar em relação ao respectivo grupo alérgico (Florenzano, 2013). Acredita-se que esse dimorfismo na resposta ao poluente esteja associado à maior atividade do sistema anti-oxidativo das fêmeas durante a fase pós-natal.

1.3 Imunologia pós-natal e impacto da poluição atmosférica

Postula-se que as crianças são mais vulneráveis aos efeitos adversos de poluição ambiental do que os adultos (Kim, 2004). Acredita-se que, em grande parte, isto ocorre devido às diferenças anatomofisiológicas e imunológicas entre estes organismos. Nesse contexto, sabe-se que após o nascimento, aproximadamente, 80% dos alvéolos estão formados, mas a maturação continua até a adolescência. Em virtude do maior número de alvéolos, a frequência respiratória por minuto em crianças acaba sendo superior a dos adultos. Soma-se a isto, o fato de que as crianças passam maior tempo ao ar livre do que os adultos e, também, desempenham mais atividades físicas e estão mais expostos e susceptíveis à poluição ambiental exterior. Coletivamente, isto contribui para expor crianças a uma maior quantidade de poluentes do que os adultos (Diert et al., 2000; Pinkerton et al., 2000; Plopper et al., 2000).

Por seu turno, durante o período pós-natal, os neonatos apresentam deficiência (imaturidade) imunológica (inata e adquirida) frente aos estímulos nocivos. De fato, não são incomuns os frequentes ataques infecciosos de microorganismos (ex.: bactérias e vírus) em crianças e neonatos (Ghazal et al., 2013).

A imaturidade da resposta imunológica envolve uma certa deficiência, porém não a total incapacidade, na resposta de vários componentes da resposta imunológica. Dentre esses, o reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) comprometidos, em parte, pela redução na expressão de receptores da imunidade inata, como os receptores do tipo *toll* (TLR) e moléculas relacionadas (ex.: MyD88 - *myeloid differentiation primary-response protein 88* e CD14) (Lisciandro, van den Biggelaar, 2010), ou comprometimento da biossíntese de algumas citocinas em relação ao indivíduo adulto. Por exemplo, em condições fisiológicas, os neonatos possuem concentrações reduzidas de IL-12 e interferon gamma (IFN- γ) em contraste à concentrações elevadas de IL-1 β , IL-6, IL-23 e IL-10 (Prendergast et al., 2012). Acrescenta-se que no período neonatal, a função de diversas células responsáveis pela eliminação rápida do patógeno e a manutenção da homeostasia, tais

como as células “*natural killer*” (NK), estão reduzidas. Em neonatos, a resposta dos leucócitos e outros fagócitos à um patógeno invasor ocorre de forma diferenciada, onde observa-se uma baixa quimiotaxia e, conseqüentemente, migração celular, opsonização, atividade bactericida intracelular, e atividades fagocítica e oxidativa reduzidas (Nussbaum, Sperandio 2011; Yost et al., 2009). As APCs em neonatos mesmo após o estímulo antigênico com o lipopolissacarídeo da parede celular (LPS) da *Escherichia coli* apresentam um fenótipo relativamente imaturo, caracterizado pela expressão atenuada de marcadores de ativação celular (ex.: CD40, CD80 e CD86) e quimiocinas (ex.: CXCL9, CXCL13, CCL18) (Liscianro, van den Biggelaar, 2010).

A capacidade de gerar uma resposta inflamatória deve estar associada à um controle fino do sistema imune modular negativamente essa resposta quando esta se torna demasiada; todavia, no neonato, esse controle modulatório refinado difere grandemente de um indivíduo adulto. Dentre as diferenças, estão a deficiência da resposta neonatal à antígenos T-dependentes, tal como a ausência de interação entre as células T e B e a conseqüente diminuição na geração de anticorpos. Além disto, destaca-se a capacidade reduzida das células T regular a expressão de moléculas de adesão e receptores destas (Ghazal et al., 2013; Ridge et al., 1996). No entanto, a grande maioria das células T sofre apoptose e as demais não formam células de memória de longa duração (Holt et al., 2005). Aquelas que não sofrem apoptose, desenvolverão o fenótipo T-regulador (Treg).

Ademais, existe no neonato maior propensão ao desenvolvimento do perfil Th2, devido à capacidade desses em suprimir a função de células Th1 fetais e atrasar a maturação dessas células em comparação as células Th2, juntamente com a concentração reduzida de IL-12 presente neste organismo. Tal desbalanço imunológico ocorre de forma persistente, que se inicia do nascimento e perdura até os dois anos de idade. Isto poderia explicar, em parte, a predominância do risco à infecções respiratórias e, subsequentemente, ao desencadeamento da asma e outras doenças alérgicas na infância (Belderbos et al., 2009; Holt et al., 2005).

O impacto do MP derivado do diesel, bem como de seus contaminantes no desenvolvimento e função do sistema imunológico pré e pós-natal ainda é obscuro. Todavia, ensaios experimentais clínicos, utilizando amostras biológicas (ex.: sangue, esfregaços bucais, cordão umbilical) obtidas de crianças residentes em locais de alto tráfego ou de grande atividade industrial, revelam uma redução da população de células CD41 concomitante ao aumento significativo de linfócitos B e células NK (Hertz-Picciotto et al., 2005, 2008).

1.4 Receptores da imunidade inata (*Toll like receptors - TLR*)

Os receptores do tipo *toll* (TLR) são receptores com estruturas evolutivamente conservadas, amplamente envolvidos no sistema de defesa de plantas, insetos e mamíferos. Foram descobertos na década de 80 em estudos com moscas *Drosophila*, por atuarem na polaridade dorsoventral das asas destas, durante a embriogênese. A denominação “*Toll*” refere-se a expressão alemã, “maravilhoso” e foi atribuída à Christiane Nusslein-Volhard, ganhadora do prêmio nobel (Tesse et al., 2011).

Estudos subsequentes revelaram que esses receptores são estruturas glicoproteicas parte de uma superfamília de receptores transmembrânicos, que compreende também os receptores das interleucinas do tipo 1 (IL-1Rs). A diferença essencial entre os constituintes de membrana dos TLRs e dos receptores IL-1 deve-se ao fato que a porção extracelular do receptor TLRs possui resíduos ricos em leucina (LRR), enquanto a do receptor de IL-1 contém três domínios ricos em imunoglobulinas (Tesse et al., 2011).

Os receptores da família dos TLRs encontram-se expressos em diferentes níveis de quase todas as células da imunidade inata, incluindo os monócitos/macrófagos, neutrófilos, células epiteliais e DCs (Romani, 2004). Dentre as principais substâncias reconhecidas pelos TLRs, destaca-se o ligante exógeno LPS, embora outras substâncias e estruturas exógenas como peptidoglicanos, flagelina (presentes em algumas bactérias), glicofosfatidil inositol (GPI; encontrados em protozoários), zimosan (presente em fungos), RNA de dupla fita (vírus) e estruturas de DNAs ricas em sequências conservadas de bases nitrogenadas do tipo citosina e guanina (CpGs; presente em vírus e bactérias) (Trinchieri, Sher, 2007), também possuem a capacidade de ativá-los. Entretanto, alguns estudos mostram que alguns compostos sintéticos (ex.: imidazoquinolina, loxoribina e bropirimina) interagem com receptores do tipo 7, 8 e 9 (TLR7, TLR8 e TLR9), resultando na ativação de macrófagos e DCs via sinalização dependente de MyD88 (Heil et al., 2004; Hemmi et al., 2002). Ademais, já é de conhecimento que alguns TLRs (ex.: TLR4, TLR2) são alvos de ligantes endógenos, incluindo a proteína de choque térmico 60, 70 e 90 (HSP60, HSP70 e HSP90), fibrinogênio, fibronectina, do sulfato de heparina solúvel e a elastase (Johnson et al., 2004).

Atualmente, 13 TLR já foram identificados, dentre estes 10 em humanos e 13 em camundongos. Alguns subtipos de TLR estão presente na superfície celular, tal como os receptores tipo 1, 2, 4, 5, 6 e 11 (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 e TLR11) e quando ativados pelos seus respectivos ligantes, estes são endocitados e direcionados para o

endossomo onde iniciam a cascata de sinalização intracelular. Já outros subtipos de TLRs, como os do tipo 3, 7, 8, 9 e 10 (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR10) estão expressos na porção intracelular da célula (retículo endoplasmático) e quando ativados por seus respectivos ligantes (ex.: resíduos CpG), são endocitados para o compartimento endossomal/lisossomal onde iniciam a via de sinalização e recrutamento das moléculas adaptadoras. A saber, o tráfego dos TLRs tanto para o endossomo como para o endolisossomo é orquestrado por proteínas como PRAT4A, gp96 e UNC93B1, com afinidades distintas para os diferentes TLRs (Ahmad-Nejad et al., 2002; Kawai, Akira, 2011; Matsumoto et al., 2003).

O reconhecimento de patógenos pelos TLRs envolve um mecanismo de sinalização bastante complexo, o qual depende do recrutamento e combinação seletiva de diferentes proteínas adaptadoras, por meio de processos que envolvem fosforilação e/ou ubiquitinação. Dentre as principais moléculas recrutadas destacam-se: MyD88, TIRAP (*TIR-domain-containing adaptor molecule*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*, também conhecido como TICAM2 [*toll-like receptor adaptor molecule 2*]) e SARM (*sterile α - and armadillo-motifcontaning protein*) (Akira, Takeda, 2004). Em particular, a proteína MyD88 consiste no componente necessário para o mecanismo de ativação de quase todos os TLRs, sendo também a via de sinalização dos receptores de IL do tipo IL-1RI e IL-18R. Associada à quinase IRAK4 (*IL-1R-associated kinase 4*), MyD88 inicia o recrutamento e a ativação de outras moléculas, tais como a IRAK1, TRAF6 (*tumour-necrosis-factor-receptor-associated factor*) e do complexo TAK1 (*transforming-growth-factor- β -activated kinase*)/TAB (quinasas dependente de TGF- β). Subsequentemente, essas moléculas fosforilam diversas proteínas e complexos proteicos (ex.: MAP/ERK quinases 1/2 [MEK1/2], MAP quinase-quinase 3/6 [MKK3/6], complexo I Kappa B Kinase [IKK]), levando à ativação de quinases (ex.: p38 e JUN N-terminal quinase [JNK]) e fatores de transcrição (ex.: fator de transcrição nuclear kappa B [NF- κ B], CREB [*cAMP-response element binding protein*], fator de transcrição ativador de proteína 1 [AP-1]) (Li et al., 2010).

Além da proteína MyD88, o mecanismo de ativação e sinalização alternativo para TLR2 e TLR4 depende da molécula TIRAP, resultando na ativação de NF- κ B, p38, JNK e da proteína quinase ativada por sinais extracelulares (ERK) (Newton, Dixit, 2012), enquanto para TLR3 e TLR4, a ativação pode ocorrer independentemente da MyD88, mas dependente de TRIF (*TIR-domain-containing adapter molecule-inducing interferon β*), também conhecido como TICAM1 (*toll-like receptor adaptor molecule 1*), com o auxílio de TRAM,

resultando na via de sinalização intracelular que leva a ativação do fator de transcrição regulador de interferon do tipo 3 (IRF-3) e do NF- κ B (Figura 2) (O'Neill, Bowie, 2007).

Figura 2 – Ilustração simplificada da cascata de sinalização iniciada após ativação de TLRs

Mediante ativação dos TLRs, transmembrânicos ou endossomais, as moléculas adaptadoras (MyD88, TIRAP, TRIP ou TRAM) são recrutadas e inicia-se uma complexa cascata de sinalização mediada por IRAK e TRAF6. Isto culmina na ativação de proteínas quinases (ex.: p38 MAPK, ERK1/2, JNK), que irão ativar fatores de transcrição (ex.: NF- κ B e AP-1) importantes na modulação do crescimento, sobrevivência e morte celular.

Adicionalmente, na presença de ligantes como o LPS, a ativação de TLR4 requer o auxílio de outras moléculas de superfície, como CD14, uma proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI) contendo resíduos ricos em leucina (LRR) e a proteína de diferenciação mielóide 2 (MD-2) que se complexa com o TLR4. Para tanto, o LPS é reconhecido por uma proteína ligadora de LPS (LBP). Posteriormente, CD14 se acopla diretamente ao LPS (em menor proporção) ou ao LPS ligado (LPS-LBP) e o transfere ao complexo TLR4-MD-2, dando início a cascata de sinalização intracelular (Tesse et al., 2011).

1.5 Sinalização intracelular dos TLRs

Em termos moleculares, a ativação dos fatores NF- κ B, AP-1 e CREB resultante da estimulação dos TLRs e outros receptores (ex.: receptor de TNF tipo I [TNF-RI]), é também crucial para a regulação de diversos genes de proliferação e sobrevivência celular, incluindo as ciclinas (D1 e D2), ciclooxigenase 2 (COX-2) e proto-oncogenes (c-Myc, c-Myb, BCL-2 e

BCL-XL). Ademais, esses regulam a expressão de genes fatores de crescimento (GM-CSF), integrinas de superfície (CD40L) e moléculas de adesão, bem como contribuem para a expansão de células APC (ex.: DCs) envolvidas na captação e processamento do alérgeno na asma (Li et al., 2010; Newton, Dixit, 2012).

A família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) consiste numa das principais vias de sinalização envolvida na ativação dos TLR2 e TLR4 e, assim, auxilia na proliferação e sobrevivência celular, via ativação do AP-1 e CREB/ATF (*Activating transcription factors*). Esta última compreende 4 membros: 1) proteína quinase ativada por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK1/2); 2) p38 MAPK, 3) proteína C-jun NH2-terminal quinase/proteína quinase ativada por estresse (SAPK/JNK) e 4) ERK5, sendo todas fosforiladas e ativadas por quinases sinalizadoras MAP-quinase-quinase (MAPKK) ou MAP/ERK quinases (MEK): MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7 e MEK5 respectivamente (Pearson et al., 2001). Na cascata de sinalização dos TLRs, as MAPK são ativadas via TAK ou MAPKK, a Tpl2 (*Tumor Progression Locus 2*) (Li et al., 2010).

A ativação do fator de transcrição nuclear AP-1, um complexo dimérico formado por membros das famílias Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2) ocorre, principalmente, via ativação de JNK e ERK1/2 (Polli, 2007). No que tange à família do NF- κ B, existem pelo menos cinco membros: p65 (REL-A), REL-B, REL citoplasmática (c-REL), p50 (NF- κ B1) e p52, os quais possuem um domínio homólogo REL na porção N-terminal, responsável pela dimerização e ligação específica às sequências de pares de DNA. A ativação do NF- κ B resultante de estimulação dos TLRs também requer a ativação de TRAF6 e do complexo TAK1/TAB, que juntos ativam o complexo I Kappa B Kinase (IKK) formado por IKK- β , IKK- α e NEMO (IKK- γ).

Por seu turno, a ativação do complexo IKK induz a fosforilação de I κ B α , uma proteína inibitória que mascara o sinal de localização nuclear de NF- κ B. Como consequência da fosforilação, o I κ B α é ubiquitinizado e degradado, liberando a subunidade p65. Já a fosforilação de p105 (precursor de p50) pelo complexo IKK, libera a p50, que juntamente com a p65 translocam-se para o núcleo e iniciam a transcrição das citocinas. A fosforilação proteossomal de p105, que existe em complexo com a MAPKK Tpl2, ativa a cascata Tpl2-MEK-ERK1/2, induzindo genes pró-inflamatórios via ativação de fatores de transcrição (ex.: CREB), mostrando que a ativação de MAPK via TLR pode ocorrer em consequência da ativação de NF- κ B (Kaway, Akira, 2011; Newton, Dixit, 2012).

1.6 Poluição atmosférica e TLRs

Dada à ampla distribuição dos TLR no organismo, incluindo nas APCs, a ativação desses receptores pode contribuir grandemente para a exacerbação da resposta inflamatória infecciosa e alérgica (Li et al., 2010). Além disso, nos últimos dez anos evidências clínicas e experimentais vêm demonstrando fortemente um possível *link* entre os efeitos lesivos dos poluentes ambientais e a ativação dos TLRs. Desta feita, Takano et al. (2002) sugerem que os efeitos deletérios das PED sobre as vias aéreas de camundongos ICR são regulados via TLR4 e TLR2 no pulmão destes, tanto na presença quanto na ausência de LPS, indicando que *per se* esse poluente ambiental atua como um potencial ligante desses TLRs. Corroborando tal sugestão, Inoue et al. (2006) mostraram que a exposição de camundongos C3H/HeJ (deficiente natural de TLR4) ao mesmo poluente, reduziu significativamente as concentrações de vários mediadores/marcadores inflamatórios (ex.: KC, proteína inflamatória do tipo 1 α produzida por macrófagos [MIP-1 α] e IL-1 β). Além disso, camundongos selvagens C3H/HeO/J, mas não os deficientes de TLR4 (C3H/HeJ), quando expostos as PED exibiram potente resposta inflamatória pulmonar associada à maior ativação e expressão de moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição (MYD88, TRAF6, IRAK-1, NF- κ B e AP-1) (Cho et al., 2005).

Mais recentemente, segundo achados clínico de Kerkhof et al. (2010) em esfregaços bucais ou amostras de sangue coletados de crianças residentes em regiões com índice elevado de poluição ambiental, tanto a expressão (mRNA) de TLR2 quanto de TLR4 estava aumentada em relação a crianças que vivem em regiões menos poluídas. Curiosamente, Roland et al. (1991), demonstraram previamente que as quinonas afetam a produção de leucotrienos e, ainda, exercem ações alquilantes que favorecem a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), capazes de lesar células epiteliais do pulmão de linhagem humana (Chung et al., 2008) e de estimular a síntese de proteínas de choque térmico (ex.: HSP60, HSP70) que, por sua vez, são ligantes endógenos dos TLR2 e TLR4 e, também, estimulam as integrinas CD91, CD40 e CD14 ou APC (Quintana, Cohen, 2005).

Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese deste estudo, no qual postulamos que os TLRs (em particular, o TLR4) representam potenciais alvos/mecanismos de indução de susceptibilidade à inflamação alérgica (asma) em infantes que vivem em regiões expostas à altas concentrações do poluente ambiental 1,2-NQ.

1.7 Inflamação alérgica pulmonar (asma)

A asma é uma síndrome/condição inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, que afeta indivíduos de diferentes idades, incluindo crianças e neonatos (OMS, 2009).

Segundo o Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2011) dos Estados Unidos, a incidência da asma nesse país, entre os anos de 2008 e 2010, foi maior em crianças do que em adultos, gerando nesse período um custo, aproximado, de U\$ 55 bilhões para o serviço de saúde. De acordo com a agência Global initiative for asthma (GINA, 2012), bem como outras agências e estudos (D'Amato et al., 2010; Departamento de Informática do SUS [Datasus], 2009; OMS, 2009), o aumento na incidência de asma e outras doenças das vias aéreas, observado nos últimos 20 anos na população de países industrializados e em desenvolvimento, como o Brasil, deve-se, em parte, ao crescimento da urbanização bem como da frota de veículos automotores. Estima-se que em todo mundo, mais de 300 milhões de indivíduos são acometidos por doenças respiratórias (asma), pelo menos, 250.000 sucumbem em países de baixa renda per capita devido às complicações relacionadas (GINA, 2012). Nesse cenário, a asma destaca-se como uma das grandes preocupações, uma vez que a perspectiva de crescimento dessa doença para o ano de 2025 gira em torno de 100 milhões de indivíduos (OMS, 2009).

A inflamação alérgica pulmonar ou asma é uma doença de fisiopatologia complexa, visto que inúmeras células e elementos celulares participam e desempenham funções diferenciadas. A característica predominante dessa doença inclui a hiperresponsividade brônquica (HB) e o bloqueio recorrente (parcialmente reversível) das vias aéreas em resposta à estímulos variados encontrados dentro ([*indoor*] ex.: pêlo animal, ácaros, gases, fungos) e fora de casa ([*outdoor*] ex.: pólen, fumaça de cigarro, poluentes ambientais) (Holguin et al., 2008). Tais estímulos *per se* não afetariam indivíduos não sensíveis (não-asmáticos) (GINA, 2012); todavia, a exposição sucessiva de indivíduos sensíveis a um determinado alérgeno ou substância irritante/tóxica, pode resultar num quadro típico de inflamação pulmonar alérgica, onde a eosinofilia, a hipersecreção de muco e a hiperplasia de células caliciformes atuam como marcadores importantes. Entretanto, a inflamação persistente contribui para alterações ultra estruturais locais nas vias aéreas, refratárias (ou não) à terapia atual, que impreterivelmente evoluem para o quadro de remodelamento e fibrose das vias aéreas, e consequentemente ao agravando do quadro da doença, devido a perda de função gradativa do órgão (ex.: menor elasticidade e complacência pulmonar) (Burgess et al., 2008).

Em geral, o nível de inflamação nas vias aéreas determina a frequência, a severidade e a extensão da doença nos pacientes asmáticos (Killeen, Skora, 2013). Por consistir em um processo multicelular, a inflamação pulmonar é orquestrada por inúmeras populações de células ativadas, como os eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, basófilos, além dos linfócitos T $CD4^+$ e APC como as DCs e os macrófagos (Bradding et al., 2006; Holgate, 2008). Desta feita, na vigência da asma ou da sensibilização alérgica, as APCs iniciam o processo de reconhecimento, processamento e apresentação antigênica. Para tanto, atraem e interagem com células T auxiliares (Th), promovendo a resposta imunológica primária para geração de células Th clones e subsequente polarização (diferenciação) de células Th em células Th auxiliares do tipo 2 (Th2) efectoras.

A ativação das células T $CD4^+$ é dependente de 3 sinais: 1) interação antígeno-específica dos receptores de superfície celular de células T (TCR) com o complexo de histocompatibilidade maior (MHC)-peptídeo das células APC profissionais; 2) ligação de moléculas co-estimuladoras (ex.: CD80, CD86, CD40) presentes na superfície de APC, com receptores de superfície CD28, receptores de membrana das células T citotóxicas (CTLA-4) ou CD40 ligante (CD40L), presentes na células T $CD4^+$; 3) ativação de citocinas inflamatórias (ex.: IL-4, IL-5 e IL-13] (Jaffar et al., 1999). Esse processo resulta na ativação de linfócitos B, produção de IgE e das células de memória. Nos pulmões, a desgranulação dos mastócitos localizados na luz brônquica ocorre via mecanismo ligação cruzada de IgE em seus receptores $Fc\epsilon RI$ presentes na superfície dessas células. A liberação de conteúdos endógenos (ex.: histamina, proteases neutras [cinases e/ou triptase]), bem como a consequente estimulação da biossíntese de eicosanóides, fator de ativação plaquetária (PAF) e citocinas Th2/Th1 (Figura 3) contribuem para o agravamento do quadro (Kawakami, Galli, 2002).

A liberação e ativação dessas células/mediadores culmina em duas respostas distintas, denominadas respostas alérgica imediata e alérgica tardia. A fase imediata caracteriza-se por broncoconstrição e edema (Schoorman et al., 2003), enquanto a fase tardia compreende a migração de células inflamatórias do sangue (em particular, eosinófilos) para o tecido periférico, a proliferação das células T e o aumento na biossíntese de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) em órgãos linfóides, as quais exercem um papel crucial na gravidade dos sinais e sintomas (ex.: eosinofilia, aumento na produção de muco e HB) em pacientes asmáticos (Hutchison et al., 2009; Sampson, 2000). Além das citocinas de perfil Th2 participam também citocinas de perfil T auxiliar do tipo I (Th1; $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$), quimiocinas (CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 e CCL22), VCAM e ICAM, eicosanóides (ex.:

prostaglandinas D₂ e E₂ [PGD₂ e PGE₂], cisteinil-leucotrieno-4 [LTC₄], leucotrieno D₄ [LTD₄]) e fatores de crescimento envolvidos principalmente no remodelamento pulmonar (ex.: fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito [GM-CSF] e fator transformador de crescimento β [TGF- β]; Figura 3) (Bradding et al., 2006; Holgate, 2008).

Outras populações celulares, incluindo linfócitos T CD8⁺ (comumente relacionado à produção de linfócitos T citotóxicos resultantes do reconhecimento viral), células T auxiliar 17 (Th17; identificadas como células T CD4⁺ produtoras de IL-17) e as células Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ [*Forkhead box protein 3*]) participam ativamente da patologia da asma, contribuindo de forma ambígua tanto no efeito pró, ou anti-inflamatório (Betts, 2009; Hwang, 2010; McGuirk et al., 2010).

Figura 3 - Representação esquemática da fisiopatologia da asma.

Fisiopatologia da asma alérgica, desde a captação do antígeno até o desencadeamento do processo inflamatório. Em destaque nota-se os diferentes tipos celulares, receptores e mediadores envolvidos na asma, além dos fatores de transcrição gênica e genes relacionados a predisposição e propagação da patologia nas vias aéreas. Fonte: Vercelli, 2008.

