Juliana Florenzano

**“EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ) E A
SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL À INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS E FÊMEAS”**

Juliana Florenzano

**“EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ) E A
SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL À INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS E FÊMEAS”**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

São Paulo
2011

Juliana Florenzano

**“EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ) E A
SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL À INFLAMAÇÃO PULMONAR EM
CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS E FÊMEAS”**

Dissertação apresentada ao Departamento
de Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia
Pereira Costa

São Paulo
2011

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

Florenzano, Juliana.

Exposição precoce ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e a susceptibilidade diferencial à inflamação pulmonar em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas / Juliana Florenzano. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Soraia Kátia Pereira Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Toxicologia (Poluentes ambientais) e Toxicologia e asma.

Versão do título para o inglês: Early exposure to the pollutant 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) and differential susceptibility to lung inflammation in male and female C57BL / 6 mice

Descritores: 1. Asma 2. 1,2-naftoquinona 3. Hormônios sexuais
4. Catalase 5. Inflamação 6. Puberdade I. Costa, Soraia Kátia Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB042/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliana Florenzano.

Título da Dissertação: Exposição precoce ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ)
e a susceptibilidade diferencial à inflamação pulmonar em
camundongos C57BL/6 machos e fêmeas.

Orientador(a): Soraia Kátia Pereira Costa.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.013.08

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 113/07/CEEA, datado de 06.12.07 e por solicitação da Profa. Dra. Soraia K.P. Costa, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna JULIANA FLORENZANO ao projeto de pesquisa *"Contribuição farmacológica do estudo da exposição de camundongos na fase neonatal ao poluente 1,2- naftoquiminona (1,2-NQ) e sua repercussão na resposta inflamatória na fase adulta"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 11 de novembro de 2008.

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

Dedico este trabalho aos meus pais Wilson e Rosa, pelo amor incondicional, pela dedicação em oferecer o melhor para nós filhas, pela amizade, paciência e compreensão.

A minha irmã Tatiana, minha amiga, minha paixão, meu amor.

Ao meu marido Fernando, meu companheiro, amigo, pelo seu amor, carinho, e dedicação durante todos os 10 anos juntos.

AMO VOCÊS!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo companheirismo nesse minha jornada.

À Profa. Soraia K. P. Costa, pela oportunidade, por confiar no meu trabalho, pela paciência nos momentos que precisei me ausentar e pela amizade que construímos durante esses anos.

Ao Prof. Marcelo N. Muscará, pelas orientações, conselhos e também pela amizade.

À Profa. Dra. Telma Maria Tenório Zorn, por colaborar na avaliação histológica do presente estudo e principalmente ao Rodrigo F Fávoro, que contribuiu para a análise dos materiais e disponibilização de tempo para me ajudar.

À Profa. Dra. Maria Helena C. de Carvalho, pela colaboração no fornecimento de anticorpos e principalmente à Dra. Graziela Scialanti Ceravolo pela atenção e dedicação.

A minha amiga queridíssima Karen Tiago dos Santos, a qual tenho muito amor, agradeço pela sua amizade, companheirismo e preocupação comigo e dedicação com o meu trabalho. Espero que nossa amizade seja eterna.

Ao meu amigo Leandro Rodrigues, o qual também tenho um carinho especial.

A Dra. Simone Ap. Teixeira, uma amiga para todas as horas. Agradeço pela sua contribuição e dedicação.

As Srs. Maria Alice Barreto e Irene Maria Gouvea pelo auxílio técnico incansável e pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Agradeço a todos aos demais amigos de laboratório, Marco Aurélio V. de Paula, Eduardo E. Valentim, Edira Baptista, Aline M. Dantas, Paula Campi, Cristiane Silva, Rodrigo Porto, pelo carinho e amizade que recebi de todos.

À Selma Rigonati, secretária de pós-graduação do departamento de farmacologia, pela paciência e ajuda prestada.

.....

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico - CNPq e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela credibilidade inserida e apoio financeiro fornecido, ambos indispensáveis para a conclusão deste estudo.

RESUMO

Florenzano J. Exposição precoce ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e a susceptibilidade 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.

Evidências sugerem que fatores hormonais bem como ambientais parecem influenciar no grau de inflamação alérgica de indivíduos (ou da prole). Neste sentido, estudo prévio do grupo demonstrou que a exposição de camundongos neonatos ao poluente ambiental, 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), encontrado nas partículas de exaustão do diesel (PED), potencializou a inflamação alérgica nas vias aéreas desses animais na fase adulta. Neste estudo, o objetivo foi avaliar a influência da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na resposta inflamatória alérgica em camundongos C57BL/6, na fase da puberdade, em ambos os gêneros, machos e fêmeas. Foram utilizados animais obtidos do Biotério Local mediante a aprovação do Comitê de Ética ICB/USP. Parâmetros funcionais e inflamatórios foram avaliados em diferentes grupos experimentais após 43 dias da exposição a 1,2-NQ. A exposição de camundongos fêmeas e machos a 1,2-NQ não promoveu diferenças na hiperreatividade (HR) nas vias aéreas destes frente à metacolina (MCh) quando comparado aos respectivos grupos controles. Porém, a HR foi maior nas fêmeas alérgicas, tanto na ausência quanto presença da 1,2-NQ. A exposição precoce de camundongos machos, mas não fêmeas, a 1,2-NQ + OVA/OVA, levou ao aumento significativo do influxo de leucócitos (eosinófilos) no pulmão, sangue e medula óssea em relação aos respectivos grupos controles do mesmo gênero e também das fêmeas. De forma semelhante, concentrações de IL-4, IL-5, IL-13 e INF- γ foram mensuradas no pulmão, enquanto IgE aumentado foi detectado no sangue periférico desses animais. Ademais, o aumento da atividade da enzima antioxidante catalase foi observada no grupo 1,2-NQ + OVA/OVA de animais fêmeas, mas não no respectivo grupo de machos. Considerando que o aumento da atividade da catalase está associado a ausência de exacerbação da resposta inflamatória em fêmeas jovens, mas não em machos, sugerindo que o aumento da atividade da catalase constitui um fator antioxidante de controle da exacerbação da resposta inflamatória alérgica frente a exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ, o qual deve ser dependente de hormônios sexuais.

Palavras-chave: 1,2-naftoquinona, asma, hormônios sexuais, catalase, puberdade

ABSTRACT

Florenzano J. Early exposure to the pollutant 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) and differential susceptibility to lung inflammation in male and female C57BL / 6 mice [Masters thesis (Pharmacology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Evidence suggests that hormonal factors and environmental seem to influence the degree of allergic inflammation of adult individuals (or offspring). Previously, the group showed that exposure of neonatal mice to environmental pollutant, 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), found in diesel exhaust particles (PED), enhanced the allergic inflammation in the airways of these animals in adulthood. In this study, the aim was to evaluate the influence of early exposure to the pollutant 1,2-NQ in the allergic inflammatory response in C57BL / 6, during puberty in both males and females mice. Animals were obtained from the Local Animal House with the approval of Local Ethics Committee of ICB / USP. Functional and inflammatory parameters were assessed in different experimental groups after 43 days of exposure to 1,2-NQ. The exposure of female and male mice to 1,2-NQ did not influence the airways hyperreactivity (HR) evoked by methacholine (MCh) compared to respective control groups. However, HR was higher in allergic females mice in both the absence and presence of 1,2-NQ. Early exposure of male mice treated with 1,2-NQ + OVA / OVA, but not females, led to significant increase in the influx of leukocytes (eosinophils) in the lung, blood and bone marrow in comparison to respective control groups of the same gender and also females. Similarly, concentrations of IL-4, IL-5, IL-13 and INF- γ were measured in the lungs, while increased IgE was detected in peripheral blood of these animals. Furthermore, increased activity of the antioxidant enzyme catalase was found in female mice group treated with 1,2-NQ + OVA / OVA, but not males. Considering that increase of catalase activity is associated of exacerbation to inflammatory response in young females but not males, we suggest that increase activity of this enzyme may constitute a anti-oxidant factor to control the exacerbation of the allergic inflammatory response by previous exposure 1,2-NQ, which should be dependent on sex hormones.

Key words: 1.2-naphthoquinone, asthma, sex hormones, catalase, puberty

LISTA DE REAGENTES E DROGAS

Reagente ou droga	Nº Catálogo	Procedência
1,2-Naftoquinona	346616	Sigma; EUA
Al(OH) ₃	•	EMS; SP – Brasil
Álcool butílico PA.	244	Vetec; RJ – Brasil
Anticorpo de captura - IL-10	840125	R&D Systems; EUA
Anticorpo de captura – TNF- α	840143	R&D Systems; EUA
Anticorpo de captura IL-1 β	840134	R&D Systems; EUA
Anticorpo de detecção - IL-10	840126	R&D Systems; EUA
Anticorpo de detecção - IL-1 β	840135	R&D Systems; EUA
Anticorpo de detecção - TNF- α	84144	R&D Systems; EUA
Azul de Evans	•	Merck; SP – Brasil
Cloridrato de acetil- β -metacolina	A2251	Sigma; EUA
Coating Buffer	421701	BioLegend; EUA
DMSO	•	Universal Herbs Inc.
Formaldeído	606758	Aldrich; EUA
Heparina sódica	•	Hipolabor; MG – Brasil
IL-10/camundongo (padrão)	840127	R&D Systems; EUA
IL-1 β /camundongo (padrão)	840136	R&D Systems; EUA
Instant-prov	•	Neuprov; PR – Brasil
Isoflurano	•	BioChimico; RJ – Brasil
KCl	C1058.01,AG	Synth; SP – Brasil
KH ₂ PO ₄	F1030.01.AG	Synth; SP – Brasil
Kit ELISA IgE/camundongo	4220.39137H	Biolegend; EUA
Kit ELISA IL-13/camundongo	88.7137.22	eBioscience; EUA
Kit ELISA IL-5/camundongo	88.7054.22	eBioscience; EUA
Kit ELISA INF- γ /camundongo	88.7314.22	eBioscience; EUA
NaCl	C1060-01ag	Synth; SP - Brasil
NaHCO ₃	7412	Mallinckrodt; SP - Brasil
Na ₂ HPO ₄	5374.500	Fisher
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	7914	Mallinckrodt; SP – Brasil
NaCl	106	Vetec; RJ – Brasil
Ovalbumina	A5503	Sigma; EUA
Oxigênio	•	White Martins; SP - Brasil
Paraplat	40010	Histosec/Merck; SP - Brasil
Soro fetal bovino	•	GIBCO; CA – EUA
TNF- α /camundongo (padrão)	840145	R&D Systems; EUA
Turk	03867	Fluka; EUA
Tween 20	400062	Cayman; EUA
• Não se aplica		

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviações	Por extenso
1,2-NQ	1,2-Naftoquinona
1,4-NQ	1,4-Naftoquinona
ABS	Absorbância
Al(OH) ₃	Hidróxido de alumínio
APCs	Células apresentadoras de antígenos
CCAC	Manual Canadense de Cuidado Animal
CDs	Células dendríticas
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DATASUS	Departamento de Informática do SUS
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	Proteínas de matriz extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GM-CSF	Fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito
GSH	Glutathione redutase
HRB	Hiperresponsividade brônquica
IgE e IgG	Imunoglobulina E e G
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
IL-13	Interleucina-13
IL-1 β	Interleucina-1-beta
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
INF- γ	Interferon-gama
INF- α	Interferon-alfa
INF- β	Interferon-beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo

LTB4	Leucotrieno B4
LTD4	Leucotrieno D4
LTC4	Cisteinil-leucotrieno 4
MCh	Metacolina
MIP-2	Proteína inflamatória do tipo 2
MP	Material particulado
MO	Medula óssea
NO	Óxido Nítrico
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato de sódio
PED	Partícula de exaustão do diesel
Penh	“Pause enhanced”
PGD2	Prostaglandina E2 e D2
PMN	Polimorfonuclear
ROFA	“Residual oil fly ash”
SOD	Superóxido dismutase
TGF- β	Fator transformador de crescimento beta
Th1 e Th2	Célula T auxiliar do tipo 1 e 2
TLR	Receptores toll
TLR4	Receptor TLR do tipo 4
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRPV1	“Transient receptor potential channel – vanilloid 1”
TXA2	Tromboxano A2
U.S. E.P.A	Agência proteção ambiental EUA
VCAM-1	Molécula de adesão vascular 1

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Relação dos grupos experimentais	30
------------	----------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Esquema de exposição de camundongos neonatos ao poluente na presença e ausência do estímulo alérgico com ovalbumina (OVA).	30
Figura 2:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos fêmea jovens frente à MCh.	40
Figura 3:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos macho jovens frente à MCh.	41
Figura 4:	Análise comparativa entre os gêneros	42
Figura 5:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no pulmão (LBA) de camundongos fêmea.	44
Figura 6:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no pulmão (LBA) de camundongos macho.	45
Figura 7:	Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ no LBA.	46
Figura 8:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no sangue periférico de camundongos fêmea.	48
Figura 9:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no sangue periférico de camundongos macho.	49
Figura 10:	Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ no sangue periférico.	50
Figura 11:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA na medula óssea de camundongos fêmea.	52
Figura 12:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA na medula óssea de camundongos macho.	53
Figura 13:	Análise comparativa entre gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ na medula óssea.	54
Figura 14:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA) de camundongos fêmea.	56
Figura 15:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA) de camundongos macho.	57
Figura 16:	Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ na gênese de citocinas no LBA.	58
Figura 17:	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre os níveis de IgE no sangue periférico de camundongos fêmea e macho.	60
Figura 18:	Fotomicrografia (microscopia de luz) representativa do parênquima pulmonar de camundongos fêmea expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.	62
Figura 19:	Fotomicrografia (microscopia de luz) representativa do parênquima pulmonar de camundongos macho expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.	63
Figura 20:	Análise da concentração dos níveis da enzima catalase em camundongos fêmea e macho expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Asma: papel dos hormônios sexuais	16
1.2	A poluição e o seu impacto sobre a saúde de crianças e neonatos	19
1.3	Farmacologia das partículas da exaustão do diesel e seus componentes	22
2	JUSTIFICATIVA DO PROJETO.....	26
3	OBJETIVO	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Animais.....	28
4.2	Delineamento experimental/exposição do camundongo neonato ao poluente	28
4.3	Inflamação alérgica (sensibilização e desafio com OVA).....	29
4.4	Avaliação dos parâmetros funcionais e inflamatórios	31
4.4.1	<i>Medida da função pulmonar (hiperreatividade das vias aéreas) “in vivo”</i>	31
4.4.2	<i>Obtenção do LBA e sangue periférico, preparo e quantificação celular</i>	31
4.4.3	<i>Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular</i>	32
4.4.4	<i>Determinação da concentração de citocinas no LBA</i>	33
4.4.5	<i>Análise de imunoglobulinas</i>	34
4.4.6	<i>Avaliação histopatológica.....</i>	35
5	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS <i>IN VITRO</i>	36
5.1	Dosagem da catalase.....	36
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
7	RESULTADOS.....	39
7.1	Avaliação comparativa do aumento da reatividade das vias aéreas de camundongos macho e fêmea expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	39
7.2	Análise comparativa do efeito da exposição precoce à 1,2-NQ sobre a celularidade (leucócitos) no LBA, sangue periférico e medula óssea de camundongos macho e fêmea na vigência (ou não) de OVA	43
7.2.1	<i>Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ sobre a inflamação pulmonar: quantificação de leucócitos no LBA.....</i>	43

