JULIANA FLORENZANO MARTORELLI

**PAPEL DO RECEPTOR TRPA1 NA SUSCEPTIBILIDADE DIFERENCIAL A
INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR EM CAMUNDONGOS DE
AMBOS OS GÊNEROS EXPOSTOS À POLUIÇÃO NA FASE NEONATAL**

Tese apresentada ao Departamento de
Farmacologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo,
para obtenção do Título de Doutor em
Farmacologia

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia
Pereira Costa

Versão Original

São Paulo
2017

RESUMO

Florenzano J. Papel do receptor TRPA1 na susceptibilidade diferencial a inflamação alérgica pulmonar em camundongos de ambos os gêneros expostos à poluição na fase neonatal [Tese (Doutorado em Farmacologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2017.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a prevalência e mortalidade associada à asma vêm aumentando como consequência da poluição do ar ambiente (PAA), sendo que as opções de tratamento são limitadas e há crescente preocupação com o tratamento de crianças. Nosso grupo demonstrou que a exposição de camundongos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) durante o desenvolvimento pós-natal induziu maior suscetibilidade dos machos (mas não das fêmeas) à asma durante a puberdade, sugerindo que fatores hormonais estão envolvidos. Dados recentes sugerem que a ativação de receptores de potencial transitório (TRPA1) em fibras aferentes sensoriais vagal representam potenciais alvos de PAA. O objetivo deste estudo foi investigar a intensidade do dano pulmonar (oxidantes vs. antioxidantes) ao impacto precoce da 1,2-NQ em camundongos jovens de ambos os sexos e, ainda, averiguar as associações entre os TRPA1 e a 1,2-NQ. Camundongos machos e fêmeas C57Bl/6 (2-5 g) foram nebulizados por 15 min com a 1,2-NQ (100 nM) durante três dias alternados. Os animais foram utilizados 24 h após a exposição ao PAA ou na puberdade 24 h após o desafio com a ovalbumina (OVA). Após 24 h da exposição pós-natal a 1,2-NQ, somente o pulmão das fêmeas exibiu aumento da atividade da catalase e expressão (RNAm) do Nrf2. O estímulo alérgico na puberdade de ambos os sexos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal aumentou a atividade das glutathione peroxidase, redutase e S-transferase somente no pulmão das fêmeas que, diferentemente dos machos, não mostram exacerbação da inflamação alérgica, mas exibem maior nitração e carbonilação proteica, expressão (RNAm) da eNOS e TRPA1. A terapia farmacológica com o HC030031, antagonista TRPA1 na puberdade reduziu a eosinofilia pulmonar dos machos e inibiu o aumento da $[Ca^{2+}]_i$ em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal frente a 1,2-NQ. Em conclusão, a via de sinalização regulada por TRPA1 está envolvida na maior susceptibilidade à asma em machos jovens pré-expostos a 1,2-NQ. A ausência deste efeito em fêmeas se deve ao aumento das defesas antioxidantes e da maturidade pulmonar/imunológica.

Palavras-chave: Poluente, asma, hormônios sexuais, antioxidantes, TRPs, quinonas

ABSTRACT

Florenzano J. The involvement of the TRPA1 receptor in the differential gender susceptibility to allergic lung inflammation in mice exposed to ambient pollution during neonatal period.

According to the World Health Organization, the prevalence and mortality associated with asthma have increased as a result of ambient air pollution (PAA), with treatment options being limited and increasing concern related to children treatment. We demonstrated that the mice exposure to the PAA, 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), during postnatal period induced increased susceptibility of males (but not females) to asthma during puberty, suggesting that hormonal factors might be involved. Recent evidences suggest that the activation of transient potential receptors TRPA1 in vagal sensory afferent fibers acts as a potential target to PAA. The aim of this study was to investigate the intensity of lung damage (oxidants vs. antioxidants) to the early impact of 1,2-NQ on young mice of both sexes, and to investigate the associations between TRPA1 and 1,2-NQ. Male and female C57Bl/6 mice (2-5g) were exposed to 1,2-NQ (100nM) during 15 minutes over 3 alternate days. Mice were used 24 h after exposure to PAA or at puberty after 24 h ovalbumin (OVA) challenge. After 24 h postnatal exposure to 1,2-NQ, only females lungs showed increased catalase activity and Nrf2 mRNA expression. At puberty, the allergic stimulation of mice prior exposed to 1,2-NQ from both sexes led to increased glutathione peroxidase, reductase and S-transferase activities only in female lung, which, unlike male, did not exhibit exacerbation of allergic inflammation, but showed increased pulmonary nitration and protein carbonylation, and increased mRNA expression of eNOS and TRPA1. Pharmacological treatment with the TRPA1 antagonist HC030031 at puberty reduced eosinophilia in male lung and inhibited the increased $[Ca^{2+}]_i$ in dorsal root ganglion neurons culture to 1,2-NQ. We conclude that the signaling pathway regulated by TRPA1 is involved in the increased asthma susceptibility in male mice exposed to 1,2-NQ at neonatal phase. The lack of susceptibility in female might be linked to increased antioxidant defenses and the pulmonary/immunological maturity.

Keywords: Pollutant, asthma, sex hormones, antioxidants, TRPs, quinones

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Anatomofisiologia e Inflamação Alérgica Pulmonar e Atividade Antioxidante*

O sistema respiratório é dividido em duas partes, I) trato respiratório superior: cavidade nasal, faringe (nasofaringe, orofaringe e laringofaringe), laringe e início da traquéia, II) trato respiratório inferior: traquéia, brônquio primário esquerdo e direito, pulmão, bronquíolos e alvéolos (Figura 1). O trato respiratório inferior está localizado na cavidade torácica a qual é protegida pela caixa torácica, costelas, esterno, músculos entre as costelas e o diafragma. O pulmão é o principal órgão do sistema respiratório, sendo este responsável por promover trocas gasosas. Assim, o seu desenvolvimento e maturação são de extrema importância para sobrevivência dos indivíduos logo após o nascimento. Durante o desenvolvimento intrauterino, os pulmões adquirem mecanismos de defesa contra hiperóxia neonatal a fim de reduzir/prevenir a apoptose de células alveolares e, conseqüentemente, a lesão pulmonar logo após o primeiro contato com o oxigênio atmosférico (Ni et al., 2015; Li et al., 2016).

Figura 1: Estrutura do sistema respiratório. FONTE: Adaptado – www.todamateria.com.br/sistema-respiratorio/; http://biologiaygeologia.org/unidadbio/esa/cn3/biohumana/nutricion/u4_contenido/4.1.2AlveolusDiagram.png

Desde o período gestacional, o pulmão em desenvolvimento sofre grande influência dos hormônios esteroides sexuais tanto maternos quanto fetal (vide revisão: Sathish et al., 2015; Figura 2). No sexo masculino, a testosterona produzida pelos testículos do feto auxilia na diferenciação sexual, assim como no processo de desenvolvimento pulmonar e ramificação morfogênica; contudo, esse hormônio causa atraso na produção de surfactante no final da gestação (Seaborn et al., 2010). Diferentemente, o desenvolvimento alveolar pulmonar nas meninas no período fetal e pós-natal é mais eficiente por apresentarem expressão abundante do receptor ER β (Beyer et al., 2003; Patrone et al., 2003). De fato, os receptores de estrógeno (ER), ao contrário dos andrógenos, induz e acelera a maturação pulmonar bem como a formação alveolar (Massaro et al., 2006; vide revisão Sathish et al., 2015). Apesar dos fetos do sexo feminino possuírem pulmão menor além de reduzido número de brônquios comparado ao sexo masculino, os fetos do sexo feminino produzem surfactante pulmonar mais cedo, o que torna esse órgão mais rapidamente maturo nesse sexo (vide revisão: Sathish et al., 2015).

Por conta do atraso no desenvolvimento e maturação pulmonar dos meninos, estes exibem maior susceptibilidade às doenças que acometem as vias aéreas, como a asma, da infância até a puberdade (de Marco et al., 2000; Soto-Ramírez et al., 2013; Wang et al., 2017; Figura 2). Ademais, os pulmões são considerados altamente susceptíveis à plasticidade e, portanto, o crescimento e maturação deste órgão podem ser influenciados por interferências intra e extrauterinas, levando ao comprometimento da função. Por exemplo, o aumento da frota de veículos automotores e a consequente exposição aos poluentes do ar atmosférico (PAA) gerado por este e outros vêm contribuindo grandemente de forma indireta (exposição gestacional) e direta (exposição neonatal) para a deficiência no desenvolvimento pulmonar (vide revisão: Veras et al., 2016). Além disto, o baixo peso corporal de neonatos, a restrição de crescimento intrauterino e a prematuridade, consistem em importantes consequências da exposição gestacional à PAA (Parker et al., 2011; vide revisão: Shah e Balkhair, 2011). Desta feita, estas crianças podem apresentar hiperreatividade das vias aéreas e menor fluxo expiratório, resultado da imaturidade pulmonar (vide revisão: Pike et al., 2012).

Figura 2: Efeitos conhecidos da testosterona e estrógeno no pulmão de neonatos e crianças. O símbolo (+) indica efeito positivo e o (-) indica efeito negativo. FONTE: Adaptado - Carey et al., 2007.