Somado aos tipos celulares e mediadores inflamatórios, fatores genéticos, como os genes *HAVCR1* (*TIM1*) e *ADAM33* expressos em células do músculo liso pulmonar de humanos e altamente expressos nas vias aéreas de camundongos A/J, participam da

fisiopatologia da asma (Bijanzadeh et al., 2010). Por este motivo, camundongos da linhagem de A/J desenvolvem HB espontânea, independentemente do tratamento desses com ferramentas farmacológicas capazes de promover respostas alérgicas (ex.: OVA) (Teerlink et al., 2008). Ainda, a polarização de células T CD4⁺ naíve para Th2 efectoras está associada ao aumento na expressão de múltiplos fatores de transcrição gênica, incluindo GATA-3 (*GATA-binding protein 3*), STAT-6 (*signal transduction-activated transcription 6*) e proto-oncogene c-MAF (Figura 3) (Hausding et al., 2004; Kiwamoto et al., 2006). Isto ocorre como resultado da sinalização mediada pela interação da IL-4 com seu receptor IL4R α , localizado na membrana da célula T CD4⁺ naíve, onde a estimulação do receptor leva à ativação de STAT-6 que, por conseguinte, estimula GATA-3 e induz a polarização das células Th em Th2. Em contrapartida, na vigência de IL-12, essa diferenciação poderá ser inibida pelo fator de transcrição gênica T-bet ativado, o qual é responsável pela polarização de células Th em Th1 (Murphy, Reiner, 2002). Ademais, o fator de transcrição c-MAF, expresso especificamente por células Th2, também exerce regulação positiva na expressão de IL-4 e, conseqüentemente, na população de células Th2 (Vercelli, 2008).

Por tratar-se de uma patologia heterogênea, que possui diferentes fenótipos, tanto a terapia quanto a maior compreensão da fisiopatologia da asma fica comprometida. Dentre esses fenótipos a forma alérgica de asma é a mais comum, cuja associação com atopia familiar desencadeada por antígenos ambientais apresenta um papel principal (Tsai et al., 2012). A atopia e doenças relacionadas (ex.: asma, dermatite atópica) são conhecidas como patologias de tecidos específicos, incluindo pulmão, nariz e pele, respectivamente.

Mais recentemente, postula-se que a alergia também exhibe natureza sistêmica, visto que alterações significativas podem também ocorrer em outros compartimentos e estruturas, tais como o tecido hematopoiético (Allakhverdi et al., 2009). De fato, as sensibilizações com alérgenos em indivíduos alérgicos induzem resposta sistêmica, capaz de estimular a gênese (células progenitoras) de células inflamatórias específicas, como os eosinófilos. Conseqüentemente, a diferenciação e liberação dos eosinófilos da MO para a mucosa respiratória e outros tecidos ocorre de forma precoce e intensa (Uhm et al., 2012).

Apesar do prévio conhecimento de que a resposta alérgica na asma é específica e orquestrada por células profissionais da resposta adaptativa, acredita-se hoje que outras células, bem como receptores da imunidade inata, tal como a família dos receptores de domínio de oligomerização de ligação à nucleotídeos (NOD)-like (NLR) e os TLRs, participam ativamente na amplificação ou regressão dessa doença (Sly, Holt, 2011). Nesse sentido, mecanismos alternativos de especificidade no reconhecimento e apresentação de

antígenos foram recentemente descritos, sugerindo que a ativação da resposta inata funciona como um pré-requisito para a indução e propagação da resposta imune adquirida em patologias como a asma (Akira et al., 2001; Medzhitov, 2001).

De fato, a ativação dos TLRs na resposta alérgica parece exercer, de forma ambígua, um caráter regulatório, capaz de reduzir (Bortolatto et al., 2008) ou aumentar (Piggott et al., 2005) o processo alérgico na asma. Segundo esses autores, a sensibilização alérgica (OVA) em camundongos previamente expostos ao ligante natural do TLR4, o LPS, reduz de forma dose-dependente a resposta alérgica Th2, caracterizada por redução do quadro de eosinofilia, citocinas Th2, HB, produção de muco e níveis sérico de IgE e IgG1, via mecanismo dependente do complexo TLR4-MyD88 e do eixo IL-12/INF- γ (Bortolatto et al., 2008). No entanto, outros trabalhos mostram que a proteína MyD88 participa do efeito desencadeado pelo LPS, via TLR4, na potencialização da resposta alérgica à OVA, fato que contraria a hipótese da higiene (Piggott et al., 2005).

É provável que devido a ampla distribuição dos TLR no organismo, incluindo nas células APCs, o contato do LPS com esses receptores conjugados à MyD88 leva à ativação das DCs e suas moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86). Na vigência de um segundo estímulo (ex.: OVA), as DCs sensibilizadas respondem de forma mais intensa e, conseqüentemente, uma resposta adaptativa mais severa (Iwasaki, Medzhitov, 2004; Schröder, Mauer, 2007).

Cabe ressaltar que a imunidade inata constitui uma resposta de extrema importância em patologias como a asma, visto que o epitélio pulmonar encontra-se constantemente em contato com o meio externo e, portanto, atuando como barreira ativa aos diversos agente nocivos (ex: microrganismos e poluentes atmosféricos). O fluido de revestimento epitelial, que exerce atividade antioxidante, bem como o clearance muco-ciliar e, principalmente, as células do sistema imunológico inato/adaptativo contribuem para a proteção do epitélio pulmonar (e organismo) de possíveis lesões oriundas de contatos com alérgenos ambientais (Sly, Holt, 2011).

No que tange as células fagocíticas presentes no epitélio pulmonar, os macrófagos caracterizam-se como um dos principais fagócitos das vias aéreas, pois atuam no controle da homeostasia pulmonar. Ao menos duas grandes populações de macrófagos são encontradas nos pulmões, os macrófagos alveolares (AMs) e intersticiais (IMs). Após o contato com o patógeno, os AMs podem se diferenciar em 2 subpopulações de macrófagos: clássicos (M1) e ativados (M2), importantes na produção de mediadores pró e anti-inflamatórios (Draijer et al., 2013). A diferenciação/ativação de macrófagos M2 requer o aumento de citocinas Th2

(ex.: IL-13, IL-4) e do fator de transcrição STAT6. Ativados, os macrófagos M2 liberam diversos mediadores inflamatórios e pró-fibróticos, responsáveis pelo aumento do recrutamento celular, secreção de muco e o remodelamento pulmonar (Moreira, Hogaboam, 2011).

Por seu turno, as DCs são amplamente conhecidas por serem as mais eficazes apresentadoras de antígenos das vias aéreas (células apresentadoras profissionais). Além disso, formam uma densa rede de comunicação com as células vizinhas no pulmão (ex.: células epiteliais), atuando como sentinelas na resposta imune pulmonar, onde fazem o reconhecimento antigênico via MHC-TCR ou por interferência prévia de receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (PRR) presentes na superfície da célula (van Rijt et al., 2005). Dentre as diversas populações de DCs, dois grandes subconjuntos, as DCs convencionais (cDCs), que expressam níveis moderados a elevados de CD11c⁺ e CD11b⁺, e uma segunda subpopulação, denominada DC plasmocitóide (pDC), que expressa o antígeno 1 de DCs plasmocitóides (PDCA-1) e baixos níveis de CD11c, são encontradas no pulmão. Na asma experimental em murinos, estudos reportam que múltiplos subtipos de DC possuem papel chave na iniciação das respostas imunes no pulmão devido ao envolvimento destas na comunicação entre órgãos linfóides e não-linfóides. Assim, quando ativadas no parênquima pulmonar, as DCs migram para o linfonodo mediastinal e estimulam a diferenciação de células T CD4⁺ em células Th efetoras (Bezemer et al., 2011).

Outra célula envolvida na resposta imune bem como na asma, são as células exterminadoras naturais (células NK). De fato, pacientes asmáticos exibem aumento da subpopulação de células NK2 (produtoras de IL5 e IL-13) (Wei et al., 2005). Outra célula NK não convencional, comum em processos alérgicos, são as células T NK invariantes (iNKT), as quais contribuem na exacerbação da asma por permitirem a rápida secreção de citocinas e quimiocinas, que modulam a polarização de células T e o recrutamento celular (ex.: eosinófilos, basófilos e neutrófilos) durante a resposta alérgica tardia (Thomas et al., 2010).

1.8 Hipótese e justificativa do projeto

Vários estudos epidemiológicos e poucos farmacológicos demonstram uma estreita relação entre a emissão de PED (e seus contaminantes) e o agravamento da inflamação alérgica em indivíduos susceptíveis, como crianças (Fedulov et al., 2008; Backes et al., 2013). Os mecanismos envolvidos não são claros, muito embora, tanto as crianças quanto os neonatos possuem imaturidade imunológica, bem como maior capacidade permeável do epitélio pulmonar, em virtude do maior número de alvéolos em neonatos quando relacionados ao indivíduo adulto (Dietert et al., 2000; Sly, Holt, 2011).

Ademais, sabe-se que o sistema imunológico inato contém sensores (PRRs) expressos em diversas células da imunidade inata (ex: DCs), capazes de responder à componentes microbianos (ou de origem diversa), denominados PAMPs, que em reconhecimento ao patógeno emitem sinais essenciais para o direcionamento da resposta adaptativa. Nesse sentido, a cascata de sinalização deflagrada pelos TLR é essencial para uma resposta adaptativa eficaz em patologias como a asma (Sly, Holt, 2011). Assim, estudos mostram que a exposição prévia de animais ao LPS, *Mycoplasma pneumoniae* ou *Chlamydia pneumoniae* intensifica a inflamação alérgica e a HB induzidas pela OVA, via mecanismo modulado por TLRs (Schröder, Mauer, 2007; Schröder, 2009).

Por seu turno, a participação dos TLRs tem sido recentemente sugerida como alvos em potencial para os efeitos deletérios de poluentes ambientais, associado ao aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar (Kerkhof et al., 2010; Inoue et al., 2006). Ademais, conforme exposto acima, as PED possuem em sua composição as quinonas, as quais interferem na diferenciação Th-Th2 (King et al., 2006; Santos et al., 2013). Desta feita, hipotetizou-se neste estudo, que os efeitos deletérios das PEDs sobre as vias aéreas, via ativação dos TLRs, ocorre pela ação do seu contaminante químico 1,2-NQ, visto que estudo prévio do grupo evidenciou-se que a exposição neonatal à esse poluente resultou em exacerbação da inflamação alérgica na fase adulta (Santos et al., 2013). Postulou-se ainda, que a ação da 1,2-NQ como agente sensibilizador no pulmão dos animais, resulta da amplificação e maior maturação de células envolvidas na homeostase do sistema imunológico na fase neonatal, comprometendo na fase tardia, o balanço local (vias aéreas) e sistêmico da imunidade Th2. O estudo dos mecanismos desencadeados por poluentes ambientais, auxiliam na compreensão do aumento de doenças pulmonares em indivíduos mais susceptíveis, como crianças, residentes em grandes centros urbanos.

1.9 Objetivos e estratégias

Com base no exposto, a proposta do projeto de pesquisa objetivou:

- 1) avaliar o impacto imediato da exposição de camundongos neonatos à 1,2-NQ sobre as células do sistema imunológico destes, com ênfase nas populações de linfócitos, células NK1, DCs, e moléculas co-estimuladoras;
- 2) elucidar o possível envolvimento do TLR4 e as moléculas adaptadoras (MyD88 e TRIF) envolvidas na ativação deste receptor sobre a resposta imune inata de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal e sua repercussão na resposta alérgica (adaptativa) na idade adulta;
- 3) investigar os possíveis mecanismos moleculares de sinalização celular envolvidos após ativação do complexo TLR4-MyD88 pela 1,2-NQ.

Estratégias:

Foram utilizadas estratégias comparativas funcionais e bioquímicas em camundongos C57BL/6 selvagens, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}, e deficientes naturais de TLR4 (C57BL10/ScCr):

- I- com o auxílio da citometria de fluxo, avaliou-se a população das células e moléculas co-estimuladoras em esplenócitos dos diferentes grupos animais;
- II- utilizando-se o pletismógrafo de corpo inteiro, analisou-se os parâmetros funcionais da reatividade das vias aéreas (função pulmonar via Penh);
- III- de posse de técnicas bioquímicas clássicas, avaliou-se as células inflamatórias no sangue, LBA e MO via microscopia óptica ou por análise histopatológica no pulmão, além do conteúdo sérico de citocinas e IgE via ensaio imunoenzimático (Elisa);
- IV- a integridade e/ou expressão (RNAm) de alguns subtipo de TLR (e moléculas adaptadoras) foi avaliada via RT-PCR em tempo real nos pulmões dos animais;
- V- utilizando-se a técnica de *Western Blot*, mensurou-se a fosforilação proteica de quinases em explantes pulmonares dos diferentes grupos. Já a ativação de fatores de transcrição no pulmão foi realizada via *gel-shift*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), conforme certificado (registro n°. 170 nas fls. 80 do livro 2). Camundongos neonatos machos (2 – 3 g) C57BL/6 selvagens, deficiente natural do TLR4 (C57BL10/ScCr) e nocautes, TLR4^{-/-} (C57BL/6) e MyD88^{-/-} (C57BL/6) foram obtidos de matrizes fornecidas pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP e/ou do Biotério de Criação da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia/ICB sob ventilação controlada, temperatura constante (21 – 22 °C), ciclo claro-escuro (12/12 h) e com ração e água *ad-libitum*.

2.2 Exposição ao poluente 1,2-NQ e delineamento experimental

Em média, grupos de cinco camundongos neonatos selvagens (C57BL/6), deficientes (C57BL10/ScCr) ou nocautes (TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}), receberam pela via nasal, a nebulização com 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min; Sigma, St. Louis, MO, EUA) ou respectivo veículo (PBS [99,008%], Tween 80 [0,001%] e DMSO [0.001%] - Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil; 10 mL; 15 min) durante 3 dias alternados (6°, 8° e 10° dias de vida). Para tanto, os animais foram colocados na cuba de polietileno hermeticamente fechada (área de 600 cm²), conforme dimensões propostas pelo Manual Canadense de Cuidado Animal (CCAC, 1993), acoplada ao inalador ultrassônico (Mod. Respiramax - NS, São Paulo, Brasil), cuja capacidade de nebulização corresponde ao volume de 1 mL/min.

No protocolo 1 (Tabela 2; Figura 4), após a última exposição ao poluente, os camundongos neonatos retornaram as caixas com as respectivas mães até o período do desmame, onde foram separados por gênero em grupos de 5 animais. Na idade adulta (59° dia de vida), os animais foram submetidos ao protocolo alérgico com a ovalbumina (OVA) e, após 24 h da última exposição à OVA, os animais foram submetidos aos ensaios funcionais e bioquímicos (Figura 4, painel A). No protocolo experimental 2, os animais neonatos C57BL/6, selvagens ou TLR4^{-/-} foram expostos ao poluente da mesma forma que o protocolo 1, todavia, foram utilizados ainda neonatos após 24 h da última exposição ao poluente 1,2-NQ

para avaliações dos diversos parâmetros celulares e moleculares (Tabela 2; Figura 4, painel B).

Tabela 2 - Relação dos grupos experimentais e respectivos tratamentos.

	<i>Tratamento neonatal</i>	<i>Tratamento adulto</i>	<i>Grupos</i>
1	Veículo do poluente	Veículo da OVA	Controle-veículo
2	1,2-NQ	Veículo da OVA	1,2-NQ
3	Veículo do poluente	OVA	OVA/OVA (alérgico)
4	1,2-NQ	OVA	1,2-NQ+OVA/OVA
5	Veículo do poluente	_____	Veículo (neonato)
6	1,2-NQ	_____	1,2-NQ (neonato)

Os ensaios experimentais *in vivo* e *in vitro* foram realizados 24 h após a última exposição a OVA ou a 1,2-NQ.

2.3 Determinação da concentração de 1,2-NQ no interior da câmara

A concentração de 1,2-NQ nebulizada, bem como o cálculo da solução remanescente (volume não nebulizado), após o período de nebulização, foi determinado via análise gravimétrica, de acordo (Dennis et al., 1990; Arzhavitina, Steckel, 2010).

Para tanto, o recipiente para nebulização foi pesado antes e após a adição da solução de 1,2-NQ (100 nM, 10 ml) e, imediatamente, após o processo de nebulização. A massa da 1,2-NQ nebulizada dentro da câmara foi calculada com base na equação: $[m_{nq} = mw_{nq} \cdot [NQ] \cdot V_{sol}]$, onde m_{nq} = massa de 1,2-NQ nebulizada no interior da câmara, mw_{nq} = peso molecular da 1,2-NQ (a saber: 158,15 g/mol), $[NQ]$ = concentração da solução de 1,2-NQ preparada e V_{sol} = volume de solução nebulizada na caixa. Após 15 min, verificou-se que a concentração resultante da solução de 1,2-NQ nebulizada no interior da câmara foi cerca de 152 ng, com aproximadamente, 2 a 3% de perda.

2.4 Indução da inflamação alérgica com OVA

Camundongos adultos (8 semanas [59º dia de vida]) previamente expostos a 1,2-NQ ou respectivo veículo na fase neonatal, foram sensibilizados (via s.c.) com a OVA (Grau V, Sigma, St. Louis, MO, EUA), 20 µg em 0,2 mL de PBS adsorvida em 1,6 mg de Al(OH)₃ ou seu respectivo veículo (1,6 mg de Al(OH)₃ em 0,2 mL de PBS) na região dorsal (Santos et al., 2013). Após 7 dias, esses receberam o mesmo tratamento (reforço) e, no 14º dia, foram desafiados pela via nasal (nebulização) com a solução de OVA (1%; 10 mL, 20 min) ou

veículo (10 mL de PBS, 20 min), numa frequência de duas vezes por semana durante quatro semanas (Figura 4 painel A, protocolo 1).

Figura 4 – Ilustração esquemática dos protocolos experimentais utilizados no estudo

A

B

Camundongos neonatos (selvagens, deficientes e nocautes) foram expostos à solução de 1,2-NQ (100 nM; 10 mL; 15 min) ou veículo e, na fase adulta, foram submetidos ao estímulo alérgico com OVA (sensibilizados s.c., dia 0 e 7 e desafiados 2x/semana; 4 semanas pela via nasal). Após 24 h, os animais foram submetidos aos ensaios funcionais (*Penh* – *pause enhanced*) e bioquímicos (Protocolo I, painel A). No protocolo II (painel B), os animais neonatos foram usados logo após 24 h do tratamento com a 1,2-NQ.

2.5 Determinação da pureza do composto 1,2-NQ via teste cromogênico cinético

Para determinação da pureza do composto 1,2-NQ quanto a possível contaminação com o LPS, foi realizado o teste cromogênico cinético (quantitativo) pelo Laboratório de Controle Farmacêutico (CONFAR) da Faculdade de Ciências farmacêuticas (FCF) da USP.

Para tanto, alíquotas da solução de 1,2-NQ (100 nM; 10 mL) e do seu respectivo veículo (10 mL de PBS [99,008%], Tween 80 [0,001%] e DMSO [0.001%]), previamente preparadas em meio apirogênico, foram dispostas em duplicatas numa placa de 96 poços. A curva padrão foi realizada com diluições seriadas de endotoxina de *Escherichia coli* nas concentrações de 50000, 5000, 0,500, 0,050 e 0,005 UE/mL. O controle negativo (água bi-distilada) foi disposto na placa no mesmo volume e em duplicata. Em seguida, o volume de 50 µL do reagente de LAL (Lisado de Amebócito Limulus) foi adicionado em cada amostra na placa e esta foi reservada (37 °C; 10 min). A seguir, o volume de 100 µL do substrato cromogênico foi adicionado em cada amostra e a leitura placa foi efetuada em espectrofotômetro (D.O. 405 a 410 nm). A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido acético. A análise dos dados foi efetuada utilizando-se o programa WinKQCL. Os dados foram expressos como unidade endotóxica (UE/mL) com base na curva padrão descrita acima.

2.6 Avaliação dos parâmetros funcionais, inflamatórios e bioquímicos

2.6.1 Medida da função pulmonar (hiperresponsividade das vias aéreas) “in vivo”

A medida da resistência das vias aéreas à passagem do ar ou hiperresponsividade das vias aéreas em camundongos foi realizada em animais conscientes não-immobilizados, frente à concentrações crescentes do agonista colinérgico metacolina (MCh; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 24 h após o último desafio com OVA (ou veículo). Essa medida foi determinada pelo registro da curva pressórica da respiração (pausa aumentada - *Penh*) com o auxílio de um pletismógrafo barométrico de corpo inteiro (Mod. PLY3351; Buxco; Nova Iorque, EUA). Brevemente, os animais foram individualmente colocados em câmaras transparentes de acrílico (Mod. PLY4211; BUXCO; NY, EUA), nas quais concentrações crescentes de MCh (3,125; 6,250; 12,5; 25,0 e 50 mg/mL) ou PBS (50 µL/animal) foram adicionadas e a leitura do *Penh* foi realizada ($\approx$ 2-3 min). Para minimizar o estresse dos animais e diminuir possíveis

interferências na captação de sinais pelo transdutor, a medida foi feita em ambiente isolado e isento de barulho (Santos et al., 2013).

A impedância expressa para a medida do *Penh* compreende a equação, onde **Penh= [(tempo expiração / tempo relaxamento) – 1]:(fluxo expiratório max. / fluxo inspiratório max.)**, cujo o índice obtido nessa equação serve como indicador da resposta broncoconstritora pulmonar (Elekes et al., 2007; Santos et al., 2013).

2.6.2 *Quantificação celular do lavado broncoalveolar, sangue e medula óssea*

Para obtenção das amostras biológicas, os animais foram continuamente anestesiados com a mistura de isoflurano (2%) em oxigênio (100%) e, depois, submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. O sangue periférico foi imediatamente coletado, via artéria abdominal, em uma seringa contendo heparina (5 UI/mL), enquanto a traquéia desses animais foi canulada com um tubo de polietileno para a coleta do lavado broncoalveolar (LBA). Para tanto, foi feita a inserção intra-traqueal do volume de 0,3 mL de PBS heparinizado (5 UI/mL), o qual foi cuidadosamente aspirado com o fluido (LBA). Tal procedimento foi repetido por mais 4 vezes até obtenção de um volume aproximado de 1,5 mL de LBA, sendo então reservado para quantificação celular e outras análises bioquímicas.

O LBA coletado foi centrifugado (300 g; 10 min) e as células (botão celular) obtidas foram ressuspensas em tampão PBS (0,2 mL). O volume de 10 µL dessa amostra foi adicionado ao volume de 190 µL de cristal violeta (0,2% diluído em ácido acético 30% e água destilada), cuja solução final foi usada para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos foi efetuada por técnica de citocentrífuga (Fanem, São Paulo, Brasil), as lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa e as células presentes no lavado foram diferenciadas de acordo com a sua morfologia em neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos. Os dados foram expressos como número de células ($\times 10^4$) por LBA.

Do sangue periférico coletado, foi igualmente retirado um volume de 10 µL e adicionado ao volume de 190 µL do corante cristal violeta (0,2%) para contagem do número total de células usando-se a câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos do sangue periférico foi efetuada em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa e as células presentes no sangue periférico foram diferenciadas de acordo com a sua morfologia em neutrófilos, linfócitos, eosinófilos e monócitos. Os dados foram expressos como número de células ($\times 10^5$) por mL de sangue.

Para a coleta da medula óssea (MO), ambos os fêmurs foram removidos (≈ 1 cm cada). Com o auxílio de uma seringa e agulha (0,80 x 25 cm) contendo 4 mL de meio asséptico DMEM (GIBCO BRL, EUA), foi realizado a inserção desta numa das extremidades dos fêmurs, e essa solução foi injetada lentamente. O lavado medular foi homogeneizado e depois alíquotado (10 μ L). A seguir, cada alíquota foi ressuspensa em 190 μ L da solução de cristal violeta (0,2%). A quantificação do número total de células do homogenato final foi feita em câmara de Neubauer, enquanto a análise diferencial das células do lavado medular foi feita por microscopia após o processamento das amostras utilizando-se a técnica de citocentrífuga (Fanem, Brasil). As lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa contendo as células presentes na MO foram diferenciadas de acordo com a sua morfologia em: mononucleares, eosinófilos e neutrófilos imaturos (pró-mielócito, mielócito e metamielócito), neutrófilos e eosinófilos maduros. Os resultados foram expressos como número de células ($\times 10^6$) por medula.

2.6.3 Avaliação histopatológica

Mediante anestesia (isoflurano em oxigênio) e posterior sacrifício, os animais selvagens e TLR4^{-/-} foram submetidos à uma excisão da cavidade torácica, donde a artéria pulmonar foi canulada (tubo PE-90) para perfusão pulmonar com o tampão PBS heparinizado (5 UI/mL, 5 mL) e, subsequentemente, com a solução de paraformaldeído (4%, 5 mL) em PBS (pH 7.4). Ao final desse procedimento, o pulmão foi removido, seccionado (sagitalmente) e essas amostras foram imediatamente imersas e fixadas na mesma solução de paraformaldeído por 24 h (temperatura 4 °C). A seguir, as espécimes foram embebidas em parafina (Histosec, Merck, EUA) e seccionadas (5 μ m) em micrótomo (Spencer 820, American Optical Corporation; USA). Os cortes obtidos foram montados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As imagens dos cortes em lâminas foram capturadas digitalmente utilizando-se o microscópio Nikon E600 (Nikon, Tóquio, Japão) integrado à câmera digital (Olympus DP-72, Japão). Com o auxílio do programa Image-Pro Plus (Media Cybernetics, CA, USA), a análise histopatológica das espécimes (*score*) foi realizada com base na contagem da inflamação perivascular, a saber: 0 = normal, 1 = branda, 2 = moderada, 3 = severa.

2.6.4 Obtenção e preparo de células esplênicas e timócitos

Os animais neonatos tratados conforme o protocolo 2 (Figura 4, painel B) foram anestesiados com o isoflurano em oxigênio e exsanguinados. O baço e timo foram rapidamente removidos e macerados em meio asséptico DMEM. O macerado obtido de cada estrutura foi centrifugado (450 g; 5 min à 4 °C) e os botões celulares separados. As hemácias sofreram lise após adição de 1 mL de tampão *Red blood cell lysing buffer* (1 min; Sigma Chemical Company, EUA). A seguir, adicionou-se o volume de 39 mL de tampão PBS gelado nessas amostras que, novamente foram centrifugadas (450 g; 5 min a 4 °C) e os botões celulares isolados e ressuspensos em DMEM. O número de células foi quantificado via microscopia óptica.

