

KARLA BARROSO FEITOSA

**Caracterização do mecanismo de ativação da via de
sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações
deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona**

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

São Paulo

2018

KARLA BARROSO FEITOSA

**Caracterização do mecanismo de ativação da via de
sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações
deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona**

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

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

Versão original.

São Paulo

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Feitosa, Karla Barroso

Caracterização do mecanismo de ativação da via de sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona / Karla Barroso Feitosa; orientadora Soraia Katia Pereira Costa . -- São Paulo, 2018.
109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. 1,2-naftoquinona. 2. poluente ambiental. 3. quimiotaxia. 4. Inflamação alérgica. 5. remodelamento pulmonar. I. Costa , Soraia Katia Pereira, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karla Barroso Feitosa

Titulo da Dissertação/Tese: Caracterização do mecanismo de ativação da via de sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona

Orientador: Prof^a Dr^a Soraia Katia Pereira Costa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Efeito da exposição neonatal ao poluente ambiental 1,2-naftoquinona na inflamação pulmonar e função cardiovascular em camundongos: papel do dimorfismo sexual, dos receptores de potencial transiente (TRP), toll 4 (TLR4) e da apolipoproteína (APO-E)*", registrado sob o protocolo nº **48/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Soraia Katia Pereira Costa**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Charliston Alves da Cunha (Iniciação Científica), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Pós-Graduando), Simone Aparecida Teixeira (Técnico de laboratório), Leandro Rodrigues (Pós-graduando), Karla Barroso Feitosa (Pós-Graduando), Flávia Neto de Jesus (Pós-graduando), Leticia Zorante de Lucena (Iniciação Científica), Lucia Rossetti Lopes (Pesquisador Colaborador), Marcelo Nicolás Muscará (Pesquisador Colaborador), Antonio Garcia Soares Jr (Pós-Graduando), Juliana Florenzano Martorelli (Pós-Graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effect of neonatal exposure to the ambiente pollutant 1,2-naphthoquinone in the lung inflammation and cardiovascular function in mice: role of sexual dimorphism, transient receptors potential channels (TRP), toll 4 receptors (TLR4) and apolipoprotein (APO)*", protocol nº **48/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/8/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Soraia Katia Pereira Costa**

- Team members: *Charliston Alves da Cunha (Undergraduate Student), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Graduate Student), Simone Aparecida Teixeira (Laboratory Technician), Leandro Rodrigues*



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

(Graduate Student), Karla Barroso Feitosa (Graduate Student), Flávia Neto de Jesus (Graduate Student), Leticia Zorante de Lucena (Undergraduate Student), Lucia Rossetti Lopes (Colaborator Researcher), Marcelo Nicolás Muscará (Colaborator Researcher), Antonio Garcia Soares Jr (Graduate Student), Juliana Florenzano Martorelli (Graduate Student)

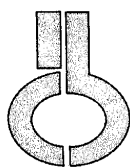
At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Mus musculus	C57BL/6	Macho/male	2-15 g	60
	C57BL/6 KO APO-E	Macho/male	2-15 g	42
	C57BL/6	Fêmea/female	2-15 g	60
	C57BL/6 KO Toll 4 (TLR4)	Macho/male	2-15 g	20

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 27 de setembro de 2014.

PARECER 1200/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, nesta data, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Caracterização do mecanismo de ativação da via de sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona*" da pesquisadora **Soraia Kátia Pereira Costa** e aluna **Karla Barosso Feitosa**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **27.09.2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

À minha família:

Minha mãe **Maria Lúcia Pereira dos Santos** (*in memoriam*). A ti, que te dispuseste a viver longe da terra que amava, dos amigos e familiares, para me apoiar e pela paciência (só sendo mãe para aguentar o meu mau humor). E mesmo partindo antes do fim dessa jornada se faz presente em meu coração, porque família é jamais esquecer.

À minha irmã **Keila** e minha sobrinha **Karolina**. Obrigada por ficarem sempre ao meu lado em todos os momentos e, principalmente, por me compreenderem todas as vezes que disse “hoje não posso”.