A asma é uma doença inflamatória alérgica crônica das vias aéreas inferiores, cuja prevalência mundial afeta em torno de 334 milhões de indivíduos (Asher e Pearce, 2014). De acordo com dados publicados por Kuschnir et al. (2016) na Revista de Saúde Pública do Brasil, mais de 250 mil mortes anuais em todo o mundo ocorrem como consequência da asma. Estima-se que até 2025, outros 400 milhões de indivíduos serão acometidos pela asma (GAN, 2014; GINA, 2015).

Caracterizada pela obstrução reversível do fluxo de ar, a asma causa lesões epiteliais, aumento na produção de muco, hiperplasia da musculatura lisa, hiperresponsividade brônquica (HRB) e remodelamento tecidual (vide revisão: Szeffler et al., 2012). Tais efeitos decorrem de uma somatória de alterações celulares, vasculares e bioquímicas, donde predomina o aumento da liberação de fatores de crescimento, do influxo de eosinófilos, linfócitos Th2 CD4 + (Brightling et al., 2002), neutrófilos e mastócitos na musculatura lisa das vias aéreas, assim como de mediadores liberados dessas células (Azzawi et al., 1990; vide revisão: Kon e Kay, 1999; vide revisões: Lacy e Moqbel, 2001). Nesse processo, os linfócitos Th2 CD4 + são importantes na condução da resposta alérgica e perpetuação da inflamação crônica, que engloba resposta imunológica aberrante (exagerada) no indivíduo asmático frente a diversos alérgenos (vide revisão: Dunican e Fahy, 2015). Mediante a ativação dos linfócitos Th2, as citocinas interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 são produzidas e participam ativamente do mecanismo de atração e ativação dos eosinófilos circulantes.

Importantemente, postula-se que a patogênese da asma é bastante influenciada por desequilíbrios nas defesas antioxidantes, favorecendo assim o aumento de compostos pró-oxidantes, que resulta em estresse oxidativo devido a uma maior geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs). As espécies reativas são terminologias usadas para designar moléculas que, em geral, contêm de um a quatro átomos juntamente com uma molécula de oxigênio ou nitrogênio em sua estrutura. Podem ser geradas intracelularmente, via diferentes mecanismos, que envolvem a respiração mitocondrial, bem como o sistema xantina/xantina oxidase ou, ainda, o sistema enzimático da NADPH oxidase, um dos sistemas primários de geração de espécies reativas (Halliwell e Cross, 1994; vide revisão: Comhair e Erzurum, 2010).

As EROs representam um termo coletivo para definir uma grande variedade de radicais livres de oxigênio, incluindo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) ou, ainda, os radicais derivados de oxigênio, que não possuem elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peroxinitrito ($ONOO^-$). O $\bullet OH$ é o mais reativo de todas as EROs (vide revisão: Mak et al., 2006). Está bem descrito que o óxido nítrico (NO) reage rapidamente com o $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, mais reativo que os seus precursores, sendo mais tóxico para as células do que o H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e o NO (Brunelli et al., 1995). O $ONOO^-$ constitui uma das ERNs capaz de modificar várias biomoléculas, assim como aminoácidos, proteínas, enzimas e cofatores. Ademais, o $ONOO^-$ é capaz de promover nitração de resíduos de tirosina, permitindo assim a formação da proteína 3-nitrotirosina (3-NT) uma espécie reativa de nitrogênio que, assim como as EROs,, promove efeitos deletérios nas células e membranas. A produção excessiva de ERNs promove o chamado estresse nitrosativo, o qual também induz danos estruturais e consequente perda de função celular (vide revisão: Chirino et al., 2006). Nesse âmbito, derivados de células inflamatórias como o dióxido de nitrogênio, ácido nitroso e peroxidases podem mediar a nitração de tirosina, para formar a 3-NT (Brennan et al., 2002). Por seu turno, a nitração de resíduos de tirosina pode alterar a estrutura e função de proteínas, indicando que a nitração proteica estar fundamentalmente associada ao dano celular oxidativo. A significância biológica da nitração de resíduos de tirosina favorece a formação da 3-NT em patologias diversas, atuando assim como marcador específico de dano oxidativo via $ONOO^-$ e outras ERNs (Ahsan, 2013).

A inflamação alérgica das vias aéreas (asma) *per se* induz a geração endógena de EROs e ERNs via ativação de células inflamatórias (ex.: neutrófilos, eosinófilos e macrófagos), estruturais (ex.: endoteliais) e as células apresentadoras de antígeno (APCs) (vide revisões: Morcillo et al., 1999; Rahman et al., 2006; Louhelainen et al., 2008; Van der Vliet, 2011). As EROs podem reagir com o nitrito e NO e formarem as ERNs. O nitrito (NO_2^-) e o nitrato (NO_3^-), considerados marcadores de estresse oxidativo, são produtos finais do metabolismo do NO, conhecidos como produtos estáveis, sendo estes mensurados no ar condensado exalado de pacientes com asma (Corradi et al., 2001; vide revisão: Silkoff et al., 2006) e, também, em fumantes (Balint et al., 2001). Em fumantes, níveis elevados de NO_3^- , mas não de NO_2^- , foram encontrados no ar exalado destes.

Tanto as EROs / ERNs quanto os biomarcadores para suas produções (ex.: H_2O_2 , isoprostanos, resíduos de nitrotirosina) foram mensurados no pulmão de indivíduos com asma e DPOC, bem como em modelo animal de inflamação alérgica (vide revisão: Mak e Chan-Yeung, 2006; Park et al., 2009; vide revisão: Popov, 2011; Koskela et al., 2012), aparentemente contribuindo para o aumento ou manutenção do processo inflamatório (Kharitonov et al., 1994; Ganas et al., 2001; vide revisão: Rahman e Biswas, 2004). Segundo Koskela et al. (2012), a geração de estresse oxidativo em pacientes com asma está diretamente associada ao grau de severidade (e tosse) da doença, indicando que essas substâncias podem atuar como marcadores da gravidade da asma. Corroborando esses achados, altas concentrações plasmáticas de agentes oxidantes / EROs e de produtos de peroxidação lipídica (ex.: $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , HOCl e $\text{OH}^{\bullet}$) foram encontradas em pacientes com asma (vide revisões: Caramori et al., 2004; Psarras et al., 2005). Em contrapartida, um aumento significativo de marcadores antioxidantes foram também mensurados nos pulmões e sangue de indivíduos (Kelly et al., 1999; Mak et al., 2006; Fabian et al., 2011; Fitzpatrick et al., 2011) e animais (Koike et al., 2007; Konga et al., 2009) com asma e DPOC, possivelmente na tentativa de neutralizar a toxicidade dos oxidantes. Concentrações variáveis dos agentes antioxidantes existem quanto ao nível celular e anatômico.

As defesas endógenas antioxidantes dividem-se em enzimáticas e não enzimáticas: I) as enzimáticas englobam as famílias da superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glutathione S-transferase (GST). Cada família possui isoenzimas que se distribuem de forma distinta no organismo; II) categoria não enzimática das defesas antioxidantes engloba

as vitaminas E e C, beta-caroteno, glicose e bilirrubina (vide revisão: Mak et al., 2006). Outros antioxidantes com peso mais elevado incluem proteínas com grupamentos tiol oxidáveis (ex.: albumina e proteínas), que se ligam aos metais livres, como a glicoproteína transferrina, transportadora do íon ferro do sangue.

O sistema glutathiona é formado pela glutathiona reduzida (GSH), oxidada (GSSG) e GPx, sendo esta última a principal enzima responsável pela redução do H_2O_2 em H_2O , via oxidação da GSH (servindo como doador de elétrons) em GSSG que, em seguida, retorna ao estado reduzido (GSH) por ação enzimática da GR. Essa enzima utiliza o NADPH gerado a partir do sistema de derivação da hexose monofosfato/via pentose fosfato como doador de elétrons. A geração de NADPH intracelular ocorre pela redução do NADP^+ , via ação da glicose-6-fosfatase dehidrogenase (G6PD), enzima determinante na ação de tamponamento do GSH citosólico (GSH/GSSG) e, portanto, nomeado antioxidante regulatório (vide revisões: Sies, 1999; Dickinson e Forman, 2002). A GST é a grande responsável por promover desintoxicação de xenobióticos, como compostos químicos carcinogênicos, poluentes ambientais e agentes antitumorais, além de inativar aldeídos endógenos α , β -insaturados, quinonas e hidroperóxidos, formados como metabólitos secundários durante o estresse oxidativo. As GSTs promovem conjugação com moléculas de sinalização, incluindo a 15-deoxi- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J (15d-PGJ) e 4-hidroxinonenal com a glutathiona. Antagonizam a expressão de genes transativados por receptor γ ativado por proliferador de peroxissomo (PPAR γ) e do fator de transcrição nuclear eritróide relacionado ao fator 2, o Nrf2 (vide revisão: Hayes et al., 2005).