2.6.5 Avaliação da expressão das moléculas de superfície no baço e timócitos

As células esplênicas e timócitos (*ver item 2.6.4*) obtidas dos animais, na densidade de 1×10^6 células/poço, foram incubadas com o anticorpo monoclonal anti-CD16/32 (diluição 1:100, 30 min à 4 °C; Bioscience Pharmingen, CA, EUA) para o bloqueio dos receptores Fc e, subsequentemente, com anticorpos (ACs) conjugados com fluorocromo (FITC, APC, PE, Cy, PercP, PE-Cy5 e Pacific blue; 30 min, 4 °C) para as moléculas de superfície de interesse: anti-CD4, anti-CD8, anti-Foxp3, anti-CD45R, anti-B220, anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD40, anti-I-Ab, anti-NK1, anti-PDL-1 ($0,5 \mu\text{g}/10^6$ células; Bioscience Pharmingen, CA, EUA) e, ainda, com anticorpos monoclonais de camundongos dos isótipos IgG2a e IgG2b. Após o período de incubação, as células foram lavadas por duas vezes com o tampão PBS (contendo 3% de soro fetal bovino, pH 7.4), centrifugadas (450 g; 5 min a 4°C) e depois ressuspensas em paraformaldeído (1%; 200 μL) (Peron et al., 2010). A análise da expressão dessas diferentes moléculas no baço ou timo, foi feita com base na aquisição de 5000 eventos em *gate* específico para CD11c^+ em citômetro de fluxo (mod FACScanto; Becton e Dickinson, Mountain View, CA), utilizando-se o programa CellQuest (Apple, EUA).

2.6.6 Avaliação de citocinas/quimiocinas no LBA

No LBA dos diferentes grupos (Tabela 2) de camundongos selvagens ou $\text{TLR4}^{-/-}$ e $\text{MyD88}^{-/-}$, as concentrações de diferentes citocinas e quimiocinas (IL-4, IL-5, IL-12, IL-13,

IL-1 β , IFN- γ e eotaxina) foram mensuradas via teste de ELISA, conforme instruções do fabricante (eBioscience, CA, EUA).

As curvas padrões para IL-5, IL-12, IL-13 e eotaxina (CCL11) foram realizadas nas seguintes concentrações: 0 pg/mL (diluyente do kit), 3,90 pg/mL, 7,81 pg/mL, 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL e 500 pg/mL. Já a curva padrão para IFN- γ foi efetuada nas concentrações de 0 pg/mL (diluyente do kit), 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL e 2000 pg/mL. A curva padrão para IL-1 β foi feita nas concentrações de 0 pg/mL, 7,81 pg/mL, 15,625 pg/mL, 31,25 pg/mL, 62,5 pg/mL, 125 pg/mL, 250 pg/mL, 500 pg/mL, 1000 pg/mL. Em todos os casos, a leitura das amostras foi efetuada em espectrofotômetro (Spectramax plus, Molecular Devices, CA, USA), utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm.

2.6.7 *Determinação da concentração de IgE plasmática total*

As amostras de sangue periférico previamente coletadas (em heparina - 5 UI/mL) dos diferentes grupos experimentais (Tabela 2) foram centrifugadas (3.000 g; 10 min). O plasma foi separado e armazenado para avaliação dos níveis protéicos de IgE, via ensaio imunoenzimático ELISA, conforme instruções do fabricante (BioLegend, San Diego, CA, EUA). A curva padrão para IgE foi feita nas concentrações de 0 ng/mL (diluyente do kit), 0,156 ng/mL, 0,312 ng/mL, 0,625 ng/mL, 1,25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 5 ng/mL e 10 ng/mL. A leitura das amostras foi efetuada sob o comprimento de onda (Absorbância) de 450 nm e 570 nm, e a concentração mínima de IgE detectável no plasma do camundongo foi de 0,1 ng/ml.

2.6.8 *Determinação da concentração de IgE OVA-específica*

As amostras de plasma dos grupos tratados com OVA (expostos ou não ao poluente quando neonatos) ou das linhagens C57BL/6 (selvagem e TLR4^{-/-}) foram centrifugadas (3.000 g; 10 min) e o respectivo sobrenadante foi coletado para mensuração do conteúdo protéico de IgE anti-OVA via ensaio imunoenzimático ELISA, adaptado de Russo et al. (2001). Para tanto, placas de 96 poços foram tratadas com a solução de OVA (2 μ g) em tampão carbonato (pH 9,5; 100 μ L/poço) e submetidas à incubação (24 h à 4 °C). Após esse período, a reação em cada amostra foi bloqueada pela adição da solução tampão de PBS e albumina de soro bovino (BSA; 3%; 200 μ L/poço) por 1 h. Após lavagens com o tampão PBST (PBS + Tween 80 [0,05%]), as amostras foram colocadas em placa de 96 poços (100 μ L/poço) e a curva

padrão foi realizada utilizando-se a mistura (*pool*) de plasma de camungongos hiperalérgicos (C57BL10/ScCr) tratados com OVA, onde para esta curva atribuiu-se um valor arbitrário de 10.000 unidades (U.A.). Após nova incubação das amostras na placa (24 h, 4 °C) e posteriores lavagens, uma alíquota do anticorpo anti-IgE de camundongo foi adicionada em cada amostra (100 µL/poço) e essas foram mantidas por 2 h à 4 °C. Após novo ciclo de lavagem da placa (4x com PBST), o anticorpo anti-IgE-biotinizado para camundongo foi adicionado às amostras (100 µL/poço; 1 h em T.A.) e, após outros ciclos de lavagens, a enzima estreptavidina-HRP (100 µL/poço; 30 min) e o substrato tetrametilbenzidina (TMB; 100 µL/poço; 30 min; BioLegend, San Diego, CA, EUA) foram finalmente adicionados aos poços contendo as amostras. Essa reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ (100 µL), e a leitura das amostras foi efetuada sob comprimento de onda (ABS) de 450 e 570 nm. As medidas de ABS foram convertidas em U.A., baseada na curva padrão descrita acima.

2.6.9 Extração, quantificação do RNA e preparação do cDNA (transcrição reversa)

A expressão do RNAm dos receptores (TLR2, 4 e 7), das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF, bem como dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet em amostras de tecido pulmonar dos diferentes grupos das linhagens C57BL/6 selvagem, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para tanto, as amostras de tecidos foram homogeneizadas em Trizol (1 mL/100 mg de tecido; Gibco, BRL, EUA) para a extração do RNA total. Após 5 minutos da homogeneização, um volume de 200 µl da solução de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1) foi adicionado às amostras. Após agitação para a extração dos lipídios, os tubos foram reservados (10 min.), e as amostras foram posteriormente centrifugadas (12.000 g; 15 min., 4 °C), dando origem a uma suspensão contendo três fases: 1) aquosa (sobrenadante), que contém o RNA, 2) turva (intermediária), que contém o DNA e 3) sólida inferior (precipitado), que contém proteínas e lipídios.

O volume de 500 µl da fase aquosa foi separado e misturado ao volume de 500 µl de isopropanol, que levou à precipitação do RNA. Após 10 minutos em temperatura ambiente, essas amostras foram novamente centrifugadas (12.000 g; 10 min., 4 °C). Os sobrenadantes foram descartados e o precipitado (*pellet*) contendo RNA foi lavado em etanol (95%; 500 µl). Após centrifugação (7.000 g; 5 min., 4 °C), os sobrenadantes foram desprezados, e os precipitados lavados novamente com etanol (75%; 500 µl) e centrifugados (7.000 g; 5 min., 4 °C). Os precipitados de RNA total resultantes de cada amostra foram ressuspensos em água tratada com dietilpirocarbonato (50 µl; DEPC 0,1%).

Para a quantificação do RNA total, as amostras foram diluídas em água Milli-Q autoclavada (1:1000), e a absorbância em cada amostra foi medida em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro; Amersham Bioscience, Inglaterra). As concentrações de RNA total foram calculadas em $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Para verificar a integridade do RNA extraído, amostras contendo 1 μg de RNA foram submetidas à eletroforese (70 V; 30 min.) em gel de agarose (1% em TAE [Tris acetato EDTA]) contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA), o qual foi relacionado à qualidade das bandas de RNA correspondentes às subunidades ribossomais 18 e 28S.

2.6.10 .Purificação / transcrição reversa do RNA total e análise da expressão gênica (qPCR)

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase. Para tanto, 3 μg de RNA total de cada amostra foram diluídas em q.s.p. 9 μL de água DEPC, e depois aquecidas (37 °C; 10 min.). Após novo processo de aquecimento dessas amostras (75 °C; 5 min), estas foram adicionadas a uma solução contendo o inibidor de RNases (1 μl , RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor, Fermentas Life Science), DNase (1 μL , Dnase I, Fermentas Life Science), 4 μL de 5X First-Strand Buffer, 1 μL de oligo dT (100 μM , Fermentas Life Science), DTT (2 μL , 0,1M) e dNTPs (1 μL , 10mM, Fermentas Life Science). Em seguida, as amostras foram reservadas (37 °C; 10 min).

A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNase e a enzima transcriptase reversa (1 μL ; RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Life Science) à 37 °C por 1 h, 75 °C por 5 min e 37 °C por 2 min. Após a reação as amostras de cDNA foram mantidos a -20 °C.

Para a análise da expressão (RNA_m) por RT-PCR em tempo real (qPCR), cada amostra, realizada em duplicata, contem cDNA diluído (3 μL ; 1:10), solução de PCR Maxter mix (6 μL , SYBR Green ROX Mix, LGC Biotecnologia) e o volume de 3 μL de cada *primer* (300 nM; forward e reverse; Tabela 3). As amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação (10 min à 95 °C) e 40 ciclos de amplificação (95 °C por 30 s e 60 °C por 1 min). Em seguida, estas foram dispostas em duplicata e analisadas juntamente com o controle negativo, que avaliou a especificidade da reação (Mx3005P® qPCR System, Stratagene). Após a etapa de amplificação, curvas de dissociação foram obtidas e os produtos formados submetidos à eletroforese em gel de agarose (2%) para confirmação da especificidade da amplificação da reação.

A análise quantitativa foi realizada com o auxílio do programa MxPro (Stratagene, versão 3.0). A expressão RNAm relativa do gene de interesse foi normalizada em relação a Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT), utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ via aplicação da equação: $2 - [\Delta C_t (\text{teste}) - \Delta C_t (\text{HPRT})]$ (Livak e Schmittgen, 2001). Os valores obtidos no grupo veículo foi designado como 1 e os valores obtidos no grupo tratado foram normalizados com os dados obtidos na mesma corrida e foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=5-6 amostras.

Tabela 3 - Sequências de *primers*

<i>Gene</i>	<i>Sequência (5'- 3')</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>Produto (pb)</i>
TLR2	F: TAG GGG CTT CAC TTC TCT GC R: CCA AAG AGC TCG TAG CAT CC	60	126
TLR4	F: TCA GAA CTT CAG TGG CTG GA R: AGA GGT GGT GTA AGC CAT GC	60	82
TLR7	F: CTC TGC GAG TCT CGG TTT TC R: AGA AGG GAG CCA AGG ACA TT	60	137
MyD88	F: AGA GCT GCT GGC CTT GTT AG R: CCA CCT GTA AAG GCT TCT CG	60	125
TRIF	F: CAG CTC AAG ACC CCT ACA GC R: ACA TGT TCC GAA CCG ACA G	60	128
GATA3	F: AGG GCT ACG GTG CAG AGG TA R: CGG AGG GTA AAC GGA CAG AG	60	201
T-bet	F: GAG GAA GGG TTT GAA GGG TG R: AGA AGG AGG GCG TGT TTA CC	60	121
HPRT	F: TAT GCC GAG GAT TTG GAA AA R: ACA GAG GGC CAC AAT GTG AT	60	117

A expressão (mRNA) das moléculas e receptores foi identificada com base nas sequências acima em RT-PCR.

2.6.11 Avaliação da expressão protéica pulmonar da molécula MyD88 via Western Blot

A expressão protéica da molécula adaptadora MyD88 no tecido pulmonar de camundongos dos diferentes grupos foi avaliada via técnica de Western Blot. Para tanto, as amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS (50 mM, 5 vol/mg; pH 7.4) contendo *fenil-metil-sulfonil-fluoridro* (PMSF; 0,5 mM), leupeptina (2,5 µg/mL), antipaína (2,5 µg/mL), NaF (30 mM), pirofosfato (20 mM), B-GP (5 mM) e DTT (1 mM) e depois, centrifugadas (1000 g; 5 min). O conteúdo proteico em cada sobrenadante foi diluído em tampão TRIS (50 mM) a um volume q.s.p. 130 µL. Adicionou-se a cada amostra, o volume de 30 µL de tampão

de Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8) contendo SDS (2%), glicerol (10%), azul de bromofenol (0,001%) e 2-mercaptoetanol (5%). Subsequentemente, separou-se 20 µg de proteína presente nas amostras via eletroforese em gel de poliacrilamida (10%; contendo lauril sulfato de sódio; SDS-PAGE), usando-se um tampão específico (Tris 25 mM, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS) e intensidade constante de corrente (35 mA; voltagem ≈ 100-180 V; Laemmli, 1970).

As bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente via sistema submerso para membrana de nitrocelulose (150 mA, ~40 V; 2h), utilizando-se o tampão específico: Tris (25 mM), glicina (192 mM), SDS (0,1%) e (V/V) de etanol absoluto (18%). A eficiência da transferência foi avaliada pela coloração das membranas por vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético à 5%). A seguir, as membranas foram incubadas (12 h, 18 °C) com anticorpos primários anti-MyD88 (monoclonal de camundongo; 1:500). Após lavagens apropriadas (6x; 10min com TBS-T), as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase (cabra anti-camundongo-HRP – *horseradish peroxidase*; 1:3000). As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens (6x; 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas com o auxílio do kit de revelação, com emissão de quimioluminescência (LumiPhos, Pierce, EUA). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela adição da solução de caseína (0,2%) em TBS-T (Tris-HCl [20 mM], NaCl [137 mM], contendo 0,1% de Tween 20; pH 7,4).

As imagens foram capturadas via sistema de imagens ChemImager (Alpha Innotech, CA, EUA) e as intensidades das bandas foram analisadas por densitometria, e então normalizadas pelos valores de densitometria obtidos das bandas após incubação da membrana com a α -tubulina (controle interno). Os resultados foram expressos como média de % da razão de densitometria de MyD88 por α -tubulina.

2.7 Avaliação dos mecanismos moleculares

2.7.1 Estimulação dual de células esplênicas e análise da população de linfócitos

As células esplênicas obtidas dos animais neonatos C57BL/6, selvagens e TLR4^{-/-}, expostos ao 1,2-NQ ou veículo (*ver item 2.6.4*), na densidade de 1×10^6 células/poço, foram incubadas com o anticorpo anti-CD3 (1 µg/mL; estímulo inespecífico de linfócito), forbol miristato acetato (PMA; 50 ng/mL) + Ionomicina (1 µg/mL; estímulo de linfócito T) ou OVA

(2 $\mu\text{g/mL}$; estímulo de linfócitos Th2), em meio de cultura DMEM contendo brefeldina, durante 24 h (em estufa com 5% de CO_2 à 37 °C), como descrito previamente (Peron et al. 2010). Após esse período, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD16/32 (diluição 1:100, 30 min à 4 °C; eBioscience[®]) para o bloqueio dos receptores Fc e, subsequentemente, com o anticorpo conjugado com fluorocromo FITC anti-CD4 (0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células) durante 30 min a 4 °C, para a marcação de linfócitos. Para a análise da expressão de citocinas intracelular pelas células T CD4⁺, as células foram fixadas e permeabilizadas com Cytotfix[®] / Cytoperm[®] (20 min e 5 min, respectivamente à 4 °C) de acordo com as instruções do fabricante (E-biosciences, San Diego, CA). Ao término desse tempo, as células foram incubadas (20 min; 4 °C) com os anticorpos específicos conjugados com fluorocromo (PE, PEcy7 e APC) para as citocinas de interesse: anti-IL-17, anti-IL-4 e anti-IFN- γ , respectivamente (0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células; BD Biosciences San Diego, CA). Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com Permwash, centrifugadas (450 g, 5 min; 4 °C) e depois ressuspensas em paraformaldeído (1%; 200 μL). A análise da expressão das moléculas nessas células foi realizada após aquisição de 5000 eventos em portão (*gate*) específico para CD4⁺ em citômetro de fluxo (FACSanto Becton e Dickinson, Mountain View, CA), utilizando-se o programa CellQuest (Apple, CA, EUA).

2.7.2 Cultura de tecido pulmonar (*explante*)

Decorridas 24 h da última exposição com o poluente 1,2-NQ, ou respectivo veículo, os camundongos C57BL/6, selvagens ou TLR4^{-/-}, foram anestesiados com a mistura 2% de isoflurano em 100% de oxigênio e, depois dessangrados. O pulmão foi então rapidamente removido e adicionado em placas de cultura contendo meio asséptico DMEM. A cada poço foram adicionados fragmentos (3 porções) de igual peso ($\cong$ 1 mg) do lóbulo pulmonar referentes a dois animais (*“pool pulmonar”*). Em seguida, os fragmentos pulmonares foram estimulados com 1,2-NQ (100 nM, 2 mL) e incubados (em estufa com 5% de CO_2 à 37 °C) em meio asséptico DMEM, contendo 1% de L-glutamina e 0,5% de penicilina/estreptomicina, durante 5, 15 ou 30 min. Após os períodos de incubação, os fragmentos pulmonares, bem como as alíquotas do sobrenadante da cultura nos diferentes tempos foram coletados e armazenados em freezer -80 °C, para posterior análises bioquímicas (Proust et al., 2003).

2.7.3 Expressão proteica de HSP (60, 70 e 90) e papel das quinases (ERK1/2 e SAPK/JNK) em explante pulmonar via Western Blot

A expressão proteica de HSP60, HSP70 e HSP90 no pulmão de camundongos 24 h após a última exposição ao poluente (ou veículo), bem como a expressão da proteína quinase ativada por sinais extracelulares 1 e 2 (ERK1/2), proteína c-jun NH2-terminal quinase / proteína quinase ativada por estresse (SAPK/JNK) e as respectivas proteínas fosforiladas: pERK1/2 e pSAPK/JNK em explantes pulmonares, foi avaliada via técnica de Western Blot. Para tanto, amostras de pulmão foram homogeneizadas e processadas conforme descrito previamente (*ver item 2.6.11*). De modo distinto, as amostras de explantes pulmonares, foram homogeneizadas em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 2,5 µg/mL leupeptina; 2,5 µg/mL antipaína; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 1 mM DTT; 20 mM pirofosfato; 5 mM B-GP), incubadas no gelo (15 min) e centrifugadas (13.000 g; 4 °C) durante 20 min para obtenção do sobrenadante (fração citoplasmática), o qual foi imediatamente processado conforme descrito (*ver item 2.6.11*).

As membranas resultantes da separação e transferência de proteínas, via eletroforese (*ver 2.6.11*), foram incubadas (12 h, 18 °C) com anticorpos primários monoclonal de camundongo ou coelho: anti-SAPK/JNK (1:1000), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-phospho-SAPK/JNK (1:1000), anti-phospho-ERK1/2 (1:1000), anti-HSP60 (1:10000), anti-HSP70 (1:10000) e anti-HSP90 (1:500). Após lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário de cabra anti-camundongo-HRP e anti-coelho-HRP conjugado com a enzima peroxidase de rábano (1:3000). As membranas foram lavadas e as bandas imunorreativas foram reveladas via kit de revelação (LumiPhos, Pierce, EUA). A intensidade das bandas foi analisada por densitometria, utilizando-se o software J-image, sendo que para as proteínas fosforiladas, bem como para as totais, a porcentagem de densitometria foi corrigida pela intensidade das bandas do controle interno anti- α -tubulina de cada membrana. Ainda, para as proteínas fosforiladas, a intensidade das bandas, também foi corrigida pela intensidade das bandas da proteína total (ex.: % de densitometria de pERK1/2 / % de densitometria de ERK total). Os resultados foram expressos como média de porcentagem da razão de densitometria de cada proteína avaliada pela proteína total ou pela α -tubulina. Os anticorpos da proteína fosforilada e da respectiva proteína total, foram incubados em membranas distintas, e posteriormente corrigidos pela α -tubulina da membrana.

2.7.4 Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética (*Gel-shift*) para o NF- κ B e AP-1

Este ensaio consiste na reação de ligação de proteínas de extrato nuclear com uma sequência de nucleotídeos específica para o fator de transcrição, sendo esta previamente marcada com ^{32}P pela T4 polinucleotídeo quinase. Quando o meio reacional é submetido a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, a sonda livre (oligonucleotídeo) migra mais que a sonda ligada ao fator nuclear (banda de retardo).

Para a extração de proteínas nucleares, o método utilizado foi baseado no trabalho de Rong, Baudry (1996). As células foram coletadas em PBS e centrifugadas (12.000 g; 4 °C) por 3 minutos e o *pellet* foi ressuspensionado em tampão de lise (10 mM HEPES; 1,5 mM MgCl_2 ; 10 mM KCl; 2 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina; 2 $\mu\text{g/mL}$ antipaína; 0,5 mM PMSF; 0,1 mM EDTA; 30 mM NaF; 3 mM ortovanadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e incubado em gelo durante 15 minutos. Foi adicionado em seguida NP-40 0,5% com agitação vigorosa sob centrifugação (13.000 g) durante 30 segundos (4 °C). O sobrenadante foi mantido em temperatura a -80 °C para posteriores análises. O botão celular (*pellet*) foi ressuspensionado em tampão de extração (20 mM HEPES; 1,5 mM MgCl_2 ; 300 mM NaCl; 0,25 mM EDTA; 2 $\mu\text{g/mL}$ leupeptina; 2 $\mu\text{g/mL}$ antipaína; 0,5 mM PMSF; 30 mM NaF; 3 mM ortovanadato; 0,5 mM DTT; 2 mM pirofosfato) e, depois, incubado por 20 minutos em gelo, seguido de centrifugação (13.000 g; 4 °C) por mais 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido e a concentração de proteínas determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

O oligonucleotídeo de DNA contendo a sequência do NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCAGGC – 3') ou de AP-1 (c-Jun) 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA – 3', foi marcado com a adição de γ - ^{32}P ATP (Perkin-Elmer, Waltham, MA, EUA) em uma solução contendo Tampão T_4 quinase, T_4 quinase e água; nas seguintes concentrações: 3,5 pmol de oligonucleotídeo, 1U/ μL de T_4 quinase, 1 μL de ^{32}P ATP (3Ci/mmol), 1 μL de tampão T_4 Kinase (10 X) (Promega) em 10 μL de volume de reação. Após incubação à 37 °C por 10 minutos, o excesso de ^{32}P ATP foi retirado com resina sephadex G-25. Foram colocadas colunas (Microspin G-25; GE Healthcare) em um tubo de microcentrifuga, centrifugando-se por (800 g, por 1 min). A coluna foi transferida para um novo tubo aplicando-se a sonda marcada no centro da resina. Após centrifugação o eluato foi recolhido, e no dia do ensaio, a atividade da sonda foi determinada em cintilador beta Tri-carb (Perkin-Elmer), usando no ensaio 30.000 cpm/ μL .

O ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética para NF- κ B (ensaio de competição) foi realizado de acordo (Munhoz et al., 2006). A sonda – o oligonucleotídeo consenso de dupla fita de NF- κ B marcado com 32 P (30.000 cpm) – e o extrato nuclear (2,5 μ g), o oligo frio em excesso ou o anticorpo específico para subunidades (p65, p50, p52, cRel e REL-B) foram aplicados no gel de poliacrilamida (5,5% [acrilamida/bisacrilamida (37,5:1)]). Para a eletroforese, foi usado o tampão TBE (45 mM Tris, 45 mM Ácido Bórico, 0,5 mM EDTA). O gel foi submetido à eletroforese por 2 h (150 V). Após a corrida, o gel foi exposto para secagem e analisado por autoradiografia.

Para o ensaio de *supershift* do gel de retardo, foram adicionados anticorpos específicos às subunidades que compõe o complexo NF- κ B durante a incubação do extrato nuclear com o oligonucleotídeo contendo a sequência específica para o NF- κ B. Foram utilizados anticorpos (1 μ L) contra as subunidades p65, p50, p52, cRel e REL-B (Santa Cruz Biothecnology, EUA).

2.8 Análise estatística

Os dados são expressos como médias $\pm$ EPM de valores absolutos ou em %. Os resultados foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Bonferroni ou Dunnett. Quando indicado, o teste *t* Student pareado (ou não-pareado) foi utilizado. As diferenças foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (Prisma 4.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

3.1 Avaliação da contaminação do composto 1,2-NQ por endotoxina bacteriana

De acordo com o ensaio cromogênico quantitativo, baixas concentrações da endotoxina bacteriana (LPS; <1,4 UE/mg) foi detectada na amostra de 1,2-NQ (100 nM, 10 mL) bem como no volume de 10 mL do respectivo veículo (<0,1 UE/mg).

Adiante, amostras desse mesmo lote de 1,2-NQ (Lote: 02604DE - Sigma; EUA) e das soluções para o preparo do veículo da 1,2-NQ (DMSO; Universal Herbs Inc; EUA e Tween 20; Cayman; EUA) foram utilizados.