À **Tasha** e **Olaf**, meus pelucinhas, certeza da espera na porta e companhia constante a qualquer hora!

AGRADECIMENTOS

À profa. Dra **Soraia K P Costa**, mais que orientadora, um grande apoio e amiga. Obrigada por todo ensinamento adquirido e oportunidades. Acima de tudo, obrigada por ajudar minha família a permanecer reunida durante este período.

Ao prof. Dr. **Marcelo N Muscará**, pelas sugestões que muito contribuíram para este trabalho e pela confiança em trabalhos posteriores.

À **Mirtes Midori Tanae**, grande amiga, pelo incentivo ao doutorado em lugar tão distante e palavras encorajadoras quando tive medo de tentar.

À profa. Dra **Telma M T Zorn**, pela colaboração na parte histológica e especialmente ao Dr **Rodolfo Favaro**, pela disposição para auxiliar na técnica e avaliação imunohistoquímica. À **Fernanda Barrence**, minha gratidão pelo auxílio no preparo do material histológico e sua disposição para ajudar sempre que necessário, mesmo para doar sangue.

À prof. Dra **Carla M Prado** e sua aluna **Fernanda Roncon**, pelo auxílio nas técnicas imunohistoquímicas e por pacientemente ensinar a avaliação quantitativa e sempre estar disponível para dúvidas.

À profa. Dra **Heloísa H Ferreira**, pelo grande aprendizado em seu laboratório nas técnicas de quimiotaxia e adesão e a **Aline Sato**, muito obrigada por ser uma grande parceira na separação de eosinófilos!

Ao prof. Dr **Wothan Tavares** por disponibilizar seu laboratório para a avaliação da mecânica pulmonar e à **Maria Aparecida** que realizou os experimentos com muita dedicação.

À Dra **Simone A Teixeira**, você é o grande apoio do laboratório e um auxílio técnico inestimável. Muito obrigada por toda ajuda.

A todos os amigos do laboratório de Farmacologia e Bioquímica da Inflamação e Radicias Livres: **Antonio Soares, Karen Santos, Juliana Florenzano, Flavia de Jesus, Silvia Coavoy, Leandro Rodrigues, Filipe Mesquita, Elly A Neto, Flavia Batista, Tuanny Schmidt, Mariana Alves, Marcella Moro, Leonardo Marques, Carolina Marques, Anderson Romério, Andréia Almeida** e aos ICs **Ágata da Silva, Charlinston Alves, Mayrine Oliveira, Sibeile Silveira, Gabriel Luciano, Mariana Camilo**. Alguns a convivência foi por curto período, no entanto a todos agradeço pelo apoio não somente acadêmico, mas no pior momento que poderia passar ao final desta caminhada. O apoio de vocês foi essencial.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo apoio financeiro imprescindível para realização deste trabalho.

RESUMO

Feitosa, KB. Caracterização do mecanismo de ativação da via de sinalização do receptor da resposta inata TLR4 nas ações deletérias do poluente ambiental 1,2-naftoquinona. [Tese (Doutorado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo; 2018.