O mecanismo de defesa antioxidante é distinto entre os sexos masculino e feminino em diferentes fases da vida (Hackenhaar et al., 2009), onde de modo geral, as fêmeas exibem maior atividade de defesas antioxidantes. Nos machos esse efeito é atribuído, particularmente, ao efeito supressor da testosterona, que bloqueia a atividade das enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx. Em contrapartida, o estrógeno favorece a atividade de enzimas antioxidantes nas fêmeas (vide revisão: Viña et al., 2005; Alonso-Alvarez et al., 2007; Figura 3). Corroborando estes achados, a expressão (RNAm) da GPx no pulmão de camundongos fêmeas na fase perinatal (e neonatal) foi maior do que dos machos da mesma idade (Tondreau et al. 2012).

De acordo com Boucher et al. (2010), no período peri/neonatal os andrógenos constituem os únicos hormônios sexuais que apresentam dimorfismo sexual

importante no pulmão de camundongos, visto que níveis elevados destes foram mensurados no pulmão dos machos comparado ao das fêmeas. Segundo Hackenhaar et al. (2009), esses efeitos supressores antioxidantes da testosterona sobrepõem o período neonatal, visto que a atividade da GPx em ratos continua menor no pulmão dos machos em relação às fêmeas no período pós-puberdade. Por outro lado, o papel protetor do estrógeno em camundongos fêmeas foi demonstrado pela maior atividade antioxidante (ex.: SOD e GPx) no cérebro destas quando comparado aos machos ou fêmeas ovariectomizadas, via mecanismo dependente da ação do estrógeno em seu receptor que, ativado, levou a subsequente ativação da via MAPK (vide revisão: Pajovic e Saici, 2008).

Figura 3: Mecanismo de ação das enzimas antioxidantes. Esquema de reações e respectivas enzimas (quadros verdes) envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. O ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$ formado é catalisado por uma das três enzimas superóxido dismutase (SOD), resultando na desmutação desse radical livre em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual sofre ação da catalase ou GPx, reduzindo-se à H_2O . A GPx utiliza a glutathiona como co-fator. A glutathiona oxidada (GSSG) é então convertida em GSH por ação da GR, enzima intracelular que usa o NADPH gerado pela via pentose fosfato como um doador de elétrons. FONTE: Adaptada - Barbosa et al (2006).

No contexto da regulação das defesas antioxidantes, o fator de transcrição nuclear eritróide relacionado ao fator 2 (Nrf2) consiste em um dos principais mecanismos regulatórios responsável pela transcrição de diversos genes de substâncias e enzimas envolvidas na citoproteção (Itoh et al., 1997; vide revisão: Motohashi e Yamamoto, 2004), tais como a glutathiona, metabolismo das EROs e dos xenobióticos (Okawa et al., 2006; Yates et al., 2009). Corroborando estas evidências,

Cho et al. (2004b) observaram que em animais nocautes do Nrf2, os sinais de fibrose pulmonar por bleomicina foram mais intensos comparados com os de camundongos selvagens.

O Nrf2, em condição normal, é constantemente degradado pela via ubiquitina-proteossoma dependente da proteína Keap1 (ECH Kelch associado a proteína 1), uma proteína citosólica rica em compostos tióis e múltiplos resíduos de cisteínas reativas, que servem como sensores primários do estresse oxidativo. Nessa condição, a proteína Keap1 é inativada (vide revisão: Taguchi et al., 2011) e uma vez ativado o Nrf2 no sistema biológico, este é translocado para o núcleo da célula, onde sofrerá heterodimerização com a proteína da família Maf e, a seguir, irá se ligar ao elemento de resposta antioxidante (ARE). A partir daí, inicia-se a ativação de vários genes envolvidos na síntese de antioxidantes, incluindo a glutatona, tioredoxina redutase 1 (Txnrd 1), peroxiredoxinas 1 (Prdx 1), desintoxicantes de xenobióticos pela NAD(P)H desidrogenase, quinona 1 (NQO1), glutatona S-transferase (GST), SOD-3, heme-oxigenase-1 (HO-1), glucuronosiltransferase-1a6 (UGT-1a6) e a enzima CuZnSOD, dentre outros (vide revisões: Lee e Johnson, 2004; Taguchi et al., 2011).

Além das fontes enzimáticas endógenas, que resultam na formação de EROs/ERNs e radicais livres, alguns agentes oxidantes são produzidos exogenamente por poluentes atmosféricos (Chao et al., 2012). Estes atuarão direto ou indiretamente sobre as vias respiratórias, intensificando ou desencadeando doenças inflamatórias e outras patologias no pulmão (vide revisão: Rahman et al., 2006; Asano et al., 2012).

1.2 Poluição ambiental: conceitos básicos e efeitos adversos sobre a saúde

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição do ar pode ser definida como a contaminação do ar ambiente (interno e externo) por diversos agentes químicos, físicos ou biológicos, os quais são capazes de modificar as características naturais da atmosfera.

Os contaminantes do ar ambiente interno, tais como os dispositivos de combustão doméstica (ex.: lareiras, aquecimento à gás), e os de contaminação externa (ex.: fontes móveis como os veículos automotores, os processos industriais e a queima de florestas) são fontes móveis e estacionárias comuns de PAA em grandes centros urbanos, como São Paulo.

Os poluentes podem ser classificados como poluentes primários e secundários, sendo que os primários representam os poluentes emitidos diretamente na atmosfera (ex.: dióxido de enxofre, monóxido de carbono e material particulado), enquanto os secundários resultam de reações químicas com outros poluentes ou gases atmosféricos, como o ozônio e óxido de nitrogênio (vide revisão: Bernstein et al., 2004). Dentre os poluentes de grande relevância para a saúde pública, destacam-se o material particulado (MP), monóxido de carbono, ozônio, dióxido de nitrogênio e o dióxido de enxofre (OMS, 2014).

O MP, também conhecido como partícula poluente, é uma mistura complexa de partículas extremamente pequenas e gotículas líquidas que ficam suspensas no ar ambiente (United States Environmental Protection Agency [EPA], 2017). Classificado de acordo com o seu diâmetro, o MP divide-se em ultrafino (tamanho $< 0.1 \mu\text{m}$), fino (tamanho entre 0.1 à $2.5 \mu\text{m}$; $\text{MP}_{2.5}$) e grosso (tamanho $> 2.5 \mu\text{m}$; vide revisão: Brunekreef e Forsberg, 2005).

Formada pela combustão de combustíveis fósseis e, principalmente, da engenharia de veículo automotor e processos de industrialização, o $\text{MP}_{2.5}$ eliminado na queima/exaustão do diesel (PEDs) constitui um dos poluentes mais comuns no ar atmosférico da cidade de São Paulo e de outros grandes centros (Riediker et al., 2007; Andrade et al., 2012). De acordo com o relatório de qualidade do ar da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB; <http://www.cetesb.sp.gov.br>), em 2016, a emissão de PAA provenientes de veículos automotores no ano de 2015 contribuiu grandemente para a PAA na região metropolitana de São Paulo, a qual compreende, principalmente, monóxido de carbono (CO; 97%), hidrocarbonetos (81%), NO_x (NO e NO_2 , monóxido de nitrogênio e dióxido de nitrogênio, respectivamente; 78%), SO_x (SO e SO_2 , monóxido de enxofre e dióxido de enxofre, respectivamente; 43%) e MP (40%).

A poluição resultante da combustão do diesel engloba uma complexa mistura que contém mais de 100 compostos químicos orgânicos e inorgânicos, divididos entre fase gasosa e particulada. A fase particulada é ainda capaz de adsorver substâncias químicas (poluentes) dispersas na atmosfera, como as quinonas (Cho et al., 2004a; vide revisão: Sumi e Kumagai, 2007). Segundo Cho e colaboradores (2004a), para cada g de PED, existe aproximadamente $13,7 \mu\text{g}$ da quinona 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) e, pelo menos, duas propriedades químicas de grande interesse toxicológico. Devido ao caráter eletrofílico das quinonas, consideradas agentes pró-oxidantes,

atuam como transportadores de elétrons a partir de um substrato biológico de oxigênio, levando a geração de EROs e oxidação de grupos funcionais de proteínas.

A 1,2-NQ, via reações bioquímicas mediadas pelo citocromo P450 (ex.: P450 redutase) e por outras flavoenzimas, pode ser reduzido a uma semiquinona (um radical livre) e, em seguida, em hidroquinona, via sequências de reduções de um elétron (vide revisão: Kumagai et al., 2012). A capacidade pró-oxidante da 1,2-NQ é dependente do potencial de redução da quinona (vide revisão: Kumagai et al., 2012). Além disto, outras quatro reações bioquímicas podem ocorrer: 1) a 1,2-NQ pode diretamente ser reduzida à hidroquinona, via ação da NADPH quinona redutase; 2) a 1,2-NQ pode reagir com a hidroquinona e, assim, formar duas semiquinonas; 3) a semiquinona formada pode reagir com o oxigênio molecular (O_2), gerando quinonas e $O_2^{\bullet-}$ e, por fim, 4) a hidroquinona pode reagir com $O_2^{\bullet-}$ e, também, formar semiquinonas e H_2O_2 (vide revisão: Kumagai et al., 2012). A 1,2-NQ também favorece ligações covalentes com proteínas nucleofílicas, como a cisteína, histidina e lisina, que inativam algumas proteínas celulares (Kumagai et al., 2002; Endo et al., 2007). Em termos estrutural e molecular, a 1,2-NQ possui um grupo carbonila α,β -insaturado, que favorece ligações fortes com macromoléculas (proteínas) de tecidos que têm grupamentos tióis na sua estrutura e, também, no DNA que, subsequentemente, causam lesão tecidual (Bolton et al., 2000; Kumagai et al., 2002; Iwamoto et al., 2007; Endo et al., 2007; Saeed et al., 2007).