3.2 Avaliação das populações celulares de camundongos neonatos expostos a 1,2-NQ

3.2.1 *Análise comparativa das populações de linfócitos T, células NK1 e da molécula PDL-1 no timo de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ*

Nos timócitos provenientes de camundongos C57BL/6 selvagens expostos na fase neonatal (6^o, 8^o e 10^o dias de vida) ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min), a análise da população de células via citometria de fluxo para linfócitos T CD4⁺CD8⁺ (duplo positivo – imaturo; Figura 5, painéis A e B), T CD4⁺ (linfócitos T simples positivo - maduro; Figura 5, painéis A e C), Treg (CD4⁺Foxp3⁺; dados não mostrados) e células NK1 (Figura 5, painéis E e F) não revelou diferenças significativas na porcentagem da população dessas células quando comparadas ao respectivo grupo veículo (Figura 5, painéis A-C). Porém, os timócitos de animais C57BL/6 selvagens expostos a 1,2-NQ no período neonatal exibiram aumento significativo (P<0,01) da porcentagem de linfócitos T CD8⁺ (linfócitos T simples positivo – maduro) em comparação ao respectivo grupo veículo (Figura 5, painéis A e D). Ainda, um aumento significativo (P<0,01) na porcentagem de PDL-1 (Figura 5, painéis G e I), mas não de CD11c⁺PDL-1⁺ (Figura 5, painéis H e I), foi encontrado no timo de camundongos C57BL/6 selvagens expostos precocemente a 1,2-NQ em relação ao respectivo grupo exposto apenas ao veículo (Figura 5, painéis G-I).

De modo distinto, nos timócitos provenientes de camundongos C57BL/6 TLR4^{-/-} expostos na fase neonatal ao poluente, a análise da população de linfócitos T CD4⁺CD8⁺, T CD4⁺ e T CD8⁺ não revelou diferenças significativas na porcentagem dessas populações de

células quando comparadas ao respectivo grupo veículo (Figura 6, painéis A-D). Quando as populações dessas células foram analisadas como valores absolutos, observou-se discreta diminuição, embora não significativa, em relação ao grupo veículo (Figura 6, painéis E, F e G, respectivamente). Ao contrário dos animais C57BL/6 selvagens, a população de células NK1 em timócitos de camundongos C57BL/6 TLR4^{-/-} foi significativamente reduzida ($P < 0,05$) quando analisada como porcentagem de células (Figura 6, painéis H e J), mas não como valor absoluto (Figura 6, painel I) em comparação ao respectivo grupo veículo da mesma linhagem.

Figura 5 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T, NK-1 e PDL-1 no timo de camundongos C57BL/6 selvagens.

Camundongos selvagens foram expostos no 6º, 8º e 10º dia de vida a 1,2-NQ (100nM, 10 mL; 15 min) ou veículo. Timócitos foram obtidos 24 h após a última exposição a 1,2-NQ e incubados (30 min) com ACs anti-CD4, anti-CD8, anti-NK-1 e anti-PDL-1. As populações de células foram quantificadas em citômetro de fluxo e expressas como porcentagem de linfócitos CD4⁺CD8⁺ (duplo positivo - imaturos; painéis A e B), CD4⁺ (painéis A e C), CD8⁺ (painéis A e D), NK1 (painéis E e F) e PDL-1 (painéis G, H e I). Os dados estão expressos como a média ± E.P.M. para n=4-7 animais. **P<0,01 vs. veículo. WT (wild type - selvagens).

Figura 6 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no timo de camundongos TLR4^{-/-}.

Camundongos TLR4^{-/-} foram expostos no 6^o, 8^o e 10^o dia de vida a 1,2-NQ (100nM, 10 mL; 15 min) ou veículo e, 24 h após a última exposição, os timócitos foram obtidas e incubados (30 min) com anti-CD4, anti-CD8 e anti-NK-1. As populações de células foram quantificadas via citômetro de fluxo e expressas como porcentagem de linfócitos CD4⁺CD8⁺ (duplo positivo - imaturos; painéis A e B), CD4⁺ (painéis A e C), CD8⁺ (painéis A e D), NK1 (painéis H e J) ou como valores absolutos (painéis E, F, G e I). Os dados estão expressos como a média ± E.P.M. para n=4-7 animais. *P<0,05 vs. veículo.

3.2.2 *Análise comparativa das populações de linfócitos T e NK1 no baço de camundongos neonatos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos ao poluente 1,2-NQ*

As porcentagens celulares de linfócitos T CD4⁺ (linfócitos T simples-positivo, maduros; Figura 7, painéis A e C), CD8⁺ (linfócitos T simples-positivo, maduros; Figura 7, painéis B e C), bem como linfócitos Treg (CD4⁺Foxp3⁺) e linfócitos B (B220/CD45R; dados não mostrados) no baço de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ não diferem significativamente da porcentagem celular obtida no baço do respectivo grupo controle (veículo; Figura 7, painéis A-C). Todavia, essa exposição precoce a 1,2-NQ aumentou marcadamente ($P<0,01$) a porcentagem de células NK1 esplênicas em relação ao respectivo grupo veículo (Figura 7, painéis D e E).

Em camundongos TLR4^{-/-}, o tratamento precoce com a 1,2-NQ aumentou, porém de forma não significativa, as populações de linfócitos T CD4⁺ (Figura 8, painéis A-C) e T CD8⁺ (Figura 8, painéis C-E) em relação ao respectivo grupo controle (veículo; Figura 8, painéis A-E). Tal como observado nos animais selvagens, a exposição precoce a 1,2-NQ em camundongos TLR4^{-/-} aumentou significativamente ($P<0,05$) a porcentagem de células NK1 esplênicas, embora o valor absoluto dessas, não mostrou um aumento estatisticamente diferente, em relação ao respectivo grupo veículo (Figura 8, painéis F-H).

Figura 7 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no baço de camundongos C57BL/6 selvagens.

Os camundongos selvagens foram expostos no 6º, 8º e 10º dia de vida ao poluente 1,2-NQ (100nM, 10 mL; 15 min) ou veículo. As células do baço foram obtidas 24 h após à última exposição ao poluente e marcadas por 30 min com anti-CD4, anti-CD8 e anti-NK-1. As células foram analisadas por citometria de fluxo e os dados foram expressos como porcentagem de linfócitos CD4⁺ (painéis A e C), CD8⁺ (painéis B e C) e NK1 (painéis D e E). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=4-7 animais. **P<0,01 vs. veículo. WT (wild type - selvagens).

Figura 8 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de linfócitos T e NK-1 no baço de camundongos TLR4^{-/-}.

As células do baço de camundongos TLR4^{-/-} neonatos foram obtidas 24 h após à última exposição ao poluente e marcadas por 30 min com anti-CD4, anti-CD8 e anti-NK-1. As células foram analisadas por citometria de fluxo e os dados foram expressos como porcentagem de linfócitos CD4⁺ (painéis A e C), CD8⁺ (painéis C e D) e NK1 (painéis F e H) ou como valores absolutos (painéis B, E e G). Os dados são expressos como a média ± E.P.M. para n=6-8 animais. *P<0,05 vs. veículo.

3.2.3 *Análise das populações celulares CD11c⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal*

Em esplenócitos de camundongos C57BL/6 selvagens expostos a 1,2-NQ, a incubação com ACs para a integrina de superfície de DCs (anti-CD11c) e moléculas co-estimuladoras (anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86 e anti-I-Ab [MHC-II]) revelou tanto por análise de granulosidade (SSC; Figura 9, painel B) quanto como porcentagem de células CD11c⁺ (Figura 9, painel A), aumento significativo ($P < 0,05$) na população de células CD11c⁺ quando comparadas ao grupo veículo (Figura 9, painéis A e B). De forma semelhante, a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 no baço dos camundongos neonatos selvagens expostos a 1,2-NQ aumentou ($P < 0,01$) em relação ao respectivo grupo controle-veículo, via análise por média de imunofluorescência (M.F.I.) de CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺, mas não como percentual de células para CD11c⁺CD80⁺ (Figura 9, painéis C a J). Nenhuma diferença foi observada na expressão das moléculas de superfície CD40 (dados não demonstrados) e I-Ab no baço dos animais selvagens expostos a 1,2-NQ em relação aos respectivos grupos controles, seja esta por porcentagem de células CD11c⁺I-Ab⁺ via histograma (Figura 9, painéis K e M), ou por M.F.I. de CD11c⁺I-Ab⁺ (Figura 9, painéis L e N).

Em esplenócitos de camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ, a análise via citometria de fluxo da população de células CD11c⁺, por granulosidade (Figura 10, painel B) e por análise da porcentagem das células CD11c⁺ (Figura 10, painel A), revelou um aumento significativo ($P < 0,05$) na população de CD11c⁺ quando comparado ao grupo veículo (Figura 10, painéis A e B). De modo inverso, nota-se uma diminuição ($P < 0,05$) na expressão das moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 e I-Ab no baço dos camundongos TLR4^{-/-} neonatos expostos ao 1,2-NQ, quando avaliados por M.F.I de CD11c⁺CD80⁺, CD11c⁺CD86⁺ ou CD11c⁺I-Ab⁺ (Figura 10, painéis D, F, H, J, L e N), mas não via percentual celular para CD11c⁺CD80⁺ e CD11c⁺CD86⁺ e CD11c⁺I-Ab⁺ (Figura 10, painéis C, E, G, I, K e M). Não houve diferença significativa na expressão da molécula de superfície CD40, tanto quando avaliada como porcentagem de células ou M.F.I (dados não demonstrados).

Figura 9 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de células CD11c⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos C57BL/6.

As células do baço de camundongos C57BL/6 neonatos foram obtidas 24 h após à última exposição ao poluente e marcadas por 30 min com anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86 e anti-I-Ab. As células CD11c⁺ foram analisadas por citometria de fluxo e os dados foram expressos por granulosidade (SSC; painel B) e como porcentagem de células (painel A). Da mesma forma, os dados das moléculas co-estimuladoras foram expressos como porcentagem de CD80, CD86 e I-Ab (painéis C, E, G, I, K e M) ou como média de imunofluorescência (M.F.I) para CD80, CD86 e I-Ab (painéis D, F, H, J, L e N). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=6-8 animais. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,01 vs. veículo. A linha tracejada representa a média do animal naíve. WT (wild type - selvagens).

Figura 10 - Efeito do estímulo neonatal com o poluente 1,2-NQ sobre a população de células CD11c⁺ e moléculas co-estimuladoras no baço de camundongos TLR4^{-/-}.

As células do baço de camundongos TLR4^{-/-} neonatos foram obtidas 24 h após a última exposição ao poluente e marcadas por 30 min com anti-CD11c, anti-CD80, anti-CD86 e anti-I-Ab. As células CD11c⁺ foram analisadas via citômetro de fluxo e expressas por granulocidade (SSC; painel B) e como porcentagem de células (painel A). Da mesma forma, os dados das moléculas co-estimuladoras foram expressos como porcentagem de CD80, CD86 e I-Ab (painéis C, E, G, I, K e M) ou como média de imunofluorescência (M.F.I) para CD80, CD86 e I-Ab (painéis D, F, H, J, L e N). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=6-8 animais. *P<0,05 vs. veículo.

3.3 Avaliação dos parâmetros funcionais, celulares/inflamatórios e bioquímicos na fase adulta de animais expostos precocemente (fase neonatal) a 1,2-NQ

3.3.1 *Análise comparativa da inflamação alérgica pulmonar em camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} expostos precocemente ao poluente 1,2-NQ*

A exposição precoce (6^o, 8^o e 10^o dias de vida) de camundongos machos selvagens C57BL/6 ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) induziu, na idade adulta, maior susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar ($P < 0,01$), a qual caracterizou-se por aumento do influxo de leucócitos totais (eosinófilos, linfócitos, e neutrófilos) no LBA quando comparado aos valores no LBA dos grupos controle de camundongos da mesma linhagem, que receberam somente o veículo (grupo veículo), ou 1,2-NQ ou o estímulo alérgico (Figura 11, painéis A-E).

Em contrapartida, na vigência da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ, camundongos deficientes de TLR4 (C57BL10/ScCr) não exibiram aumento da resposta inflamatória alérgica no pulmão após o estímulo alérgico com OVA na idade adulta, quando comparado ao número de células (totais, eosinófilos, linfócitos, e neutrófilos) no LBA dos grupos de camundongos da mesma linhagem, que receberam somente o veículo ou o poluente (Figura 11 A-E). Ainda, o influxo celular no LBA de animais tratados com a 1,2-NQ e OVA mostrou-se significativamente reduzido em relação ao grupo alérgico da mesma linhagem ou ao respectivo grupo de animais selvagens. A celularidade no LBA dos animais C57BL10/ScCr alérgicos foi significativamente maior ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo veículo, ou aos demais grupos, sendo esta formada por eosinófilos e linfócitos (Figura 11, painéis A-D).

A exposição precoce dos camundongos TLR4^{-/-} ao poluente 1,2-NQ, assim como dos animais MyD88^{-/-} não elevou a contagem de leucócitos no pulmão (LBA) destes quando desafiados com a OVA na idade adulta em relação aos valores celulares obtidos no LBA dos respectivos grupos controle, ou expostos somente ao poluente da mesma linhagem (Figura 11, painéis A-E). Quando comparado ao grupo alérgico das respectivas linhagens, ou ao mesmo grupo (1,2-NQ+OVA/OVA) de animais selvagens, a resposta inflamatória alérgica no pulmão de animais TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} mostrou-se significativamente reduzida (Figura 11, painéis A-E). Na vigência do estímulo alérgico somente (grupo OVA), os camundongos TLR4^{-/-}, bem como MyD88^{-/-} exibiram aumento significativo ($P < 0,01$) no número de leucócitos totais e diferenciais ($P < 0,05$) no LBA em relação aos demais grupos da respectiva linhagem (Figura

11, painéis A-D). Quando comparado ao mesmo grupo de animais das demais linhagens, nota-se que a resposta inflamatória no pulmão dos animais alérgicos TLR4^{-/-} foi substancialmente maior, conforme quantificado pelo número de células totais (Figura 10, painel A), mononucleares (Figura 11, painel C e E), e polimorfonucleares (Figura 11, painel B e D) no LBA destes animais.

Figura 11 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade no LBA) na fase adulta.

As contagens de leucócitos totais (painel A), eosinófilos (painel B), linfócitos (painel C), neutrófilos (painel D) e macrófagos (painel E) foram avaliadas no LBA 24 h após o último desafio com OVA (ou veículo). Os dados estão expressos como a média ± E.P.M. para n=6-8 animais. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 vs. veículo. #P<0,05, ##P<0,01 e ###P<0,001 vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.3.2 *Análise comparativa da resposta inflamatória alérgica no sangue periférico de camundongos selvagens, deficientes ou TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} expostos precocemente a 1,2-NQ*

A exposição precoce de camundongos machos selvagens C57BL/6 a 1,2-NQ induziu, mediante o estímulo alérgico com OVA na idade adulta, um aumento marcante ($P < 0,01$) no número de leucócitos totais e diferenciais (eosinófilos e linfócitos) em relação aos valores de celularidade dos animais da mesma linhagem expostos ao veículo do poluente, ao poluente isoladamente ou ao grupo alérgico (Figura 12, painéis A-C). Nesse compartimento, não foram detectadas diferenças significativas para o número de neutrófilos e monócitos entre os diferentes grupos de animais selvagens (Figura 12, painéis D e E).

Assim como nos camundongos deficientes do receptor TLR4 (C57BL10/ScCr), em camundongos TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}, o estímulo alérgico não aumentou significativamente o número de leucócitos total e diferencial (mononucleares e polimorfonucleares) no sangue periférico (Figura 12, painéis A-E) dos camundongos expostos precocemente a 1,2-NQ, quando comparado aos valores celulares no sangue dos camundongos das respectivas linhagens que receberam os veículos ou somente o poluente. Ainda, a resposta inflamatória nos animais tratados com a 1,2-NQ e OVA mostrou-se significativamente reduzida quando comparada a celularidade no sangue periférico de camundongos alérgicos da linhagem correspondente, ou camundongos selvagens expostos aos mesmos tratamentos (Figura 12, painéis A-E).

O estímulo alérgico isolado promoveu em todas estas linhagens um acréscimo significativo ($P < 0,01$) no número de células totais e, em alguns casos, diferenciais (linfócitos, eosinófilos e neutrófilos), quando comparado aos respectivos grupos de animais que receberam somente o veículo ou a 1,2-NQ (Figura 12, painéis A-D). Nas diferentes linhagens analisadas, ressalta-se que somente a exposição neonatal a 1,2-NQ *per se* não foi suficiente para aumentar ou reduzir o número de células no sangue periférico destes em relação aos respectivos animais que receberam o veículo (Figura 12, painéis A-E).

Figura 12 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes de TLR4 e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade no sangue periférico) na fase adulta.

As contagens de leucócitos totais (painel A), eosinófilos (painel B), linfócitos (painel C), neutrófilos (painel D) e monócitos (painel E) foram mensuradas no sangue periférico 24 h após o último desafio com OVA (ou veículo). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=6-8$ animais. * $P<0,05$, ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ vs. veículo. # $P<0,05$, ## $P<0,01$ e ### $P<0,001$ vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.3.3 *Análise comparativa da celularidade na MO de camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal*

Na vigência do estímulo alérgico com OVA, camundongos machos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal exibiram aumento significativamente do número de leucócitos totais e diferenciais (neutrófilos e eosinófilos), tanto imaturos como maduros, em relação aos valores de celularidade obtidos no grupo da mesma linhagem exposto somente ao estímulo alérgico, ou ao veículo do poluente ou a 1,2-NQ isoladamente (Figura 13, painéis A-F). Somente o tratamento prévio com a 1,2-NQ na fase neonatal ou o estímulo alérgico isolado não modificou o número de células na MO desses animais em relação ao grupo veículo (Figura, painéis 13 A-F).

Tal como no sangue periférico, a figura 13 (painéis A-F) ilustra que o estímulo alérgico com a OVA em camundongos deficientes de TLR4 (C57BL10/ScCr) ou em ambos camundongos TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} precocemente expostos a 1,2-NQ não exacerbou, de forma significativa, o número de leucócitos totais, mononucleares, neutrófilos imaturos e maduros, bem como eosinófilos imaturos e maduros na MO destes em relação aos respectivos grupos expostos somente aos veículos, ao poluente, ou ao alérgeno OVA (Figura 13, painéis A-F). Contudo, quando comparado ao mesmo grupo de camundongos selvagens, observa-se uma redução do número de células totais e do número de eosinófilos maduros na MO dos animais (Figura 13, painéis A e F).

A análise do número de eosinófilos imaturos e maduros na MO dos animais das linhagens C57BL10/ScCr, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} alérgicos evidenciou um aumento ($P < 0,05$) no número de células em relação aos demais grupos da mesma linhagem ou quando comparado ao mesmo grupo de animais C57BL/6 selvagens (Figura 13, painéis E e F).

Figura 13 - Efeito da exposição neonatal de camundongos selvagens, deficientes e nocautes de TLR4 ou MyD88) ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade na MO) na fase adulta.

As contagens de leucócitos totais (painel A), mononucleares (painel B), neutrófilo imaturo (painel C), neutrófilos maduros (painel D), eosinófilos imaturos (painel E) e eosinófilos maduros (painel F) foram avaliadas na MO 24 h após o último desafio com OVA (ou veículo). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=6-8 animais. *P<0,05 e ***P<0,001 vs. veículo. #P<0,05, ##P<0,01 e ###P<0,001 vs 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.3.4 *Análise histopatológica pulmonar de camundongos C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ na fase neonatal.*

A análise histopatológica dos pulmões de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal não revelou alterações morfológicas importantes e tampouco sinais característicos de inflamação (infiltrado de leucócitos) na região perivascular e peribrônquica quando comparado ao escore histopatológico ($< 0,2$) da respectiva linhagem exposta aos veículos (Figura 14, painéis A, B e E). Em contrapartida, os pulmões de camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ exibiram focos isolados de infiltrado leucocitário nas regiões peribrônquica e perivascular, cujo escore histopatológico (> 1) foi maior ($P < 0,01$) do que nos pulmões da respectiva linhagem exposta ao veículo, ou quando relacionado ao grupo correspondente de animais selvagens expostos a 1,2-NQ (Figura 14, painéis C, D e E).

Os pulmões dos camundongos selvagens expostos ao veículo na fase neonatal, e depois a OVA na fase adulta apresentaram focos edematosos e infiltrado leucocitário difuso (região perivascular ou peribrônquica), cujo escore histopatológico moderado (> 1) foi significativamente maior do que os animais controle da respectiva linhagem (Figura 14, painéis A, B e E). Somente o estímulo alérgico em camundongos TLR4^{-/-} também induziu nos pulmões destes, edema e infiltrado celular (polimorfonucleares e mononucleares) profuso e proeminente (região perivascular ou peribrônquica), cujo escore moderado (> 1) foi significativamente maior do que o obtido nos pulmões dos camundongos controle da respectiva linhagem (Figura 14, painéis C, D e E).

Camundongos selvagens previamente expostos a 1,2-NQ e posteriormente a OVA, apresentaram pulmões com regiões edematosas e infiltrados polimorfonucleares e mononucleares profuso e intenso em ambas as regiões analisadas (perivascular e peribrônquica), cujo escore histopatológico moderado (> 1) foi significativamente maior do que o obtido nos pulmões dos camundongos alérgicos ou expostos somente a 1,2-NQ da respectiva linhagem (Figura 14, painéis A, B e E). Embora os pulmões dos camundongos TLR4^{-/-} expostos ao 1,2-NQ e a OVA apresentaram focos de exsudato inflamatório (mononucleares e polimorfonucleares) proeminentes nas regiões perivascular e peribrônquica, o escore histológico moderado (> 1) não foi estatisticamente diferente do grupo alérgico da respectiva linhagem e tampouco diferiu do escore do grupo correspondente da linhagem selvagem (Figura 14, painéis C, D e E).

Figura 14 - Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de camundongos selvagens e TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ na idade neonatal na vigência do estímulo alérgico na idade adulta.

As lâminas dos diferentes grupos de animais expostos ou não ao poluente na fase neonatal e a OVA na idade adulta foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e as imagens foram capturadas em diferentes aumentos (barra: 50 μ m, coluna A e C e 20 μ m, coluna B e D). As setas indicam a presença de células poli ou mononucleares. Os quadrados indicam regiões com presença de edema e infiltrado celular. A figura E representa a análise de escore histopatológico realizada em ambas as linhagens. Os dados do score histopatológico foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=4 regiões perivascular de 3-4 diferentes animais *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 vs. veículo. #P<0,05 vs. OVA/OVA. B= brônquios, V= vaso, PB= região peribrônquica, PV região perivascular.

3.3.5 *Análise comparativa das citocinas/quimiocinas no LBA de camundongos selvagens e ambos $TLR4^{-/-}$ e $MyD88^{-/-}$ expostos precocemente a 1,2-NQ*

A estimulação alérgica com OVA em camundongos C57BL/6 selvagens, precocemente expostos a 1,2-NQ aumentou significativamente ($P < 0,05$) as concentrações de IL-4 e IL-5 no LBA, mas não interferiu nas concentrações pulmonares das demais citocinas (IL-13, IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e eotaxina) quando comparado ao grupo veículo (Figura 15, painéis A-G). Em camundongos selvagens expostos somente a 1,2-NQ, ao contrário do observado nos animais alérgicos, nota-se um aumento significativo nas concentrações tanto de citocinas/quimiocinas Th2 (IL-13 e eotaxina), bem como de citocinas Th1 (IL-12 e IL-1 β) no LBA dos animais em relação ao grupo veículo (Figura 15, painéis A-G).

A análise das distintas citocinas/quimiocinas inflamatórias em camundongos $TLR4^{-/-}$ expostos precocemente a 1,2-NQ, não apresentou alterações significativas (aumento ou diminuição) dos níveis de citocinas após estímulo com OVA ou veículo, em comparação ao respectivo grupo veículo (controle) ou ao grupo alérgico (Figura 15, painéis A-E). Entretanto, quando comparados aos respectivos grupos (grupo 1,2-NQ ou 1,2-NQ+OVA) de animais selvagens, nota-se uma redução na concentração de IL-5, IL-13, IL-12 e IL-1 β no LBA dos animais.

A estimulação alérgica com OVA em camundongos $MyD88^{-/-}$, expostos a 1,2-NQ na fase neonatal diminuiu significativamente ($P < 0,05$) a concentração de IL-13 no LBA, quando comparado ao grupo veículo, mas não interferiu nas concentrações pulmonares das demais citocinas (IL-4, IL-5, IFN- γ , IL-1 β , IL-12 e eotaxina) quando comparado aos grupos veículo, grupo 1,2-NQ ou ao grupo alérgico (Figura 15, painéis A-G). No entanto, quando comparado ao mesmo grupo de animais selvagens, observou-se (com exceção de eotaxina), uma redução nos níveis das citocinas inflamatórias no LBA (Figura 15, painéis A-F). Nos animais $MyD88^{-/-}$, o tratamento precoce com 1,2-NQ *per se* foi capaz de promover o aumento significativo dos níveis de IFN- γ no LBA dos animais, quando comparado ao grupo controle da mesma linhagem (Figura 15, painel D).

Figura 15 - Efeito da exposição neonatal de camundongos C57BL/6, selvagens, TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica (celularidade na MO) na fase adulta.

Camundongos foram expostos a 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou seu veículo no 6º, 8º e 10º dias de vida. Na fase adulta (8ª semana), esses receberam o estímulo alérgico com a OVA e as concentrações de IL-4 (painel A), IL-5 (painel B), IL-13 (painel C), IFN- γ (painel D), IL-12 (painel E), IL-1 β (painel F) e eotaxina (painel G) foram mensuradas no LBA destes 24 h após o último desafio com a OVA (ou veículo). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=5-7 animais. *P<0,05 vs. veículo. WT (wild type - selvagens).