7.2.2	<i>Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ sobre o aumento do número de leucócitos no sangue periférico</i>	47
7.2.3	<i>Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre o número de leucócitos na medula óssea.....</i>	51
7.3	Avaliação comparativa do efeito da exposição precoce de camundongos fêmea e macho a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA)	55
7.4	Concentração de IgE no sangue periférico de camundongos machos e fêmeas expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	59
7.5	Efeito da exposição neonatal a 1,2-NQ sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos fêmea e macho na fase juvenil.....	61
7.6	Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a produção de enzima antioxidante catalase no pulmão de camundongos fêmea e macho	64
8	DISCUSSÃO	66
9	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Asma: papel dos hormônios sexuais

A asma é uma doença inflamatória crônica que atinge preferencialmente as vias aéreas inferiores: traquéia, brônquios e pulmões, cujas características principais incluem obstrução do fluxo de ar e hiperresponsividade brônquica (HRB). Ademais, são comuns as alterações no epitélio brônquico (descamação), alterações mesenquimais (ex.: espessamento da lâmina basal), hipersecreção mucosa, hipertrofia das glândulas mucosas e aumento das células caliciformes que, por fim, contribuem para o aumento de secreção intraluminal, e obstrução das vias por, também, excesso de muco e angiogênese (Pascual e Peters, 2005; Mauad et al., 2007; Boulet e Sterk, 2007; Rock et al., 2010). Tudo isto resulta de uma somatória de alterações celulares, vasculares e bioquímicas (alterações inflamatórias), que compreendem: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (congestão da microvascularização brônquica) e extravasamento plasmático dos vasos para o interstício e luz das vias aéreas (edema), intensa infiltração de células inflamatórias nos brônquios, predominantemente eosinófilos, linfócitos Th2 e células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células dendríticas (CDs) e macrófagos. Além disto, os neutrófilos, linfócitos T CD4+, mastócitos e mediadores inflamatórios (ex.: histamina, citocinas do tipo Th1 e Th2, quimiocinas, prostaglandinas D2 [PGD2], tromboxanos A2 [TXA2] e cisteinil leucotrienos [LTC4, LTD4]) e fatores de crescimento, tais como o fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito (GM-CSF) e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) participam desse processo inflamatório (Garcia et al., 2005; Kallinich et al., 2005; Bradding et al., 2006; Kay, 2006).

Os mediadores inflamatórios exercem um papel crítico no desenvolvimento da asma, pois contribuem para promover lesões no epitélio brônquico e, por conseguinte, agravam o quadro de HRB, levando à disfunção das vias aéreas (Amin et al., 2000; Kay, 2005) e indução do processo de remodelamento (Global Initiative for Asthma, 1995; Cohn et al., 2004). Esse último ocorre em decorrência de repetidas lesões nas vias aéreas, podendo levar à metaplasia das células epiteliais, hipoplasia (incapacidade de diferenciar-se) de células basais ou hiperplasia de células caliciformes (Ordoñez et al.,

2001). Na vigência do processo de remodelamento, algumas proteínas como as proteínas da matriz extracelular (ECM), procollagenase III (precursor maduro para colágeno III), proteoglicanos (lumican) e glicoproteínas (tenascina) depositam-se na membrana basal reticular (Roche et al., 1989) e na mucosa brônquica (Wilson e Li, 1997; Roche et al., 1989; Jeffery et al., 1992; Laitinen et al., 1997; Huang et al., 1999) e, assim, influenciam a função celular no que se refere aos mecanismos de adesão, diferenciação e sobrevivência das células (Anwar et al., 1993; Murphy-Ullrich, 2001).

Os eosinófilos desempenham um papel relevante na asma brônquica. De fato, proteínas granulares eosinofílicas, assim como a proteína básica maior de eosinófilos e peroxidase eosinofílica, causam mudanças histopatológicas nas vias aéreas, dentre elas estreitamento reversível destas (HRB) (Gleich et al., 2000; Gleich, 2000). Adicionalmente, as células Th2 estimulam o influxo de eosinófilos via mecanismo dependente da liberação das citocinas interleucinas 4 e 5 (IL-4 e IL-5) (Garlisi et al., 1995). A IL-5 é o principal fator de crescimento dos eosinófilos, atua na diferenciação de precursores eosinofílicos (Sanderson, 1992) bem como na sensibilização (*priming*) destas (Sehmi et al., 1992). Ainda, ela favorece a sobrevivência dos eosinófilos nos tecidos (Rothenberg et al., 1989). A IL-4 também estimula o crescimento de mastócitos além de favorecer o crescimento e ativação dos eosinófilos (Kindt et al., 2007).

À semelhança dos eosinófilos, a imunoglobulina E (IgE) representa um indicador importante das doenças alérgicas (Peng, 2009 ; Rage et al., 2009), pois além de influenciar diretamente a iniciação e propagação da cascata e resposta inflamatória (Buhl, 2005), a IgE também atua como um regulador crítico de respostas Th2. Nesse caso, isso ocorre devido ao aumento de afinidade da IgE por receptores específicos (FcεRI) presentes na superfície da membrana de mastócitos e basófilos (Peng, 2009).

Em geral, a asma pode ser dividida em asma extrínseca (ou atópica) e intrínseca (ou não atópica): a forma extrínseca ocorre mediante a sensibilização inicial para antígenos inalatórios e químicos (Husain et al., 2007; Mathias et al., 2009) e, neste caso, depende da ativação de linfócitos Th2 e do aumento da gênese de IL-4 e IL-5 (Virchow et al., 1995; Humbert et al., 1996), as quais estimulam a produção de IgE pelas células B. Já na forma intrínseca, predomina a ativação de parâmetros distintos, que depende da produção de IL-5, IL-2 e interferon gama (INF- γ), mas não de IL-4, o qual é incompatível com parâmetros típicos de resposta Th2 (Walker et al., 1992, 1994).

Evidências experimentais e clínicas mostram que o aumento da biossíntese dessas citocinas na asma bem como das citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-6, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e INF- γ (Lang et al., 2002) pode ser suprimida pela IL-10, cuja produção depende da ativação de monócitos e macrófagos ativados. Pode ser também produzida por células T auxiliares e por células B. Além disto, a IL-10 possui característica pleiotrópicas, ou seja, atua sobre muitos tipos celulares como agente imunossupressor na asma (Takanashi et al., 1999).

Curiosamente, vários, porém controversos, estudos mostram que a resposta inflamatória alérgica pode ser distinta entre os gêneros masculino e feminino nas diferentes fases da vida. Por exemplo, entre a idade de 2 a 17 anos, a asma prevalece no sexo masculino, enquanto após a puberdade, essa doença afeta, pelo menos três vezes mais, o sexo feminino (Balzano et al., 2001; Schatz et al., 2006). No entanto, Vink et al. (2010) observaram em ambos os sexos que, da infância até o início da puberdade (11 anos), as respostas inflamatórias alérgicas foram idênticas entre os gêneros feminino e masculino. Cabe ressaltar, porém, que após os 16 anos de idade, a taxa de incidência da asma foi maior no sexo feminino. Corroborando tais evidências, estudos experimentais em modelo animal de asma mostram que camundongos fêmea exibiram maior resposta inflamatória alérgica nas vias aéreas do que os machos (Corteling e Trifilieff, 2004; Melgert et al., 2005).

Aproximadamente 33 a 52% de mulheres asmáticas apresentam piora do quadro inflamatório antes ou durante a menstruação (Ensom et al., 1999). Acredita-se que os hormônios femininos (estrógeno e progesterona) potencializam indiretamente a resposta inflamatória, porque são capazes de estimular a diferenciação de linfócitos Th naïve para Th2 (Miyaura et al., 2002) bem como aumentam a biogênese de IL-4 e IL-5 (Piccinni et al., 1995; Lambert et al., 2005). Curiosamente, em camundongos macho alérgicos tratados com progesterona, a resposta inflamatória eosinofílica foi bem mais intensa do que em animais alérgicos não tratados (Hellings et al., 2003), reforçando assim o papel pró-inflamatório (protetor) dos hormônios femininos. De fato, outros autores observaram que quando camundongos fêmea ovariectomizadas foram sensibilizadas com ovalbumina (OVA), a inflamação alérgica pulmonar foi significativamente menor do que nos animais não operados. No entanto, na vigência do tratamento com o benzoato de estradiol, os animais exibiram resposta inflamatória alérgica parcial (Riffo-Vasquez et al., 2007). Isto sugere que a reposição hormonal

restaura a função fisiológica do mecanismo inflamatório nos animais. Cabe acrescentar que, em estudo *in vitro* de cultura de células endoteliais da mucosa nasal de pacientes com rinite alérgica, a adição de β -estradiol e progesterona a essa cultura aumentou a adesão e degranulação eosinofílica. Em contrapartida, a adição de testosterona à mesma cultura celular inibiu o efeito de maior adesão e degranulação.

No contexto da asma e a influência dos hormônios sexuais, cabe acrescentar o papel importante das citocinas (Oliveira et al., 2007). Achados desses pesquisadores mostram que ratas ovariectomizadas submetidas à inflamação alérgica experimental exibiram aumento da concentração de IL-10 no lavado broncoalveolar (LBA) e na medula óssea (MO). Por outro lado, as concentrações de IL-4 e das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) estavam reduzidas no LBA e MO, respectivamente. Na vigência do tratamento desses animais com o estradiol previamente ao estímulo alérgico, o influxo eosinofílico aumentou marcadamente no LBA. Quando o tratamento foi realizado com a progesterona, esses autores observaram o mesmo parâmetro anterior, ou seja, redução significativa do influxo de eosinófilos no LBA, mostrando claramente o papel diferencial de ambos hormônios femininos na inflamação alérgica pulmonar experimental.

1.2 A poluição e o seu impacto sobre a saúde de crianças e neonatos

A poluição do ar é o resultado da alteração das características físicas, químicas e biológicas normais da atmosfera, de forma a causar danos ao ser humano, à fauna, à flora, aos materiais, ou restringir o pleno uso e gozo da propriedade, ou afetar negativamente o bem-estar da população (<http://www.universoambiental.com.br>). Nesse sentido, agências reguladoras, dentro e fora do país, estabelecem níveis de referência, também denominado padrão de qualidade do ar, para diferenciar a atmosfera poluída da atmosfera não poluída. No Brasil, tais padrões são estabelecidos pelo órgão consultor do governo, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), com base na resolução nº 03, de 28 de junho de 1990.

É de conhecimento que, ao longo dos anos, a poluição atmosférica piorou no mundo todo, mas infelizmente, poucos países consideram isso como uma ameaça à saúde da população. Historicamente, os primeiros relatos do impacto lesivo da poluição

atmosférica resultante do uso extensivo da queima de carvão mineral sobre a saúde da população data do século XIII, na Inglaterra (Bartra et al., 2007). Relatos históricos anteriores, ano 79 (D.C.), mostram que a poluição ambiental oriunda da erupção vulcânica do Monte Vesuvius foi também responsável por danos à saúde e morte de indivíduos na Itália. No entanto, somente no final do século XIX surgiu na Inglaterra e Estados Unidos a primeira legislação para o controle da poluição do ar, primordialmente oriunda da queima do carvão mineral (Bartra et al., 2007).

Em contrapartida, com a redução da contaminação do ar pela queima do carvão mineral, introduzia-se mundialmente o emprego de derivados do petróleo, o qual dava origem a outro contaminante importante do meio ambiente, as partículas de exaustão do diesel (PEDs). Em tese, a queima do petróleo nos motores de combustão interna deveria produzir apenas dióxido de carbono (CO_2) e água. Porém, deficiências no processo de combustão do automóvel somado as impurezas no combustível, acabam levando à formação de vários poluentes que podem incorporar-se a outras substâncias químicas presentes no ar. Paralelo ao emprego difuso dos derivados de petróleo, em particular o diesel, o crescimento e desenvolvimento das indústrias automotivas e o surgimento das grandes metrópoles, que possuem em comum uma elevada frota de automóveis, foram também estimulados (Ring et al., 2001; Bartra et al., 2007).

Por seu turno, aumenta a incidência de doenças alérgicas na população dessas metrópoles / grandes cidades, tais como São Paulo, Cidade do México e outras (Sandström et al., 2005; Gina, 2008; Datasus, 2009). Desta feita, a poluição atmosférica vem sendo considerada atualmente uma das grandes vilãs responsáveis por elevar o custo de Saúde na rede Pública de inúmeros países, dentre eles o Brasil (Arshad, 2005; Ko et al., 2007). De fato, evidências epidemiológicas sugerem que a exposição de indivíduos ao material particulado (MP) fino ($\leq 2,5 \mu\text{m}$) está correlacionada ao maior número de internações por crises pulmonares agudas e obstrutivas crônicas e, consequentemente, maior número de casos de óbitos (Peters et al., 1997; Peters et al., 2001; McCreanor et al., 2007). Outro dado curioso, refere-se ao achado pré-clínico de Oberdörster (2002) e Nemmar et al. (2008), os quais mostram que o MP ultrafino transloca-se das vias aéreas de indivíduos para a corrente sanguínea, podendo causar efeitos oxidativos diretos sobre a função vascular. A China, apesar de ser apontada como um dos principais emissores de poluição, o país ainda não possui uma política de

controle de qualidade do ar adequada e, por conta disso, possui um dos maiores contingentes de indivíduos com doenças respiratórias do mundo (Wilson et al., 2008).