As quinonas também interferem no equilíbrio redox e, portanto, na geração de EROs em células do sistema imune (macrófagos, neutrófilos), do epitélio brônquico e microssomas pulmonares (Marano et al., 2002; Li et al., 2002; Al-Humadi et al., 2002; Sun et al., 2006). Além de promover a geração de EROs, Miura et al. (2011) observaram que, em cultura de hepatócitos (camundongos), a 1,2-NQ levou à ativação do fator de transcrição Nrf2, sabidamente envolvido na gênese de enzimas antioxidante, como as glutatiónas.

Dados epidemiológicos do relatório da OMS, em 2014, revelaram que no ano de 2012, pelo menos, 1:8 do total de óbitos no mundo todo (equivalente a 7 milhões de indivíduos) ocorreu como consequência dos efeitos tóxicos da PAA interno (doméstico) e externo, destacando a PAA como uma das principais vilã da saúde humana, pois além de elevar o número de óbitos, onera o sistema público de saúde em vários países, cujos níveis de PAA estão acima do preconizado. Segundo esse mesmo relatório, a maioria das vítimas (88%) reside em países de baixa e média renda, os

quais representam 82% da população mundial. Somente nos países em desenvolvimento da Europa, África e Américas, os registros de óbitos associados à PAA totalizaram 200.000, 176.000 e 58.000, respectivamente (OMS, 2014).

De acordo com o Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), mais de 2 bilhões de crianças de comunidades urbanas de baixa renda, particularmente das regiões do Sul da África e Ásia, convivem em ambientes com concentrações extremas de PAA, pelo menos 6 vezes superiores aos valores exigidos pela OMS (Friedrich, 2017). Em tais regiões, as principais fontes poluentes são oriundas de veículos automotores, queima de resíduos e lixo, poeiras e combustíveis fósseis (ex.: petróleo e carvão mineral).

Inúmeras evidências epidemiológicas correlacionam o surgimento ou agravamento de doenças pulmonares (ex.: asma, doença obstrutiva crônica) e cardiovasculares (ex.: hipertensão) e óbitos relacionados com o aumento da PAA em indivíduos de todas as idades; entretanto, alguns estudos apontam que indivíduos mais susceptíveis, como as crianças, idosos e indivíduos com patologias (cardiopulmonares) pré-existentes sofrem mais com os efeitos adversos da PAA. Em crianças, algumas diferenças fisiológicas em relação aos adultos justificam essa maior susceptibilidade como, por exemplo, a imaturidade pulmonar e a maior frequência respiratória (elas respiram duas vezes mais rápido do que os adultos). Assim, elas são capazes de inspirar mais ar e, conseqüentemente, maior quantidade de PAA em relação ao seu peso corporal. Ademais, o trato respiratório das crianças é mais permeável às substâncias tóxicas do que o dos adultos (Friedrich, 2017), pois as barreiras naturais são menos desenvolvidas (ex.: nasal, epitélios intestinal e pulmonar) (vide revisão: Vanos et al., 2015). A imaturidade das barreiras naturais, como a barreira hematoencefálica, em crianças expostas a altas concentrações de PAA, predispõe estes a um risco maior dos efeitos deletérios das substâncias/partículas tóxicas potencialmente perigosas presentes na PAA (Calderon-Garciduenas et al., 2015; Brockmeyer e D'Angiulli, 2016). Dentre esses poluentes, o MP ultrafino ($MP < 2,5$) e o fino ($MP_{2,5}$) estão fortemente envolvidos com os efeitos adversos observados no sistema nervoso central (Calderon-Garciduenas et al., 2015).

Por seu turno, resultados do nosso grupo mostraram que a exposição de camundongos neonatos, mas não adultos, ao poluente 1,2-NQ induziu na fase adulta destes, maior susceptibilidade à inflamação pulmonar alérgica, caracterizada por potente influxo de leucócitos (linfócitos e eosinófilos) no lavado broncoalveolar,

sangue periférico e maior maturação eosinofílica na medula óssea, embora não afetou a hiperresponsividade das vias aéreas (Penh) quando comparado com o grupo alérgico. Esta resposta foi paralela a uma maior biossíntese de mediadores no pulmão (citocinas Th2, INF- γ , LTB4 e IgE), ativação de mastócitos e apresentação das CD11c esplênica, independentemente de alterações das moléculas co-estimuladoras CD86, CD80, CD40 e MHC-II (Santos et al., 2014).

De acordo com a OMS (2014), a saúde dos homens (> 25 anos) é mais afetada do que as mulheres da mesma idade pela ação da PAA (externa e doméstica) (Lim et al., 2012; WHO, 2014). Corroborando tais evidências, achados prévios deste grupo demonstraram que a exposição de camundongos neonatos de ambos os sexos ao poluente 1,2-NQ promoveu na fase juvenil dos machos exacerbação da inflamação alérgica pulmonar, a qual foi consistente com o aumento significativo das concentrações de citocinas Th2 (ex.: IL-4, IL-5 e IL-13) no LBA (Florenzano et al., 2017).

Estímulos exógenos irritantes e tóxicos, como o MP eliminado na exaustão do diesel (PED) e outros PAA ou seus produtos de formação/metabólitos relacionados (ex.: H₂O₂) parecem sensibilizar as fibras C pulmonares vagais (vide revisão: Maher et al., 2011), contribuindo assim para a inflamação e hiperreatividade das vias aéreas (Ruan et al., 2014). Acredita-se que os canais receptores de potencial transitório do tipo anquirina 1 (TRPA1), expressos em fibras sensoriais e outras células da resposta imune, (ex.: linfócitos) atuam como alvos de ação para os PAA, além da fumaça de cigarro e oxidantes gerados por estes (Andersson et al., 2008; vide revisão: Bessac e Jordt, 2008; Deering-Rice et al., 2011). Ademais, os TRPA1 podem ser ativados por moléculas endógenas, como o dianisilfosfato e metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas, ou produtos de peroxidação lipídica, comuns em processos inflamatórios e nociceptivos (Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008).

1.3 Receptores (canais) de potencial transitório (TRPs) como alvos de PAA

Os canais receptores de potencial transiente (TRPs) compreendem uma grande família de receptores em mamíferos, que compreende seis subfamílias (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP e TRPML) e 28 membros. A estrutura molecular proteica destes é formada por seis domínios transmembrana e um canal iônico disposto entre o 5º e 6º domínios. As porções C- e N- terminais desses canais participam da função e

organização do canal iônico e estão localizadas intracelularmente (vide revisão: Ramsey et al., 2006).

A expressão da subfamília TRPA (anquirina), que possui somente o membro TRPA1, foi originalmente observada em fibroblastos (Figura 4; Stokes et al., 2006) e, posteriormente, a expressão (proteica e RNAm) do TRPA1 foi também revelada em fibras sensoriais que inervam as vias aéreas e, também, em linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ e B (vide revisões: Jia e Lee, 2007; Colsoul et al., 2009; Banner et al., 2011), bem como em células epiteliais e alveolares das vias aéreas (Mukhopadhyay et al., 2011; Nassini et al., 2012) sugerindo um papel importante para os TRPA1 na fisiopatologia das doenças inflamatórias das vias aéreas.

No que tange ao mecanismo de ativação do receptor TRPA1, este ocorre de diversas maneiras, sendo o íon Ca^{2+} um dos reguladores mais importantes do mecanismo, podendo tanto potencializar, quanto inativar esse receptor, a saber: 1) pela ligação de seus agonistas (ex.: acroleína, H_2O_2), que induzem correntes internas (despolarização), principalmente de Ca^{2+} ; 2) indiretamente, via ativação de outros receptores TRP presentes na mesma fibra nervosa e, 3) via influxo de Ca^{2+} resultante da ativação do próprio TRPA1 que ativado, induz *per se* o aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_i$, levando ao fenômeno de feedback positivo (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007; Belvisi et al., 2011).

Agonistas e mediadores endógenos que ativam receptores metabotrópicos (acoplados a proteína G), como a prostaglandina E_2 (PGE_2) e bradicinina, também ativam os TRPA1, via hidrólise da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato ou via segundos mensageiros, como o diacilglicerol e o inositol 1,4,5-trifosfato. O inositol 1,4,5-trifosfato também promove a liberação de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ do retículo endoplasmático e, assim, estas correntes iônicas internas de Ca^{2+} podem despolarizar a membrana celular e, consequentemente, favorecer a abertura de canais de Na^+ dependentes de voltagem. Isto, por seu turno, causa despolarização da membrana celular, resultando na abertura de canais de Ca^{2+} voltagem dependente e maior influxo de Ca^{2+} extracelular por esses canais que, associado ao que ocorre via receptor de rianodina, eleva significativamente o estoque de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Em excesso, essa $[\text{Ca}^{2+}]_i$ pode inativar a atividade do receptor TRPV1 e, consequentemente, bloquear a ativação do TRPA1 (Zurborg et al., 2007; Vyklický et al., 2008).