3.3.6 *Concentração sérica de IgE total em camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ*

Conforme ilustra a figura 16, a concentração plasmática de IgE em camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal foi significativamente menor ($P < 0,05$) quando comparado ao respectivo grupo veículo. Na vigência do estímulo alérgico na idade adulta destes, observou-se um aumento ($P < 0,05$) na concentração de IgE em relação ao grupo controle, ao grupo que recebeu 1,2-NQ isoladamente, mas não diferiu estatisticamente do valor sérico obtido no grupo alérgico (Figura 16).

Camundongos deficientes naturais de TLR4 que receberam somente o poluente na fase neonatal não apresentaram alterações na concentração de IgE plasmática quando comparados ao grupo veículo (Figura 16). No entanto, camundongos C57BL10/ScCr expostos ao poluente na fase neonatal e OVA na idade adulta, tal como os camundongos selvagens, exibiram aumento significativo ($P < 0,05$) na concentração de IgE plasmática quando relacionados aos demais tratamentos e principalmente quando comparado com o grupo alérgico (Figura 16).

Em camundongos TLR4^{-/-}, o tratamento com o poluente 1,2-NQ na fase neonatal, de forma isolada, bem como o posterior estímulo com OVA, não foi capaz de induzir aumento na concentração de IgE do plasma dos animais (Figura 16). Contudo, quando comparado ao mesmo grupo de animais selvagens, observou-se uma diminuição nas concentrações de IgE no plasma dos camundongos TLR4^{-/-} tratados com 1,2-NQ e OVA (Figura 16).

Tanto em animais selvagens, como nos camundongos deficientes ou nocautes para TLR4, não foi possível observar aumento nas concentrações plasmáticas de IgE no grupo alérgico com relação aos demais grupos das respectivas linhagens (Figura 16).

Figura 16 - Concentração plasmática de IgE nas diferentes linhagens de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.

A figura acima ilustra as concentrações de IgE obtidas no plasma de animais selvagens, deficientes ou nocautes de TLR4 expostos à 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou veículo na fase neonatal e posteriormente submetidos ao estímulo alérgico com OVA na fase adulta. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=5-8 animais. Valores de *P<0,05 vs. veículo. #P<0,05 vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

Análise comparativa da concentração plasmática de IgE OVA-específica entre camundongos selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Conforme demonstra a figura 17, a exposição precoce de camundongos selvagens a 1,2-NQ não contribuiu de forma sinérgica com a OVA para o aumento da concentração de IgE OVA-específica no plasma dos animais quando comparado ao respectivo grupo alérgico. Ao contrário, nota-se redução significativa da concentração de IgE OVA-específica no grupo de animais que recebeu ambos os estímulos (1,2-NQ e OVA) em relação aos valores obtidos nos animais expostos somente o estímulo alérgico (Figura 17).

Nos animais TLR4^{-/-}, a concentração de IgE OVA-específica tanto em camundongos expostos precocemente a 1,2-NQ e a OVA, quanto em camundongos TLR4^{-/-} alérgicos, não mostrou-se alterada no plasma dos animais quando comparados entre si. Entretanto, os níveis de IgE OVA-específica nos animais nocautes apresentaram-se discretamente diminuídos em relação ao grupo alérgico de camundongos selvagens (Figura 17).

Figura 17 – Concentração plasmática de IgE anti-OVA em camundongos selvagens e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal

A figura ilustra as concentrações obtidas de IgE anti-OVA no plasma de animais C57BL/6 selvagens e TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou veículo na fase neonatal e depois submetidos ao estímulo alérgico com OVA na fase adulta. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=5-6 animais. Valores de **P<0,01 vs. veículo. WT (wild type - selvagens).

3.3.7 Efeito comparativo da exposição precoce do poluente 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos selvagens, deficientes e nocautes (*TLR4*^{-/-} e *MyD88*^{-/-})

A inflamação alérgica em camundongos selvagens induziu um aumento significativo da reatividade das vias aéreas (via *Penh*) frente à metacolina (MCh; 3,125; 6,250; 12,5; 25,0 e 50 mg/mL) quando comparado ao grupo controle (Figura 18, painéis A, E e F). Todavia, a exposição dos animais selvagens à 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) na fase neonatal não potencializou o aumento dessa reatividade evocada pela MCh conforme ilustra a figura 18 (painel A) e, também expresso como área sob a curva (AUC; Figura 18, painel E) e resposta máxima (Emax.; Figura 18, painel F).

A análise comparativa da reatividade das vias aéreas das diferentes linhagens de camundongos deficientes e nocautes de TLR4 ou de MyD88, submetidos aos tratamentos com o poluente e OVA não apresentaram aumento nos valores de *Penh* frente às concentrações crescentes de MCh em relação ao grupo veículo e ao grupo 1,2-NQ da linhagem correspondente (Figura 18, painéis B-F). Em contraste, o valor absoluto de *Penh* ou da AUC e Emax frente a curva concentração resposta à MCh nos grupos de animais *TLR4*^{-/-}, *MyD88*^{-/-} ou deficiente do TLR4 expostos a 1,2-NQ e OVA foi significativamente menor ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo alérgico, ou quando comparado com o mesmo grupo de camundongos selvagens (Figura 18, painéis A-F).

Ademais, a exposição precoce a 1,2-NQ *per se*, não induziu aumento na reatividade das vias aéreas nas diferentes linhagens analisadas. Em animais C57BL10/ScCr somente o grupo alérgico mostrou reatividade das vias aéreas aumentada ($P < 0,05$) em relação aos demais grupos da mesma linhagem ou quando comparado ao grupo correspondente de camundongos das demais linhagens (Figura 18, painéis A-F).

Figura 18 - Avaliação da reatividade das vias aéreas de camundongos selvagens, deficientes e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ.

A reatividade das vias aéreas (via *Penh*) frente à MCh (concentrações crescentes) em camundongos adultos selvagens (painel A), ScCr (painel B), TLR4^{-/-} (painel C) e MyD88^{-/-} (painel D) foi avaliada nos animais tratados com o poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou respectivo veículo, na ausência ou presença de OVA, 24 h após o último desafio. A medida de *Penh* foi realizada por curva concentração-resposta e expressa como valores absolutos (painéis A-D), área sob a curva (AUC, painel E) e efeito máximo (Emax, painel F) nas diferentes linhagens de camundongos. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=5-7$ animais. Valores de * $P<0,05$ e *** $P<0,001$ vs. veículo. # $P<0,05$ e ## $P<0,05$ vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.3.8 *Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na expressão RNAm e protéica pulmonar dos TLRs e moléculas adaptadoras*

Conforme demonstrado na figura 19, a análise por PCR em tempo real revelou no pulmão de camundongos selvagens expostos na fase neonatal a 1,2-NQ um aumento significativo na expressão de RNAm de TLR2, TLR4, TLR7 e TRIF, sem afetar a expressão (RNAm e proteica) de MyD88, em relação aos mesmos animais expostos ao veículo do poluente (Figura 19, painéis A-F).

O posterior estímulo alérgico na fase adulta promoveu nos animais expostos previamente a 1,2-NQ um aumento subsequente na expressão (RNAm) do TLR4 e da molécula TRIF, em relação ao respectivo grupo veículo (Figura 19, painéis A-D). Nenhum aumento significativo foi observado na expressão de RNAm para TLR2, TLR4, TLR7 e moléculas adaptadoras no pulmão do grupo de camundongos selvagens alérgicos (Figura 19, painéis A-F).

Na vigência da exposição precoce a 1,2-NQ, camundongos TLR4^{-/-} também apresentaram aumento significativo na expressão de RNAm para a molécula adaptadora TRIF, bem como para MyD88 em relação ao grupo veículo (Figura 19, painéis D e E). Em contraste, os camundongos TLR4^{-/-} expostos somente ao alérgeno não exibiram aumento significativo na expressão (RNAm) para TRIF e MyD88 quando comparados aos demais tratamentos da mesma linhagem, ou quando comparados ao mesmo grupo de camundongos selvagens (Figura 19, painéis C e D). Todavia, camundongos TLR4^{-/-} expostos a ambos os tratamentos (1,2-NQ e OVA) não apresentaram diferenças significativas na expressão de RNAm para as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF no pulmão em relação ao grupo veículo, 1,2-NQ ou grupo alérgico (Figura 19, painéis C e D).

Figura 19 - Efeito da exposição precoce do poluente sobre a expressão (RNAm) e/ou protéica de TLRs e das moléculas adaptadoras nos pulmões de camundongos selvagens e TLR4^{-/-}.

A expressão relativa (RNAm) e/ou protéica de TLR2 (painel A), TLR4 (painel B), TLR7 (painel C) e moléculas adaptadoras TRIF (painel D) e MyD88 (painel E e F) foi avaliada no pulmão de camundongos selvagens e/ou nocautes para TLR4 expostos ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) na ausência ou presença do estímulo alérgico. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=5-6 animais. Valores de * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ vs. veículo. # $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.3.9 Expressão RNAm e protéica dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet no pulmão de camundongos selvagens e nocautes expostos precocemente a 1,2-NQ

Como ilustrado na figura 20, no pulmão de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a análise por PCR em tempo real revelou um aumento significativo ($P<0,05$) na expressão relativa (RNAm) para os fatores de transcrição GATA3 e T-bet no pulmão, quando comparado ao grupo veículo (Figura 20, painéis A e B). De modo semelhante, em animais selvagens alérgicos, o tratamento prévio com a 1,2-NQ aumentou ($P<0,01$) a expressão (RNAm) para ambos os fatores GATA3 e T-bet no pulmão dos animais em relação ao respectivo grupo veículo, ou quando comparado com o grupo alérgico (Figura 20, painéis A e B). Nenhum aumento significativo foi observado na expressão (RNAm) para GATA3 e T-bet no pulmão de camundongos selvagens expostos somente a OVA (Figura 20, painéis A e B).

Em contraste, a exposição precoce a 1,2-NQ *per se* bem como o posterior estímulo alérgico na fase adulta, não induziu alterações (aumento ou diminuição) na expressão (RNAm) para GATA3 e T-bet no pulmão dos camundongos TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} em relação ao grupo veículo ou alérgico das respectivas linhagens. Entretanto, a expressão de RNAm para ambos os fatores de transcrição mostrou-se significativamente reduzida no grupo 1,2-NQ bem como no grupo exposto a ambos os estímulos (1,2-NQ e OVA) em relação aos correspondentes camundongos selvagens (Figura 20, painéis A e B).

No pulmão dos animais TLR4^{-/-} alérgicos, observou-se um aumento significativo na expressão de RNAm para T-bet, mas não para GATA3 quando comparado aos demais grupos da respectiva linhagem (Figura 20, painéis A e B). Nenhuma diferença na expressão de ambos os fatores de transcrição foi encontrada no pulmão de camundongos MyD88^{-/-} alérgicos (Figura 20, painéis A e B).

Figura 20 - Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ na expressão (RNAm) dos fatores de transcrição GATA3 e T-bet nos pulmões de camundongos C57BL/6, selvagens, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}.

A expressão relativa (RNAm) de GATA3 (painel A) e T-bet (painel B) foi avaliada no pulmão de camundongos selvagens e TLR4^{-/-} ou MyD88^{-/-} expostos a 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) na ausência e presença do estímulo alérgico. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=4-7 animais. Valores de *P<0,05 e **P<0,01 vs veículo. #P<0,05 vs. 1,2-NQ+OVA/OVA. WT (wild type - selvagens).

3.4 Avaliação dos mecanismos moleculares

3.4.1 Análise comparativa das populações de linfócitos Th17, Th1 e Th2 no baço de camundongos selvagem e TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ e re-estimulados *in vitro*

A análise da população de linfócitos T em células esplênicas de camundongos C57BL/6 selvagens expostos a 1,2-NQ no período neonatal e re-estimulada *in vitro* com PMA e ionomicina, durante 24 h, revelou um aumento marcante ($P < 0,01$) na porcentagem de linfócitos Th17 (CD4⁺/IL-17⁺) e Th1 (CD4⁺/INF- γ ⁺) em relação ao grupo veículo que recebeu o mesmo estímulo (Figura 21, painéis A e B). Já a porcentagem da população de linfócitos Th2 (CD4⁺/IL-4⁺) em células esplênicas de camundongos neonatos selvagens expostos a 1,2-NQ e re-estimulados com PMA e ionomicina não diferiu da população de células do grupo veículo (Figura 21, painel C). Todavia, quando as células esplênicas de animais selvagens expostos a 1,2-NQ foram re-estimuladas com a OVA durante 24 h, evidenciou-se um aumento na população Th2 em relação ao grupo veículo (Figura 21, painel C). Em contraste, em células esplênicas de animais selvagens expostos a 1,2-NQ e re-estimuladas *in vitro* com o anti-CD3 durante 24 h, a porcentagem da de células Th17 (Figura 21, painel A), Th1 (Figura 21, painel B) e Th2 (Figura 21, painel C) não foi distinta da população encontrada no respectivo grupo controle (veículo).

Diferentemente dos camundongos selvagens, em camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ no período neonatal, a análise da população de linfócitos T em esplenócitos, após re-estímulo com PMA e ionomicina, não revelou nenhum aumento na porcentagem de linfócitos Th17 e Th1 em relação ao grupo veículo (Figura 21, painéis A e B). No entanto, quando comparados aos respectivos grupos de animais selvagens observa-se uma redução na população de linfócitos Th17 e Th1 (Figura 21, painéis A e B). A população de linfócitos Th2 em células esplênicas de camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ e re-estimulados com PMA e ionomicina não diferiu da população de células do grupo controle, mas foi menor em relação ao respectivo grupo de animais selvagens (Figura 21, painel C).

Em células esplênicas de camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ no período neonatal e re-estimuladas *in vitro* com a OVA durante 24 h, observa-se um aumento na porcentagem da população de células Th2 em relação ao respectivo grupo veículo. Quando comparados aos mesmos grupos de animais selvagens, observa-se uma diminuição na população de linfócitos Th2 (Figura 21, painel C).

Nas células esplênicas dos animais TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ e re-estimuladas com o anti-CD3, observa-se um aumento significativo ($P < 0,05$) na população de células Th17 (Figura 21, painel A) e Th1 (Figura 21, painel B), quando comparado ao respectivo grupo veículo. Todavia, quando comparadas aos mesmos grupos de animais selvagens não foram observadas diferenças nas populações de células Th17 e Th1 estimuladas com anti-CD3 (Figura 21, painéis A e B). A população de linfócitos Th2 não diferiu entre o grupo exposto a 1,2-NQ e veículo após re-estimulação *in vitro* com o anti-CD3; no entanto, nota-se diminuição na população de linfócitos Th2 nestes animais, quando comparado aos respectivos grupos de animais selvagens (Figura 21, painel C).

Figura 21 - Efeito do estímulo *in vitro* em células esplênicas de camundongos neonatos selvagens e TLR4 nocautes previamente expostos a 1,2-NQ sobre o perfil de linfócitos T.

As células esplênicas dos camundongos foram obtidas 24 h após a última exposição a 1,2-NQ e, então, reestimuladas por mais 24 h com anti-CD3, OVA ou PMA + ionomicina. A população de linfócitos nessas células foi analisada via citômetro de fluxo. Os resultados foram expressos como a média $\pm$ E.P.M da porcentagem de células Th17 (CD4+/IL-17+; painel A), Th1 (CD4+/IFN- γ +; painel B) e Th2 (CD4+/IL-4+; painel C) para n=10 animais. Valores de *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 vs. veículo. WT (wild type - selvagens).

3.4.2 Efeito do poluente 1,2-NQ na ativação (fosforilação) das proteínas-quinases em explante pulmonar de camundongos neonatos C57BL/6, selvagens e TLR4^{-/-}

A expressão da proteína fosforilada e da proteína total para ERK1/2 e SAPK/JNK no pulmão dos camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ, mostrou aumento discreto, porém não significativo (com exceção da expressão proteica total de ERK1/2), após re-estímulo *in vitro* com 1,2-NQ, nos diferentes tempos avaliados (0, 5, 15 e 30 min), quando comparados com os respectivos grupos de animais selvagens expostos ao veículo do poluente e re-estimulados *in vitro* com 1,2-NQ (Figuras 22 e 23, painéis A e B). Entretanto, nos animais selvagens tratados precocemente com o poluente, a razão da expressão das proteínas (ERK1/2 e SAPK/JNK) fosforiladas pela respectiva proteína total nos explantes pulmonares, não demonstrou diferenças (aumento ou diminuição) após re-estímulo *in vitro* com 1,2-NQ, em comparação ao grupo de animais tratados precocemente com veículo e re-estimulados *in vitro* com 1,2-NQ (Figura 22 e 23, painel C).

A análise da expressão proteica de ERK1/2 e SAPK/JNK no pulmão de camundongos TLR4^{-/-} neonatos, mostrou que o tratamento precoce com 1,2-NQ, bem como o reestímulo *in vitro* com o poluente nos diferentes tempos (0, 5, 15 e 30 min), não promoveu alterações significativas na fosforilação, ou na expressão proteica total de ERK1/2 e SAPK/JNK, quando comparado com os animais expostos previamente ao veículo do poluente e re-estimulados *in vitro* com 1,2-NQ (Figuras 22 e 23, painéis D-F).

Figura 22 - Análise temporal da expressão proteica total e da forma fosforilada de ERK1/2 em explante pulmonar de camundongos neonatos selvagens e TLR4^{-/-} submetidos ao estímulo dual com 1,2-NQ.

Os camundongos neonatos, selvagens ou TLR4^{-/-} foram expostos ao poluente 1,2-NQ (ou veículo). 24 h após à última exposição ao poluente o pulmão foi retirado e reestimulados in vitro com 1,2-NQ (5, 15 e 30 min). A expressão proteica total e da forma fosforilada de ERK foi avaliada em explantes de pulmão. As bandas imunorreativas foram expressas na forma de porcentagem de pERK por tubulina (painéis A e D), ERK1/2 (total) por α-tubulina (painéis B e E) ou razão de pERK por ERK1/2 (painéis C e F). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. para n=3 pools (cada pool = pulmão de 2 animais). Valores de *P<0,05 vs. veículo (controle) WT (wild type - selvagens).

Figura 23 - Análise temporal da expressão proteica total e da forma fosforilada de SAPK/JNK em explante pulmonar de camundongos neonatos selvagens e TLR4^{-/-} submetidos ao estímulo dual com 1,2-NQ.

Os camundongos neonatos, selvagens ou TLR4^{-/-} foram expostos ao poluente 1,2-NQ (ou veículo). 24 h após à última exposição ao poluente o pulmão foi retirado e reestimulado *in vitro* com 1,2-NQ (5, 15 e 30 min). A expressão proteica total e da forma fosforilada de SAPK/JNK foi avaliada em explantes de pulmão. As bandas imunorreativas foram expressas na forma de porcentagem de pJNK por tubulina (painéis A e D), JNK total por α-tubulina (painéis B e E) ou razão de pJNK por JNK (painéis C e F). Os dados foram expressos como a média ± E.P.M. para n=3-4 pools (cada pool = pulmão de 2 animais). WT (wild type - selvagens).

3.4.3 Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na ativação dos fatores de transcrição nuclear NF- κ B e AP-1 em pulmão de camundongos C57BL/6 neonatos selvagens

Após 24 h da exposição a 1,2-NQ, a análise da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, via ensaio de gel de retardo, demonstrou um aumento significativo ($P < 0,05$) na translocação de NF- κ B (sonda ligada ao fator nuclear) no pulmão desses animais em relação a translocação medida (unidades arbitrárias; U.A.) nos pulmões dos animais naive ou expostos ao veículo do poluente (Figura 24, painéis A e B). Não foram observadas diferenças estatísticas nos valores (U.A.) do NF- κ B obtidos entre os grupos naive e veículo (Figura 24, painéis A e B).

Em contraste, a exposição ao poluente 1,2-NQ reduziu significativamente ($P < 0,01$) a ativação do fator de transcrição nuclear AP-1 no pulmão dos animais quando comparado a translocação medida (U.A.) nos pulmões dos animais naive ou expostos ao veículo do poluente (Figura 25, painéis A e B). Não foram observadas diferenças estatísticas nos valores (U.A.) de AP-1 entre os grupos naive e veículo (Figura 25, painéis A e B).

Figura 24 - Efeito da 1,2-NQ na ativação do NF- κ B em pulmão de camundongos neonatos selvagens.

A ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B em pulmão de camundongos selvagens expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou veículo foi avaliada 24 h após a última exposição ao poluente utilizando o ensaio de gel de retardo em extratos nucleares. As bandas de retardo de NF- κ B, foram expressas como unidades arbitrárias (painéis A e B) e as bandas não específicas (NE) não foram quantificadas. Os dados foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=6 animais. *P<0,05 vs veículo. #P<0,05 vs naïve.

Figura 25 - Efeito da 1,2-NQ na ativação de AP-1 em pulmão de camundongos neonatos selvagens.

A ativação do fator de transcrição nuclear AP-1 em pulmão de camundongos selvagens expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou veículo foi avaliada 24 h após a última exposição ao poluente utilizando o ensaio de gel de retardo em extratos nucleares. As bandas de retardo de AP-1 foram expressas como unidades arbitrárias (painéis A e B) e as bandas não específicas (NE) não foram quantificadas. Os dados foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=6$ animais. $**P<0,01$ vs veículo. $^{##}P<0,01$ vs naïve.

3.4.4 Caracterização do NF- κ B – ensaio de competição e Supershift

Com objetivo de avaliar a especificidade da ligação das proteínas nucleares ao oligonucleotídeo do NF- κ B utilizado, foi realizado o ensaio de competição entre o “oligo frio” (não marcado radioativamente) de NF- κ B (em excesso molar de 2, 5 e 10 vezes em relação ao oligo marcado) e o oligo marcado. Como demonstrado na Figura 26, as amostras (extrato nuclear de pulmão de camundongos selvagens tratados com 1,2-NQ), marcadas com o excesso molar de oligo frio (com exceção das bandas não específicas; NE), foram deslocadas pelo excesso de oligo frio, demonstrando a especificidade da interação de ligação NF- κ B/DNA. As bandas NE não foram deslocadas pelo excesso de oligo frio do NF- κ B, mostrando que estas proteínas não pertencem à família do NF- κ B.

No mesmo gel, foi realizado o ensaio de *supershift* para a identificação das subunidades do NF- κ B presentes nos complexos formados nos extratos nucleares de pulmão de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ (Figura 24), utilizando anticorpos específicos para diferentes subunidades do NF- κ B (p65, p50, p52, cREL e REL-B). O ensaio evidenciou que somente o AC anti-subunidade p50 deslocou (*shift*) o complexo (Figura 26) e assim podemos sugerir que no pulmão de camundongos selvagens tratados com 1,2-NQ somente homodímeros de p50/p50 estão presentes no extrato nuclear.

Figura 26 - Ensaio de competição realizado por gel shift em extrato nuclear de pulmão do grupo 1,2-NQ e ensaio de *supershift*.

A avaliação da especificidade da ligação das proteínas nucleares ao oligonucleotídeo do NF- κ B em amostras de pulmão de animais expostos a 1,2-NQ foi realizada via ensaio de competição entre o oligo frio (não-marcado radioativamente) de NF- κ B (em excesso molar de 2, 5 e 10 vezes em relação ao oligo marcado) e o oligo marcado. No mesmo gel de retardo foram utilizados anticorpos específicos para as diferentes subunidades do NF- κ B (*supershift*).

3.4.5 Efeito da exposição a 1,2-NQ na expressão proteica das proteínas de choque térmico (HSP) no pulmão de camundongos neonatos selvagens

Após 24h da exposição a 1,2-NQ, a análise da expressão das proteínas HSP60, HSP70 e HSP90 no pulmão dos animais neonatos C57BL/6 selvagens mostrou um aumento significativo ($P < 0,01$) da expressão proteica da HSP70, mas não das HSP60 e 90, quando comparado ao respectivo grupo controle (veículo), ou ao grupo naïve (Figura 26, painéis A-C). Também não foram observadas diferenças significativas na expressão proteica das HSP60, 70 e 90 nos pulmões dos animais expostos somente ao veículo do poluente na fase neonatal quando comparado aos animais sem qualquer tratamento prévio (grupo naïve; Figura 26, painéis A-C).

Figura 27 - Avaliação da expressão proteica das HSP60, HSP70 e HSP90 no pulmão de camundongos neonatos selvagens expostos a 1,2-NQ.

A expressão proteica de HSP60, HSP70 e HSP90 no pulmão de camundongos selvagens expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min) ou veículo foi avaliada 24 h após a última exposição ao poluente. As bandas imunorreativas de HSP60 (painel A), HSP70 (painel B) e HSP90 (painel C), foram expressas na forma de porcentagem de HSP por α -tubulina. Os dados foram expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=6$ animais. ** $P < 0,01$ vs veículo # $P < 0,05$ vs naïve.

4 DISCUSSÃO

Uma grande variedade de estudos epidemiológicos, e poucos farmacológicos, têm evidenciado associações entre a poluição do ar por MP (e seus contaminantes) e mortalidade ou redução da expectativa de vida entre pessoas de todas as idades e, em particular, de indivíduos susceptíveis como os asmáticos e infantes (Backes et al., 2013; Fedulov et al., 2008; Huguin et al., 2008; Ko et al., 2007). Nesse sentido, a contribuição científica prévia deste grupo no âmbito dos efeitos de um dos contaminantes do MP eliminado na exaustão do diesel (PED), a 1,2-NQ, na saúde de neonatos e adultos revelou que a exposição de camundongos C57BL/6 neonatos, mas não de adultos, à 1,2-NQ aumentou marcadamente a susceptibilidade destes à inflamação alérgica pulmonar na fase adulta. Concomitantemente, observou-se no LBA um aumento das concentrações de citocinas Th2, LTB₄ e IgE (Santos et al., 2013). Conclui-se que a 1,2-NQ constitui-se um dos principais contaminantes químicos responsáveis pelas ações deletérias das PED nas vias aéreas (ex.: asma) de infantes.