As partículas de interesse da poluição do ar possuem diâmetros entre 0,01 a 100 μm , sendo estas classificadas em MP ultrafino ($< 0,1 \mu\text{m}$), fino ($0,1 - 2,5 \mu\text{m}$) e grosso ($> 2,5 \mu\text{m}$) (Brunekreef e Forsberg, 2005). As PEDs pertencem ao grupo do MP fino ($0,1 - 2,5 \mu\text{m}$) e consistem numa complexa mistura de mais de 100 compostos químicos orgânicos e inorgânicos divididos entre as fases particuladas e gasosas, donde pelo menos 40 componentes apresentam alto poder tóxico na atmosfera, tais como os hidrocarbonetos poliaromáticos, hidrocarbonetos alifáticos e heterocíclicos (Agência de Proteção Ambiental EUA, 2002; U.S.E.P.A). As fases particuladas contêm núcleos carbônicos capazes de adsorverem hidrocarbonetos aromáticos e cetonas aromáticas policíclicas e aldeídos. Dentre esses, destaca-se a substância química 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), cuja concentração química para cada grama de PED é, em média, 13,7 μg (Cho et al., 2004). Outras quinonas também foram identificadas na superfície dos MP (Schuetzle et al., 1981; Schuetzle, 1983; Bolton et al., 2000).

As quinonas são geradas via metabolismo de hidroquinonas e/ou catecois, sendo esses nomeados a partir de derivados de compostos aromáticos semelhantes, tais como, as benzoquinonas derivadas do benzeno. Já as naftoquinonas são derivadas do naftaleno (Bolton et al., 2000). A geração das naftoquinonas a partir do naftaleno constitui a principal causa dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dessa substância sobre linfócitos e leucócitos mononucleares humanos (Wilson et al., 1996). De fato, evidências mostram que tanto as quinonas quanto seus produtos de redução (ex: hidroquinona, semiquinonas) são de particular interesse farmacológico e toxicológico, pois causam imunotoxicidade, carcinogênese (ex.: câncer de pulmão), reações de arilação eletrofílica de núcleos celulares, servem como agentes alquilantes e interagem com flavoproteínas para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais lesam membranas celulares (Monks et al., 1992; Bolton et al., 2000; Cho et al., 2004) e promovem a geração de radicais livres (Kumagai et al., 1995).

1.3 Farmacologia das partículas da exaustão do diesel e seus componentes

Em relação ao pouco conhecimento do papel antigênico do MP, outro aspecto importante diz respeito à compreensão exata dos mecanismos de ação envolvidos. Curiosamente, a glutathione reduzida (GSH), um dos principais antioxidantes do meio intracelular implicado na prevenção de doenças promovidas pelo excesso de radicais livres ou espécies reativas tóxicas de oxigênio, está presente em baixas concentrações no pulmão de animais expostos as PEDs (Dong et al., 2005).

Alguns estudos experimentais mostram que o dano celular, o processo inflamatório e apoptose de macrófagos podem ocorrer devido a exposição as PEDs e aos compostos nelas adsorvidos, como a 1,2-NQ. Por exemplo, segundo Lim et al. (1998), a administração intratraqueal (i.tr.) das PEDs em camundongos aumentou a atividade da enzima P450 redutase, a qual é responsável pelo aumento da produção de O_2^- . Outro estudo *in vitro* demonstrou que as PEDs diminuíram a atividade da superóxido dismutase (SOD) e da glutathione e, paralelamente, reduziram a atividade da enzima antioxidante catalase. Isto resultou em menor produção de agentes oxidantes, indicando um dos mecanismos pelos quais as PEDs causam dano celular, possivelmente devido a capacidade dessas partículas neutralizarem agentes oxidantes ((Mori et al., 1996; Pandya et al., 2002).

Outro importante aspecto a ser mencionado diz respeito ao pouco conhecimento da toxicidade dos diferentes compostos químicos presentes nas fases particulada e gasosa das PEDs sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória (alérgica ou não) em indivíduos neonatos e jovens nascidos de mães saudáveis. Embora ainda não exista um consenso reconhecido sobre o efeito direto da poluição atmosférica no desencadeamento da asma e outros efeitos adversos na saúde de infantes, a literatura epidemiológica e experimental sugere que as crianças são as mais afetadas e, principalmente, aquelas com doenças respiratórias (Nicolai, 2002; Ward e Ayres, 2004). Em parte, acredita-se que isto se deve ao fato das crianças não responderem satisfatoriamente ao tratamento farmacológico ou não aderirem a ele (Bush e Saglani, 2010). Ademais, os neonatos da espécie humana em comum com neonatos animais possuem a imunidade comprometida e, portanto, maior susceptibilidade ao efeito deletério da poluição ambiental sobre a função das vias aéreas e desenvolvimento pós-natal (Venn et al., 2001; Hamada et al., 2007; Hougaard et al., 2008). Cabe acrescentar que Strickland et al. (2009),

investigando a teratogenicidade das PEDs em bebês, verificou uma nítida correlação entre esses bebês com malformação no aparelho cardiovascular e a maior exposição de suas mães durante a gestação à poluição ambiental.

Por seu turno, Lichtenfels juntamente com o grupo do Prof. Saldiva (2007) demonstraram que ratas expostas à poluição ambiental de São Paulo, desde a fase neonatal, exibiram na fase adulta uma maior taxa de abortamento e menor taxa de fertilidade. Além disto, achados de Fedulov et al. (2008) mostram que camundongos fêmea (não alérgicas) prenhas, quando expostas a uma única aplicação i.tr. da suspensão de PEDs (ou de partículas imunologicamente inertes como o dióxido de titânio) induziram aumento da resposta inflamatória alérgica à OVA e HRB na prole, indicando que o estado de prenhez *per se* influencia na capacidade dessas partículas aumentarem a susceptibilidade da prole à tais estímulos. É bem possível que tais efeitos potencializadores da poluição atmosférica sejam devido a uma maior produção de mediadores inflamatórios, visto que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que tanto as PEDs quanto alguns dos seus contaminantes químicos orgânicos estimulam a biossíntese de citocinas (Heo et al., 2001; Devouassoux et al., 2002; Takizawa, 2004; Yanagisawa et al., 2006; Inoue et al., 2007; Teles et al., 2010). De fato, evidências experimentais mostram que a exacerbação da inflamação alérgica pulmonar frente ao contato prévio de animais com as PEDs ocorre em virtude da maior estimulação de células Th2 (Takano et al., 1997, 1998; Ichinose et al., 1998). Além disto, acredita-se que a exposição às PEDs afeta mecanismos antioxidantes nas vias aéreas (Behndig et al., 2006) bem como aumenta as concentrações séricas de citocinas inflamatórias (IL-6 e TNF- α) (Törnqvist et al., 2007).

Segundo Hamada et al. (2007) a exposição de camundongos neonatos ao MP fino rico em metais de transição (ROFA) promoveu aumento da resposta inflamatória alérgica, das concentrações de IgE e IgG e HRB à metacolina (MCh) na fase juvenil desses animais, indicando um aumento da susceptibilidade destes ao desenvolvimento da asma, independentemente do estímulo antigênico. Isto é curioso e acresce à literatura que o MP fino atua como potente fator adjuvante ou co-fator para o início (ou aumento) da sensibilização à resposta alérgica, pois o conhecimento prévio de acordo com a literatura é que a asma materna e/ou a exposição materna à alérgenos constituem os

principais fatores de risco para o desenvolvimento da asma na infância (Fujimaki et al., 1997; Jones, 2002; Liu et al., 2009).

Contudo, nesse contexto, um importante aspecto a ser questionado diz respeito ao pouco conhecimento da toxicidade dos diferentes compostos químicos presentes nas fases particulada e gasosa das PEDs sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória alérgica ou não nas diferentes fases da vida. Nesse sentido, resultados do grupo mostraram que a co-injeção i.tr. de 1,2-NQ com as PEDs em vias aéreas de ratos adultos *in vivo* causou hiporreatividade na traquéia e brônquio isolados desses animais, bem como intensificou a inflamação nas vias aéreas (inferiores e superiores) quando comparado com o efeito das PEDs isoladas, sugerindo que a 1,2-NQ exerce um papel lesivo importante na composição das PEDs e, de acordo com os achados deste grupo, os efeitos observados dependem, pelo menos em parte, de mecanismos neurogênicos (Teles et al., 2010; Oliveira et al., 2007).

Ainda em relação ao efeito deletério da 1,2-NQ na composição das PEDs sobre a saúde de neonatos e jovens, os estudos são escassos até o presente momento. No entanto, recente estudo do nosso laboratório mostrou que a exposição aguda de camundongos neonatos ao poluente isolado 1,2-NQ promoveu na fase adulta desses animais aumento marcante da resposta alérgica frente à OVA. Ao contrário, quando animais adultos foram expostos ao mesmo poluente, a resposta inflamatória alérgica não foi potencializada. Isto sugere que a exposição previa de camundongos, na fase neonatal, induziu alteração na resposta imunológica desses animais. Tal resposta foi consistente com a elevação da biossíntese de células inflamatórias, citocinas Th2, INF- γ , LTB₄ e IgE bem como maior apresentação antigênica e aumento da população de CDs (CD11c+CD8a+) (Santos et al., 2009). Esses achados contribuem com a sugestão de que o contato de indivíduos, na fase neonatal e não somente no útero, com a poluição atmosférica e, em particular, com a 1,2-NQ, sensibilizou o sistema imunológico, de alguma forma, causando potencialização da resposta inflamatória nas vias aéreas e/ou tolerância neonatal do sistema imune desses animais, um fenômeno capaz de interferir grandemente com o balanço local e sistêmico da imunidade Th2, independentemente do estímulo antigênico prévio. Curiosamente, dados epidemiológicos revelaram que, muito embora a poluição do ar na Alemanha foi reduzida, os casos de doenças das vias aéreas (ex.: asma) em crianças foram mais frequentes nesse mesmo período (von Mutius,

1996), sugerindo que possivelmente na fase perinatal, as chances de se desenvolver doenças que dependem de fatores ambientais não podem ser ignoradas.

2 JUSTIFICATIVA DO PROJETO

Em ambiente poluído as respostas imunes maternas parecem influenciar no desenvolvimento da inflamação alérgica de sua prole. Ademais, fatores genéticos e ambientais operam durante o período embrionário tornando as vias aéreas de recém-nascidos mais susceptíveis aos poluentes ambientais e, também, as predispõem à maior susceptibilidade/sensibilidade aos aeroalérgenos.

Nesse contexto, alguns estudos epidemiológicos, e poucos farmacológicos, sugerem que em certos períodos da vida, principalmente na fase perinatal, aumentam-se as chances de se desenvolver doenças que dependem de fatores ambientais. De fato, estudos de metanálise observaram que crianças que habitam em locais de alto tráfego apresentam maiores chances de desenvolverem neoplasias, como a leucemia (Reynolds et al., 2004; Neri et al., 2006). Paralelamente, outra linha de evidências sugere que os meninos são mais susceptíveis do que as meninas aos efeitos deletérios da poluição atmosférica, e que esse parâmetro é revertido na puberdade (von Mutius, 1996). Com relação ao impacto da 1,2-NQ na resposta inflamatória alérgica, pouco se conhece no que tange ao efeito da exposição de indivíduos saudáveis na fase neonatal e o perfil comparativo de resposta inflamatória alérgica desses indivíduos, de ambos os gêneros, na puberdade. Partindo dessa premissa, o grupo achou pertinente o seguinte objetivo:

3 OBJETIVO

Avaliar comparativamente o efeito da exposição precoce (fase neonatal) de camundongos ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica e hiperresponsividade das vias aéreas desses animais, dos gêneros masculino e feminino, no início da puberdade.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

O projeto foi desenvolvido conforme as normas pré-estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), mediante emissão de certificado (113/07/CEEA), em 06/12/2007.

Foram utilizados camundongos (C57BL/6) isogênicos de ambos os gêneros (machos e fêmeas) na fase neonatal e juvenil (2 a 15 g), obtidos do biotério de criação de camundongos do Departamento de Farmacologia/ICB da USP.

4.2 Delineamento experimental/exposição do camundongo neonato ao poluente

Para avaliar o efeito da exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica e biomarcadores desta resposta do referido animal na puberdade, foi utilizado o modelo de exposição pelas vias aéreas recentemente padronizado em nosso laboratório (Santos et al., 2009) com pequenas modificações adaptadas para este estudo (Fig. 1).

Grupos contendo 4 a 5 camundongos neonatos (2 a 3 g) com seis dias de vida, saudáveis foram colocados na cuba de polietileno hermeticamente fechada (área de 600 cm²), conforme dimensões estabelecidas previamente (Manual Canadense de Cuidado Animal - CCAC, 1993; Santos et al., 2009). Na lateral esquerda dessa cuba um orifício ($\varnothing \approx 1,5$ cm) permitiu a saída de ar, enquanto na lateral direita foi adaptado um conector de polietileno ($\varnothing \approx 2,0$ cm), o qual foi acoplado ao inalador ultrassônico (Mod. Respiramax; NS, São Paulo, Brasil), cuja capacidade de nebulização corresponde ao volume de 1 mL/min com, aproximadamente, $\approx 3\%$ de perda.

Os camundongos foram submetidos à nebulização da solução de 1,2-NQ (100 nM/10 mL) ou o mesmo volume do seu veículo (10 mL de PBS: Tween 80: DMSO [99,008%: 0,001%: 0.001%]; Fig. 1) durante o intervalo de 15 min por três dias

alternados (6°, 8° e 10° dias de vida). Após cada sessão de nebulização, os animais neonatos foram pesados e re-integrados às mães, em suas caixas no biotério local, onde permaneceram até o desmame ou de acordo com o protocolo experimental. Na fase juvenil (26° e 33° dias de vida), os respectivos camundongos foram submetidos ao segundo estímulo inflamatório, neste caso com a proteína do ovo de galinha, ovalbumina (OVA), ou seu respectivo veículo ($\text{Al}(\text{OH})_3$ e PBS; *item 3.3*).