O aumento da poluição do ar ambiente (PAA) correlaciona-se com uma alta incidência de efeitos adversos na saúde da população, resultando em maior número de óbitos causados por complicações respiratórias e cardiovasculares, particularmente, em indivíduos suscetíveis (ex.: neonatos). Resultados do grupo mostram que camundongos neonatos C57Bl/6, quando expostos ao PAA 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), um dos contaminantes do MP eliminado na exaustão do diesel, exibem maior susceptibilidade à asma, paralelo ao aumento da resposta humoral e células Th2 / Th17, via mecanismo regulado por receptores da resposta inata TLR4. Os objetivos deste estudo consistem em: i) Avaliar os efeitos da exposição precoce à 1,2-NQ sobre a mecânica respiratória, além de caracterizar mecanismos celulares envolvidos na exacerbação dessa resposta em animais selvagens e nocautes TLR4, ii) Averiguar e validar em PMN obtidos de voluntários, a influência da 1,2-NQ sobre a funcionalidade dessas células e o papel dos TLR4. Camundongos selvagens e nocautes TLR4 (2 – 22 g) foram usados, expostos à 1,2-NQ, e os parâmetros funcionais e celulares avaliados. PMN foram obtidos do sangue periférico de voluntários saudáveis, e submetido ao teste de quimiotaxia em microplacas. Camundongos selvagens expostos à 1,2-NQ exibem alteração estrutural (remodelamento) no pulmão, caracterizada por aumento na produção de muco e da área/espessura da musculatura lisa peri-bronquica, que intensificou a hiperresponsividade das vias aéreas frente à MCh. No epitélio pulmonar dos animais selvagens expostos à 1,2-NQ, o desafio antigênico aumentou a imunorreatividade para ICAM, VCAM-1 e PECAM-1, sendo esse efeito (exceto PECAM-1) supresso em animais nocautes TLR4. A incubação da 1,2-NQ com os PMN humano não afetou a quimiotaxia frente ao fMLP. A 1,2-NQ favoreceu *per se* a quimiotaxia dos eosinófilos e aumentou a migração frente à eotaxina. Esse efeito foi bloqueado pelo LPS-RS. Conclui-se que os receptores TLR4 regulam a funcionabilidade dos PMN, sendo esse efeito controlado pela imunorregulação das ICAM-1 e VCAM-1 (mas não PECAM), atuando como feedback (+) na exacerbação da eosinofilia alérgica em pulmão de camundongos expostos à 1,2-NQ na fase neonatal. Em PMN humano, a 1,2-NQ regula a quimiotaxia e o mecanismo pode e o TLR4 está envolvido na resposta.

Palavras-chave: 1,2-naftoquinona. TLR4. Molecula de adesão. Quimiotaxia. Inflamação alérgica. Remodelamento pulmonar.

ABSTRACT

Feitosa, KB. Characterization of the activation mechanism involved in the TLR4 signaling pathway during the deleterious actions of the environmental pollutant 1,2-naphthoquinone. [Thesis (Doctorate in Pharmacology)] - Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo; 2018.

The increase in ambient air pollution (PAA) correlates with the higher incidence of adverse effects on the population health, resulting in a higher number of deaths due to respiratory and cardiovascular diseases, particularly in susceptible individuals (eg neonates). Previous results from our group show that neonates C57Bl / 6 mice, when exposed to 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ), one of the MP contaminants eliminated in diesel exhaust, exhibit a greater susceptibility to allergic lung inflammation, concomitantly with increased humoral response and Th2 / Th17 cells population, via mechanism dependent on the innate TLR4 response. The aims of this study are: i) To evaluate the effects of early exposure to 1,2-NQ on respiratory mechanics, besides characterizing cellular mechanisms involved in the exacerbation of this response in wild animals and TLR4 knockouts; ii) To verify and validate in PMN obtained from volunteers, the influence of 1,2-NQ on the functionality of these cells and the role of TLR4. Both wild mice (WT) and TLR4 knockouts (KO; 2-22 g) were used, and inhaled with the 1,2-NQ. The functional and cellular parameters were evaluated. PMN were isolated from the blood of healthy volunteers and submitted to chemotaxis on microplates. Wild mice exposed to 1,2-NQ exhibit structural alteration (remodeling) in the lung, characterized by increased production of mucus and increased area / peri-bronchial smooth muscle thickness, which led to airways hyperresponsiveness to MCh. In the lung epithelium of WT mice exposed to 1,2-NQ, the antigen challenge (OVA) increased the immunoreactivity for ICAM, VCAM-1 and PECAM-1, and this effect (except PECAM-1) was suppressed in TLR4 KO mice. Incubation of 1,2-NQ with human PMN did not affect the chemotaxis of cells against fMLP, although *per se* favored chemotaxis of eosinophils and increase eotaxin-induced chemotaxis. It is concluded that TLR4 receptors regulate PMN function, and this effect is controlled by the immunoregulation of ICAM-1 and VCAM-1 (but not PECAM), acting as feedback (+) in the exacerbation of allergic eosinophilia in the lung of mice exposed to 1,2-NQ in the neonatal phase. In human PMN, the 1,2-NQ regulates chemotaxis and TLR4 is involved in response.