Embora a ocorrência da asma não seja restrita a uma determinada faixa etária, sabe-se que uma maior susceptibilidade às doenças alérgicas e infecciosas ocorre nos primeiros anos de vida por conta da vulnerabilidade do sistema imune desses indivíduos às diversidades ambientais, dentre elas os poluentes e microorganismos (Sly e Holt, 2011). Por seu turno, os TLRs constituem uma família de receptores de defesa do hospedeiro que são expressos em diferentes tipos celulares, principalmente em células do sistema imunológico, células epiteliais nas vias aéreas, entre outras (Tesse et al., 2011). Entretanto, estudos mostram a diminuição da expressão desses receptores, bem como de moléculas acessórias relacionadas (ex.: MyD88 e CD14) na fase pós-natal e na primeira infância (Lisciandro, van den Biggelaar, 2010). É interessante ressaltar que os subtipos TLR2 e TLR4 vêm sendo sugeridos como alvos das ações de poluentes ambientais, como o O₃, *Residual oil fly ash* [ROFA] e as PED, sem a interferência de seus agonistas naturais PAMPs, tais como LPS e flagelina (Bevelander et al., 2007; He et al., 2010; Takano et al., 2002; Willians et al., 2007).

A priori, neste estudo, admitiu-se ser relevante avaliar a pureza da 1,2-NQ, visto que concentrações significativas de LPS, o agonista natural de TLR4, foram encontradas em diferentes tipos de MP. Por exemplo, Shoenfelt et al. (2009) demonstraram que a adição do MP urbano (MP_{2,5} e MP₁₀) em cultura de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 selvagens (mas não na cultura proveniente de camundongos TLR2^{-/-}, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}) aumentou significativamente a concentração de citocinas/quimiocinas (TNFα e RANTES),

sendo esse aumento inibido pelo tratamento com o bactericida de bacilos Gram-, a polimixina B. Isto sugere uma possível contaminação do MP com o LPS. Neste estudo, o ensaio cromogênico cinético do lote (02604DE) da 1,2-NQ (100 nM) e de seu respectivo veículo não revelou concentrações significativas de LPS na amostra e, portanto, esse lote e o veículo foram empregadas ao longo do estudo. Vale ressaltar que, de acordo com a literatura atual, nenhuma evidência foi encontrada no tocante à contaminações da 1,2-NQ pelo LPS.

Em continuidade, avaliou-se o potencial efeito da 1,2-NQ sobre a população de células (linfócitos, DCs), moléculas co-estimuladoras e receptores (TLRs) essenciais na interface entre a resposta inata e adaptativa, ainda na fase neonatal dos animais expostos ao poluente. Destaca-se que camundongos da linhagem C57BL/6 selvagens permaneceram como modelo experimental por apresentar o mesmo *background* genético dos camundongos nocauteados para o receptor TLR4 (TLR4^{-/-}) ou componente acessório deste (molécula adaptadora MyD88; MyD88^{-/-}) empregados neste estudo para melhor compreensão do papel do TLR4 na imunidade inata. Com o intuito de especular se a via de sinalização IL-12/IFN- γ participa desse aumento de susceptibilidade na exposição precoce ao poluente 1,2-NQ, empregou-se também camundongos C57BL10/ScCr, os quais exibem deleção genômica na porção 74-kb no locus do TLR4, que favorece a mutação nula desse receptor (Coutinho, Meo, 1978), além da mutação no cromossomo 6 do receptor de IL-12 (IL-12R β 2), que inviabiliza a funcionalidade da via IL-12/Th1 (Poltorak et al., 2001).

Em neonatos, sabe-se que as células T CD4⁺ possuem maior propensão ao desenvolvimento do perfil Th2 devido à supressão natural da função (imaturidade) das células Th1. Tal desbalanço imunológico ocorre de forma persistente desde o nascimento até os dois anos de idade, fase onde conhecidamente existe grande predominância de riscos às infecções respiratórias e ao desencadeamento da asma e outras doenças alérgicas na infância (Holt et al., 2005; Belderbos et al., 2009).

Com isto em mente e de posse do conhecimento prévio que o camundongo neonato, mas não o adulto, exibe aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica após exposição à 1,2-NQ (Santos et al., 2013), avaliou-se a população de linfócitos, DCs, células NK do subtipo 1 (NK1), que apesar de primeiramente descritas pela sua atividade antitumoral e antimicrobiana, estão entre as células-chave do sistema imune inato e adaptativo, e do ligante do receptor de morte celular programada 1 [PDL-1] em timócitos ou esplenócitos isolados de camundongos neonatos selvagens e TLR4^{-/-} 24 h após o contato com a 1,2-NQ.

Os resultados obtidos demonstram, pela primeira vez, que apenas o breve contato inalatório de camundongos neonatos selvagens à 1,2-NQ foi suficiente para estimular o desenvolvimento e maturação de células e componentes envolvidos na resposta inata/adaptativa, caracterizado por uma maior população de células T CD8⁺ e da molécula PDL-1 no timo, bem como maior população de células NK1 no baço desses animais. Em contraste, nos esplenócitos de camundongos TLR4^{-/-} neonatos, a exposição à 1,2-NQ não afetou a expressão do PDL-1 ou população das células T CD8⁺, mas ainda estimulou a população de células NK1 esplênicas. Estes resultados indicam que o aumento populacional das células T CD8⁺ e da molécula PDL-1 no timo dos animais selvagens expostos ao poluente é regulado, pelo menos em parte, via mecanismo dependente da ativação dos TLR4. Desta feita, especula-se que o aumento da população de células de resposta inata (T CD8⁺, NK1) e a maior expressão de mecanismos inibitórios de proliferação e produção de linfócitos T (PDL-1) refletem o aumento da atividade da imunidade inata na tentativa de suprimir o efeito irritante do poluente 1,2-NQ.

Por outro lado, as células T CD4 também desempenham um papel crucial na função do sistema imunológico, pois quando polarizadas, auxiliam os linfócitos B na produção de anticorpos, além de estimularem e manterem as respostas executadas por células T CD8 (veja revisão: Zhu et al., 2010). Salienta-se que alguns poluentes ambientais, de forma semelhante aos alérgenos, possuem a capacidade de sensibilizar (*primar*) populações de células do sistema imunológico já num primeiro contato. De fato, imediatamente após a administração das PED em camundongos, Dong et al. (2005a, b) observaram um aumento significativo da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos linfonodos destes, independentemente do estímulo alérgico com a OVA.

Neste estudo, nem a exposição neonatal de camundongos selvagens e nem dos TLR4^{-/-} à 1,2-NQ afetou a população de células T CD4⁺CD8⁺ (imaturas), T CD4⁺, Treg (CD4⁺FoxP3⁺) e linfócitos B (B220/CDR45) nos esplenócitos ou timócitos destes quando comparado ao respectivo grupo de camundongos neonatos controle exposto ao veículo. É provável que, pelo menos no período avaliado, a população dessas células não representa alvos de ação direta da 1,2-NQ ou, ainda, que esse poluente *per se* não possui características imunogênicas suficientes para promover maturação, expansão e ativação das populações celulares de CD4⁺/CD25⁺. Concordante, em parte, com nossos achados, Miller et al. (2009) observaram que a exposição aguda de macacos *Rhesus* filhote (dois meses de idade) ao poluente O₃ *per se* não modificou essa mesma população de células ativadas (CD4⁺/CD25⁺ e T CD8⁺/CD25⁺) no sangue periférico, epitélio ou interstício dos animais; contudo, na vigência

do segundo estímulo (ex.: alérgeno de poeira ambiental), ambas as populações de células elevaram-se marcadamente nesses compartimentos, indicando que a co-exposição de poluentes ou o estímulo adicional posterior com agente irritante (alérgeno) é necessário para estimular tais células já primadas. Reforçando esses achados, a administração intra-traqueal das PED em camundongos adultos não afetou a população de linfócitos T CD4⁺ nos esplênocitos destes; porém, na presença da OVA, a população de linfócitos T CD4⁺ foi amplificada (Inoue et al., 2009b). Acrescenta-se que as diferenças entre as linhagens, diferenças de doses/concentrações administradas, assim como o tempo de exposição dos animais ao MP (exposição crônica vs. aguda) devem ser consideradas. No presente estudo empregou-se apenas a 1,2-NQ, enquanto os demais autores usaram o MP de diferentes tamanhos (ex.: PED), que contém composição complexa (Ho et al., 2002).

Em contrapartida, no sangue do cordão umbilical ou periférico de neonatos nascidos de gestantes expostas à altas concentrações de MP_{2,5}, evidenciou-se um aumento importante na população de células NK e CD19⁺; porém, com redução significativa na população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico (Hertz-Picciotto et al., 2005; Herr et al., 2010). Esses resultados reforçam que a distinção entre a vulnerabilidade imunológica nas duas etapas analisadas (gestacional e neonatal) representa o fator preponderante para os efeitos mais graves do MP sobre as células.

Adiante, verificou-se que o contato precoce de camundongos neonatos selvagens ao poluente 1,2-NQ induziu, 24 h depois, um incremento significativo na população de células CD11c⁺ e de moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) nos esplênocitos, os quais subsequentemente participam da ativação de células apresentadoras de antígeno e a polarização de linfócitos Th2. Como consequência, aumenta-se a produção de citocinas Th2, cruciais na deflagração da resposta alérgica (Santos et al., 2013). Em contraste, demonstramos aqui que em camundongos TLR4^{-/-} com idade correspondente aos camundongos selvagens, o mesmo tratamento com a 1,2-NQ diminuiu a expressão de CD80, CD86 e MHC-II, mas continuou estimulando a população de CD11c⁺ nos esplênocitos destes, de forma semelhante à população de CD11c⁺ obtida em camundongos neonatos selvagens. Da mesma forma, outros autores observaram que a sensibilização prévia de camundongos ICR e Balbc com a OVA potencializa os efeitos da PED no tocante à maior expressão de DCs (CD11c⁺ e DEC205), das moléculas co-estimulatórias (MHC-II, CD80 e CD86), macrófagos (F4/48) e linfócitos B (CD19) no pulmão dos camundongos asmáticos, conferindo assim um reforço para a fisiopatologia da asma (Inoue et al., 2009a). Dados interessantes de Inoue et al. (2011) revelam que a exposição de PEDs ultrafinas aumentou, de forma dependente da dose, a

expressão de CD11c⁺, CD80, CD86, CD69 e CD40L em modelo de dermatite atópica em camundongos NC/Nga.

Até o presente momento, contudo, não existem evidências na literatura do envolvimento de TLR4^{-/-}, ou do bloqueio deste receptor, nas ações deletérias da 1,2-NQ ou outros poluentes urbanos, principalmente em APCs. No entanto, sabe-se que a estimulação de TLR4 pelo agonista LPS, leva ao aumento na síntese de GM-CSF e IL-1 β , necessárias à maturação das DCs pulmonares (Alexis et al., 2005). Assim, especulou-se aqui que a ativação dos TLR4 pela 1,2-NQ representa um mecanismo que favorece a expressão das moléculas CD80, CD86 e MHC-II e, conseqüentemente, aumento na ativação e maturação das APC.

Por seu turno, dentro do complexo efeito inflamatório induzido pelas PED e outros poluentes, alguns mecanismos vêm sendo propostos, incluindo a participação dos TLR2 e TLR4 (Bevelander et al., 2007; He et al., 2010; Takano et al. 2002), que contêm um mecanismo molecular complexo que envolve moléculas acessórias, como a MyD88 (Vercelli, 2008). Ativada, essa molécula inicia uma extensa cascata que levará à fosforilação/ativação de outras moléculas ou vias de transdução de sinais, como as quinases IKK e MAPK, importantes no controle da resposta inflamatória (Piggott et al., 2005).

De posse de camundongos C57BL10/ScCr, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}, demonstrou-se aqui, pela primeira vez, que ao contrário da resposta obtida em camundongos selvagens, na qual a exposição precoce desses animais ao poluente 1,2-NQ resultou em aumento da susceptibilidade destes à inflamação alérgica pulmonar na fase adulta, tipicamente caracterizada nos animais selvagens por marcante eosinofilia no LBA (e parênquima pulmonar) associado ao aumento significativo de IgE plasmática e citocinas Th2 (IL-4 e IL5) e, ainda, maior maturação de eosinófilos da MO para o sangue periférico, a inflamação foi abolida nos animais deficientes e nocautes. Compete ressaltar que nos animais nocautes, o número de leucócitos no pulmão (LBA) e demais compartimentos foi reduzido à níveis inferiores daqueles obtidos no pulmão dos respectivos grupos expostos somente ao alérgeno, indicando que a deleção do TLR4 (e MyD88), em camundongos expostos previamente a 1,2-NQ, afeta a inflamação alérgica na vigência de um segundo estímulo, já que nos animais expostos somente ao alérgeno essa inibição do influxo de leucócitos não foi mensurada. Acredita-se que tal discrepância de resultados poderia ser explicada pelo fato do tratamento precoce com a 1,2-NQ promover modificações na estrutura e funcionalidade de células e receptores envolvidos na resposta imune desses animais (ex.: CD11c⁺, co-estimuladoras, linfócitos) e capazes de influenciar a resposta inflamatória após o contato com o segundo alérgeno (OVA).

Interessante notar que a exacerbação alérgica na fase adulta dos animais selvagens expostos previamente à 1,2-NQ ocorreu em paralelo à ampliação da população de CD11c⁺ (e moléculas co-estimuladoras (CD80 e CD86) frente ao contato neonatal com a 1,2-NQ. Nessa resposta, o reconhecimento (direto ou indireto) do composto 1,2-NQ pelo TLR4 é essencial, visto que os animais TLR4^{-/-} exibiram redução significativa dessas moléculas necessárias para ativação de APCs e polarização de células T CD4⁺. Diante dessas evidências, conclui-se que a ativação de TLR4 e o posterior recrutamento da molécula MyD88 constituem o mecanismo de ação envolvido no aumento de susceptibilidade à inflamação alérgica em animais expostos precocemente a 1,2-NQ. Ademais, salienta-se que os camundongos deficientes C57BL10/ScCr exibiram o mesmo perfil inibitório da resposta inflamatória alérgica na vigência da exposição à 1,2-NQ quando comparado ao TLR4^{-/-}, indicando que a via IL-12/IFN- γ (IL-12/Th1) também participa dessa ação sensibilizante da 1,2-NQ.

Evidências demonstradas por Bevelander et al. (2007) corroboram, em parte, com os achados deste estudo, no qual esses autores observaram que a exposição de camundongos ao poluente NO₂ promoveu HB e eosinofilia no LBA do animais selvagens, mas falhou em promover alteração celular em camundongos TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-}. Além disso, as concentrações elevadas de citocinas Th1 e Th2, e metaplasia das células produtoras de muco, reveladas nos pulmões dos camundongos selvagens expostos a NO₂ não foram detectáveis de forma significativa nos animais TLR2^{-/-} e MyD88^{-/-}. Willians et al. (2007) observaram, tal como em nosso estudo, que a exposição aguda (3 h) de camundongos C57BL/6 selvagens, mas não de TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}, ao poluente O₃ promoveu HB, neutrofilia no LBA e aumento da expressão (RNAm) de IL-6 e KC no pulmão dos animais. Nos animais selvagens expostos ao poluente O₃, os autores mostraram expressão aumentada de TLR2 e 4 e de MyD88.

De forma curiosa, observou-se que neste estudo, o aumento de responsividade (Penh) nas vias aéreas frente à MCh, nos animais selvagens expostos a 1,2-NQ e a OVA, ao contrário do que se observa com a celularidade e citocinas no LBA, não foi estatisticamente diferente do grupo alérgico, e ainda, foi completamente abolida em camundongos C57BL10/ScCr, TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-}. Nesse sentido, outros achados indicam que a eosinofilia acentuada no LBA pode ocorrer de forma independente da HB (Rosi et al., 1999).

No que tange à fisiopatologia da asma, as funções relacionadas às células T CD4 resultam de estímulos promovidos pelo reconhecimento alérgeno-específico, o qual ocorre via ativação das DCs. Nesse sentido, a ativação do fenótipo Th2 (T CD4⁺/IL-4⁺) em patologias de origem alérgica já está bem estabelecida. Nesse processo, a diferenciação e função das células T CD4⁺ naive para células Th2 efetoras é bastante influenciada pela IL-4. Esta, por sua vez,

interage com seu respectivo receptor (IL-4R) em diversas células (ex.: eosinófilos, células epiteliais), levando à ativação de múltiplos fatores de transcrição gênica, incluindo o GATA-3, STAT-6, c-MAF, dentre outros fatores envolvidos na polarização das células Th2 (Hausding et al., 2004; Kiwamoto et al., 2006). Contudo, essa polarização Th2, na presença de concentrações elevadas de IL-12, pode ser inibida pelo fator de transcrição gênica T-bet ativado, o qual influencia a polarização de células Th em Th1 (Murphy, Reiner, 2002).

Cabe ressaltar que neste estudo, a expressão (RNAm) de GATA3 no pulmão dos animais selvagens expostos a 1,2-NQ, na presença ou ausência do estímulo alérgico, mostrou-se elevada, enquanto no pulmão dos respectivos grupos de animais TLR4^{-/-} e MyD88^{-/-} a expressão desse fator estava ausente, indicando que após a exposição a 1,2-NQ esse fator é ativado e participa do aumento de susceptibilidade à inflamação alérgica via mecanismo dependente da ativação do complexo TLR4-MyD88. De forma semelhante, a instilação i.tr. de MP fino (MP_{2,5}) em camundongos BALB/c aumentou a expressão de TLR4 (população de células positivas para TLR4) no sangue dos animais, assim como a produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), Th1 (IL-6, IFN- γ) e aumento da expressão (RNAm) de GATA3 e T-bet no pulmão dos animais (Zhao et al., 2012).

O aumento da síntese de IL-12 e IFN- γ , em geral, está associado à uma maior ativação do T-bet e polarização Th1 e, em contrapartida, menor atividade da via Th2. Neste estudo, a expressão de T-bet no pulmão dos animais selvagens expostos a 1,2-NQ (na ausência e presença de OVA) revelou-se estatisticamente maior do que nos grupos veículo e alérgico; no entanto, foi completamente abolido no grupo de animais TLR^{-/-} expostos à 1,2-NQ. Diante disto, é possível sugerir que o contato precoce com a 1,2-NQ, via ativação da cascata TLR4-MyD88, estimula a síntese de IFN- γ e IL-12 no pulmão (LBA) dos animais, os quais aumentam a expressão de T-bet e a subsequente diferenciação de Th-Th1 e a geração de citocinas relacionadas. Nesse âmbito, Singh et al. (2013) observaram que a prole de camundongos BALB/c expostos à fumaça do cigarro durante a prenhez exibiu eosinofilia no LBA, aumento de citocinas Th2 (IL-13 e IL-4) e HB, além da ativação de ERK1/2 e aumento na expressão de GATA3, STAT6; porém, redução da expressão de T-bet no pulmão desses animais após estímulo alérgico (*Aspergillus*). Em contrapartida, outros estudos, tal como o nosso, sugerem que o aumento da expressão de T-bet contribui para o agravamento da fisiopatologia da asma severa (Finotto et al, 2002).

Apesar do conhecimento clássico do balanço entre a supressão do perfil Th2 e aumento da resposta Th1 (ou vice-versa), postula-se atualmente que ambos os perfis celulares

encontram-se paralelamente ativados em casos de respostas alérgicas exacerbadas (Crespo-Lessmann et al., 2010; Hodgkins et al., 2010).

É de conhecimento que os TLRs possuem, em comum, mecanismos moleculares dependentes de moléculas acessórias, tais como MyD88 e TRIF (Li et al., 2010). Admitindo ser válido neste estudo a relevância dos TLR4 (e MyD88) no aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica em animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, avaliou-se a seguir a expressão de outros subtipos de TLRs, bem como mecanismos moleculares relacionados. Nesta etapa, verificou-se que no pulmão de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ, a expressão (RNAm) dos TLR2, TLR4, TLR7 e da molécula TRIF, mas não MyD88, mostrou-se significativamente elevada em relação ao controle. Estes resultados indicam que, além dos TLR4, os TLR2 e TLR7 possam estar envolvidos nos efeitos lesivo/sensibilizante da 1,2-NQ. Corroborando tal sugestão, observou-se que no pulmão de camundongos selvagens assim como TLR4^{-/-} expostos à 1,2-NQ, ocorreu aumento significativo da expressão (RNAm) da molécula TRIF, indicando que a 1,2-NQ alterou a expressão dessa molécula envolvida no mecanismo molecular do TLR3, independentemente da presença do TLR4. Já a expressão (RNAm) de MyD88 em animais TLR4^{-/-}, ao contrário de animais selvagens, mostrou-se aumentada após exposição ao poluente 1,2-NQ.

Pelo caráter inédito do tipo de resultados apresentados (expressão proteica/RNAm), no que tange ao envolvimento de outros TLR (TLR7, TLR3 e TLR2) na resposta inflamatória alérgica exacerbada em camundongos C57BL/6 expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a confirmação dessa suposição somente seria possível mediante o uso de fármacos bloqueadores desses receptores ou, ainda, de animais nocautes para tais receptores. Todavia, um grande corpo de evidências corrobora nossos resultados e reforça a participação do TLR4 e outros subtipos de TLRs nos efeitos deletérios evocados por diversos poluentes ambientais. Por exemplo, Takano et al. (2002) observaram que o tratamento (i.tr.) de camundongos (ICR) com a suspensão de PED aumentou, após 4h, a expressão (RNAm) para TLR4, além de promover maior localização nuclear da subunidade p50 de NF-κB no pulmão destes, independentemente do tratamento concomitante com o LPS. Em estudo *in vitro*, He et al. (2010) revelaram que a adição do MP₁₀ urbano em cultura de células RAW264.7 (semelhantes à macrófagos) aumentou marcadamente a expressão (RNAm) para o TLR2 nessas células, mostrando uma provável correlação entre o aumento dos parâmetros inflamatórios (eosinofilia, citocinas/quimiocinas) em animais expostos ao MP₁₀ urbano com a maior expressão destes. Em modelo experimental de estresse gestacional, a exposição de

camundongos fêmeas prenhas às PEDs aumentou na prole desses animais, os níveis de IL-1 β , bem como a expressão (RNAm) de TLR4 e caspase-1 no cérebro. Os autores sugerem que a exposição de fêmeas prenhas ao poluente, aumenta a susceptibilidade da prole ao desenvolvimento de estresse, por ativação dos TLR4 pelas PEDs (Bolton et al., 2013).

Somados aos resultados deste estudo, esses achados confirmam a sugestão de que poluentes ambientais, tais como a 1,2-NQ e MP, são capazes de aumentar a expressão de receptores TLRs, sabidamente envolvidos no reconhecimento antigênico. Deve-se acrescentar que outras evidências mostram o envolvimento dos TLRs no reconhecimento de compostos sintéticos (ex.: imidazoquinolina), bem como ligantes endógenos, tais como as HSPs e o fibrinogênio (Fabbri, 2012; Johnson et al., 2004), tornando plausível propor o reconhecimento (direto ou indireto) do composto 1,2-NQ pelos TLR4 e, possivelmente, outros subtipos.

Em patologias como a asma, um estímulo adicional que leva ao aumento na população, diferenciação e ativação das células T CD4 e APCs do indivíduo, pode ocasionar uma resposta alérgeno-específica diferenciada e exacerbada (Holgate, 2008). De fato, a adição *in vitro* de diferentes concentrações de PEDs em esplenócitos e células T CD4⁺ provenientes de camundongos ICR estimulou a produção de IL4 e IgE, além da expressão de CD19, IL-4R, CD69 e CD40L no sobrenadante dessas células (Inoue et al. (2010). Tais resultados sugerem que após o contato com as PEDs, as células T naíves adquirem maior predisposição para diferenciarem-se em células Th2.

Neste estudo, a adição de um estímulo secundário (ex.: OVA ou PMA+ionomicina *in vitro*) em esplenócitos de camundongos selvagens expostos previamente a 1,2-NQ promoveu um aumento significativo na expressão de células Th2 (CD4⁺/IL-4⁺; estímulo com OVA), Th1 (CD4⁺/IFN- γ ⁺) e Th17 (CD4⁺/IL-17⁺; estímulo com PMA+ionomicina). Em contrapartida, em esplenócitos obtidos de camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ, o perfil de células Th2, Th1 e Th17 seguido do estímulo secundário *in vitro* (OVA ou PMA+ionomicina, respectivamente) foi reduzido de forma significativa. Em suporte aos nossos achados, Hodgkins et al. (2010) observaram concentrações elevadas de citocinas Th1 (IL-12p70, IL-1a, IL-1b e IL-6) e Th17 em células pulmonares (T CD4⁺ ou CD11c⁺) isoladas de camundongos selvagens expostos a NO₂ e estimuladas com OVA *in vitro*. Desta forma, esse conjunto de evidências reforça nossos achados, onde sugerimos que o poluente 1,2-NQ é capaz de sensibilizar (*primar*), de modo inespecífico, a população de células T CD4⁺ que, na vigência de um estímulo secundário específico (ex.: OVA), induz a ativação e polarização das subpopulações de

células (Th1, Th2 e Th17) e consequente exacerbação da resposta de acordo com a sinalização mediada pelo segundo estímulo.