A regulação do ciclo do Ca^{2+} pelo potencial de membrana e vice-versa é modulada pela capacidade da célula fixar concentrações intracelulares desse íon,

principalmente, via Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático e da membrana plasmática (Belvisi et al., 2011).

Figura 4: Esquema da estrutura do canal receptor de potencial transitório com domínios tipo anquirina 1 (TRPA1). O TRPA1 é expresso em fibras sensoriais. Ions Ca^{2+} penetram no interior da célula via canais iônicos em resposta aos diversos estímulos exógenos (ex.: MP, fumaça de cigarro e irritantes) e endógenos (ex.: PIP_2) nas vias aéreas. PIP_2 (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato). FONTE: Adaptado – Bessac e Jordt, 2008.

Considerando que as vias aéreas são estruturas densamente innervadas por ramos e fibras nervosas oriundas dos nervos trigêmeo e do vago, assim como por neurônios (aférentes) somatossensoriais (vide revisão: Lee e Pisarri, 2001), essas estruturas neurais exibem vias de condução rápida e limiar quimiosensitivo multi-responsivos além de limiares mecanossensitivos distintos. Ademais, as fibras medem a tensão do tecido das vias aéreas, a qual controla a retroalimentação respiratória (inflação e/ou deflação do pulmão) (vide revisão: Widdicombe, 2001).

A subpopulação dos aferentes neuronais, denominados nociceptores polimodais (PMN) ou fibras nervosas não mielinizadas do tipo C, respondem a estímulos endógenos e ambientais, incluindo extrema força mecânica, altas variações de temperatura ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e/ou mediadores químicos produzidos no local da inflamação ou aplicados exogenamente (Bautista et al., 2006; vide revisão: Belvisi et al., 2011). Devido a natureza de percepção das fibras PMN aos estímulos potencialmente lesivos, estas se destacam como inervações protetoras das vias aéreas. Na vigência da estimulação das fibras PMN em vias aéreas, algumas sensações e/ou sintomas podem ser deflagrados, como a tosse, dispneia, broncoespasmo e secreção de muco e edema associados às doenças inflamatórias do pulmão (ex.: asma e DPOC)

(Simon e Liedtke, 2008; vide revisão: Taylor-Clark e Undem, 2011). Corroborando essas evidências, resultados do nosso grupo mostraram que a injeção intratraqueal (i.tr.) da mistura dos poluentes 1,2-NQ e PED induziu aumento da expressão (RNAm) do receptor TRPV1 no brônquio principal de ratos (Teles et al., 2010). Além disto, esse mesmo tratamento com os poluentes causou inflamação nas vias aéreas superiores dos animais, a qual foi substancialmente inibida pelo tratamento destes com o antagonista de substância P (SR140333) e, também, pelo pré-tratamento dos animais com a capsaicina na fase neonatal, um tratamento sabidamente capaz de promover degeneração das fibras sensoriais C e depleção dos neuropeptídeos. Em conjunto, esses resultados mostraram que os poluentes PED e 1,2-NQ exercem seus efeitos via mecanismos (neurogênicos) dependentes, pelo menos em parte, da ativação das fibras nervosas sensoriais C (via TRPV1) que inervam as vias aéreas (Teles et al., 2010). Esses achados reforçam outros estudos (vide revisão: Akopian et al., 2016), os quais mostram que a exposição aos PAA emitidos pela combustão de veículos automotores, como as PED e seus contaminantes ou produtos gerados por estas (ex.: eletrofilicos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, quinonas e EROs,) resulta na produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios nas vias aéreas via mecanismos dependentes da ativação dos canais receptores TRPV1 e TRPA1 ou independente de Ca^{2+} . Contudo, pouco se sabe sobre os efeitos direto/indireto de compostos eletrofilicos, como a 1,2-NQ, em canais receptores TRPA1.

2 RESUMO E CONCLUSÕES

1. A exposição precoce (período neonatal) ao PAA, 1,2-NQ, promoveu maior susceptibilidade diferencial à inflamação alérgica pulmonar entre camundongos machos e fêmeas jovens, sendo que a proteção maior foi conferida às fêmeas, em decorrência da manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes (enzimas e moléculas não enzimáticas), resultantes da maior maturidade pulmonar do sexo feminino;
2. A exacerbação da inflamação alérgica pulmonar em camundongos machos jovens previamente expostos a 1,2-NQ foi reduzido pelo antagonismo dos TRPA1, sugerindo o envolvimento de mecanismos neurovasculares regulados por esse receptor via ação direta da 1,2-NQ ou indireta (EROs).
3. A capacidade do PAA, 1,2-NQ, em promover aumento significativo da $[Ca^{2+}]_i$ em cultura de neurônios do gânglio da raiz dorsal, foi significativamente reduzido pela adição do antagonista de TRPA1, HC030031. Estes dados demonstram que a 1,2-NQ pode ativar, diretamente, os TRPA1 expressos em neurônios sensoriais;
4. Estes resultados, em conjunto, mostram que os TRPA1 participam das ações deletérias de PAA, como as quinonas encontradas em MP, representando assim um potencial alvo terapêutico para o tratamento da inflamação alérgica pulmonar associada à exposição aos poluentes ambientais, como as PED e/ou seu contaminante 1,2-NQ.
5. A proteção conferida às fêmeas contra as ações deletérias da 1,2-NQ parece depender, grandemente, da influência de fatores hormonais, sabidamente capazes de estimular a maturidade pulmonar e imunológica, via ativação de mecanismos de defesas antioxidantes. Contudo, a confirmação do papel do hormônio sexual feminino precisa ser confirmada num futuro estudo.

REFERÊNCIAS*

- Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol.* 2013;74(10):1392-9.
- Akopian AN, Fanick ER, Brooks EG. TRP channels and traffic-related environmental pollution-induced pulmonary disease. *Semin Immunopathol.* 2016;38(3):331-8.
- Al-Humadi NH, Siegel PD, Lewis DM, Barger MW, Ma JY, Weissman DN, Ma J. K. Alteration of intracellular cysteine and glutathione levels in alveolar macrophages and lymphocytes by diesel exhaust particle exposure. *Environ Health Perspect.* 2002;110:349.
- Alfonso-Prieto M, Biarnés X, Vidossich P, Rovira C. The molecular mechanism of the catalase reaction. *J Am Chem Soc.* 2009;131(33):11751-61.
- Alonso-Alvarez C, Bertrand S, Faivre B. Testosterone and oxidative stress: the oxidation handicap hypothesis. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 2007; 274: 819–825.
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci.* 2008;28(10):2485-94.
- Andrade MD, de Miranda RM, Fornaro A, Kerr A, Oyama B, de Andre PA, Saldiva P. Vehicle emissions and PM(2.5) mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health.* 2012;5(1):79-88.
- Asano H, Horinouchi T, Mai Y, Sawada O, Fujii S, Nishiya T, Minami M, Katayama T, Iwanaga T, Terada K, Miwa S. Nicotine- and tar-free cigarette smoke induces cell damage through reactive oxygen species newly generated by PKC-dependent activation of NADPH oxidase. *J Pharmacol Sci.* 2012;118(2):275-87.
- Asher I, Pearce N. Global burden of asthma among children. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;18(11):1269-78.
- Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Wardlaw AJ, Knowles G, Assoufi B, Collins JV, Durham S, Kay AB. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Respir Dis.* 1990;142(6 Pt 1):1407-13.

* De acordo com:

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

- Balint B, Donnelly LE, Hanazawa T, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax*. 2001;56(6):456-61.
- Balzano G, Fuschillo S, Melillo G, Bonini S. Asthma and sex hormones. *Allergy*. 2001;56(1):13-20.
- Banner KH, Igney F, Poll C. TRP channels: emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol Ther*. 2011;130(3):371-84. doi: 10.1016/j.pharmthera.2011.03.005. Review.
- Barbosa LF, Medeiros MHG, Augusto O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. *Quím. Nova* [online]. 2006, vol.29, n.6, pp. 1352-1360. ISSN 0100-4042.
- Bautista DM, Jordt SE, Nikai T, Tsuruda PR, Read AJ, Poblete J, Yamoah EN, Basbaum AI, Julius D. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*. 2006;124(6):1269-82.
- Belvisi MG, Dubuis E, Birrell MA. Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. *Chest*. 2011;140(4):1040-7.
- Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(5):1116-23. Review.
- Bessac BF, Jordt SE. Breathtaking TRP channels: TRPA1 and TRPV1 in airway chemosensation and reflex control. *Physiology (Bethesda)*. 2008;23:360-70. Review.
- Beyer C, Küppers E, Karolczak M, Trotter A. Ontogenetic expression of estrogen and progesterone receptors in the mouse lung. *Biol Neonate*. 2003;84(1):59-63.
- Boucher E, Provost PR, Devillers A, Tremblay Y. Levels of dihydrotestosterone, testosterone, androstenedione, and estradiol in canalicular, saccular, and alveolar mouse lungs. *Lung*. 2010;188(3):229-33.
- Boucher E, Provost PR, Plante J, Tremblay Y. Androgen receptor and 17beta-HSD type 2 regulation in neonatal mouse lung development. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;311(1-2):109-19.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
- Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, et al. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase- deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 2002;277:17415–27.