Keywords: 1,2-naphthoquinone. TLR4. Adhesion molecule. Chemotaxis. Asthma. Pulmonary remodeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização TLR4.....	25
Figura 2: Óbitos atribuídos à poluição do ar ambiente (PAA) global no ano de 2016 com base em doenças cardiovasculares e pulmonares.....	27
Figura 3: Ativação metabólica do naftaleno à 1,2-NQ.....	32
Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental.....	38
Figura 5: Esquema da placa de quimiotaxia.....	48
Figura 6: Avaliação da mecânica respiratória (resistência das vias aéreas; R _n) após 24 h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal.....	53
Figura 7: Avaliação da mecânica respiratória (resistência do parênquima; G) após 24 h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal.....	54
Figura 8: Avaliação da mecânica respiratória (Elastância; H) após 24h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal.	55
Figura 9: Receptores TLR4 regula o remodelamento das vias aéreas induzido pela exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ.	57
Figura 10: TLR4 regula a deposição de fibras colágenas em vias aéreas de camundongos alérgicos expostos a 1,2-NQ no período neonatal.	59
Figura 11: Efeito da exposição neonatal à 1,2-naftoquinona sobre a produção de muco no epitélio das vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4.....	61
Figura 12: Análise imunohistoquímica para MMP9 em vias aéreas e parênquima de camundongos selvagens e nocautes TLR4 adultos pré-expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal.	63
Figura 13: Análise imunohistoquímica para IL-13 em vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4 expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	65
Figura 14: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 (selvagens e nocautes TLR4) expostos à 1,2-NQ na fase neonatal.	67
Figura 15: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 (selvagens e nocautes TLR4) expostos à 1,2-NQ na fase..	68
Figura 16: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão	69
Figura 17: Percentagem de apoptose inicial e tardia das células PMN (eosinófilos) após incubação com concentrações crescentes do poluente 1,2-NQ durante 20 minutos.....	71
Figura 18: Percentagem de apoptose inicial e tardia das células PMN (neutrófilos) após incubação com poluente 1,2-NQ durante 20 min	72
Figura 19: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i>	74
Figura 21: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de eosinófilos <i>in vitro</i>	77
Figura 20: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de eosinófilos <i>in vitro</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,2-DDN - trans-1,2-diidróxido-1,2-diidronaftaleno
1,2-DHN - 1,2-diidroquinaftaleno
1,2-NQ - 1,2-naftoquinonas
1,2-NQH2: 1,2-dihidroquinaftaleno
1,2-NQHG: monoglucuronídeo do 1,2-NQH2
1,2-NQR: radical semiquinona da 1,2-NQ;
1,2-NQ-SG: aduto glutatona (GSH) da 1,2-NQ
1,4-NQ - 1,4-naftoquinonas
AKR: aldo-ceto redutase
Al(OH)₃ – hidróxido de alumínio
AP-1 - fator de transcrição ativador de proteína
APCs – células apresentadoras de antígeno
C/EBPs
c-MAF - proto-oncogene
COPD - doença pulmonar obstrutiva crônica
CREB - proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
CS₂ - dissulfeto de carbono
CYP450 - citocromo P450
DCs - células dendríticas
DMSO – dimetilsulfóxido
ECD - ectodominio
EGF - fator de crescimento epidermal
EGFR - Fator de Crescimento Epidérmico
EMC - matriz extracelular
EMT - transição epitelial-mesenquimal
EPA - Agência de Proteção Ambiental
ERK1/2 - quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2
EROS - espécies reativas de oxigênio
fator de transcrição gênica T-bet
fatores de transcrição GATA-1
FcRI - receptores de alta afinidade ligados a IgE
G - resistência
GATA- fator de transcrição de ação "trans" específico de células T
GM-CSF - fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito
GPCR - receptores acoplados à proteína G
GSH: glutatona
GST: GSHT-transferase
H - elastância
H₂S - sulfeto de hidrogênio
HAP - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HB - hiperresponsividade brônquica
HC - hidrocarbonetos
HQ - hidroquinona
HSP - proteínas de choque térmico
HTAB – brometo de hexadeciltrimetil-amônio
HUVEC - células endoteliais de veia umbilical humana
IARC - Agência Internacional para Pesquisa do Câncer
ICAM-2 - molécula de adesão intercelular 2
IKK - complexo I Kappa B quinase