4.3 Inflamação alérgica (sensibilização e desafio com OVA)

Grupos contendo 4 a 5 camundongos foram expostos ao poluente 1,2-NQ (ou veículo) na fase neonatal (dias 6, 8 e 10) e, posteriormente, foram sensibilizados (26° e 33° dias de vida) e desafiados (40° e 42° dias de vida) com OVA ou respectivo veículo. A sensibilização dos animais com a OVA (Grau V; 10 µg em 0,2 mL de PBS adsorvida em 1,6 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$) ou tratamento com o veículo da OVA foi realizada via injeção subcutânea (s.c.) na região dorsal dos animais (Riffo-Vasquez et al., 2007; Hamada et al., 2007). Após sete dias, esses animais receberam o reforço pela mesma via s.c. e, no 14° e 16° dia, eles foram desafiados durante 20 min, pela via nasal, com a solução de OVA (1%; 10 mL).

Figura 1: Esquema de exposição de camundongos neonatos ao poluente na presença e ausência do estímulo alérgico com ovalbumina (OVA). Animais (neonatos) foram nebulizados com a solução de 1,2-NQ, seu respectivo veículo ou PBS. No 26^o dia de vida, esses animais foram sensibilizados com OVA ou seu veículo e, no 40^o dia de vida, eles foram desafiados com OVA ou seu veículo. Após 24 h da 2^a exposição com OVA ou veículos, os animais foram mortos e submetidos a diferentes análises *in vitro*. As medidas funcionais do Penh *in vivo* foram efetuados antes ou durante os tratamentos dos animais conforme item 3.4.1.

Tabela 1 - Relação dos grupos experimentais

GRUPOS	TRATAMENTOS	ABREVIATÕES	N
1	Veículos de 1,2-NQ + sensibilização e desafio com veículos de OVA	V-1,2-NQ + V-OVA	5 – 7
2	1,2-NQ + sensibilização e desafio com veículos de OVA	1,2-NQ + V-OVA	5 – 7
3	Veículos de 1,2-NQ + sensibilização e desafio com OVA	V-1,2-NQ + OVA/OVA	5 – 7
4	1,2-NQ + sensibilização e desafio com OVA	1,2-NQ + OVA/OVA	5 – 7

4.4 Avaliação dos parâmetros funcionais e inflamatórios

4.4.1 Medida da função pulmonar (hiperreatividade das vias aéreas) “in vivo”

A medida da resistência das vias aéreas à passagem do ar (hiperresponsividade das vias aéreas) em animais conscientes e não-imobilizados frente a uma substância broncoconstritora, tal como o agonista colinérgico metacolina (MCh), foi determinada pelo registro da curva pressórica da respiração, com o auxílio de um pletismógrafo barométrico de corpo inteiro (PLY3351-Aerosol delivery system; BUXCO; NY, EUA), conforme descrito (Hamelmann et al., 1997; Elekes et al., 2008; Santos et al., 2009). Para tanto, os animais foram colocados em câmaras transparentes de acrílico apropriadas (Mod.: PLY4211; BUXCO; NY, EUA), nas quais concentrações crescentes da solução de MCh (3,125; 6,250; 12,5; 25,0 e 50 mg/mL) ou do veículo PBS (50 µL/animal) foram nebulizadas durante 2-3 min. Para cada concentração de MCh, a leitura do Penh foi feita por um período máximo de 5 min ou, em geral, até os valores de Penh retornarem à linha de base.

A medida do Penh é um índice bastante complexo, cuja impedância expressa compreende os seguintes parâmetros recomendados pelo fabricante: $Penh = [(tempo \text{ expiração} / tempo \text{ relaxamento}) - 1] : (fluxo \text{ expiratório max.} / fluxo \text{ inspiratório max.})$. Esse índice serve como indicador de uma broncoconstrição e / ou aumento da resistência das vias aéreas, a qual possui uma correlação bem próxima com as medidas tradicionais invasivas de resistência das vias aéreas.

A medida foi feita em ambiente com pouca luz e isolado de ruídos, a fim de minimizar o estresse dos animais e diminuir possíveis interferências na captação de sinais pelo transdutor.

4.4.2 Obtenção do LBA e sangue periférico, preparo e quantificação celular

Mediante anestesia com a mistura de isoflurano e oxigênio (proporção 1:3), os camundongos foram submetidos à coleta de sangue periférico pela artéria abdominal e, em seguida, mortos por deslocamento cervical. A coleta do lavado broncoalveolar (LBA) foi realizada via canulação da traquéia do animal com um tubo de polietileno e a

lavagem broncoalveolar foi realizada pela injeção do volume de 0,3 mL do PBS heparinizado (5 UI/mL). O volume injetado foi cuidadosamente aspirado com o fluido broncoalveolar e tal procedimento foi repetido por mais 4 vezes.

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 μ L dessa amostra foi adicionado ao volume de 190 μ L de cristal violeta (0,2% diluído em ácido acético 30%), 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, 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 μ L e adicionado ao volume de 190 μ L do corante cristal violeta (0,2%), o qual foi submetido à contagem do número total de células em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos (neutrófilos, linfócitos, macrófagos e eosinófilos) do sangue periférico foi efetuada em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa. Os dados foram expressos como número de células ($\times 10^5$) por mL de sangue.

4.4.3 Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular

A coleta de medula óssea (MO) foi realizada nos animais dos diferentes grupos experimentais, conforme estabelecido anteriormente (Tabela 1). Os animais foram mortos e, em seguida, o fêmur esquerdo destes foi removido (≈ 1 cm). Com o auxílio de uma seringa e agulha (0,80 x 25 cm) contendo 2 mL de PBS heparinizado, foi realizado a inserção desta numa das extremidades do fêmur, e a solução foi injetada lentamente. O lavado da MO foi homogeneizado com auxílio de pipeta Pasteur no próprio tubo de coleta e depois alíquotado (10 μ L). Cada alíquota foi ressuspensa em 190 μ L da solução de cristal violeta (0,2%) e a quantificação do número total de células nesse homogenato foi feita em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos foi efetuada por técnica de citocentrífuga (Fanem, Brasil). As lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa e as células presentes no lavado foram diferenciadas de acordo com a sua

morfologia em células mononucleares, neutrófilos maduros e imaturos, e eosinófilos maduros e imaturos. Os resultados foram expressos como número de células ($\times 10^6$) por medula.

4.4.4 Determinação da concentração de citocinas no LBA

No LBA dos diversos grupos experimentais (Tabela 1), as concentrações de diferentes citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-13), e Th1 (IL-1 β e TNF- α), INF- γ e a citocina antiinflamatória IL-10 foram mensuradas por ensaio de ELISA, conforme instruções do fabricante (eBioscience, EUA).

Para isto, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo monoclonal para cada citocina: anti-IL1 β , anti-IL-4, anti-IL-5, anti-IL-13 e anti-INF- γ foram diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1M, pH 9,6), anti-TNF- α e anti-IL-10 foram diluídos em tampão fosfato (0,2 M, pH 6,5) e, a seguir, essas placas foram deixadas em temperatura a 4 °C por 18 h. Para o bloqueio do anticorpo primário, as placas foram submetidas a quatro lavagens com o tampão PBST (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e depois preenchidas com 200 μ L/poço de solução de bloqueio (3% gelatina em PBST, Sigma) à 37 °C por 3 h e submetidas a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100 μ L das amostras ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à cada placa, que foi mantida em temperatura à 4 °C por 18 h. Após novo ciclo de lavagens, o volume de 100 μ L dos citados anticorpos biotinilados específicos de detecção para cada citocina foi acrescido aos poços das placas que foram mantidas em temperatura ambiente por 1 h. Cada placa foi submetida a novo ciclo de lavagem e o volume de 100 μ L de estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionado em cada poço e as placas foram mantidas em temperatura ambiente (22 °C) por 1 h. Após novos ciclos de lavagens das placas, a reação ag-ac foi revelada seguida a adição de 100 μ L por poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (2 N) em cada poço.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com correção para 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com as citocinas recombinantes. A curva padrão para IL-5 e IL-13 foi feita 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. Curva padrão para TNF- α , IL-10 e INF- 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. Já a curva padrão de 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.

4.4.5 *Análise de imunoglobulinas*

As amostras do sangue periférico dos diferentes grupos experimentais foram centrifugadas (800 g; 3 min) e o sobrenadante foi coletado e avaliado para os níveis protéicos de IgE, via ensaio imunoenzimático ELISA, conforme instruções do fabricante (BioLegend; EUA).

Para isto, placa de 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo monoclonal anti-IgE foi diluído *coating buffer* (8,4 g NaHCO₃, 3,56 g Na₂CO₃; pH 9,5) e, a seguir, essas placas foram deixadas em temperatura a 4 °C por 18 h. Para o bloqueio do anticorpo primário, a placa foi submetida a quatro lavagens com tampão PBST (solução PBS contendo 0,05% de Tween 20) e depois preenchida com 200 μ L/poço de solução de bloqueio (1% BSA em PBS) à 37 °C por 3 h e submetida a novo ciclo de lavagens. A seguir, 100 μ L das amostras ou dos padrões das citocinas recombinantes foram adicionados à placa e deixadas à 4 °C por 18 h. Após novo ciclo de lavagens, o volume de 100 μ L do anticorpo biotinilado específico de detecção para a citocina foi acrescido aos poços da placa e mantidos por 1 h em temperatura ambiente. A placa foi submetida a novo ciclo de lavagem e o volume de 100 μ L de estreptavidina conjugada com peroxidase foi adicionado em cada poço e a placa foi mantida por 1 h em temperatura ambiente (22 °C). Após novos ciclos de lavagem da placa, a reação ag-ac foi revelada seguida a adição de 100 μ L por poço da solução de 3.3'5.5' tetrametilbenzidina (TMB). A reação foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (2 N) em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Espectra Max plus 384 (Sunnyvale, CA, EUA) em comprimento de onda de 450 nm com

correção a 570 nm. As concentrações das amostras foram calculadas a partir das curvas-padrão obtidas com a citocina recombinante.

A curva padrão para IgE foi feita nas concentrações de 0 ng/mL (diluente 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 ABS de 450 nm e a concentração mínima de IgE detectável no LBA do camundongo foi de 0,1 ng/mL.

4.4.6 Avaliação histopatológica

Os pulmões provenientes dos animais saudáveis e alérgicos, pré-tratados ou não com a 1,2-NQ na fase neonatal, foram perfundidos com uma solução de PBS heparinizado (5 mL; 5 UI/mL) para lavagem e remoção do sangue e em seguida com solução formaldeído 4% em PBS (pH 7,4). Os pulmões removidos foram fixados em solução de formaldeído 4% em PBS (pH 7,4) durante 24 h. As amostras foram então incluídas em parafina (paraplast; Histosec, Merck; EUA) e depois foram seccionadas em cortes transversais (5 µm) com o auxílio de um micrótomo (American Optical Corporation - modelo Spencer 820).

As seções foram desidratadas e diafinizadas em concentrações crescentes de álcool e xilol e depois montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina (H e E). As análises qualitativas das alterações histopatológicas do material foram feitas nas seções cobertas com lamínulas em meio de montagem permanente DPX com o auxílio de microscopia (Nikon Eclipse E200).

5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS *IN VITRO*

5.1 Dosagem da catalase

O método ocorre em duas etapas. Na primeira reação (R1), a catalase contida na amostra dismuta o H_2O_2 (de concentração conhecida) em água e oxigênio molecular. Em seguida, na segunda reação (R2), o H_2O_2 remanescente é determinado pela oxidação do reagente o-dianisidina (O.D) em uma reação catalizada pela enzima peroxidase (HRP).

Preparação das amostras:

As amostras de pulmão foram pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato 50mM, pH 7,0 (1:10, p/v).

Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 7.500 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi separado para o ensaio. Metade do volume de sobrenadante foi incubado a 60 °C por 2 h (para inativação da catalase) para os brancos da reação.

Curva padrão de H_2O_2 : foi preparada em tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 nas concentrações: 8820, 4410, 2205, 1125, 882, 441, 221, 113, 88, 44, 22 e 11 μM .

Reação 1: foi realizada incubando-se 30 μL de sobrenadante das amostras (brutos e inativados) com 500 μL de H_2O_2 10 mM em temperatura ambiente (durante 2 min). A reação foi interrompida com 500 μL de NaN_3 1 mM. Em paralelo, 30 μL de tampão fosfato 50 mM, pH 7,0 foram incubados com 500 μL de H_2O_2 (nas diferentes concentrações da curva) com os respectivos tempos de incubação.

Reação 2: foi realizada em placa de ELISA incubando-se 20 μL do produto da primeira reação com 200 μL de reagente contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e 0,095 $\mu\text{g/mL}$ de HRP em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0.

A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando-se o aumento da absorbância da mistura a 460 nm, por meio de leituras coletadas em intervalos de 10 s durante 10 min. O valor de atividade da catalase foi calculado a partir da velocidade máxima por minuto de cada reação e extrapolado na curva de H_2O_2 . O resultado foi expresso em U Catalase/mg de proteína. Uma unidade de Catalase foi definida como a quantidade de H_2O_2 (em μmol) degradada por minuto.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como médias $\pm$ EPM de valores absolutos ou porcentagem. Os mesmos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) de uma única ou duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças entre as médias foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (software Prism 4.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

7 RESULTADOS

7.1 Avaliação comparativa do aumento da reatividade das vias aéreas de camundongos macho e fêmea expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Na puberdade, os camundongos fêmea expostos ao poluente (1,2-NQ + V-OVA) na fase neonatal, não exibiram, após 43 dias do tratamento, aumento significativo da reatividade das vias aéreas às concentrações crescentes de MCh (3,125; 6,250; 12,5; 25,0 e 50 mg/mL) quando comparado ao grupo controle V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 2, painel A). Já o grupo alérgico sem exposição prévia ao poluente V-1,2-NQ + OVA/OVA exibiu aumento significativo ($P < 0,05$) da reatividade das vias aéreas frente à MCh quando comparado aos grupos V-1,2-NQ + V-OVA e 1,2-NQ + V-OVA (Figura 2, painel A). Embora o grupo de fêmeas 1,2-NQ + OVA/OVA exibiu potente aumento na reatividade das vias aéreas frente à MCh, essa resposta não foi estatisticamente diferente do grupo alérgico V-1,2-NQ + OVA/OVA (Figura 2, painel A). Os gráficos de Emax (Figura 2, painel B) e AUC (Figura 2, painel C) ilustram e confirmam estes resultados.