Brightling CE, Symon FA, Birring SS, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ. TH2 cytokine expression in bronchoalveolar lavage fluid T lymphocytes and bronchial submucosa is a feature of asthma and eosinophilic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;110(6):899-905.

Brindicci C, Kharitonov SA, Ito M, Elliott MW, Hogg JC, Barnes PJ, Ito K. Nitric oxide synthase isoenzyme expression and activity in peripheral lung tissue of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(1):21-30.

Brockmeyer S, D'Angiulli A. How air pollution alters brain development: the role of neuroinflammation. *Transl Neurosci*. 2016;7(1):24-30. doi:10.1515/tnsci-2016-0005. Review.

Brown PC, Dulik DM, Jones TW. The toxicity of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) and two thioether conjugates studied with isolated renal epithelial cells. *Arch Biochem Biophys*. 1991;285(1):187-96.

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

Brunelli L, Crow JP, Beckman JS. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxyntirite to *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1):327-34.

Buffinton GD, Ollinger K, Brunmark A, Cadenas E. DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates. *Biochem J*. 1989;257(2):561-71.

Calderón-Garcidueñas L, Vojdani A, Blaurock-Busch E, Busch Y, Friedle A, Franco-Lira M, Sarathi-Mukherjee P, Martínez-Aguirre X, Park SB, Torres-Jardón R, D'Angiulli A. Air pollution and children: neural and tight junction antibodies and combustion metals, the role of barrier breakdown and brain immunity in neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*. 2015;43(3):1039-58.

Capel ID, Smallwood AE. Sex differences in the glutathione peroxidase activity of various tissues of the rat. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1983;40(3):367-78.

Caramori G, Papi A. Oxidants and asthma. *Thorax*. 2004;59(2):170-3. Review.

Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ Jr, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(8):308-13. Review.

Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. *Methods Enzymol*. 1985;113:484-90.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. [base de dados na internet] [acesso em 3 de março de 2017] Disponível em:

<http://www.cetesb.sp.gov.br/2016/05/03/cetesb-divulga-relatorios-anuais-de-qualidade-do-ar-e-das-praias-e-inventario-de-residuos-do-estado/>.

Chao MW, Po IP, Laumbach RJ, Koslosky J, Cooper K, Gordon MK. DEP induction of ROS in capillary-like endothelial tubes leads to VEGF-A expression. *Toxicology*. 2012;297(1-3):34-46.

Chen ZH, Na HK, Hurh YJ, Surh YJ. 4-Hydroxyestradiol induces oxidative stress and apoptosis in human mammary epithelial cells: possible protection by NF-kappaB and ERK/MAPK. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;208(1):46-56.

Chirino YI, Orozco-Ibarra M, Pedraza-Chaverri J. [Role of peroxynitrite anion in different diseases]. *Rev Invest Clin*. 2006;58(4):350-8. 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*. 2004a;38:1-14.

Cho HY, Reddy SP, Yamamoto M, Kleeberger SR. The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 2004b;18(11):1258-60.

Colsohl B, Nilius B, Vennekens R. On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma. *Clin Exp Allergy*. 2009;39(10):1456-66. doi: 10.1111/j.1365-2222.2009.03315.x. Review.

Comhair SA, Erzurum SC. Redox control of asthma: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(1):93-124. Review. Erratum in: *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(2):321.

Corradi M, Montuschi P, Donnelly LE, Pesci A, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased nitrosothiols in exhaled breath condensate in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;163(4):854-8.

Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174:231-235 (1994).

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):389-406. Review.

de Marco R, Locatelli F, Sunyer J, Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(1):68-74.

Deering-Rice CE, Johansen ME, Roberts JK, Thomas KC, Romero EG, Lee J, Yost GS, Veranth JM, Reilly CA. Transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) is a mediator of lung toxicity for coal fly ash particulate material. *Mol Pharmacol*.

2012;81(3):411-9.

Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Hughen RW, Light AR, Yost GS, Veranth JM, Reilly CA. Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(6):950-9.

Deering-Rice CE, Shapiro D, Romero EG, Stockmann C, Bevans TS, Phan QM, Stone BL, Fassl B, Nkoy F, Uchida DA, Ward RM, Veranth JM, Reilly CA. Activation of Transient Receptor Potential Ankyrin-1 by Insoluble Particulate Material and Association with Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53(6):893-901.

Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(5-6):1019-26. Review.

Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem*. 2007;282(18):13180-9.

Duguet A, Iijima H, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Eosinophil peroxidase mediates protein nitration in allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(7):1119-26.

Dunican EM, Fahy JV. The Role of Type 2 Inflammation in the Pathogenesis of Asthma Exacerbations. *Ann Am Thorac Soc*. 2015 Nov;12 Suppl 2:S144-9. doi: 10.1513/AnnalsATS.201506-377AW. Review.

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

Enomoto A, Itoh K, Nagayoshi E, Haruta J, Kimura T, O'Connor T, Harada T, Yamamoto M. High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes. *Toxicol Sci*. 2001;59(1):169-77.

Fabian E, Pölöskey P, Kósa L, Elmadfa I, Réthy LA. Activities of antioxidant enzymes in relation to oxidative and nitrosative challenges in childhood asthma. *J Asthma*. 2011;48(4):351-7.

Fedorova M, Bollineni RC, Hoffmann R. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrom Rev*. 2014;33(2):79-97. doi: 10.1002/mas.21381. Review.

Feng Y, Gregor P. Cloning of a novel member of the G protein-coupled receptor family related to peptide receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;231(3):651-4.

Fitzpatrick AM, Teague WG, Burwell L, Brown MS, Brown LA; NIH/NHLBI Severe Asthma Research Program. Glutathione oxidation is associated with airway macrophage functional impairment in children with severe asthma. *Pediatr Res*. 2011;69(2):154-9.

Fleming I. Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS. *Pflugers Arch*. 2010;459(6):793-806. doi: 10.1007/s00424-009-0767-7. Review.

Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*. 1984;105:114-21.

Florenzano J, Santos KT, Teixeira SA, Barreto MA, Muscará MN, Costa SKP. Early-lifetime exposure to pollutant induces differential susceptibility to lung inflammation in C57BL/6 mouse gender. 10th world congress on inflammation, 2011, Paris. *Anais do 10th world congress on inflammation*, 2011.

Florenzano J, Santos KT, Teixeira SA, Rodrigues L, Brain SD, Muscará MN, Costa SKP. Neonatal exposure to electrophilic environmental pollutant induces gender-dependent susceptibility to pulmonary allergic inflammation in the juvenile period: contribution of redox cycling (manuscrito à ser submetido).

Förstermann U, Boissel JP, Kleinert H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J*. 1998;12(10):773-90. Review.

Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem*. 1980;26(2):227-31.

Friedrich MJ. UNICEF Reports on the Impact of Air Pollution on Children. *JAMA*. 2017;317(3):246.

Fuertes E, Bracher J, Flexeder C, Markevych I, Klümper C, Hoffmann B, Krämer U, von Berg A, Bauer CP, Koletzko S, Berdel D, Heinrich J, Schulz H. Long-term air pollution exposure and lung function in 15 year-old adolescents living in an urban and rural area in Germany: The GINIplus and LISAplus cohorts. *Int J Hyg Environ Health*. 2015;218(7):656-65.

Ganas K, Loukides S, Papatheodorou G, Panagou P, Kalogeropoulos N. Total nitrite/nitrate in expired breath condensate of patients with asthma. *Respir Med*. 2001 Aug;95(8):649-54.

Global Initiative for Asthma (GINA). *Global Strategy for Asthma Management and Prevention: updated 2015*. Vancouver; [base de dados na internet] [acesso em 13 de março de 2017]. Disponível em: http://www.ginasthma.org/local/uploads/files/GINA_Report_2015_Aug11.pdf

Greaves E, Grieve K, Horne AW, Saunders PT. Elevated peritoneal expression and

estrogen regulation of nociceptive ion channels in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(9):E1738-43.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem.* 1974;249(22):7130-9.

Hackenhaar FS, Salomon TB, Alabarse PV, Ehrenbrink G, Benfato MS. Pulmonary antioxidant defences and protein damage during the ageing process of both sexes. *Cell Biochem Funct.* 2009;27(6):378-82.

Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 1994 Dec;102 Suppl 10:5-12. Review.

Halima BA, Sarra K, Kais R, Salwa E, Najoua G. Indicators of oxidative stress in weanling and pubertal rats following exposure to nicotine via milk. *Hum Exp Toxicol.* 2010;29(6):489-96.

Rahmani AH, Alzohairy M, Babiker AY, Khan AA, Aly SM, Rizvi MA. Implication of androgen receptor in urinary bladder cancer: a critical mini review. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2013;4(3):150-5.

Hayashi A, Suzuki H, Itoh K, Yamamoto M, Sugiyama Y. Transcription factor Nrf2 is required for the constitutive and inducible expression of multidrug resistance-associated protein 1 in mouse embryo fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;310(3):824-9.

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:51-88. Review.

Iijima H, Duguet A, Eum SY, Hamid Q, Eidelman DH. Nitric oxide and protein nitration are eosinophil dependent in allergen-challenged mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001;163(5):1233-40.