IL - interleucina
INF- β – interferon beta
INF- γ – interferon-gama
IRAK4 - quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1
IRF-3 fator de transcrição regulador de interferon do tipo 3
JAM - moléculas de adesão juncional
JNK - JUN N-terminal quinase
LFA-1 - antígeno associado à função leucocitária
LO - lipoxigenase
LPS - lipopolissacarídeos
LTB-4 - leucotrieno -4
MAC-1 - antígeno macrófago-1
MAP - proteína quinase ativada por mitógeno
MB - membrana basal reticular
MCh - metacolina
MCP-1 - proteína quimiotática de macrófagos-1
MD-2 - proteína de diferenciação mielóide 2
MEK1/2 – MAP/ERK1/2
MHC II - complexo principal de histocompatibilidade classe II
MKK 3/6 - MAP quinase quinase 3/6
MLB - células musculares lisas brônquicas
MMP9 - metaloproteinase de matriz 9
MP – material particulado
MRP: proteína associada à resistência multidroga
MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio
MyD88 - molécula adaptadora proteína 88 de resposta primária de diferenciação mielóide
NFATc - fator nuclear de células T ativadas
NF- κ B - fator de transcrição nuclear kappa B
NO - óxido nítrico
NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductase 1
Nrf2: fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2
OVA - ovalbumina
P450R: citocromo P450 redutase
PAA - poluição do ar ambiente
PAF - fator ativador de plaquetas
PAMPs - padrões moleculares associados à patógenos
PECAM-1 - molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1
PED – partícula de exaustão do diesel
PI3K - fosfoinosítideo-3 quinase
PLA₂ - fosfolipase A₂
PMN - leucócitos polimorfonucleares
PSGL-1 - glicoproteína ligante da P-selectina
PTKs - proteínas tirosina quinase
PTP1B - proteína tirosina fosfatase 1B
RANTES - regulada sob ativação e expressa e secretada pela célula T normal
Rn - resistência das vias aéreas
RRP - Receptores de Reconhecimento de Padrões
RTK – receptor tirosina quinase
SO₂ - dióxido de enxofre

STAT-1 - signal transducional-activated transcription 1
Syk - tirosina quinase do baço
TAB - quinase dependente de TGF β
TAK1 - quinase ativada pelo fator de transformação de crescimento β
TGF- β - fator transformador de crescimento β
Th2 - T helper 2
TIMP-1 - inibidor de metaloproteinase tecidual
TIR - domínio intracelular receptor Toll/IL-1
TIRAP - molécula adaptadora contendo domínio TIR
TLR - receptores tipo Toll
TNF- α - fator de necrose tumoral-alfa
TRAF 6 - fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
TRIF - molécula adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon β (IFN- β)
TRPV1 - canais receptores de potencial transitório vaniloide
TSLP - linfopoietina estromal tímica
UGT: uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase
VCAM-1 - molécula de adesão célula vascular 1
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular
VLA-4 - molécula de adesão tardio antígeno 4;
VOC – compostos orgânicos voláteis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>Inflamação alérgica</i>	17
1.2	<i>Remodelamento das vias aéreas</i>	20
1.3	<i>Receptor toll da imunidade inata e inflamação pulmonar</i>	22
1.4	<i>Poluição atmosférica e epidemiologia.....</i>	26
1.2	<i>Material particulado e o efeito biológico do contaminante eletrofilico 1,2-naftoquinona</i>	29
2	Justificativa deste estudo	35
3	Objetivos e estratégias para alcançá-los.....	36
4	material e métodos.....	37
4.1	<i>Ética em pesquisa: animais e seres humanos.....</i>	37
4.2	<i>Ensaio em modelo animal</i>	37
4.2.1	<i>Animais e exposição ao poluente 1,2-NQ.....</i>	37
4.2.2	<i>Indução da inflamação alérgica pulmonar.....</i>	38
4.2.3	<i>Avaliação da mecânica respiratória in vivo:</i>	39
4.2.3.1	<i>Preparo dos animais</i>	40
4.2.4	<i>Preparo do tecido pulmonar e caracterização dos perfis histopatológico e imunohistoquímico</i>	41
4.2.5	<i>Análise morfológica - remodelamento pulmonar</i>	41
4.2.6	<i>Determinação da produção de muco</i>	42
4.2.7	<i>Determinação de fibras colágenas</i>	42
4.2.8	<i>Expressão de moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, MMP9 e IL-13</i>	43
4.3	<i>Ensaio translacionais - Material biológico de voluntários</i>	44
4.3.1	<i>Obtenção de células polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico de voluntários saudáveis.....</i>	44
4.3.2	<i>Deteção de apoptose em eosinófilos e neutrófilos do sangue periférico de voluntários saudáveis.....</i>	46
4.3.3	<i>Ensaio de quimiotaxia de PMN in vitro.....</i>	47
	<i>Dosagem de peroxidase eosinofílica (EPO).....</i>	49
	<i>Dosagem de mieloperoxidase (MPO)</i>	49
4.3.4	<i>Viabilidade celular das PMNs via ensaio de MTT</i>	50
4.3.4.5	<i>Avaliação do perfil de expressão das moléculas de adesão em PMN humanos.....</i>	50
5	Resultados.....	52
5.1	<i>Avaliação dos parâmetros funcionais em camundongos selvagens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal</i>	52
5.1.1	<i>Exposição precoce a 1,2-NQ aumenta a resistência das vias aéreas</i>	52
5.2	<i>Avaliação de parâmetros inflamatórios e celulares em camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal</i>	56