Assim como as fêmeas jovens, o grupo de camundongos jovens macho 1,2-NQ + V-OVA, não exibiram aumento significativo da reatividade das vias aéreas frente ao estímulo com a MCh quando comparado ao grupo controle V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 3, painel A). A exposição dos machos ao veículo do poluente e posteriormente ao estímulo alérgico (grupo V-1,2-NQ + OVA/OVA) promoveu aumento significativo da reatividade das vias aéreas quando comparado ao grupo V-1,2-NQ + V-OVA do mesmo gênero (Figura 3, painel A). Já o grupo 1,2-NQ + OVA/OVA de camundongos macho revelou aumento significativo da reatividade das vias aéreas em relação ao controle correspondente 1,2-NQ + V-OVA, porém, essa resposta foi semelhante àquela obtida no grupo somente alérgico V-1,2-NQ + OVA/OVA (Figura 3, painel A). Os gráficos de Emax (Figura 3, painel B) e AUC (Figura 3, painel C) corroboram tais resultados.

A análise comparativa do aumento da reatividade das vias aéreas entre os grupos de camundongos (1,2-NQ + OVA/OVA) macho e fêmea revelou que as fêmeas exibem maior resposta de reatividade das vias aéreas frente à MCh (Figura 4).

Figura 2: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos fêmea jovens frente à MCh. Reatividade das vias aéreas (Penh) *in vivo* induzida pela MCh 24 h após o último desafio com OVA ou veículo. O painel A mostra o gráfico de linha da concentração-resposta à MCh nas vias aéreas dos diversos grupos experimentais de camundongos fêmea jovens. Os painéis (em barra) B e C representam essas mesmas respostas expressas como Emax e AUC, respectivamente. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 5-7$ animais. #### $P < 0,001$ e ## $P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA e &&&& $P < 0,001$ e &&& $P < 0,01$ vs. 1,2-NQ + V-OVA.

Figura 3: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a reatividade das vias aéreas de camundongos macho jovens frente à MCh. Reatividade das vias aéreas (Penh) *in vivo* induzida pela MCh 24 h após o último desafio com OVA ou veículo. O painel A mostra o gráfico de linha da concentração-resposta à MCh nas vias aéreas dos diversos grupos experimentais de camundongos macho jovens. Os painéis (em barra) B e C representam essas mesmas respostas expressas como Emax e AUC, respectivamente. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n= 6-10$ animais. # $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA.

Figura 4: Análise comparativa entre os gêneros. A reatividade das vias aéreas (Penh) frente MCh 24 h após o último desafio com OVA ou seu veículo. Os painéis A e B (em barra) ilustram essas respostas expressas como Emax e AUC, respectivamente, entre os grupos. ** $P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (machos) e * $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (machos).

7.2 Análise comparativa do efeito da exposição precoce à 1,2-NQ sobre a celularidade (leucócitos) no LBA, sangue periférico e medula óssea de camundongos macho e fêmea na vigência (ou não) de OVA

7.2.1 Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ sobre a inflamação pulmonar: quantificação de leucócitos no LBA

A figura 5 mostra que a exposição de camundongos fêmea na fase neonatal à 1,2-NQ (1,2-NQ + V-OVA) evocou, após 43 dias de vida, um aumento no número total de leucócitos e linfócitos no pulmão dos animais, muito embora o aumento não foi estatisticamente diferente do grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 5, painéis A e D). A associação do poluente ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA) reduziu significativamente o influxo celular no LBA comparado ao grupo de fêmeas 1,2-NQ + V-OVA (Figura 5, painéis A e D).

Por outro lado, o grupo de camundongos macho tratados com 1,2-NQ + V-OVA não sofreram alterações quanto ao influxo de células na cavidade pulmonar (Figura 6). Na vigência do estímulo alérgico, os machos do grupo 1,2-NQ + OVA/OVA exibiram aumento significativo do influxo celular no LBA, caracterizado por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos (Figura 6, painéis A, C, D e E). O grupo do mesmo gênero tratado com V-1,2-NQ + OVA-OVA não apresentou nenhum aumento em relação ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 6).

A análise comparativa da exposição a 1,2-NQ + V-OVA foi semelhante entre os gêneros macho e fêmea. No entanto, quando tratados com V-1,2-NQ + OVA/OVA demonstraram aumento no influxo celular (neutrófilos e eosinófilos; figura 7, painéis C e E), significativamente maior no LBA das fêmeas em relação ao grupo de machos V-1,2-NQ + OVA-OVA. Por outro lado, o grupo de fêmeas tratadas com 1,2-NQ + OVA/OVA mostrou influxo celular (leucócitos totais, neutrófilos e linfócitos; Figura 7, painéis A, C e D), significativamente menor quando comparado ao grupo de machos 1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 5: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no pulmão (LBA) de camundongos fêmea. O LBA dos diferentes grupos animais na fase juvenil (43 dias após nascimento) foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 5-7$ animais. $##P < 0,01$ e $\#P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V- OVA, $\&P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA e $**P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 6: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no pulmão (LBA) de camundongos macho. O LBA dos diferentes grupos animais na fase juvenil (43 dias após nascimento) foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n=6-10$. #### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, &&& $P < 0,001$, && $P < 0,01$ e & $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 7: Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ no LBA. O LBA foi obtido 24 h após o último desafio com OVA ou seu respectivo veículo. Os painéis A, B, C, D e E representam a comparação entre os camundongos fêmeas e machos referente à contagem de leucócitos totais e diferenças. *** $P < 0,001$ e * $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (machos) e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (machos).

7.2.2 Efeito da exposição precoce da 1,2-NQ sobre o aumento do número de leucócitos no sangue periférico

Camundongos fêmea pré-tratadas com 1,2-NQ (grupo 1,2-NQ + V-OVA) exibiram, após 43 dias de vida, aumento estatisticamente diferente no número total de leucócitos, neutrófilos e linfócitos no sangue periférico, comparados ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 8, painéis A, C e D). Já a associação do poluente ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA) resultou numa redução significativa do número total de leucócitos e linfócitos quando comparado ao grupo exposto a 1,2-NQ não alérgico (1,2-NQ + V-OVA).

Já a figura 9 mostra que a exposição de camundongos macho a 1,2-NQ (1,2-NQ + V-OVA) não provocou aumento no número de leucócitos no sangue periférico dos animais. Já o grupo 1,2-NQ + OVA/OVA apresentou aumento estatisticamente diferente no número total de leucócitos assim como na população de linfócitos e eosinófilos (Figura 9, painéis A, D e E) comparado ao grupo controle alérgico V-1,2-NQ + OVA/OVA. Tal aumento foi também estatisticamente maior quando comparado ao mesmo grupo de fêmeas submetidas ao mesmo tratamento (Figura 10).

Figura 8: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no sangue periférico de camundongos fêmea. O sangue dos diferentes grupos animais, na fase juvenil (43 dias após nascimento), foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n= 5-7$ animais. $###P < 0,001$, $##P < 0,01$ e $\#P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, $\&\&P < 0,01$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, $***P < 0,001$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 9: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA no sangue periférico de camundongos macho. O sangue dos diferentes grupos animais, na fase juvenil (43 dias após nascimento), foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 6-10$ animais. #### $P < 0,001$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, &&& $P < 0,001$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 10: Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ no sangue periférico. O sangue periférico foi obtido 24 h após o último desafio com OVA ou seu respectivo veículo. Os painéis A, B, C, D e E representam a comparação entre os camundongos fêmeas e machos referente à contagem de leucócitos totais e diferenças. *** $P < 0,001$ vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (machos).

7.2.3 Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre o número de leucócitos na medula óssea

Camundongos fêmea do grupo 1,2-NQ + V-OVA exibiram, após 43 dias de vida, um aumento no número total de leucócitos e neutrófilos maduros na MO (Figura 11, painéis A e D), o qual foi estatisticamente diferente do grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA. A exposição da 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico nesse mesmo gênero (1,2-NQ + OVA/OVA) diminuiu significativamente o número total dos leucócitos assim como das células mononucleares e neutrófilos imaturos comparados ao grupo 1,2-NQ + V-OVA (Figura 11, painéis A, B e C). Também foi demonstrado que o grupo 1,2-NQ + OVA/OVA exibiu redução substancial na contagem total dos leucócitos, neutrófilos maduros e eosinófilos maduros na MO em relação ao grupo V-1,2-NQ + OVA/OVA (Figura 11, painéis A, D e F).

Já o grupo de camundongos macho tratados com 1,2-NQ + V-OVA não exibiu aumento no número de leucócitos na MO quando comparado ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 12). Ao contrário, o grupo do mesmo gênero tratado com 1,2-NQ + OVA/OVA exibiu aumento estatisticamente diferente na contagem total dos leucócitos, células mononucleares e neutrófilos imaturos na MO (Figura 12, painéis A, B e C) comparados ao grupo exposto somente ao poluente, 1,2-NQ + V-OVA. Observamos também, que esse grupo (1,2-NQ + OVA/OVA) de animais apresentou aumento de eosinófilos imaturos em relação ao controle, V-1,2-NQ + V-OVA (Figura 12, painel E).

Figura 11: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA na medula óssea de camundongos fêmea. A medula óssea dos diferentes grupos animais, na fase juvenil (43 dias após nascimento), foi obtida 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 5-7$ animais. $###P < 0,001$, $##P < 0,01$ e $\#P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, $\&\&\&P < 0,001$, $\&\&P < 0,01$ e $\&P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, $***P < 0,001$ e $*P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 12: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica induzida pela OVA na medula óssea de camundongos macho. A medula óssea dos diferentes grupos animais, na fase juvenil (43 dias após nascimento), foi obtida 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n=6-10$. $###P < 0,001$, $##P < 0,01$ e $\#P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, $\&\&\&P < 0,001$ e $\&\&P < 0,01$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, $**P < 0,01$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 13: Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ na medula óssea. A medula óssea foi obtida 24 h após o último desafio com OVA ou seu respectivo veículo. Os painéis A, B, C, D, E e F representam a comparação entre os camundongos fêmeas e machos referente à contagem de leucócitos totais e diferenças. ***P< 0,001 vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (machos) e ***P< 0,001 e *P< 0,05 vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (machos).

7.3 Avaliação comparativa do efeito da exposição precoce de camundongos fêmea e macho a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA)

Camundongos fêmea tratados com 1,2-NQ + V-OVA, após 43 dias de vida, não exibiram diferenças significativas nas concentrações das citocinas Th2 IL-13, IL-5 e IL-4 (Figura 15, painéis B, C e D) e nem das citocinas INF- γ e TNF- α (Figura 14, painéis A e E), quando comparado ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA. Por outro lado, o tratamento com a 1,2-NQ + V-OVA promoveu aumento significativo das concentrações de IL-1 β e IL-10 (Figura 14, painéis F e G) em relação ao grupo V-1,2-NQ + V-OVA. A exposição desse mesmo gênero a 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA) reduziu marcadamente as concentrações das citocinas INF- γ , IL-13, IL-5, IL-4 (Figura 14, painéis A, B, C e D), mas não da citocina IL-1 β (Figura 14, painel F), a qual se apresentou estatisticamente maior quando comparado ao grupo V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Já o grupo de camundongos macho expostos 1,2-NQ + V-OVA, também não exibiram aumento significativo das concentrações das citocinas Th2 IL-13, IL-5 e IL-4 (Figura 15, painéis B, C e D), das citocinas INF- γ , TNF- α e IL-1 β (Figura 15, painéis A, E e F) e nem da citocina antiinflamatória IL-10 (Figura 15, painel G) quando comparados ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA. Por outro lado, a exposição da 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA), promoveu aumento estatisticamente diferente tanto das citocinas Th2 e INF- γ (Figura 15, painéis A, B, C e D) quando comparado ao grupo alérgico (V-1,2-NQ + OVA/OVA). Porém, observamos diminuição significativa das citocinas TNF- α , IL-10 nesse mesmo grupo (1,2-NQ + OVA/OVA) quando comparamos ao grupo alérgico V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 14: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA) de camundongos fêmea. O LBA dos diferentes grupos animais, na fase juvenil 43 dias após o nascimento, foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados são expressos como média ± E.P.M. para n= 3-7 animais. ###P< 0,001, ##P< 0,01 e #P< 0,05 vs. V-1,2-NQ + V-OVA, &&&P< 0,001, &&P< 0,01 e &P< 0,05 vs. 1,2-NQ + V-OVA, ***P< 0,001 e **P< 0,01 vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 15: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a gênese de citocinas no pulmão (LBA) de camundongos macho. O LBA dos diferentes grupos animais, na fase juvenil 43 dias após o nascimento, foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 3-10$ animais. ### $P < 0,001$, ## $P < 0,01$ e # $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, && $P < 0,01$ e & $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

Figura 16: Análise comparativa entre os gêneros sobre a inflamação induzida pela 1,2-NQ na gênese de citocinas no LBA. O LBA foi obtido 24 h após o último desafio com OVA ou seu respectivo veículo. Os painéis A, B, C, D e E representam a comparação entre os camundongos fêmea e macho referente à gênese de citocinas. *** $P < 0,001$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA (machos) e ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (fêmeas) vs. 1,2-NQ + OVA/OVA (machos).

7.4 Concentração de IgE no sangue periférico de camundongos machos e fêmeas expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Camundongos fêmea tratados com 1,2-NQ + V-OVA, após 43 dias de vida, não exibiram aumento da concentração de IgE. Já a exposição a 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA; figura 17, painel A), aumentou significativamente os níveis de IgE nesse grupo quando comparamos ao grupo que recebeu a exposição apenas do poluente (1,2-NQ + V-OVA). O mesmo perfil de resposta foi observado do grupo alérgico (V-1,2-NQ + OVA/OVA) quando comparado a esse grupo (1,2-NQ + V-OVA).