Isensee J, Meoli L, Zazzu V, Nabzdyk C, Witt H, Soewarto D, Effertz K, Fuchs H, Gailus-Durner V, Busch D, Adler T, de Angelis MH, Irgang M, Otto C, Noppinger PR. Expression pattern of G protein-coupled receptor 30 in LacZ reporter mice. *Endocrinology.* 2009;150(4):1722-30.

Itoga M, Konno Y, Moritoki Y, Saito Y, Ito W, Tamaki M, Kobayashi Y, Kayaba H, Kikuchi Y, Chihara J, Takeda M, Ueki S, Hirokawa M. Correction: G-Protein-Coupled Estrogen Receptor Agonist Suppresses Airway Inflammation in a Mouse Model of Asthma through IL-10. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136326.

Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, Hayashi N, Satoh K, Hatayama I, Yamamoto M, Nabeshima Y. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;236(2):313-22.

- Jacenic D, Cygankiewicz AI, Krajewska WM. The G protein-coupled estrogen receptor as a modulator of neoplastic transformation. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;429:10-8. doi: 10.1016/j.mce.2016.04.011. Review.
- Jentsch AM, Bachmann H, Fürst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(2):251-6.
- Jia Y, Lee LY. Role of TRPV receptors in respiratory diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(8):915-27. Review. Erratum in: *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772(10):1182.
- Kelly FJ, Mudway I, Blomberg A, Frew A, Sandström T. Altered lung antioxidant status in patients with mild asthma. *Lancet*. 1999;354(9177):482-3.
- Kharitonov SA, Yates D, Robbins RA, Logan-Sinclair R, Shinebourne EA, Barnes PJ. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet*. 1994;343(8890):133-5.
- Koike Y, Hisada T, Utsugi M, Ishizuka T, Shimizu Y, Ono A, Murata Y, Hamuro J, Mori M, Dobashi K. Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007;37(3):322-9.
- Koizumi R, Taguchi K, Hisamori M, Kumagai Y. Interaction of 9,10-phenanthraquinone with dithiol causes oxidative modification of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) through redox cycling. *J Toxicol Sci*. 2013;38(3):317-24.
- Kon OM, Kay AB. T cells and chronic asthma. *Int Arch Allergy Immunol*. 1999;118(2-4):133-5. Review.
- Konga DB, Kim Y, Hong SC, Roh YM, Lee CM, Kim KY, Lee SM. Oxidative stress and antioxidant defenses in asthmatic murine model exposed to printer emissions and environmental tobacco smoke. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2009;28(4):325-40.
- Koskela HO, Purokivi MK, Nieminen RM, Moilanen E. Asthmatic cough and airway oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012;181(3):346-350.
- Kumagai Y, Koide S, Taguchi K, Endo A, Nakai Y, Yoshikawa T, Shimojo N. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. *Chem Res Toxicol*. 2002;15(4):483-9.
- Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2012;52:221-47. doi: 10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517. Review.
- 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.
- Kuschnir FC, Gurgel RQ, Solé D, Costa E, Felix MM, de Oliveira CL, de

Vasconcellos MT, Kuschnir MC. ERICA: prevalence of asthma in Brazilian adolescents. *Rev Saude Publica*. 2016;50 Suppl 1:13s.

Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*. 2003;278(25):22546-54.

Lacy P, Moqbel R. Immune effector functions of eosinophils in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2001;1(1):79-84. Review.

Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(8):1201-9.

Lee JM, Johnson JA. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J Biochem Mol Biol*. 2004;37(2):139-43. Review.

Lee LY, Pisarri TE. Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers. *Respir Physiol*. 2001;125(1-2):47-65. Review.

Li Q, Wall SB, Ren C, Velten M, Hill CL, Locy ML, Rogers LK, Tipple TE. Thioredoxin Reductase Inhibition Attenuates Neonatal Hyperoxic Lung Injury and Enhances Nuclear Factor E2-Related Factor 2 Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55(3):419-28.

Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-Rohani H, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 2012;380(9859):2224-60.

Louhelainen N, Myllärniemi M, Rahman I, Kinnula VL. Airway biomarkers of the oxidant burden in asthma and chronic obstructive pulmonary disease: current and future perspectives. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2008;3(4):585-603. Review.

Maarsingh H, Pera T, Meurs H. Arginase and pulmonary diseases. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2008;378(2):171-84. doi: 10.1007/s00210-008-0286-7. Review.

Maher SA, Dubuis ED, Belvisi MG. G-protein coupled receptors regulating cough. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(3):248-53. Review.

Mak JC, Chan-Yeung MM. Reactive oxidant species in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2006;12(1):7-11. Review.

Mak JC, Leung HC, Ho SP, Ko FW, Cheung AH, Ip MS, Chan-Yeung MM. Polymorphisms in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(4):440-7.

Marano F, Boland S, Bonvallot V, Baulig A, Baeza-Squiban A. Human airway epithelial cells in culture for studying the molecular mechanisms of the inflammatory response triggered by diesel exhaust particles. *Cell Biol Toxicol*. 2002;18(5):315-20.

Massaro D, Massaro GD. Estrogen receptor regulation of pulmonary alveolar dimensions: alveolar sexual dimorphism in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(5):L866-70.

Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol*. 2011;24(4):559-67.

Morcillo EJ, Estrela J, Cortijo J. Oxidative stress and pulmonary inflammation: pharmacological intervention with antioxidants. *Pharmacol Res*. 1999;40(5):393-404. Review.

Motohashi H, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*. 2004;10(11):549-57. Review.

Mukhopadhyay I, Gomes P, Aranake S, Shetty M, Karnik P, Damle M, Kuruganti S, Thorat S, Khairatkar-Joshi N. Expression of functional TRPA1 receptor on human lung fibroblast and epithelial cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011;31(5):350-8.

Nassenstein C, Kwong K, Taylor-Clark T, Kollarik M, Macglashan DM, Braun A, Udem BJ. Expression and function of the ion channel TRPA1 in vagal afferent nerves innervating mouse lungs. *J Physiol*. 2008;586(6):1595-604.

Nassini R, Pedretti P, Moretto N, Fusi C, Carnini C, Facchinetti F, Viscomi AR, Pisano AR, Stokesberry S, Brunmark C, Svitacheva N, McGarvey L, Patacchini R, Damholt AB, Geppetti P, Materazzi S. Transient receptor potential ankyrin 1 channel localized to non-neuronal airway cells promotes non-neurogenic inflammation. *PLoS One*. 2012;7(8):e42454.

Newby DE, Mannucci PM, Tell GS, Baccarelli AA, Brook RD, Donaldson K, Forastiere F, Franchini M, Franco OH, Graham I, Hoek G, Hoffmann B, Hoylaerts MF, Künzli N, Mills N, Pekkanen J, Peters A, Piepoli MF, Rajagopalan S, Storey RF; ESC Working Group on Thrombosis, European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.; ESC Heart Failure Association. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *Eur Heart J*. 2015;36(2):83-93b.

Ni J, Lin YG, Wu L, Huang W, Wei JF, Jiang XQ. [Protective Effect of Activated Nrf2 against Hyperoxia-induced Lung Injury in Neonatal Rats]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2015;46(3):399-402.

North ML, Khanna N, Marsden PA, Grasemann H, Scott JA. Functionally important role for arginase 1 in the airway hyperresponsiveness of asthma. *Am J Physiol Lung*

Cell Mol Physiol. 2009;296(6):L911-20.

Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S. Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(3). pii:E22. doi: 10.3390/cancers9030022. Review.

Okawa H, Motohashi H, Kobayashi A, Aburatani H, Kensler TW, Yamamoto M. Hepatocyte-specific deletion of the keap1 gene activates Nrf2 and confers potent resistance against acute drug toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;339(1):79-88.

Organização Mundial da Saúde. WHO: Air pollution [base de dados na internet] [acesso em 5 de junho de 2014] Disponível em: http://www.who.int/topics/air_pollution/en/.

Pajovi SB, Saici ZS. Modulation of antioxidant enzyme activities by sexual steroid hormones. *Physiol Res* 2008; 57: 801-811.

Paoliello-Paschoalato AB, Oliveira SH, Cunha FQ. Interleukin 4 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in eosinophils. *Cytokine*. 2005;30(3):116-24.

Park CS, Kim TB, Lee KY, Moon KA, Bae YJ, Jang MK, Cho YS, Moon HB. Increased oxidative stress in the airway and development of allergic inflammation in a mouse model of asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2009;103(3):238-47.

Parker JD, Rich DQ, Glinianaia SV, Leem JH, Wartenberg D, Bell ML, Bonzini M, Brauer M, Darrow L, Gehring U, Gouveia N, Grillo P, Ha E, van den Hooven EH, Jalaludin B, Jesdale BM, Lepeule J, Morello-Frosch R, Morgan GG, Slama R, Pierik FH, Pesatori AC, Sathyanarayana S, Seo J, Strickland M, Tamburic L, Woodruff TJ. The International Collaboration on Air Pollution and Pregnancy Outcomes: initial results. *Environ Health Perspect*. 2011;119(7):1023-8.