5.2.2 Exposição precoce à 1,2-NQ estimula o remodelamento das vias aéreas em camundongos via TLR4: análise morfométrica	56
5.2.3 Receptor TLR4 regula a deposição de fibras colágenas em vias aéreas e vasos de camundongos expostos precocemente ao poluente 1,2-NQ.....	58
5.2.4 Produção de muco em camundongos expostos a 1,2-NQ: papel dos TLR4	60
5.2.5 Papel da metaloproteinase 9 (MMP-9) e TLR4 no aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar em camundongos expostos à 1,2-NQ	62
5.2.6 Papel da IL-13 na exacerbação da inflamação alérgica pulmonar em animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal	64
5.2.7 Regulação da expressão de moléculas de adesão no pulmão de camundongos expostos à 1,2-NQ quando neonatos: papel do TLR4	66
5.3 Estudos in vitro: Impacto da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade de PMN obtidos do sangue periférico de voluntários sadios.....	70
5.3.1 Determinação, via citometria de fluxo, da viabilidade celular de PMN obtidos do sangue periférico de voluntários sadios frente o poluente 1,2-NQ.....	70
5.3.2 Efeito da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade (atividade quimiotática) dos neutrófilos obtidos de voluntários sadios frente ao fMLP	73
5.3.3 Efeito da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade (atividade quimiotática) dos eosinófilos obtidos de voluntários sadios frente à eotoxina	75
6 DISCUSSÃO.....	78
7 RESUMO E CONCLUSÕES	92

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação alérgica

A inflamação é a resposta do organismo à uma infecção, lesão ou estresse tecidual e envolve uma cascata bem organizada de mudanças celulares dentro do tecido. Os mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, aminas biogênicas e eicosanoides, induzem alterações em diversos processos biológicos, variando de repostas vasculares locais à alterações da temperatura corporal.

Como o sistema imune é o principal contribuidor para a inflamação, as células imunes (macrófagos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos e linfócitos) têm papel importante nas respostas inflamatórias (Amin et al., 2012; Andersson et al., 2016). No entanto, células não imunes, como as células epiteliais, endoteliais e fibroblastos, também contribuem para o processo (Haj-Salem et al., 2018; Mitchell et al., 2017; Semlali et al., 2010; Shoda et al., 2016). De acordo com a natureza do estímulo, as vias inflamatórias e os tecidos-alvo variam significativamente.