Camundongos macho expostos a 1,2-NQ + V-OVA, também não exibiram alterações na concentração de IgE. Já a exposição a 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA; figura 17, painel B), aumentou significativamente os níveis de IgE nesse grupo quando comparamos ao grupo controle, V-1,2-NQ + V-OVA. O mesmo perfil de resposta foi observado do grupo alérgico (V-1,2-NQ + OVA/OVA) quando comparamos ao grupo controle.

Figura 17: Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre os níveis de IgE no sangue periférico de camundongos fêmea e macho. O sangue periférico dos diferentes grupos animais, na fase juvenil 43 dias após o nascimento, foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. Painel A fêmeas e painel B machos. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n= 3-8$ animais. $##P < 0,01$ e $###P < 0,001$ vs. V-1,2-NQ + V-OVA, $&&P < 0,01$ e $&P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA.

7.5 Efeito da exposição neonatal a 1,2-NQ sobre as alterações morfológicas no pulmão de camundongos fêmea e macho na fase juvenil

A figura 18 ilustra a fotomicrografia (em três aumentos: 300 µm, 100 µm e 30 µm) representativa do corte histológico do pulmão do grupo de camundongos fêmea. O grupo V-1,2-NQ + V-OVA revela padrão histológico preservado, sem a presença de infiltrado inflamatório. A fotomicrografia do mesmo gênero exposto ao poluente 1,2-NQ + V-OVA mostra discreto influxo leucócitos na região periobrionquiolar, caracterizado principalmente por linfócitos. Enquanto a fotomicrografia representativa do respectivo grupo de fêmeas alérgicas, V-1,2-NQ + OVA/OVA, demonstra um quadro inflamatório intenso no parênquima pulmonar, formado pela presença marcante de eosinófilos, a fotomicrografia representativa dos animais expostos a ambos estímulos (1,2-NQ + OVA/OVA) ilustra um parênquima pulmonar preservado, morfológicamente dentro da normalidade e semelhante ao do animal controle (V-1,2-NQ + V-OVA).

A figura 19 ilustra a fotomicrografia (em três aumentos: 300 µm, 100 µm e 30 µm) representativa do corte histológico do pulmão do grupo de camundongos macho. O V-1,2-NQ + V-OVA, assim como nas fêmeas, revela padrão histológico preservado, sem a presença de infiltrado inflamatório. A fotomicrografia do mesmo gênero exposto ao poluente 1,2-NQ + V-OVA mostra discreto influxo de leucócitos, caracterizado principalmente por linfócitos, porém menor do que o observado nas fêmeas. Enquanto a fotomicrografia representativa do respectivo grupo de machos alérgicos, V-1,2-NQ + OVA/OVA, demonstra um discreto influxo de leucócitos, caracterizado principalmente por linfócitos, a fotomicrografia representativa dos animais expostos a ambos estímulos (1,2-NQ + OVA/OVA) demonstra um quadro inflamatório intenso no parênquima pulmonar, formado pela presença marcante de eosinófilos.

Figura 18: Fotomicrografia (microscopia de luz) representativa do parênquima pulmonar de camundongos fêmea expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. O pulmão dos diferentes grupos animais, na fase juvenil 43 dias após o nascimento, foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. O grupo V-1,2-NQ + V-OVA mostra o parênquima pulmonar com morfologia normal. O grupo 1,2-NQ + V-OVA observamos um pequeno aglomerado de células inflamatórias no parênquima pulmonar desses animais. O grupo V-1,2-NQ + OVA/OVA mostra um denso influxo de células inflamatórias (eosinófilos). O grupo 1,2-NQ + OVA/OVA mostra o parênquima pulmonar com morfologia normal. V = vaso sanguíneo; B = brônquio; área demarcada para ilustração da região analisada. Coluna A: aumento de 300 μm ; Coluna B: aumento 100 μm ; Coluna C: aumento de 30 μm .

Figura 19: Fotomicrografia (microscopia de luz) representativa do parênquima pulmonar de camundongos macho expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. O pulmão dos diferentes grupos animais, na fase juvenil 43 dias após o nascimento, foi obtido 24 h após a última exposição com OVA ou veículo. O grupo V-1,2-NQ + V-OVA mostra o parênquima pulmonar com morfologia normal. O grupo 1,2-NQ + V-OVA observamos algumas células inflamatórias no parênquima pulmonar desses animais. O grupo V-1,2-NQ + OVA/OVA mostra um aglomerado de células inflamatórias no parênquima pulmonar. O grupo 1,2-NQ + OVA/OVA mostra um denso influxo de células inflamatórias (eosinófilos). V = vaso sanguíneo; B = brônquio; área demarcada para ilustração da região analisada. Coluna A: aumento de 300 μ m; Coluna B: aumento 100 μ m; Coluna C: aumento de 30 μ m.

7.6 Efeito da exposição precoce a 1,2-NQ sobre a produção de enzima antioxidante catalase no pulmão de camundongos fêmea e macho

Camundongos fêmea expostas a 1,2-NQ + V-OVA na fase neonatal, exibiram aumento da atividade da catalase quando comparado ao grupo alérgico (V-1,2-NQ + OVA/OVA; figura 20, painel A). Já a exposição a 1,2-NQ somada ao estímulo alérgico (1,2-NQ + OVA/OVA), promoveu aumento da atividade dessa enzima quando comparados ao grupo alérgico (V-1,2-NQ + OVA/OVA; figura 20, painel A).

Os camundongos machos, não sofreram alteração da atividade da catalase quando expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, ou seja, a produção dessa enzima foi a mesma em todos os grupos analisados (Figura 20, painel B).

Figura 20: Análise da concentração dos níveis da enzima catalase em camundongos fêmea e macho expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. O pulmão dos diferentes grupos animais na fase juvenil (43 dias após nascimento) foi obtido 24 h após o último desafio com OVA ou seu respectivo veículo. Os dados foram expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n= 3-5$. & $P < 0,05$ vs. 1,2-NQ + V-OVA e * $P < 0,05$ vs. V-1,2-NQ + OVA/OVA.

8 DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos mostram que a resposta inflamatória alérgica difere entre os sexos nas diferentes fases da vida, donde na puberdade, o sexo masculino é o mais afetado (Balzano et al., 2001; Schatz et al., 2006). Contudo, Vink et al. (2010) observaram que a prevalência de asma, da infância até a puberdade (11 anos de idade), foi semelhante entre os gêneros do sexo feminino e masculino. Já outros estudos apontaram que após a puberdade (a partir dos 16 anos de idade), esse parâmetro reverteu para o sexo feminino, sendo a taxa de acometimento três vezes maior do que no sexo masculino (Balzano et al., 2001; Schatz et al., 2006).

O presente estudo foi desenhado para avaliar comparativamente o impacto da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ sobre a inflamação alérgica e hiperresponsividade das vias aéreas em camundongos dos sexos masculino e feminino na puberdade. Os resultados iniciais deste estudo mostram que a exposição prévia da 1,2-NQ aumentou significativamente o influxo de linfócitos no LBA, leucócitos totais e linfócitos no sangue periférico de camundongos jovens do sexo feminino (puberdade). Na MO desses animais, contudo, foi possível quantificar concentrações elevadas de leucócitos totais e neutrófilos maduros. Comparativamente, camundongos macho expostos ao mesmo poluente não exibiram, na puberdade, nenhuma alteração no número de células quantificadas no LBA, sangue periférico e MO comparado ao grupo controle. Estes resultados reforçam dados da literatura e sugerem que a exposição de camundongos neonatos à poluição ambiental, no caso deste estudo a 1,2-NQ, resultou, somente nas fêmeas durante a puberdade, aumento da resposta inflamatória nas vias aéreas destas, independentemente do componente alérgico e aumento das concentrações séricas de IgE no sangue periférico, sugerindo que esse composto *per se* promove resposta inflamatória a longo prazo em fêmeas. Vale acrescentar que, como esperado, concentrações séricas significativas de IgE foi observado no sangue periférico do grupo de camundongos V-1,2-NQ + OVA/OVA, de ambos os gêneros. Da mesma forma, concentrações de IgE foram mensuradas nos grupos 1,2-NQ + OVA/OVA, de ambos os gêneros; no entanto, esse aumento não foi diferente do grupo somente alérgico dos respectivos gêneros machos e fêmeas.

Em contraste, em termos de responsividade das vias aéreas frente à MCh, tanto em fêmeas quanto em machos, a exposição precoce a 1,2-NQ não promoveu na puberdade desses animais nenhum aumento significativo na reatividade dessas estruturas em relação ao controle. Curiosamente, outros pesquisadores 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 (Kikuno et al., 2006). A diferença entre esse e o presente estudo não está claro, mas cabe ressaltar que os efeitos de uma substância num sistema operante *in vivo* é bem diferente de uma preparação *in vitro* ou cultura de células. Além das diferenças de espécie (camundongo *vs.* cobaia), vale lembrar que o efeito da 1,2-NQ neste estudo foi avaliado após 43 dias da exposição, enquanto que na preparação *in vitro* essa avaliação foi feita concomitantemente a administração da 1,2-NQ.

É de conhecimento que, aproximadamente 33 a 52%, de mulheres asmáticas apresentam piora do quadro inflamatório antes ou durante a menstruação (Ensom et al., 1999). Corroborando tais evidências, outros observaram que na asma experimental em camundongos, as fêmeas dessa espécie exibiram intensificação do quadro inflamatório alérgico (Corteling e Trifilieff, 2004; Melgert et al., 2005) e, ainda, quando camundongos macho foram castrados e posteriormente tratados com progesterona, a resposta inflamatória alérgica nesses animais foi potencializada (Hellings et al., 2003). Extensivos dados da literatura atual mostram que os hormônios femininos (em particular, o estrógeno) potencializam indiretamente a resposta inflamatória, pois estimulam a diferenciação de linfócitos Th naíve para Th2 (Miyaura et al., 2002) e aumentam a gênese de IL-4 e IL-5 (Piccinni et al., 1995; Lambert et al., 2005). Considerando tais conhecimentos, a seguinte questão pertinente deste estudo incluiu avaliar o efeito da exposição neonatal a 1,2-NQ frente ao estímulo alérgico nas vias aéreas de camundongos fêmeas e, a seguir, compará-lo com a resposta obtida nos machos.

Desta feita, a avaliação da responsividade nas vias aéreas desses animais revelou que somente as fêmeas expostas a ambos os estímulos (V-1,2-NQ + OVA/OVA e 1,2-NQ + OVA/OVA) exibiram aumento significativo da reatividade das vias aéreas à MCh quando comparado ao respectivo grupo de machos ou, ainda, quando comparado ao grupo de fêmeas somente exposto a 1,2-NQ. Tais achados corroboram, em parte, os resultados de Santos et al. (2009), os quais também não evidenciaram aumento

significativo da responsividade nas vias aéreas de camundongos macho adultos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal ou adulta e a OVA. A ausência de aumento na reatividade das vias aéreas de machos em relação as fêmeas é bastante intrigante, visto que ambos os gêneros de camundongos foram submetidos ao mesmo esquema de exposição a 1,2-NQ na mesma faixa etária. Contudo, é importante acrescentar que, neste estudo, o aumento de reatividade nas vias aéreas de fêmeas expostas a 1,2-NQ e OVA não foi diferente da resposta obtida no grupo de fêmeas somente alérgicas, sugerindo que esse aumento não foi potencializado pelo poluente, como observado com a resposta inflamatória e, portanto, isto ocorreu independentemente da exposição prévia deste. Todavia, é plausível sugerir que, em fêmeas jovens de camundongos expostas a ambos os estímulos, a responsividade das vias aéreas destas frente à MCh possa ter atingido um platô (resposta máxima) e, conseqüentemente, não foi possível mensurar nenhum aumento subsequente. Corroborando tal sugestão, em recente estudo clínico realizado no hospital São Lucas (Porto Alegre, RS), Reck et al. (2010) observaram que pacientes com asma moderada ou severa podem não responder a estímulos broncoconstritores, como à MCh. Nesse caso, se imagina que isso ocorre em decorrência do baixo grau de percepção da dispnéia ou, de alguma forma, tais pacientes desenvolveram mecanismos de tolerância frente a esse estímulo. Ademais, achados clínicos indicam que as mulheres, ao contrário dos homens, possuem maior predisposição à dispnéia e, também, usam mais frequentemente medicamentos, como os broncodilatadores de curta duração (Weiner e Massarwa, 2002; Weiner et al., 2002; Martínez-Francés et al., 2003).

Adiante, foi curioso observar que, na vigência do estímulo alérgico com a OVA, as fêmeas de camundongos expostos precocemente a 1,2-NQ, exibiram redução substancial do influxo de células inflamatórias totais e diferenciais (linfócitos, neutrófilos e eosinófilos) no LBA e sangue periférico. Na MO desses animais, o número de leucócitos totais, células mononucleares, neutrófilos imaturos e maduros e eosinófilos maduros estavam significativamente reduzidos quando comparados ao grupo de fêmeas expostas somente a 1,2-NQ ou somente fêmeas alérgicas. Em contrapartida, tanto no LBA quanto nos demais compartimentos (sangue periférico e MO) dos camundongos do gênero masculino expostos a 1,2-NQ e OVA durante a puberdade, o influxo de leucócitos totais foi significativamente maior do que o observado no respectivo grupo

de camundongos fêmea, bem como quando comparado com o grupo de machos exposto somente a 1,2-NQ ou o grupo alérgico.

Está bem estabelecido que a proliferação de células inflamatórias (linfócitos e eosinófilos) na MO ocorre, em geral, frente a um estímulo antigênico, podendo resultar numa resposta alérgica sistêmica (Denburg et al., 2000). Neste estudo, os resultados mostram que a exposição precoce dos animais machos a 1,2-NQ não causa *per se* aumento do influxo celular no pulmão e tampouco afeta a proliferação dessas células na MO na fase jovem desses animais. Contudo, na vigência de um segundo estímulo (OVA) ocorreu uma potente reposta inflamatória nas vias aéreas e outros compartimentos desses animais, antes não visualizada somente na vigência da 1,2-NQ. Com base nos resultados em ambos os gêneros, poder-se-ia sugerir que a redução da resposta inflamatória alérgica nas fêmeas expostas a 1,2-NQ na fase neonatal é proveniente de um efeito protetor indireto dos hormônios femininos, muito embora as concentrações destes não foram passíveis de avaliação até o momento. Vale acrescentar que, segundo Hamano et al. (1998), a adição de beta-estradiol em cultura de eosinófilos aumentou a adesão dessas células em células endoteliais da microvasculatura da mucosa de humanos e, a co-administração com a progesterona promoveu degranulação dos eosinófilos em cultura. Isso é interessante e poderia, em parte, sugerir e explicar que a ausência de potencialização da resposta inflamatória nas fêmeas se deve à presença dos hormônios. Por conta disso, não se deve, neste estudo, afirmar ou excluir possíveis papéis para os hormônios sexuais sobre a modulação da resposta inflamatória alérgica distinta nos camundongos macho e fêmea. Ainda no estudo de Hamano et al. (1998), esse pesquisador observou que a adição de testosterona inibiu a adesão de eosinófilos nessa preparação, reforçando, portanto, o papel modulatório distinto dos hormônios sexuais masculino e feminino.