Mecanismo molecular de ativação do complexo TLR4-MyD88 pela exposição à 1,2-NQ

É de conhecimento que na via de sinalização do complexo TLR4-MyD88, a ubiquitinação e degradação da TRAF6 é crucial para a ativação das MAPKs e de fatores de transcrição, como o NF- κ B, CREB e AP-1, importantes na gênese de citocinas Th1, (IL-6, IL-8 e IL-12; Brown et al., 2011), da família do IFN-II (ex.: IFN- γ), Th2 (RANTES, eotaxina, MCP-1), proteínas reguladoras do remodelamento da matriz extracelular (metaloproteinases [MMP13]) e de moléculas de adesão celular, como a VCAM1 (Li et al., 2010). Adicionalmente, a ativação das MAPK dependentes da estimulação dos TLRs promove a ativação de genes de proliferação e sobrevivência celular, como as ciclinas e proto-oncogenes (ex.: c-Myc, c-Myb e BCL-XL) que, quando ativados, contribuem ainda mais para a expansão de APC, influenciando positivamente na resposta deflagrada após o contato dessas células (primadas ou expandidas) com o segundo estímulo lesivo (Newton, Dixit, 2012).

Com isto em mente e de posse do conhecimento que a 1,2-NQ exerce seu efeito potencializador sobre a inflamação alérgica via sinalização dependente da ativação do complexo TLR4-MyD88, avaliou-se adiante a participação dos membros da família da MAPK, ERK1/2 e SAP/JNK. Para tanto, averiguou-se que em explantes pulmonares de camundongos selvagens e TLR4^{-/-} previamente expostos a 1,2-NQ, o re-estímulo *in vitro* com a 1,2-NQ durante diferentes intervalos de tempo (0, 5', 15' e 30') evocou um aumento, somente na expressão proteica de ERK total, mas não de ERK fosforilada ou de JNK (total e fosforilada) nos pulmões dos camundongos selvagens em relação à expressão obtida nos pulmões dos camundongos controle, que receberam o veículo do poluente, mas foram re-estimulados *in vitro* com 1,2-NQ. A relação entre a proteína fosforilada e proteína total de ERK1/2 e JNK não foi diferente entre os grupos.

Da mesma forma, nos pulmões dos camundongos TLR4^{-/-} expostos a 1,2-NQ *in vivo*, a expressão proteica (total e fosforilada) de ERK1/2 e JNK também não diferiu de forma significativa em comparação ao grupo controle, que recebeu o veículo do poluente *in vivo* e foi re-estimulado *in vitro* com a 1,2-NQ. Com isto, conclui-se que as vias ERK1/2 e JNK não representam o principal mecanismo de ativação molecular dos TLR4 frente à 1,2-NQ ou seus metabólitos.

Apesar de discreto, não se pode excluir o aumento da expressão proteica total de ERK e JNK nos pulmões de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ. É provável que o aumento dessa expressão esteja associado ao aumento da concentração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (ex.: IL-1 β , IFN- γ , IL-12) encontrada no pulmão dos animais expostos a 1,2-NQ. Ademais, a ativação da cascata de sinalização Ras/ERK é essencial para a função do receptor de IL-4 (ex.: fosforilação de STAT6) e diferenciação de células T CD4⁺ em células Th2, tanto *in vivo* como *in vitro* (Rincon, 2001; Sasaki et al., 2009). Nesse sentido, Ma et al. (2004) observaram que a expressão de SAPK/JNK, ERK e p38 aumentou em cultura de células epidermal tratada com PEDs. Segundo Cho et al. (2005), em camundongos selvagens C3H/HeOJ, mas não os deficientes de TLR4 (C3H/HeJ), o poluente ROFA induziu, após tempos distintos, potente resposta inflamatória pulmonar e aumento das concentrações de MIP-2, IL-13, IL-1 α e IL-1 β no pulmão, associado ao aumento da expressão de moléculas sinalizadoras MyD88, TRAF6 e IRAK-1. Os animais selvagens expostos ao poluente também exibiram maior ativação das vias JNK e ERK1/2, de fatores de transcrição gênica para c-Jun e c-Fos, aumento das subunidades p65 e p50 do NF- κ B e degradação de I κ B α .

No que tange a sinalização da MAPK, especialmente ERK1/2 e SAPK/JNK, ativados pela via TLR-MyD88, sabe-se que esta é essencial para ativação de fatores de transcrição nuclear como AP-1 e da família CREB/ATF. No entanto, dados obtidos neste estudo mostraram que a translocação nuclear do fator AP-1 em extratos nucleares de pulmão de camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, apresentou-se diminuída com relação ao grupo veículo. Em contrapartida, Pourazar et al. (2008) revelaram que em biópsias endobronquiais de pacientes saudáveis submetidos à inalação de PED, observa-se aumento significativo da expressão proteica total do receptor para o EGFR, de SAPK/JNK, AP-1 e maior translocação do NF- κ B. A discrepância entre esses estudos e os nossos resultados não estão bem claros, mas é possível especular, neste estudo, que a via de sinalização ativada após a exposição ao 1,2-NQ é dependente de TLR4-MYD88, seguida de posterior modulação negativa (*feedback negativo*) do fator de transcrição AP-1. Ainda, é importante ressaltar que a ativação de alguns fatores de transcrição, como o NF- κ B, também induzem respostas de proliferação e indução de genes de citocinas pró-inflamatórias, de modo independente da via das MAPKs.

A ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B via ativação dos TLRs, tal como para as MAPK, requer a ativação de TRAF6 e do complexo TAK1/TAB, que ativam o complexo IKK formado por IKK-b, IKK-a e NEMO (Kaway, Akira, 2011; Newton, Dixit,

2012). Por seu turno, a ativação do complexo IKK induz a fosforilação de I κ B α , uma proteína inibitória. Como consequência da fosforilação, I κ B α é ubiquitinizado e degradado, liberando a subunidade p65. Já a fosforilação de p105, precursor de p50, pelo complexo IKK promove a liberação de p50 que, juntamente com a p65, translocam-se para o núcleo e iniciam a transcrição de citocinas.

A análise da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B no pulmão de camundongos neonatos selvagens 24 h após a exposição destes a 1,2-NQ, indica um aumento significativo na translocação de NF- κ B em relação ao grupo controle. Corroborando nossos achados, Hirota et al. (2008) mostram que a breve tratamento da cultura de eosinófilos humanos com a solução de PED induziu a ativação do NF- κ B, associado ao aumento de MCP-1, IL-8 e quimiotaxia mediada por eotaxinas. De acordo com nossos dados, Totlandsda et al. (2010) observaram que a incubação (2 e 4 h) da cultura de células do epitélio brônquico humano com concentrações crescentes de PEDs induz, de forma dose e tempo dependentes, a elevação da concentração de citocinas (IL-6, IL-8) e maior fosforilação de p65-NF- κ B, independentemente da ativação de ERK1/2 e JNK.

Coletivamente, esses resultados sugerem que a ativação do complexo TLR4-MyD88 por alguns MP ambientais e contaminantes como a 1,2-NQ nas vias aéreas de roedores envolve a ativação subsequente do NF- κ B, e diminuição da ativação de AP-1. No entanto, dado interessante da análise das subunidades do NF- κ B ativadas após exposição do poluente 1,2-NQ, mostrou um aumento da translocação nuclear somente da subunidade p50. A ativação exclusiva de p50 pelo composto 1,2-NQ sugere a formação de homodímeros (p50/p50) e não de heterodímeros (ex.: p50/p65). Nesse contexto, estudos de longa data mostram que heterodímeros p50/p65, quando ativados, estimulam a transcrição do NF- κ B. Em contrapartida, a ativação de homodímeros p50/p50 suprime a transcrição de NF- κ B. Postula-se que, a ausência do domínio de ativação do NF- κ B no homodímero p50, seja responsável pela inibição da transcrição (Kang et al., 1992; Udalova et al., 2000; Ten et al., 1992).

Alguns estudos sugerem que a ativação da subunidade p65 é necessária para o aumento do perfil Th1 e diminuição do perfil Th2 (Aronica et al., 1999; Sica et al., 1997). Ainda, camundongos transgênicos da proteína inibitória I κ B α e portanto resistentes a sinais que induzem a degradação de I κ B α e consequente liberação a subunidade p65, exibem menor capacidade de respostas Th1 (Aronica et al., 1999). Em parte, achados de Sasaki et al. (2009) corroboram nossos achados, nos quais eles verificaram que células T tratadas com PED ou

formaldeído apresentaram, após reestímulo (CD3/CD28), aumento na sinalização da MAPK (p38, ERK1/2 e JNK) e de c-MAF em contraste com a supressão da sinalização de NF- κ B, sugerindo que ambos poluentes promovem o aumento da polarização Th2 e supressão da via Th1. Coletivamente, esses resultados nos fornecem evidências que o composto 1,2-NQ estimula respostas Th2-mediadas, ao contrário da menor ativação da via Th1, possivelmente devido a modulação negativa pelo NF- κ B inibitório (p50/p50).

A forma de reconhecimento, direto ou indireto, dos contaminantes ambientais como os 1,2-NQ pelos TLRs, ainda é obscura. Dada a semelhança estrutural da 1,2-NQ (dois anéis benzênicos e grupos carbonílicos) com os ligantes sintéticos de TLR (ex.: imidazoquinolina), a possibilidade dessa quinona interagir diretamente com os TLR é uma suposição atraente e que não pode ser descartada. No entanto, somente análises adicionais, como o ensaio de *binding* poderão esclarecer essa hipótese.

No entanto, dentre as teorias que tentam explicar a ativação da sinalização intracelular mediada por TLR, por interferência dos poluentes, está o aumento da concentração de proteínas endógenas, tal como as HSPs, como consequência da ampla geração de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) após a exposição a MPs. A saber, as proteínas HSPs compreendem uma grande família de proteínas evolutivamente conservadas que originalmente foram descobertas como proteínas induzidas por calor, bem como por outros estímulos que levam ao estresse celular, como compostos químicos e inflamação (Meyer e Silva, 1999). De fato, um estudo de Tong e Luo (2000), identificaram um aumento significativo de HSP70 em soro de pacientes asmáticos.

Diversos estudos mostram, que a exposição das células à níveis aumentados de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($\bullet O_2^-$), ou citocinas pró-inflamatórias, resulta em perturbações nos processos de dobramento e moldagem de proteínas, fisiologicamente realizados pelas HSP (ex.: HSP70). Tal desarranjo induz resposta mediada pelo aumento da síntese de HSP, sendo primeiramente uma resposta protetora, a fim de reduzir danos ao organismo. Entretanto, altas concentrações de HPS e de proteínas desdobradas, levam à indução de genes inflamatórios (ex.: ATF-6 [activating transcription fator 6]) e a piora da inflamação (Meyer, Silva, 1999; Hauet-Broere et al., 2006) Alternativamente, é sabido que as HSP atuam como ligantes endógenos, particularmente ativando células do sistema immune inato via estimulação dos TLR2 e TLR4 e, também das CD91, CD40 e CD14 ou mesmo em APC (Quintana, Cohen, 2005).

Desta forma, estabelecer a possível participação das proteínas endógenas de choque térmico, no mecanismo da exacerbação da inflamação alérgica em camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal nos pareceu relevante. Tal como no estudo de Tong e Luo (2000), observamos neste estudo, que a exposição de camundongos neonatos selvagens à 1,2-NQ, aumentou a expressão proteica de HSP70, sem afetar a expressão de HSP60 e HSP90 no pulmão dos animais. Semelhante ao encontrado pelo grupo, Becker et al. (2005) revelaram que linhagem de células epiteliais e macrófagos expostos ao MP, apresentaram aumento da concentração de IL-8 e da expressão (RNAm) de HSP70, TLR2 e TLR4.

5 CONCLUSÃO

Em resumo, os dados deste estudo nos permitem propor as seguintes conclusões (veja Figura 27):

- i) O composto 1,2-NQ, quando administrado na fase neonatal de camundongos, leva ao aumento de proteínas ativadas por estresse, e.x.: HSP70, conhecida ligante endógena do TLR4 (e outros);
- ii) A seguir, inicia-se o recrutamento da molécula MyD88 (e alternativamente TRIF) que, subsequentemente ativa o mecanismo molecular do TLR4 (via TRAF6/TAK1/TAB);
- iii) Estimulado a cascata de sinalização intracelular, ocorre a ativação dos fatores de transcrição (GATA3, T-bet e NF- κ B inibitório [p50/p50] e diminuição de AP-1), que posteriormente modulam genes para citocinas/quimiocinas, bem como para fatores de crescimento celular, que contribuem para amplificação das respostas celulares na vigência do contato secundário (ex.: OVA; fase tardia);
- iv) Na fase neonatal, o contato com a 1,2-NQ ativa (direta/indiretamente) a via de sinalização TLR4-MyD88, o qual interfere na maturação de células da imunidade inata/adaptativa. Isto leva à sensibilização (*primer*) e amplificação de populações celulares (ex.: CD11c⁺, linfócitos) e moléculas co-estimuladoras;
- v) Tais dados contribuem para a compreensão do elevado índice de doenças alérgicas em crianças residentes em grandes centros urbanos como São Paulo.

Figura 28 - Hipótese da sinalização desencadeada após exposição da 1,2-NQ em camundongos neonatos.

A exposição de camundongos neonatos ao composto 1,2-NQ (**Ia**), ou a indução de compostos endógenos por este (**Ib**), ativam o TLR4, presentes na superfície de APC (ex.: DCs) e recrutam a molécula MyD88 e/ou TRIF (**Ic**). Este processo inicia uma cascata de sinalização intracelular que resulta na ativação de fatores de transcrição (ex.: GATA3, T-bet e NF-κB), que modulam genes de citocinas/quimiocinas, diferenciação e crescimento celular, e amplificam populações de células (**Id**). Após o contato com um segundo alérgeno (ex.: OVA), a população ampliada de APCs (**Ie**), responderá de forma proeminente na indução da resposta Th2, o que resultará na exacerbação do processo alérgico (**If**). Paralelamente, a 1,2-NQ (**Ia**) ou compostos endógenos (**Ib**), via ativação de TLR4, interfere na maturação de células da imunidade inata/adaptativa e sensibilizam populações de células (ex.: linfócitos; **Iic**). Na vigência do segundo agente lesivo (**Ie**) as células já primadas induzem a polarização celular (Th1 e Th2) e exacerbação da inflamação alérgica (**If**).

REFERÊNCIAS*

- Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 1998 Jul;9(1):143-50.
- Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol*. 2002 Jul;32(7):1958-68.
- Ajersztajn L, Veras M, Barrozo LV, Saldiva P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Sep;13(9):674-8.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol*. 2001;2:675–80.
- Al-Humadi NH, Siegel PD, Lewis DM, Barger MW, Ma JY, Weissman DN, Ma J. K. Alteration of intracellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ Health Perspect*. 2002;110:349.
- Alexis NE, Lay JC, Almond M, Bromberg PA, Patel DD, Peden DB. Acute LPS inhalation in healthy volunteers induces dendritic cell maturation in vivo. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Feb;115(2):345-50.
- Allakhverdi Z, Comeau MR, Smith DE, Toy D, Endam LM, Desrosiers M, Liu YJ, Howie KJ, Denburg JA, Gauvreau GM, Delespesse G. CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Feb;123(2):472-8.
- Allen RW, Mar T, Koenig J, et al. Changes in lung function and airway inflammation among asthmatic children residing in a woodsmoke- impacted urban area. *Inhal Toxicol*. 2008; 20(4):423–33.
- Andersson M, Modig L, Hedman L, Forsberg B, Rönmark E. Heavy vehicle traffic is related to wheeze among schoolchildren: a population-based study in an area with low traffic flows. *Environ Health*. 2011;10:91.
- André PA, Veras MM, Miraglia SG, Saldiva PH. Lean diesel technology and human health: a case study in six Brazilian metropolitan regions. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67(6):639-46.
- Aronica MA, Mora AL, Mitchell DB, Finn PW, Johnson JE, Sheller JR, Boothby MR. Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. *J Immunol*. 1999 Nov 1;163(9):5116-24.
- Arzhavitina A, Steckel H. Surface active drugs significantly alter the drug output rate from medical nebulizers. *Int J Pharm*. 2010 Jan 15;384(1-2):128-36.
- Backes CH, Nelin T, Gorr MW, Wold LE. Early life exposure to air pollution: how bad is it? *Toxicol Lett*. 2013 Jan 10;216(1):47-53.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biological Journal: sample references. [Cited 2012 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barraza-Villarreal A, Sunyer J, Hernandez-Cadena L, Escamilla-Núñez MC, Sienra-Monge JJ, Ramírez-Aguilar M, Cortez-Lugo M, Holguin F, Diaz-Sánchez D, Olin AC, Romieu I. Air pollution, airway inflammation, and lung function in a cohort study of Mexico City schoolchildren. *Environ Health Perspect.* 2008 Jun;116(6):832-8.

Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R, Devlin RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Feb 15;203(1):45-52.

Becker S, Fenton MJ, Soukup JM. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Nov;27(5):611-8.

Belderbos M, Levy O, Bont L. Neonatal innate immunity in allergy development. *Curr Opin Pediatr* 2009;21:762–69.

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bstein IL, Nel A, Peden D, Diazsanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1116-23.

Betts RJ, Kemeny DM. CD8+ T cells in asthma: friend or foe? *Pharmacol Ther.* 2009 Feb;121(2):123-31.

Bevelander M, Mayette J, Whittaker LA, Paveglio SA, Jones CC, Robbins J, Hemenway D, Akira S, Uematsu S, Poynter ME. Nitrogen dioxide promotes allergic sensitization to inhaled antigen. *J Immunol.* 2007 Sep 15;179(6):3680-8.

Bezemer GF, Bauer SM, Oberdörster G, Breysse PN, Pieters RH, Georas SN, Williams MA. Activation of pulmonary dendritic cells and Th2-type inflammatory responses on instillation of engineered, environmental diesel emission source or ambient air pollutant particles in vivo. *J Innate Immun.* 2011;3(2):150-66.

Bijanzadeh M, Ramachandra NB, Mahesh PA, Mysore RS, Kumar P, Manjunath BS, Jayaraj BS. Association of IL-4 and ADAM33 gene polymorphisms with asthma in an Indian population. *Lung.* 2010;188(5):415-22.

Bolton JL, Huff NC, Smith SH, Mason SN, Foster WM, Auten RL, Bilbo SD. Maternal stress and effects of prenatal air pollution on offspring mental health outcomes in mice. *Environ Health Perspect.* 2013 Sep;121(9):1075-82.

Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2000;13(3):135-60.

Bortolatto J, Borducchi E, Rodriguez D, Keller AC, Faquim-Mauro E, Bortoluci KR, Mucida D, Gomes E, Christ A, Schnyder-Candrian S, Schnyder B, Ryffel B, Russo M. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. *Clin Exp Allergy.* 2008 Oct;38(10):1668-79.

Boubel RW, Fox DL, Tumer DB, Stern AC. *Fundamentals of Air Pollution.* 3rd ed. San Diego: Academic Press Inc.; 1994.

Bradding P, Walls AF, Holgate ST. The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2006;117:1277–84.

Braddock M, Quinn A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Apr;3(4):330-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;7:248-54.

Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *J Dent Res.* 2011 Apr;90(4):417-27.

Builtjes, P. In: Zannetti P. The Problem – Air Pollution. Air quality modeling – Theories, Methodologies, Computational Techniques, and Available Databases and Software. Fundamentals. Fremont, USA: The EnviroComp Institute and Air & Waste Management Association; 2003. v. 1, cap. 1, p. 1-33.

Burgess JK, Ceresa C, Johnson SR, Kanabar V, Moir LM, Nguyen TT, Oliver BG, Schuliga M, Ward J. Tissue and matrix influences on airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther.* 2008;1-9.

Cambra K, Martínez-Rueda T, Alonso-Fustel E, Cirarda FB, Ibáñez B, Esnaola S, Calvo M, Aldasoro E, Montoya I. Mortality in small geographical areas and proximity to air polluting industries in the Basque Country (Spain). *Occup Environ Med.* 2011 Feb;68(2):140-7.

Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guide Vol. 1. 2nd ed. 1993. [cited 2007 Sep 02]. Available from: http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/guides/english/v1_93/appen/appi.htm.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). U.S. Department of health and human services. [Homepage on internet]. United States: [cited 2011 May]. Available from: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/Asthma/>.

Cho AK, Schmitz DA, You Y, Rodriguez CE, Distefano E, Kumagai Y, Miguel AH, Figuren A, Kobayashi T, Avol EL, Froines JR. Detemination of four quinones in Diesel exhaust particles, SRM1649A and athmosferic 2.5. *Aerosol Sci Technol.* 2004;38:1-14.

Cho HY, Jedlicka AE, Clarke R, Kleeberger SR. Role of Toll-like receptor-4 in genetic susceptibility to lung injury induced by residual oil fly ash. *Phys Gen.* 2005;22:108–17.

Choi H, Wang L, Lin X, Spengler JD, Perera FP. Fetal window of vulnerability to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons on proportional intrauterine growth restriction. *PLoS One.* 2012;7(4):e35464.

Chu HW, Honour JM, Rawlinson CA, Harbeck RJ, Martin RJ. Hygiene hypothesis of asthma: a murine asthma model with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Chest.* 2003 Mar;123(3 Suppl):390S.

Chung SW, Toriba A, Chung HY, Yu BP, Kameda T, Tang N, Kizu R, Hayakawa K. Activation of 5-lipoxygenase and NF-kappa B in the action of acenaphthenequinone by modulation of oxidative stress. *Toxicol Sci.* 2008;101(1):152-8.

Clerisme-Beaty E, Rand CS. The effect of obesity on asthma incidence: Moving past the epidemiologic evidence. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123:96-7.

Companhia Ambiental do estado de São Paulo - CETESB. Material Particulado Inala vel Fino (MP2,5) e Grosso (MP2,5 – 10) na atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo (2000 – 2006). São Paulo; 2006. Available from: <http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/qualidade-do-ar/31-publicacoes-e-relatorios>.

Companhia Ambiental do estado de São Paulo – CETESB. Relatório de emissões veiculares no estado de São Paulo no Estado de São Paulo 2012. São Paulo; 2013. Available from: [http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/emissao veicular](http://www.cetesb.sp.gov.br/ar/emissao%20veicular).

Corson L, Zhu H, Quan C, Grunig G, Ballaney M, Jin X, Perera FP, Factor PH, Chen LC, Miller RL. Prenatal allergen and diesel exhaust exposure and their effects on allergy in adult offspring mice. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2010 May 11;6(1):7.

Costa SK, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscará MN, Costa SK. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Arch Toxicol*. 2010 Feb;84(2):109-17.

Coutinho A, Meo T. Genetic basis for unresponsiveness to lipopolysaccharide in C57BL/10Cr mice. *Immunogenetics*. 1978 Dec;7(1):17-24.

Crespo-Lessmann A, Juárez-Rubio C, Plaza-Moral V. [Role of toll-like receptors in respiratory diseases]. *Arch Bronconeumol*. 2010 Mar;46(3):135-42.

D'Amato G, Cecchi L, D'Amato M, Liccardi G. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2010;20(2):95-102.

Dahl ME, Dabbagh K, Liggitt D, Kim S, Lewis DB. Viral-induced T helper type 1 responses enhance allergic disease by effects on lung dendritic cells. *Nat Immunol* 2004;5:337–43.

Daly, A, Zannetti P. In: Zannetti P, Al-Ajmi D, and Al-Rashied S. An Introduction to Air Pollution – Definitions, Classifications, and History. Ambient air pollution. Fremont, USA: The Arab School for Science and Technology (ASST) and The EnviroComp Institute; 2007. Cap. 1, p. 1-14.

Dennis JH, Stenton SC, Beach JR, Avery AJ, Walters EH, Hendrick DJ. Jet and ultrasonic nebuliser output: use of a new method for direct measurement of aerosol output. *Thorax*. 1990 Oct;45(10):728-32.

Departamento de Informática do SUS - Datasus. Internações por especialidade, regiões, Brasil - 2008. Departamento de Informática do SUS, órgão da Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. [cited 2009 feb 14]. Available from: <http://www.datasus.gov.br>

Dietert RR, Etzel RA, Chen D, Halonen M, Holladay SD, Jarabek AM, Landreth K, Peden DB, Pinkerton K, Smialowicz RJ, Zoetis T. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108 Suppl 3:483-90.

Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Barger MW, Roberts JR, Zhang XD, Antonini JM, Ma JK. Exposure of brown Norway rats to diesel exhaust particles prior to ovalbumin (OVA) sensitization elicits IgE adjuvant activity but attenuates OVA-induced airway inflammation. *Toxicol Sci*. 2005a;88(1):150-60.

Dong CC, Yin XJ, Ma JYC, Millecchia L, Wu Z, Barger MW, Roberts JR, Antonini JM, Dey RD, Ma JKH. Effect of Diesel Exhaust Particles on Allergic Reactions and Airway Responsiveness in Ovalbumin-Sensitized Brown Norway Rats. *Tox Sci*. 2005b;88(1):202–12.

Draijer C, Robbe P, Boorsma CE, Hylkema MN, Melgert BN. Characterization of macrophage phenotypes in three murine models of house-dust-mite-induced asthma. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:632049.

Elekes K, Helyes Z, Kereskai L, Sándor K, Pintér E, Pozsgai G, Tékus V, Bánvölgyi A, Németh J, Szuts T, Kéri G, Szolcsányi J. Inhibitory effects of synthetic somatostatin receptor subtype 4 agonists on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 2008;578(2-3):313-22.