Na asma alérgica, há associação com inflamação eosinofílica nas vias aéreas (Lu et al., 2010) caracterizada por sensibilização e resposta imune mediada por linfócitos T helper 2 (Th2). A diferenciação Th2 requer a cooperação de vários fatores promotores, incluindo moléculas co-estimulatórias e citocinas expressas por células dendríticas e inflamatórias. Os mediadores pró-inflamatórios derivados dos eosinófilos são os principais responsáveis pelos aspectos inflamatórios na asma, como: lesão e perda de células epiteliais das vias aéreas, disfunção dos receptores colinérgicos das vias aéreas, hiperresponsividade brônquica, hipersecreção de muco e remodelamento das vias aéreas, caracterizado por fibrose e deposição de colágeno (Kay, 2005; Watt et al., 2005; Kanda et al., 2009; Walsh, 2010).

A interação entre o epitélio das vias aéreas e o meio ambiente, é crucial para a patobiologia da asma, pois as células epiteliais iniciam a resposta ao alérgeno ou patógenos resultando na ativação de respostas imune que induzem a expressão de interleucina-33 (IL-33), interleucina-25 (IL-25) e linfopoietina estromal tímica (TSLP), que sensibilizam e estimulam a maturação de células dendríticas (DCs) e aumentam o recrutamento de células Th2 efectoras (Papazian et al., 2014; Oh et al., 2013). As células epiteliais das vias aéreas expressam receptores tipo Toll (TLR) (Davis et al., 2014), presentes também, em outras células como macrófagos, mastócitos,

eosinófilos e DCs. Nestas, a sinalização via TLR induz a expressão de moléculas co-estimulatórias e citocinas que também inicia o desenvolvimento de resposta imune específica.

As DCs desempenham um papel importante na ativação do sistema imune devido sua excepcional capacidade para apresentar antígenos aos linfócitos T naíve (Guermonprez et al., 2002). A polarização dos linfócitos T CD4⁺ em células Th1 e Th2 depende do estímulo do meio ambiente local. A polarização em Th1 é um processo mediado por um mecanismo dependente de signal transducional-activated transcription 1 (STAT-1) e fator de transcrição gênica T-bet (Ma et al., 2010; Neurath et al., 2002). Por sua vez, a polarização em células Th2 envolve STAT-6 e ativação de fatores de transcrição, incluindo proteína de ligação ao GATA (GATA-3), fator nuclear de células T ativadas e (NFATc) e proto-oncogene c-MAF (Maier et al., 2012; Umetsu et al., 2002).

Para desencadear a resposta imune, a internalização do alérgeno é facilitada por receptores de alta afinidade ligados a IgE (FcRI) presentes nas células dendríticas (Kitamura et al., 2007), onde é processado pela cathepsina S e os peptídeos resultantes são direcionados para o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC II), formando o complexo antígeno-MHC II que é apresentado na superfície das APCs. Este complexo interage com receptores antígeno-específicos nos linfócitos T, que são ativados por moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) (Croft, Dubey, 2017; Mellman et al., 2001).

As células T migram para as vias aéreas sob a influência de quimiocinas (CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 e CCL22) (Garcia et al. 2005; Kallinich et al.2005) e induzem a produção de citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13) e do fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito (GM-CSF). Essas citocinas recrutam células efectoras secundárias como macrófagos, basófilos e eosinófilos para o sítio inflamatório onde elas são sensibilizadas e ativadas promovendo a secreção de mediadores, leucocitose e produção de IgE (Kay, 2006; Ryu et al., 2006; Yang et al., 2017).

A IL-5 e IL-13 recrutam e ativam eosinófilos promovendo seu influxo via fatores de transcrição GATA-1, GATA-2, PU.1 e C/EBPs (McNagny et al., 1998; McNagny & Graf, 2002; Yu et al., 2002). O primeiro estágio é a mobilização de

células da medula óssea (MO) regulada principalmente pela IL-5 e quimiocinas (RANTES/CCL5 e eotaxina), enquanto IL-4 e IL-13 regulam a transmigração dos eosinófilos do leito vascular para os compartimentos teciduais, pelo aumento da responsividade à quimiotaxia, degranulação e produção de citocinas (Fulkerson and Rothenberg, 2013; Wen et al., 2013).