A ausência de influxo celular no LBA dos camundongos fêmea 1,2-NQ + OVA/OVA e dos camundongos machos V-1,2-NQ + OVA/OVA, no primeiro momento, a baixa expressão das moléculas de adesão foram levadas em consideração. Contudo, ao analisarmos a fotomicrografia do parênquima pulmonar desses animais, observamos que tanto nas fêmeas quanto nos machos, não há presença de influxo inflamatório na região peribronquiolar, deixando de lado as especulação referentes a ausência dessas moléculas de adesão.

Em continuidade ao estudo e sabendo que a inflamação alérgica é caracterizada como um processo multicelular que envolve a participação importante de quimiocinas e citocinas Th2 e, em menor extensão, das citocinas Th1, cabe investigar o envolvimento desses mediadores e a relação destas com a resposta inflamatória e funcional nas vias aéreas dos diferentes gêneros de camundongos. Nesse contexto, é importante ressaltar que dados da literatura mostram que a estimulação de linfócitos, obtidos de camundongos fêmeas prenhas, com a progesterona elevou a produção da proteína imunomodulatória, denominada fator bloqueador dependente de progesterona, a qual sabidamente afeta o balanço Th1/Th2 e, consequentemente, a gênese de citocinas (Szekeres-Bartho e Wegmann, 1996).

Neste estudo, a análise de Elisa para diversas citocinas no LBA de camundongos fêmea jovens somente alérgicas corroboram esses achados, pois revelou aumento significativo nas concentrações de INF- γ , IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TNF- α comparado ao grupo de fêmeas controle (V-1,2-NQ + V-OVA). Assim como na resposta inflamatória nas vias aéreas, na vigência da exposição previa a 1,2-NQ, as fêmeas alérgicas não exibiram conteúdos significativos das citocinas Th2 e INF- γ em relação ao grupo veículo (V-1,2-NQ+V-OVA). Quando comparado ao grupo alérgico desse mesmo gênero foi possível observar no LBA desses animais, clara redução no conteúdo de INF- γ e das citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Tais resultados são condizentes com a celularidade no pulmão dos camundongos (fêmeas), reforçando a sugestão que o contato precoce de indivíduos do sexo feminino com a poluição, neste caso a 1,2-NQ, modula negativamente a biogênese de citocinas importantes que, consequentemente, culmina em menor geração da resposta inflamatória alérgica (feed-back negativo). Nesse sentido, dados interessantes de King et al. (2006) demonstram que em cultura de células T-CD4⁺ humana, a adição de 1,4-NQ interferiu na diferenciação das células T em Th2 com concomitante diminuição da produção Th1 via modulação de citocinas e quimiocinas. Cabe lembrar que nos camundongos fêmea expostos a 1,2-NQ e posterior estímulo alérgico (OVA), ao contrário dos resultados obtidos nos machos, as concentrações de IL-10, IL-1 β e TNF- α mostraram-se significativamente maiores quando comparados ao grupo controle (V-1,2-NQ + V-OVA). Curiosamente, a literatura demonstra que o aumento na concentração sérica de IL-10 está associada a baixas concentrações de infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) no LBA de animais selvagens quando comparados ao grupo de camundongos nocautes para essa

citocina (Backus et al., 2010). Outros revelam que a diminuição dos níveis de IL-4 e IL-5 é proporcional à diminuição de TNF- α e aumento de IL-10 (Stämpfli et al., 1999; Hutchison et al., 2008), e que a diminuição dos níveis de citocinas Th2 está diretamente associada à redução da HRB (Nakajima et al., 2007). Isto é curioso e explica, em parte, os achados deste estudo, que mostram a redução na gênese de citocinas Th2 e aumento da citocina IL-10 no grupo de fêmeas, enquanto nos machos observa-se o aumento na gênese de citocinas Th2 e diminuição da citocina IL-10, ambos expostos precocemente ao poluente e, na puberdade, ao estímulo alérgico com OVA. Isto é importante e reforça dados da literatura, donde está bem conhecido que as citocinas Th2 exercem papéis fundamentais na gravidade dos sinais e sintomas (eosinofilia, aumento na produção de muco e HRB) observados nas vias aéreas de indivíduos asmáticos (Sampson, 2000; Hutchison et al., 2009). Em particular, a IL-5, é responsável pelo crescimento, ativação, aumento da circulação e aderência dos eosinófilos no pulmão (Flood-Page et al., 2003a; Phipps et al., 2004). Desta feita, a ausência de IL-5 nos camundongos alérgicos macho é curioso e difere daquele obtido na vigência da 1,2-NQ. Não está bem claro o mecanismo para tal discrepância, mas é possível que na vigência do contato químico prévio com a 1,2-NQ, o mecanismo operante dos hormônios sexuais (testosterona) foi anulado, conforme sugerido por Hamano et al. (1998).

Por fim, é de conhecimento que a geração das naftoquinonas, a partir do naftaleno, constitui a principal causa dos efeitos citotóxicos e genotóxicos dessa substância sobre linfócitos e leucócitos mononucleares humanos (Wilson et al., 1996). De fato, evidências mostram que tanto as quinonas quanto seus produtos de redução (ex: hidroquinona, semiquinonas) são de particular interesse farmacológico e toxicológico, pois causam imunotoxicidade, carcinogênese (ex.: câncer de pulmão), reações de arilação eletrofílica de núcleos celulares, servem como agentes alquilantes e interagem com flavoproteínas para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais lesam membranas celulares (Monks et al., 1992; Bolton et al., 2000; Cho et al., 2004) e promovem a geração de radicais livres (Kumagai et al., 1995). É interessante acrescentar que o aumento na produção do radical ânion superóxido (O_2^-) frente a exposição as PEDs e, principalmente, frente aos compostos químicos nelas adsorvidos, como a 1,2-NQ, parece ser um fator chave na resposta inflamatória alérgica, principalmente na asma (Pandya et al., 2002). Ainda, as PEDs inibem a atividade de agentes antioxidantes (ex.: catalase) via desativação da reação entre a SOD e quinonas,

as quais estão presentes na superfície das PEDs (Kumagai et al., 1995). O pré-tratamento com SOD conjugada ao polietilenoglicol promove supressão das alterações provocadas na vias aéreas de camundongos expostos as PEDs, incluindo inflamação e aumento de influxo celular, assim como o aumento de produção de muco e contração das vias aéreas (Sagai et al., 1993; Sagai et al., 1996).

Com base nessas evidências a análise da atividade da catalase neste estudo revelou que a atividade dessa enzima foi maior no grupo de camundongos fêmea, mas não machos, expostas a ambos os estímulos, o poluente 1,2-NQ e ao estímulo alérgico OVA, sugerindo que essa resposta é dependente do sexo e, portanto, possivelmente de fatores hormonais. Nesse sentido, resultado interessante de Sobočanes et al. (2003), demonstraram que ao comparar o cérebro de camundongos fêmea e macho, esses pesquisadores observaram menor concentração de agentes oxidantes nas fêmeas associada a uma maior capacidade antioxidante dependente de catalase e, em menor extensão, da glutathione peroxidase (GSH-Px). Curiosamente, outros estudos sugerem que a atividade da SOD manganês, catalase e GSH-Px é influenciada por hormônios ovarianos (estrógeno e progesterona), dependendo da fase do ciclo estral. Enquanto na fase diestro, há aumento da concentração de catalase no cérebro desses animais, enquanto que em proestro há aumento da SOD manganês e diminuição da GSH-Px (Pajović e Saicić, 2008). Curiosamente, neste estudo o esfregaço vaginal dos camundongos fêmea, em todos os grupos, revelou ciclo estral na fase metaestro ou diestro. Tanto a fase metaestro quanto a diestro são fases onde há maior concentração de progesterona (Marcondes et al., 2001).

9 CONCLUSÕES

1. A exposição precoce (neonatal) de camundongos C57BL/6, do sexo masculino ou feminino, ao poluente 1,2-NQ não afetou significativamente a reatividade das vias aéreas destes frente à MCh na fase jovem dos animais (43 dias após); no entanto, promoveu resposta inflamatória nas vias aéreas das fêmeas;
2. Enquanto a exposição precoce (neonatal) de camundongos C57BL/6 de ambos os sexos ao poluente 1,2-NQ, na vigência do segundo estímulo (OVA), aumentou na fase jovem destes, a reatividade das vias aéreas frente à MCh de forma semelhante (a qual não diferiu dos respectivos grupos alérgicos), a inflamação nas vias aéreas foi potencializada somente no grupo de camundongos machos;
3. Paralelamente, a concentração da biossíntese pulmonar de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e INF- γ foi maior no grupo de camundongos macho, mas não no grupo das fêmeas, expostos a 1,2-NQ + OVA/OVA. Em contrapartida, nas fêmeas, mas não nos machos desses grupos, as concentrações de TNF- α e IL-10 bem como a atividade de catalase aumentou significativamente no pulmão;
4. Conclui-se que, a ausência da resposta inflamatória no grupo de camundongos do sexo feminino exposto a 1,2-NQ e OVA, associado ao aumento de atividade da catalase, indica um possível papel anti-oxidante dessa enzima no controle da inflamação em fêmeas, possivelmente dependente de fatores hormônios.
5. Isto nos leva a sugestão que o impacto da poluição do ar com poluentes, como a 1,2-NQ, sobre neonatos pode colocar os indivíduos do sexo masculino, na fase juvenil, em maior risco de doenças respiratórias do que os do sexo feminino.

REFERÊNCIAS¹

- Amin K, Lúdvíksdóttir D, Janson C, Nettelbladt O, Björnsson E, Roomans GM, Boman G, Sevéus L, Venge P. Inflammation and structural changes in the airways of patients with atopic and nonatopic asthma. BHR Group. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 ;162(6):2295-301.
- Anwar AR, Moqbel R, Walsh GM, Kay AB, Wardlaw AJ. Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J Exp Med*. 1993;177:839–843.
- Arshad SH, Kurukulaaratchy RJ, Fenn M, Matthews S. Early life risk factors for current wheeze, asthma, and bronchial hyperresponsiveness at 10 years of age. *Chest*. 2005;127(2):502-8.
- Backus GS, Howden R, Fostel J, Bauer AK, Cho HY, Marzec J, Peden DB, Kleeberger SR. Protective role of interleukin-10 in ozone-induced pulmonary inflammation. *Environ Health Perspect*. 2010;118(12):1721-7.
- Balzano G, Fuschillo S, Melillo G, Bonini S. Asthma and sex hormones. *Allergy*. 2001;56(1):13-20.
- Barton GM, Medzhitov R. Tolllike receptor signaling pathways. *Sciences* 2003;300:1524–5.
- Bartra J, Mullol J, del Cuvillo A, Dávila I, Ferrer M, Jáuregui I, Montoro J, Sastre J, Valero A. Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17 (Supl 2):3-8.
- Behndig AF, Mudway IS, Brown JL, Stenfors N, Helleday R, Duggan ST, Wilson SJ, Boman C, Cassee FR, Frew AJ, Kelly FJ, Sandström T, Blomberg A. Airway antioxidant and inflammatory responses to diesel exhaust exposure in healthy humans. *Eur Respir J*. 2006;27(2):359-65.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

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

Boulet LP, Sterk PJ. Airway remodeling: the future. *Eur Respir J*. 2007;30:831-4.

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.

Brunekreef B, Forsberg B. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J*. 2005;26(2):309-18.

Buhl R. Anti-IgE antibodies for the treatment of asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2005;11(1):27-34.

Bush A, Saglani S. Management of severe asthma in children. *Lancet*. 2010;376(9743):814-25. Review.

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

Corteling R, Trifilieff A. Gender comparison in a murine model of allergen-driven airway inflammation and the response to budesonide treatment. *BMC Pharmacol*. 2004;4:4.

de Oliveira AP, Domingos HV, Cavriani G, Damazo AS, Dos Santos Franco AL, Oliani SM, Oliveira-Filho RM, Vargaftig BB, de Lima WT. Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;293(3):C1120-8.

Denburg JA, Sehmi R, Saito H, Pil-Seob J, Inman MD, O'Byrne PM. Systemic aspects of allergic disease: bone marrow responses. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106(5 Suppl): S242-246.

Departamento de Informática do SUS. Gastos por doenças crônicas, São Paulo, Brasil - 2008. Fonte: Departamento de Informática do SUS, órgão da Secretaria Executiva do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br> [2009 fev. 14].

Devouassoux G, Brambilla C. Effect of diesel particles on allergic inflammatory response: cellular targets and molecular mechanisms. *Rev Mal Respir.* 2002;19(4):467-79.

Dong CC, Yin XJ, Ma JY, Millecchia L, Wu ZX, Barger MW, Roberts JR, Antonini JM, Dey RD, Ma JK. Effect of diesel exhaust particles on allergic reactions and airway responsiveness in ovalbumin-sensitized brown Norway rats. *Toxicol Sci.* 2005;88(1):202-12.

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 agonist on acute and chronic airway inflammation and hyperreactivity in the mouse. *Eur J Pharmacol.* 2008;578(2-3):313-22.

Ensom MH, Chong E, Carter D. Premenstrual symptoms in women with premenstrual asthma. *Pharmacotherapy.* 1999;19(4):374-82.

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.

Flood-Page PT, Menzies-Gow AN, Kay AB, Robinson DS. Eosinophil's role remains uncertain as antiinterleukin-5 only partially depletes numbers in asthmatic airway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003a;167:199-204.