Endo A, Sumi D, Kumagai Y. 1,2-Naphthoquinone disrupts the function of cAMP response element-binding protein through covalent modification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 14;361(1):243-8.

Fabbri M. TLRs as miRNA receptors. *Cancer Res.* 2012 Dec 15;72(24):6333-7.

Fahy O, Hammad H, Senechal S, Pestel J, Tonnel AB, Wallaert B, Tsicopoulos A. Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Der p 1 on the release of chemokines by peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: involvement of the map kinase pathway. *Am Journal of Resp Cell and Molecular Biology.* 2000;23, 247–54.

Fedulov AV, Leme A, Yang Z, Dahl M, Lim R, Mariani TJ, Kobzik L. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;38(1):57-67.

Feng R, He W, Ochi H, Castranova V. Ozone Exposure Impairs Antigen-Specific Immunity but Activates IL-7-Induced Proliferation of CD4- CD8- Thymocytes in Balb/c Mice. *J Tox Env Health.* 2006;69:1511–26.

Ferrari RA, Oliveira VS, Scabio A. Biodiesel de soja – Taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físicoquímica e consumo em gerador de energia. *Quim. Nova.* 2005;289(1):19-23.

Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science.* 2002 Jan 11;295(5553):336-8.

Florenzano F. Exposição precoce ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e a suscetibilidade diferencial à inflamação pulmonar em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas [Dissertação (mestrado em farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Ghazal P, Dickinson P, Smith CL. Early life response to infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2013 Jun;26(3):213-8.

Global initiative for asthma (GINA). Pocket guide for asthma management and prevention. Update: 2012. [update 2012; cited 2013 sep 8]. Available from: <http://www.ginasthma.com>.

Hauet-Broere F, Wieten L, Guichelaar T, Berlo S, van der Zee R, Van Eden W. Heat shock proteins induce T cell regulation of chronic inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2006 Nov;65 Suppl 3:iii65-8.

Hausding M, Ho IC, Lehr HA, Weigmann B, Lux C, Schipp M, Galle PR, Finotto S. A stage-specific functional role of the leucine zipper transcription factor c-Maf in lung Th2 cell differentiation. *Eur J Immunol.* 2004 Dec;34(12):3401-12.

He M, Ichinose T, Yoshida S, Nishikawa M, Mori I, Yanagisawa R, Takano H, Inoue K, Sun G, Shibamoto T. Urban particulate matter in Beijing, China, enhances allergen-induced murine lung eosinophilia. *Inhal Toxicol.* 2010 Aug;22(9):709-18.

- Hebeda CB, Pinedo FJ, Vinolo MA, Curi R, Farsky SH. Hydroquinone stimulates inflammatory functions in microvascular endothelial cells via NF- κ B nuclear activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2011 Nov;109(5):372-80.
- Heil, F. et al. Species-specific recognition of singlestranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303:1526–29.
- Hemmi, H. et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nature Immunol*. 2002;3:196–200.
- Herr CE, Dostal M, Ghosh R, Ashwood P, Lipsett M, Pinkerton KE, Sram R, Hertz-Picciotto I. Air pollution exposure during critical time periods in gestation and alterations in cord blood lymphocyte distribution: a cohort of livebirths. *Environ Health*. 2010 Aug 2;9:46.
- Hertz-Picciotto I, Herr CE, Yap PS, Dostál M, Shumway RH, Ashwood P, Lipsett M, Joad JP, Pinkerton KE, Srám RJ. Air pollution and lymphocyte phenotype proportions in cord blood. *Environ Health Perspect*. 2005 Oct;113(10):1391-8.
- Hertz-Picciotto I, Park HY, Dostal M, Kocan A, Trnovec T, Sram R. Prenatal exposures to persistent and non-persistent organic compounds and effects on immune system development. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Feb;102(2):146-54.
- Hirota R, Akimaru K, Nakamura H. In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell. *Toxicol In Vitro*. 2008 Jun;22(4):988-94.
- Ho KF, Lee SC, Yu JC, Zou SC, Fung K. Carbonaceous characteristics of atmospheric particulate matter in Hong Kong. *Sci Total Environ*. 2002;300(1-3):59-67.
- Hodgkins SR, Ather JL, Paveglio SA, Allard JL, LeClair LA, Suratt BT, Boyson JE, Poynter ME. NO₂ inhalation induces maturation of pulmonary CD11c+ cells that promote antigenspecific CD4+ T cell polarization. *Respir Res*. 2010 Jul 26;11:102.
- Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:872–97.
- Holguin F. Traffic, Outdoor Air Pollution, and Asthma. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2008;28:577–88.
- Holt PG, Strickland DH. Interactions between innate and adaptive immunity in asthma pathogenesis: new perspectives from studies on acute exacerbations. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125:963–72.
- Holt PG, Upham JW, Sly PD. Contemporaneous maturation of immunologic and respiratory functions during early childhood: implications for development of asthma prevention strategies. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:16–24.
- Hutchison S, Choo-Kang BS, Gibson VB, Bundick RV, Leishman AJ, Brewer JM, McInnes IB, Garside P. An investigation of the impact of the location and timing of antigen-specific T cell division on airways inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(1):107-16.
- Hwang ES. Transcriptional regulation of T helper 17 cell differentiation. *Yonsei Med J*. 2010 Jul;51(4):484-91.
- Imrich A, Ning Y, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;167(2):140-50.

- Inoue K, Fujitani Y, Kiyono M, Hirano S, Takano H. In vitro effects of nanoparticle-rich diesel exhaust particles on splenic mononuclear cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2011 Sep;33(3):519-24.
- Inoue K, Koike E, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Yoshikawa T. Effects of Diesel Exhaust Particles on Antigen-Presenting Cells and Antigen-Specific Th Immunity in Mice. *Exp Biol Med*. 2009a;234:200-09.
- Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Takano H. Effects of pulmonary exposure to diesel exhaust particles on extrathoracic CD4 polarization in asthmatic mice. *Immunoph and Immunotox*. 2009b;31(1):71-4.
- Inoue K, Takano H, Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, Yanagisawa R, Tomura S, Kumagai Y. Naphthoquinone enhances antigen-related airway inflammation in mice. *Eur Respir J*. 2007a Feb;29(2):259-67.
- Inoue K, Takano H, Ichinose T, Tomura S, Yanagisawa R, Sakurai M, Sumi D, Cho AK, Hiyoshi K, Kumagai Y. Effects of naphthoquinone on airway responsiveness in the presence or absence of antigen in mice. *Arch Toxicol*. 2007b;81(8):575-81.
- Inoue KI, Koike E, Endoh A, Sumi D, Kumagai Y, Hayakawa K, Kiyono M, Tanaka M, Takano H. Diesel exhaust particles induce a Th2 phenotype in mouse naïve mononuclear cells in vitro. *Exp and Therap Med*. 2010;1(5):761-67.
- Inoue KI, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Ichinose T, Shimada A, Yoshikawa T. The role of toll-like receptor 4 in airway inflammation induced by diesel exhaust particles. *Arch Toxicol*. 2006;80:275-79.
- Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
- Jaffar ZH, Stanciu L, Pandit A, Lordan J, Holgate ST, Roberts K. Essential Role for Both CD80 and CD86 Costimulation, But Not CD40 Interactions, in Allergen-Induced Th2 Cytokine Production from Asthmatic Bronchial Tissue: Role for $\alpha\beta$, But Not $\gamma\delta$, T Cells. *J Immunol*. 1999;163(11):6283-91.
- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:197-216.
- Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. Cutting edge: an endogenous pathway to systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through toll-like receptor 4. *J Immunol*. 2004;172:20-24.
- Johnston RA, Zhu M, Rivera-Sanchez YM, Lu FL, Theman TA, Flynt L, Shore SA. Allergic airway responses in obese mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2007;176, 650-58.
- Kang SM, Tran AC, Grilli M, Lenardo MJ. NF-kappa B subunit regulation in nontransformed CD4+ T lymphocytes. *Science*. 1992 Jun 5;256(5062):1452-6.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84.
- Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*. 2002 Oct;2(10):773-86.
- Kazani S, Israel E. Update in asthma 2011. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(1):35-40.

Kerkhof M, Postma DS, Brunekreef B, Reijmerink NE, Wijga AH, de Jongste JC, Gehring U, Koppelman GH. Toll-like receptor 2 and 4 genes influence susceptibility to adverse effects of traffic-related air pollution on childhood asthma. *Thorax*. 2010 Aug;65(8):690-7.

Kikuno S, Taguchi K, Iwamoto N, Yamano S, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;210(1-2):47-54.

Killeen K, Skora E. Pathophysiology, diagnosis, and clinical assessment of asthma in the adult. *Nurs Clin North Am*. 2013 Mar;48(1):11-23.

Kim JJ; American Academy of Pediatrics Committee on Environmental Health. Ambient air pollution: health hazards to children. *Pediatrics*. 2004 Dec;114(6):1699-707.

King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR. Oxidative stress promotes polarization of human T cell differentiation toward a T helper 2 phenotype. *J Immunol*. 2006 Mar 1;176(5):2765-72.

Kiwamoto T, Ishii Y, Morishima Y, Yoh K, Maeda A, Ishizaki K, Iizuka T, Hegab AE, Matsuno Y, Homma S, Nomura A, Sakamoto T, Takahashi S, Sekizawa K. Transcription factors T-bet and GATA-3 regulate development of airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Jul 15;174(2):142-51.

Ko FW, Tam W, Wong TW, Lai CK, Wong GW, Leung TF, Ng SS, Hui DS. Effects of air pollution on asthma hospitalization rates in different age groups in Hong Kong. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(9):1312-9.

Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:221-47.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-85.

Lee SY, Chang YS, Cho SH. Allergic diseases and air pollution. *Asia Pac Allergy*. 2013 Jul;3(3):145-54.

Li N, Wang M, Oberley TD, Sempf JM, Nel AE. Comparison of the pro-oxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. 2002;169:4531.

Li X, Jiang S, Tapping RI. Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine*. 2010 Jan;49(1):1-9.

Lin CH, Huang CC, Wang TW, Wang YJ, Lin PH. Disparity in the induction of glutathione depletion, ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and apoptosis by quinonoid derivatives of naphthalene in human cultured cells. *Chem Biol Interact*. 2007;165:200-10.

Lisciandro JG, van den Biggelaar AH. Neonatal immune function and inflammatory illnesses in later life: lessons to be learnt from the developing world? *Clin Exp Allergy*. 2010 Dec;40(12):1719-31.

Ma C, Wang J, Luo J. Activation of nuclear factor kappa B by diesel exhaust particles in mouse epidermal cells through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *Biochem Pharmacol*. 2004 May 15;67(10):1975-83.

- Marano F, Boland S, Bonvallot V, Baulig A, Baeza-Squiban A. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18(5):315-20.
- Martin S, Fernandez-Alanis E, Delfosse V, Evelson P, Yakisich JS, Saldiva PH, Tasat DR. Low doses of urban air particles from Buenos Aires promote oxidative stress and apoptosis in mice lungs. *Inhal Toxicol*. 2010 Nov;22(13):1064-71.
- Matsumoto, M. et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J. Immunol*. 2003;171:3154–62.
- McGuirk P, Higgins SC, Mills KH. The role of regulatory T cells in respiratory infections and allergy and asthma. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2010 Jan;10(1):21-8.
- McMenamiMedzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Rev. Immunol*. 2001;1:135–45.
- Meyer TN, da Silva AL. [Cell response to stress]. *Rev Assoc Med Bras*. 1999. Apr-Jun;45(2):181-8.
- Miller LA, Gerriets JE, Tyler NK, Abelb K, Schelegle ES, Plopper CG, Hyde DM. Ozone and Allergen Exposure During Postnatal Development Alters the Frequency and Airway Distribution of CD25+ cells in Infant Rhesus Monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 April; 236(1): 39–48.
- Miraglia SG, Veras MM, Amato-Lourenço LF, Rodrigues-Silva F, Saldiva PH. Follow-up of the air pollution and the human male-to-female ratio analysis in Sao Paulo, Brazil: a times series study. *BMJ Open*. 2013 Jul 26;3(7).
- Moreira AP, Hogaboam CM. Macrophages in allergic asthma: fine-tuning their pro- and anti-inflammatory actions for disease resolution. *J Interferon Cytokine Res*. 2011;31(6):485-91.
- Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci*. 2006 Apr 5;26(14):3813-20.
- Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):933-44.
- Nascimento LFC, Moreira DA. Are environmental pollutants risk factors for low birth weight? *Cad. Saúde Pública*. 2009;25(8):1791-96.
- Nemmar A, Al-Maskari S, Ali BH, Al-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(3):L664-70.
- Newton K, Dixit VM. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Mar 1;4(3).
- Nussbaum C, Sperandio M. Innate immune cell recruitment in the fetus and neonate. *J Reprod Immunol*. 2011 Jun;90(1):74-81.
- O'Neill LA, Bowie AG. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2007 May;7(5):353-64.

Organização mundial da saúde (OMS). [Cited 2013 sep 01]. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GlobalHealthRisks_report_corrigenda_20091218.pdf.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*. 2001 Apr;22(2):153-83.

Peron JP, Yang K, Chen ML, Brandao WN, Basso AS, Commodaro AG, Weiner HL, Rizzo LV. Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. *J Neuroimmunol*. 2010 Oct 8;227(1-2):10-7.

Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA et al. MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest* 2005;115:459–67.

Pinkerton KE, Joad JP. The mammalian respiratory system and critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108 Suppl 3:457-62.

Plopper CG, Fanucchi MV. Do urban environmental pollutants exacerbate childhood lung diseases? *Environ Health Perspect*. 2000 Jun;108(6):A252-3.

Plummer LE, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Impact of air pollution on lung inflammation and the role of Toll-like receptors. *Inter J Interferon, Cytokine and Mediator Res*. 2012. June;(4)43-57.

Polli S. Análise da expressão das proteínas dos genes de resposta primária, proteínas da família fos e jun, em culturas primárias de supra-renal de rato tratadas com ACTH e FGF2. [Dissertação (mestrado em ciências morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2007.

Poltorak A, Merlin T, Nielsen PJ, Sandra O, Smirnova I, Schupp I, Boehm T, Galanos C, Freudenberg MA. A point mutation in the IL-12R beta 2 gene underlies the IL-12 unresponsiveness of Lps-defective C57BL/10ScCr mice. *J Immunol*. 2001 Aug 15;167(4):2106-11.

Poltorak, A., I. Smirnova, R. Clisch, and B. Beutler. Limits of a deletion spanning Tlr4 in C57BL/10ScCr mice. *J. Endotoxin Res*. 2000;6:51.

Porter M, Karp M, Killedar S, Bauer SM, Guo J, Williams D, Breysse P, Georas SN, Williams MA. Diesel-enriched particulate matter functionally activates human dendritic cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(6):706-19.

Pourazar J, Blomberg A, Kelly FJ, Davies DE, Wilson SJ, Holgate ST, Sandström T. Diesel exhaust increases EGFR and phosphorylated C-terminal Tyr 1173 in the bronchial epithelium. *Part Fibre Toxicol*. 2008 May 6;5:8.

Prendergast AJ, Klenerman P, Goulder PJ. The impact of differential antiviral immunity in children and adults. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:636-48.

Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 2005;175:2777–82.

Ridge JP, Fuchs EJ, and Matzinger P: Neonatal Tolerance Revisited: Turning on Newborn T cells with Dendritic Cells. *Science*. 1996;271:1723-26.

- Riffo-Vasques Y, Oliveira APL, Page CP, Spina D, Tavares De Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:459-70.
- Rincon M. MAP-kinase signaling pathways in T cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Jun;13(3):339-45.
- Robays LJ, Lanckacker EA, Moerloose KB, Maes T, Bracke KR, Brusselle GG, Joos GF, Vermaelen KY. Concomitant inhalation of cigarette smoke and aerosolized protein activates airway dendritic cells and induces allergic airway inflammation in a TLR-independent way. *J Immunol*. 2009 Aug 15;183(4):2758-66.
- Roland DM, Macchia WM, Grim KS, Kimble EF, White DH, Kowalski TJ. Leukotriene biosynthesis inhibition by aryl and aroyl substituted naphthoquinones. *Agents Actions*. 1991 Sep;34(1-2):145-7.
- Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):1-23.
- Rong Y, Baudry M. Seizure activity results in a rapid induction of nuclear factor-kappa B in adult but not juvenile rat limbic structures. *J Neurochem*. 1996 Aug;67(2):662-8.
- Rosi E, Ronchi MC, Grazzini M, Duranti R, Scano G. Sputum analysis, bronchial hyperresponsiveness, and airway function in asthma: results of a factor analysis. *J Allergy Clin Immunol*. 1999 Feb;103(2 Pt 1):232-7.
- Russell AG, Brunekreef B. A focus on particulate matter and health. *Environ Sci Technol*. 2009 Jul 1;43(13):4620-5.
- Russo M, Nahori MA, Lefort J et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 24:518–26.
- Rutkowski, D. T., and Kaufman, R. J. (2004). A trip to the ER: Coping with stress. *Trends Cell. Biol*. 14, 20–28.
- Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin. Exp. Allergy*. 2000;30:(Suppl. 1)22–7.
- Sangiovanni R. Poluição de carros quadruplica o risco de morte. *Folha de São Paulo*. 2009 Mar 05; C3.
- Santos KT, Florenzano J, Rodrigues L, Fávaro R, Ventura FF, Ribeiro MG, et al. Early postnatal exposure to chemical ambient pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. *A ser editado pela Arch Toxicol*, 2013.
- Sasaki Y, Ohtani T, Ito Y, Mizuashi M, Nakagawa S, Furukawa T, Horii A, Aiba S. Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. *Int Arch Allergy Immunol*. 2009;148(3):239-50.
- Schröder NW, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy*. 2007;62:579–590.
- Schröder NW. The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009;9:38–43.
- Schuetzle D, Lee FS, Prater TJ. The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts. *Int J Environ Anal Chem* 1981;9:93–144.

- Schuurman HJ, Quesnia UX. Development and maturation of T-and B-cells. In: Nijkamp FP, Parnaham MJ. Principles of Immunopharmacology. Edinburgh, UK: Birkhauser; 2003. Cap. A2. p. 23–39.
- Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, Squibb KA, Medvedev AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009 Aug;86(2):303-12.
- Sica A, Dorman L, Viggiano V, Cippitelli M, Ghosh P, Rice N, Young HA. Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem*. 1997 Nov 28;272(48):30412-20.
- Singh SP, Gundavarapu S, Peña-Philippides JC, Rir-Sima-ah J, Mishra NC, Wilder JA, Langley RJ, Smith KR, Sopori ML. Prenatal secondhand cigarette smoke promotes Th2 polarization and impairs goblet cell differentiation and airway mucus formation. *J Immunol*. 2011 Nov 1;187(9):4542-52.
- Sly PD, Holt PG. Role of innate immunity in the development of allergy and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2011 Apr;11(2):127-31.
- Sram RJ, Binkova B, Dostal M, Merkerova-Dostalova M, Libalova H, Milcova A, Rossner P Jr, Rossnerova A, Schmuczerova J, Svecova V, Topinka J, Votavova H. Health impact of air pollution to children. *Int J Hyg Environ Health*. 2013 Aug;216(5):533-40.
- Stevens T, Cho SH, Linak WP, Gilmour MI. Differential potentiation of allergic lung disease in mice exposed to chemically distinct diesel samples. *Toxicol Sci*. 2009;107(2):522-34.
- Sun Y, Taguchi K, Sumi D, Yamano S, Kumagai Y. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity and suppression of endothelium-dependent vasorelaxation by 1,2-naphthoquinone, a component of diesel exhaust particles. *Arch Toxicol*. 2006;80(5):280-5.
- Takahashi G, Tanaka H, Wakahara K, Nasu R, Hashimoto M, Miyoshi K, Takano H, Yamashita H, Inagaki N, Nagai H. Effect of diesel exhaust particles on house dust mite-induced airway eosinophilic inflammation and remodeling in mice. *J Pharmacol Sci*. 2010 Feb;112(2):192-202.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. Diesel Exhaust Particles Enhance Lung Injury Related to Bacterial Endotoxin through Expression of Proinflammatory Cytokines, Chemokines, and Intercellular Adhesion Molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1329–35.
- Tanaka M, Aoki Y, Takano H, Fujitani Y, Hirano S, Nakamura R, Sone Y, Kiyono M, Ichinose T, Itoh T, Inoue K. Effects of exposure to nanoparticle-rich or -depleted diesel exhaust on allergic pathophysiology in the murine lung. *J Toxicol Sci*. 2013 Feb;38(1):35-48.
- Teerlink CC, Camp NJ, Bansal A, Crapo R, Hughes D, Kort E, Rowe K, Cannon-Albright LA. Significant evidence for linkage to chromosome 5q13 in a genome-wide scan for asthma in an extended pedigree resource. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(5):636-43.
- Ten RM, Paya CV, Israël N, Le Bail O, Mattei MG, Virelizier JL, Kourilsky P, Israël A. The characterization of the promoter of the gene encoding the p50 subunit of NF-kappa B indicates that it participates in its own regulation. *EMBO J*. 1992 Jan;11(1):195-203.
- Tesse R, Pandey RC, Kabesch M. Genetic variations in toll-like receptor pathway genes influence asthma and atopy. *Allergy*. 2011 Mar;66(3):307-16.

Thomas SY, Chyung YH, Luster AD. Natural killer T cells are not the predominant T cell in asthma and likely modulate, not cause, asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 May;125(5):980-4.

Tian L, Zhang W, Lin ZQ, Zhang HS, Xi ZG, Chen JH, Wang W. Impact of traffic emissions on local air quality and the potential toxicity of traffic-related particulates in Beijing, China. *Biomed Environ Sci*. 2012 Dec;25(6):663-71.

Tong W, Luo W. Heat shock proteins' mRNA expression in asthma. *Respirology*. 2000;5:227-30.

Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Låg M. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2010 Dec 16;7:41.

Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2007 Mar;7(3):179-90.

Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.

Tsai CL, Lee WY, Hanania NA, Camargo CA Jr. Age-related differences in clinical outcomes for acute asthma in the United States, 2006-2008. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 May;129(5):1252-1258.e1.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Latest findings on national air quality. 2002 Status and trends. EPA 454/K-03-001. Research Triangle Park, NC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards; 2003.

Udalova IA, Richardson A, Denys A, Smith C, Ackerman H, Foxwell B, Kwiatkowski D. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. *Mol Cell Biol*. 2000 Dec;20(24):9113-9.

Uhm TG, Kim BS, Chung IY. Eosinophil development, regulation of eosinophil-specific genes, and role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Allergy Asthma Immunol Res*. 2012 Mar;4(2):68-79.

Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*. 2008;26(4):339-62.

Valderrama JA, Colonelli P, Vásquez D, González MF, Rodríguez JA, Theoduloz C. Studies on quinones. Part 44: Novel angucyclinone N-heterocyclic analogues endowed with antitumoral activity. *Bioorg Med Chem*. 2008;16(24):10172-81.

van Rijt LS, Jung S, Kleinjan A, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. In vivo depletion of lung CD11c+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med*. 2005;201:981-91.

Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol*. 2008 Mar;8(3):169-82.

Wang T, Chiang ET, Moreno-Vinasco L, Lang GD, Pendyala S, Samet JM, Geyh AS, Breysse PN, Chillrud SN, Natarajan V, Garcia JG. Particulate matter disrupts human lung endothelial barrier integrity via ROS- and p38 MAPK-dependent pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Apr;42(4):442-9.

Wei H, Zhang J, Xiao W, Feng J, Sun R, Tian Z. Involvement of human natural killer cells in asthma pathogenesis: natural killer 2 cells in type 2 cytokine predominance. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115:841–7.

Weichenthal S, Dufresne A, Infante-Rivard C, Joseph L. Indoor ultrafine particle exposures and home heating systems: a cross-sectional survey of Canadian homes during the winter months. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006;17:288-97.

Williams AS, Leung SY, Nath P, Khorasani NM, Bhavsar P, Issa R, Mitchell JA, Adcock IM, Chung KF. Role of TLR2, TLR4, and MyD88 in murine ozone-induced airway hyperresponsiveness and neutrophilia. *J Appl Physiol*. 2007 Oct;103(4):1189-95.

Yost CC, Cody MJ, Harris ES, Thornton NL, McInturff AM, Martinez ML, Chandler NB, Rodesch CK, Albertine KH, Petti CA, Weyrich AS, Zimmerman GA. Impaired neutrophil extracellular trap (NET) formation: a novel innate immune deficiency of human neonates. *Blood*. 2009 Jun 18;113(25):6419-27.

Zanchi AC, Fagundes LS, Barbosa F Jr, Bernardi R, Rhoden CR, Saldiva PH, do Valle AC. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. *Inhal Toxicol*. 2010 Sep;22(11):910-8.

Zanin-Zhorov A, Bruck R, Tal G, Oren S, Aeed H, HersHKoviz R, et al. Heat shock protein 60 inhibits Th1-mediated hepatitis model via innate regulation of Th1/Th2 transcription factors and cytokines. *J Immunol* 2005;174:3227–36.

Zeger S, Dominici F, McDermott A, Samet JM. Mortality in the Medicare Population and Chronic Exposure to Fine Particulate Air Pollution in Urban Centers (2000–2005). *Environ Health Perspect*. 2008;116:1614–1619.

Zhao C, Liao J, Chu W, Wang S, Yang T, Tao Y, Wang G. Involvement of TLR2 and TLR4 and Th1/Th2 shift in inflammatory responses induced by fine ambient particulate matter in mice. *Inhal Toxicol*. 2012 Nov;24(13):918-27.