Patrone C, Cassel TN, Pettersson K, Piao YS, Cheng G, Ciana P, Maggi A, Warner M, Gustafsson JA, Nord M. Regulation of postnatal lung development and homeostasis by estrogen receptor beta. *Mol Cell Biol*. 2003 Dec;23(23):8542-52.

Pera T, Zuidhof AB, Smit M, Menzen MH, Klein T, Flik G, Zaagsma J, Meurs H, Maarsingh H. Arginase inhibition prevents inflammation and remodeling in a guinea pig model of chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;349(2):229-38.

Pike K, Jane Pillow J, Lucas JS. Long term respiratory consequences of intrauterine growth restriction. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012;17(2):92-8. doi: 10.1016/j.siny.2012.01.003. Review.

Pisha E, Lui X, Constantinou AI, Bolton JL. Evidence that a metabolite of equine

estrogens, 4-hydroxyequilenin, induces cellular transformation in vitro. *Chem Res Toxicol*. 2001;14(1):82-90.

Popov TA. Human exhaled breath analysis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2011;106(6):451-6; quiz 457. doi: 10.1016/j.anai.2011.02.016. Review.

Provost PR, Simard M, Tremblay Y. A link between lung androgen metabolism and the emergence of mature epithelial type II cells. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(3):296-305.

Psarras S, Caramori G, Contoli M, Papadopoulos N, Papi A. Oxidants in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Curr Pharm Des*. 2005;11(16):2053-62. Review.

Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006;533(1-3):222-39. Review.

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*. 2006;68:619-47. Review.

Reiter CD, Teng RJ, Beckman JS. Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2000;275(42):32460-6.

Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004;84(3):731-65. Review.

Riediker M. Cardiovascular effects of fine particulate matter components in highway patrol officers. *Inhal Toxicol*. 2007;19 Suppl 1:99-105.

Rosa MJ, Jung KH, Perzanowski MS, Kelvin EA, Darling KW, Camann DE, Chillrud SN, Whyatt RM, Kinney PL, Perera FP, Miller RL. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, environmental tobacco smoke and asthma. *Respir Med*. 2011;105(6):869-76.

Roum JH, Aledia AS, Carungcong LA, Kim KJ, Borok Z. Extracellular glutathione inhibits oxygen-induced permeability changes in alveolar epithelial monolayers. *J Appl Physiol* (1985). 2001;91(2):748-54.

Ruan T, Lin YJ, Hsu TH, Lu SH, Jow GM, Kou YR. Sensitization by pulmonary reactive oxygen species of rat vagal lung C-fibers: the roles of the TRPV1, TRPA1, and P2X receptors. *PLoS One*. 2014;9(4):e91763.

Saeed M, Higginbotham S, Rogan E, Cavalieri E. Formation of depurinating N3 adenine and N7 guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. *Chem Biol Interact*. 2007;165(3):175-88.

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(1):37-47.

Santos KT, Florenzano J, Rodrigues L, Fávaro RR, Ventura FF, Ribeiro MG, Teixeira SA, Ferreira HH, Brain SD, Damazo AS, Zorn TM, Câmara NO, Muscará MN, Peron JP, Costa SK. Early postnatal, but not late, exposure to chemical ambient pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. *Arch Toxicol*. 2014;88(8):1589-605.

Sathish V, Martin YN, Prakash YS. Sex steroid signaling: implications for lung diseases. *Pharmacol Ther*. 2015;150:94-108. doi: 10.1016/j.pharmthera.2015.01.007. Review.

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

Seaborn T, Simard M, Provost PR, Piedboeuf B, Tremblay Y. Sex hormone metabolism in lung development and maturation. *Trends Endocrinol Metab*. 2010;21(12):729-38. doi: 10.1016/j.tem.2010.09.001. Review.

Shah PS, Balkhair T; Knowledge Synthesis Group on Determinants of Preterm/LBW births.. Air pollution and birth outcomes: a systematic review. *Environ Int*. 2011;37(2):498-516. doi: 10.1016/j.envint.2010.10.009. Review.

Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9-10):916-21. Review.

Silkoff PE, Erzurum SC, Lundberg JO, George SC, Marczin N, Hunt JF, Effros R, Horvath I; American Thoracic Society; HOC Subcommittee of the Assembly on Allergy, Immunology, and Inflammation. ATS workshop proceedings: exhaled nitric oxide and nitric oxide oxidative metabolism in exhaled breath condensate. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(2):131-45. Review.

Simon SA, Liedtke W. How irritating: the role of TRPA1 in sensing cigarette smoke and aerogenic oxidants in the airways. *J Clin Invest*. 2008;118(7):2383-6.

Soto-Ramírez N, Ziyab AH, Karmaus W, Zhang H, Kurukulaaratchy RJ, Ewart S, Arshad SH. Epidemiologic methods of assessing asthma and wheezing episodes in longitudinal studies: measures of change and stability. *J Epidemiol*. 2013;23(6):399-410.

Stokes A, Wakano C, Koblan-Huberson M, Adra CN, Fleig A, Turner H. TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal*. 2006;18(10):1584-94.

Sumi D, Kumagai Y. [Chemical biology of 1,2-naphthoquinone, a novel air pollutant that affects signal transduction pathways]. *Yakugaku Zasshi*. 2007;127(12):1949-56. Review.

Szeffler SJ, Wenzel S, Brown R, Erzurum SC, Fahy JV, Hamilton RG, Hunt JF, Kita H, Liu AH, Panettieri RA Jr, Schleimer RP, Minnicozzi M. Asthma outcomes: biomarkers. *J Allergy Clin Immunol*. 2012;129(3 Suppl):S9-23. Review.

Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*. 2011;16(2):123-40. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01473.x. Review.

Taylor-Clark TE, Undem BJ. Sensing pulmonary oxidative stress by lung vagal afferents. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011;178(3):406-13. doi: 10.1016/j.resp.2011.05.003. Review.

Teles AM, 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. Erratum in: *Arch Toxicol*. 2010;84(2):119.

The Asthma Network (GAN). The Global Asthma Report 2014. Auckland (NZ); [base de dados na internet] [acesso em 13 de março de 2017]. Disponível em: <http://www.globalasthmareport.org>

Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S. Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res*. 2002;62(18):5196-203.

Tondreau MY, Boucher E, Simard M, Tremblay Y, Bilodeau JF. Sex-specific perinatal expression of glutathione peroxidases during mouse lung development. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;355(1):87-95.

Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, André E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13519-24.

Ukeda H, Hasegawa Y, Ishi T, Sawamura M. Inactivation of Cu,Zn-superoxide dismutase by intermediates of Maillard reaction and glycolytic pathway and some sugars. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(12):2039-42.

United States Environmental Protection Agency [EPA]. [base de dados na internet] [acesso em 1 de março de 2017] Disponível em: <https://www.epa.gov/air-trends/particulate-matter-pm25-trends>.

van der Vliet A. Nox enzymes in allergic airway inflammation. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(11):1035-44. Review.

Vanos JK. Children's health and vulnerability in outdoor microclimates: A

comprehensive review. *Environ Int.* 2015;76:1-15. doi: 10.1016/j.envint.2014.11.016. Review.

Veras MM, de Oliveira Alves N, Fajersztajn L, Saldiva P. Before the first breath: prenatal exposures to air pollution and lung development. *Cell Tissue Res.* 2017;367(3):445-455.

Viña J, Borrás C, Gambini J, Sastre J, Pallardó FV. Why females live longer than males: control of longevity by sex hormones. *Sci Aging Knowledge Environ.* 2005;2005(23):pe17. Review.

Vyklický L, Nováková-Tousová K, Benedikt J, Samad A, Touska F, Vlachová V. Calcium-dependent desensitization of vanilloid receptor TRPV1: a mechanism possibly involved in analgesia induced by topical application of capsaicin. *Physiol Res.* 2008;57 Suppl 3:S59-68.

Wages PA, Lavrich KS, Zhang Z, Cheng WY, Corteselli E, Gold A, Bromberg P, Simmons SO, Samet JM. Protein Sulfenylation: A Novel Readout of Environmental Oxidant Stress. *Chem Res Toxicol.* 2015;28(12):2411-8.

Wang IJ, Karmaus WJ, Yang CC. Polycyclic aromatic hydrocarbons exposure, oxidative stress, and asthma in children. *Int Arch Occup Environ Health.* 2017;90(3):297-303.

WHO – World Health Organization:
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/wha69-27-may-2016/en/>

Widdicombe J. Airway receptors. *Respir Physiol.* 2001;125(1-2):3-15. Review.

Yao H, Rahman I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;254(2):72-85.

Yates MS, Tran QT, Dolan PM, Osburn WO, Shin S, McCulloch CC, Silkworth JB, Taguchi K, Yamamoto M, Williams CR, Liby KT, Sporn MB, Sutter TR, Kensler TW. Genetic versus chemoprotective activation of Nrf2 signaling: overlapping yet distinct gene expression profiles between Keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis.* 2009;30(6):1024-31.

Zhu C, Wang S, Wang B, Du F, Hu C, Li H, Feng Y, Zhu R, Mo M, Cao Y, Li A, Yu X. 17 β -Estradiol up-regulates Nrf2 via PI3K/AKT and estrogen receptor signaling pathways to suppress light-induced degeneration in rat retina. *Neuroscience.* 2015;304:328-39.

Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 2007;10(3):277-9.