Fujimaki H, Saneyoshi K, Shiraishi F, Imai T, Endo T. Inhalation of diesel exhaust enhances antigen-specific IgE antibody production in mice. *Toxicology.* 1997;116(1-3):227-33.

Garcia G, Godot V, Humbert M. New chemokine targets for asthma therapy. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2005;5:155–160.

Garlisi CG, Falcone A, Kung TT, Stelts D, Pennline KJ, Beavis AJ, et al. T cells are necessary for Th2 cytokine production and eosinophil accumulation in airways of antigenchallenged allergic mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 75:75e83.

Gleich GJ, Adolphson CR, Kita H. The eosinophil and asthma. In: Busse WW, Holgate ST, editors. *Asthma and rhinitis.* 2nd ed. Oxford, England: Blackwell Science Ltd; 2000. vol. 1. p.429e79.

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:651e63.

Global Initiative for Asthma, 1995; Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:789-815.

Global initiative for asthma. Global strategy for asthma management and prevention. Update: 2008. Available from: <http://www.ginasthma.com> [2009 fev. 16].

Hamada K, Suzaki Y, Leme A, Ito T, Miyamoto K, Kobzik L, Kimura H Exposure of pregnant mice to an air pollutant aerosol increases asthma susceptibility in offspring. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(8):688-95.

Hamano N, Terada N, Maesako K, Hohki G, Ito T, Yamashita T, Konno A. Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells. *Acta Otolaryngol Suppl*. 1998;537:27-31.

Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG, Gelfand EW. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:766-75.

Hammad H, Lambrecht BN. Dendritic cells and epithelial cells: linking innate and adaptive immunity in asthma. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(3):193-204. Review.

Hellings PW, Vandekerckhove P, Claeys R, Billen J, Kasran A, Ceuppens JL. Progesterone increases airway eosinophilia and hyper-responsiveness in a murine model of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(10):1457-63.

Heo Y, Saxon A, Hankinson O. Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*. 2001;159(3):143-58.

Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT, Wallin H. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2008;5:3.

Huang J, Olivenstein R, Taha R, Hamid Q, Ludwig M. Enhanced proteoglycan deposition in the airway wall of atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160:725-9.

Humbert M, Durham SR, Ying S, Kimmitt P, Barkans J, Assoufi B, et al. IL-4 and IL-5 mRNA and protein in bronchial biopsies from patients with atopic and nonatopic asthma: evidence against “intrinsic” asthma being a distinct immunopathologic entity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154:1497e504.

Husain A, Loehle JA, Hein DW. Clinical pharmacogenetics in pediatric patients. *Pharmacogenomics*. 2007;8(10):1403-11.

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.

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Sagai M. Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway. *Toxicol Sci*. 1998;44(1):70-9.

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Sakurai M, Abe S, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T. Effects of components derived from diesel exhaust particles on lung physiology related to antigen. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2007;29(3-4):403-12.

Jeffery PK, Godfrey RW, Adelroth E, Nelson F, Rogers A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(4 Pt 1):890-9.

Jones M. Childhood coughs and colds. *J Fam Health Care*. 2002;12(2):39-41.

Kallinich T, Schmidt S, Hamelmann E. Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2005;35: 26–33.
Kay AB. The role of eosinophils in the pathogenesis of asthma. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):148-52.

Kay AB. The role of T lymphocytes in asthma. *Chem Immunol Allergy*. 2006;91: 59–75.

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.

King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR. Oxidative Stress Promotes Polarization of Human T Cell Differentiation Toward a T Helper 2 Phenotype 1. *J Immunol*. 2006;176:2765-2772.

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.

Kool M, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma and COPD: opportunities for drug development. *Curr Opin Immunol*. 2007;19(6):701-10.

Kumagai Y, Taira J, Sagai M. Apparent inhibition of superoxide dismutase activity in vitro by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*. 1995;18(2):365-71.

Laitinen A, Altraja A, Kämpe M, Linden M, Virtanen I, Laitinen LA. Tenascin is increased in airway basement membrane of asthmatics and decreased by an inhaled steroid. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(3 Pt 1):951-8.

Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Milligan GN, Lubahn DB, Estes DM. Estrogen receptor alpha (ERalpha) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4+ T cells while 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4+ T cells independent of antigen presentation. *J Immunol*. 2005;175(9):5716-23.

Lang R, Rutschman RL, Greaves DR, Murray PJ. Autocrine deactivation of macrophages in transgenic mice constitutively overexpressing IL-10 under control of the human CD68 promoter. *J Immunol*. 2002;168(7):3402-11.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril*. 2007;87(1):230-2.

Liu L, Poon R, Chen L, Frescura AM, Montuschi P, Ciabattoni G, Wheeler A, Dales R. Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect.* 2009;71(1):51-9.

Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiol Behav.* 2001;74(4-5):435-40.

Mathias CB, Freyschmidt EJ, Oettgen HC. Immunoglobulin E antibodies enhance pulmonary inflammation induced by inhalation of a chemical hapten. *Clin Exp Allergy.* 2009;39(3):417-25.

Mauad T, Bel EH, Sterk PJ. Asthma therapy and airway remodeling. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120:997-1009.

McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, Harrington R, Svartengren M, Han IK, Ohman-Strickland P, Chung KF, Zhang J. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med.* 2007;357(23):2348-58.

Melgert BN, Postma DS, Kuipers I, Geerlings M, Luinge MA, van der Strate BW, Kerstjens HA, Timens W, Hylkema MN. Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(11):1496-503.

Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol.* 2002;168(3):1087-94.

Monks TJ, Hanzlik RP, Cohen GM, Ross D, Graham DG. Quinone chemistry and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1992;112(1):2-16.

Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? *J Clin Invest.* 2001;107:785–90.

Nakajima H, Takatsu K. Role of cytokines in allergic airway inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;142(4):265-73.

Nemmar A, Inuwa IM. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicol Lett.* 2008;176(1):20-30.

Nicolai T. Pollution, environmental factors and childhood respiratory allergic disease. *Toxicology*. 2002;181-182:317-21.

Oberdörster G. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhal Toxicol*. 2002;14(1):29-56.

Oliveira JF, Teles AM, Yshii LM, Lima WT, Teixeira SA, Lima C, Barreto MAA, Muscará MN, Costa SKP. Does acute pulmonary exposure to both diesel exhaust particles (DEP) and quinones cause systemic effects?. In: 8th World Congress on Inflammation; 2007; Copenhagen. Basel, Switzerland: Birkhäuser Verlag; 2007. vol. 56. p. S343-S514.

Ordoñez CL, Khashayar R, Wong HH, Ferrando R, Wu R, Hyde DM, Hotchkiss JA, Zhang Y, Novikov A, Dolganov G, Fahy JV. Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(2):517-23.

Pajović SB, Saicić ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res*. 2008;57(6):801-11.

Pandya RJ, Solomon G, Kinner A, Balmes JR. Diesel exhaust and asthma: hypotheses and molecular mechanisms of action. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 1:103-12.

Pascual RM, Peters SP. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:477-86.

Peng Z. Vaccines targeting IgE in the treatment of asthma and allergy. *Hum Vaccin*. 2009;5(5):302-9.

Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103(23):2810-5.

Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(4):1376-83.

Phipps S, Flood-Page P, Menzies-Gow A, Ong YE, Kay AB. Intravenous anti-IL-5 monoclonal antibody reduces eosinophils and tenascin deposition in allergic-challenged human atopic skin. *J Invest Dermatol*. 2004;122:1406-12.

Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol*. 1995;155(1):128-33.

Rage E, Jacquemin B, Nadif R, Oryszczyn MP, Siroux V, Aguilera I, Kauffmann F, Künzli N; Epidemiological Study on the Genetics Environment of Asthma (EGEA). Total serum IgE levels are associated with ambient ozone concentration in asthmatic adults. *Allergy*. 2009;64(1):40-6.

Reck CL, Fiterman-Molinari D, Barreto SS, Fiterman J. Poor perception of dyspnea following methacholine challenge test in patients with asthma. *J Bras Pneumol*. 2010;36(5):539-44.

Riffo-Vasquez Y, Ligeiro de Oliveira AP, Page CP, Spina D, Tavares-de-Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37(3):459-70.

Ring J, Eberlein-Koenig B, Bherendt H. Environmental pollution and allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001;87:2-6.

Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet*. 1989;1:520-4.

Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis Model Mech*. 2010;3(9-10):545-56.

Rothenberg ME, Petersen J, Stevens RL, Silberstein DS, McKenzie DT, Austen KF, Owen WF Jr. IL-5-dependent conversion of normodense human eosinophils to the hypodense phenotype uses 3T3 fibroblasts for enhanced viability, accelerated hypodensity, and sustained antibody-dependent cytotoxicity. *J Immunol*. 1989;143(7):2311-6.

Sagai M, Furuyama A, Ichinose T. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III: Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(2):199–209.

Sagai M, Saito H, Ichinose T, Kodama M, Mori Y. Biological effects of diesel exhaust particles. I: In vitro production of superoxide and *in vivo* toxicity in mouse. *Free Radic Biol Med*. 1993;14:37–47.

Sampson AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(Suppl 1):22-27.

Sandström T, Nowak D, van Bree L. Health effects of coarse particles in ambient air: messages for research and decision-making. *Eur Respir J*. 2005;26(2):187-8.

Sanderson CJ. Interleukin-5, eosinophils, and disease. *Blood*. 1992;79(12):3101-9.

Santos KT, Florenzano J, Peron JP, Oliveira APL, Favaro R, Muscará MN, Costa SKP. High susceptibility of mice to asthma due to neonatal exposure to the environmental pollutant 1,2-naphthoquinone. In: III Iberoamerican congress of neuroimmunomodulation; 2009; Buenos Aires. Rio de Janeiro : KARGER; 2009. vol. 3. p. 50.

Schatz M, Clark S, Camargo CA Jr. Sex differences in the presentation and course of asthma hospitalizations. *Chest*. 2006;129(1):50-5.

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(2):93-144.

Schuetzle D. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ Health Perspect*. 1983;47:65-80.

Sehmi R, Wardlaw AJ, Cromwell O, Kurihara K, Walzmann P, Kay AB. Interleukin-5 selectively enhances the chemotactic response of eosinophils obtained from normal but not eosinophilic subjects. *Blood*. 1992;79(11):2952-59.

Stämpfli MR, Cwiartka M, Gajewska BU, Alvarez D, Ritz SA, Inman MD, Xing Z, Jordana M. Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergic mucosal sensitization in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;21(5):586-96.

Strickland MJ, Klein M, Correa A, Reller MD, Mahle WT, Riehle-Colarusso TJ, Botto LD, Flanders WD, Mulholland JA, Siffel C, Marcus M, Tolbert PE. Ambient air pollution and cardiovascular malformations in Atlanta, Georgia, 1986-2003. *Am J Epidemiol*. 2009;169(8):1004-14.

Su L, Sun Y, Ma F, Lü P, Huang H, Zhou J. Progesterone inhibits Toll-like receptor 4-mediated innate immune response in macrophages by suppressing NF-kappaB activation and enhancing SOCS1 expression. *Immunol Lett*. 2009;125(2):151-5.

Szekeres-Bartho J, Wegmann TG. A progesterone-dependent immunomodulatory protein alters the Th1/Th2 balance. *J Reprod Immunol*. 1996;31(1-2):81-95.

Takanashi S, Hasegawa Y, Kanehira Y, Yamamoto K, Fujimoto K, Satoh K, Okamura K. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers. *Eur Respir J*. 1999;14(2):309-14.

Takano H, Ichinose T, Miyabara Y, Yoshikawa T, Sagai M. Diesel exhaust particles enhance airway responsiveness following allergen exposure in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1998;20(2):329-36.

Takano H, Yoshikawa T, Ichinose T, Miyabara Y, Imaoka K, Sagai M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156(1):36-42.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335–76.

Teles AM, 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;84(2):109-17.

Törnqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, Macnee W, Donaldson K, Söderberg S, Newby DE, Sandström T, Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(4):395-400.

U.S. Environmental Protection Agency. A Comprehensive Analysis of Biodiesel Impacts on Exhaust Emissions. EPA420-P-02-001. Washington DC: U.S.Environmental Protection Agency; 2002a.

Universo Ambiental. Disponível em: <http://www.universoambiental.com.br> [16 abr. 2010].

van Rijt LS, Lambrecht BN. Dendritic cells in asthma: a function beyond sensitization. *Clin Exp Allergy*. 2005;35(9):1125-34.

Venn AJ, Lewis SA, Cooper M, Hubbard R, Britton J. Living near a main road and the risk of wheezing illness in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(12):2177-80.

Virchow Jr JC, Walker C, Hafner D, Kortsik C, Werner P, Matthys H, et al. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151(4):960-8.

von Mutius E. Progression of allergy and asthma through childhood to adolescence. *Thorax*. 1996;51 (Suppl 1):S3-6.

Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, et al. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150: 1038e48.

Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow Jr JC, et al. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis*. 1992;146: 109e15.

Ward DJ, Ayres JG. Particulate air pollution and panel studies in children: a systematic review. *Occup Environ Med*. 2004;61(4):e13.

Weiner P, Magadle R, Massarwa F, Beckerman M, Berar-Yanay N. Influence of gender and inspiratory muscle training on the perception of dyspnea in patients with asthma. *Chest*. 2002;122(1):197-201.

Weiner P, Massarwa F. The influence of gender on the perception of dyspnea in patients with mild-moderate asthma [Article in Hebrew] [Abstract]. *Harefuah*. 2002;141(6):515-8, 579.

Wilson AS, Davis CD, Williams DP, Buckpitt AR, Pirmohamed M, Park BK. Characterisation of the toxic metabolite(s) of naphthalene. *Toxicology*. 1996;114(3):233-42.

Wilson D, Takahashi K, Pan G, Chan CC, Zhang S, Feng Y, Hoshuyama T, Chuang KJ, Lin RT, Hwang JS. Respiratory symptoms among residents of a heavy-industry province in China: prevalence and risk factors. *Respir Med*. 2008;102(11):1536-44.

Wilson JW, Li X. The measurement of reticular basement membrane and submucosal collagen in the asthmatic airway. *Clin Exp Allergy*. 1997;27(4):363-71.

Yanagisawa R, Takano H, Inoue KI, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T, Hayakawa K. Components of diesel exhaust particles differentially affect Th1/Th2 response in a murine model of allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(3):386-95.