Os eosinófilos fluem pela corrente sanguínea e rolam até o endotélio vascular brônquico, onde ocorrem interações específicas entre as integrinas presentes em sua superfície (molécula de adesão tardio antígeno 4; VLA-4; CD49d/CD29; $\alpha 4\beta 1$) e os receptores de adesão na superfície do endotélio, a molécula de adesão célula vascular 1 (VCAM-1). Essa interação é regulada pela IL-13, que aumenta a adesão dos eosinófilos ao endotélio e este pode ser o mecanismo pelo qual a IL-13 promove o extravasamento de eosinófilos para as vias aéreas de asmáticos (Rifas, Cheng, 2003).

O recrutamento de neutrófilos induzido por alérgeno pode contribuir para a sensibilização e inflamação alérgica, indicando que estas células têm efeitos adicionais que regulam as respostas inata e adaptativa (Mantovani et al., 2011), induzindo uma resposta inflamatória que consiste em recrutar neutrófilos para as vias aéreas (Boldogh et al., 2005; Lommatzsch et al., 2006).

A regulação da migração e infiltração de neutrófilos na asma é direcionada pela interleucina-8 (IL-8) e o recrutamento induzido por esta quimiocina aumenta a liberação de O_2 , metaloproteinase de matriz 9 (MMP9), leucotrieno -4 (LTB-4) e fator ativador de plaquetas (PAF). Esses fatores resultam no movimento transmural e acúmulo de eosinófilos nas vias aéreas (Nakagome et al., 2012).

Na etapa inicial, ocorre a interação transitória entre P e E-selectinas do endotélio e a glicoproteína ligante da P-selectina (PSGL-1) presente nos neutrófilos que promove a captura da célula circulante para a parede do vaso. O neutrófilo possui em sua superfície o antígeno associado à função leucocitária (LFA-1) que interage com a molécula de adesão intercelular 2 (ICAM-2). Essa interação ativa várias quinases incluindo a tirosina quinase do baço (Syk), fosfoinositídeo-3 quinase (PI3K) e a proteína quinase ativada por mitógeno p38 que levam à ativação de integrina e adesão firme.

Posteriormente, a ligação LFA-1/ICAM-2 é substituída pela interação entre antígeno macrófago-1 (MAC-1, CD11b/CD18) / ICAM-1 (CD54). Os neutrófilos podem migrar através da barreira das células endoteliais por duas vias: a via paracelular (entre junções endoteliais) e transcelular (passando pelo citoplasma das células endoteliais) (Vestweber, 2012; Woodfin et al., 2010). Ambas as vias dependem de interações hemofílicas entre moléculas de adesão, como a molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1 (PECAM-1, CD31) e CD99, que são expressas tanto no endotélio quanto nos leucócitos (Carman, et al., 2008; Lou et al., 2007; Schenkel et al., 2007;). Outras moléculas, como moléculas de adesão juncional (JAM-A, JAM-B e JAM-C), também desempenham papéis essenciais na transmigração por meio de interações com a integrina Mac-1.

1.2 Remodelamento das vias aéreas

A avaliação do remodelamento das vias aéreas em humanos e em modelos animais, baseiam-se em análises histológicas por meio de fluorescência, técnicas imunohistoquímicas, microscopia eletrônica. O remodelamento é geralmente definido como mudanças na composição, distribuição, espessura, massa ou volume e/ ou número de componentes estruturais observados nas vias aéreas de indivíduos asmáticos comparados com indivíduos saudáveis (Bai 2010; Bergeron et al., 2009; Hirota, Martin 2013).

Essas alterações referem-se a vários tecidos como o epitélio das vias aéreas, tecido intersticial peribronquico, células da camada muscular lisa e vasculatura brônquica (Busse, 2010; Dilasser et al., 2018; Shoda et al., 2016). Essas modificações são as principais causas dos sintomas associados à diminuição da função pulmonar (Busse, 2010; Hartley et al., 2015; Malmström et al., 2015).

O epitélio das brônquias, é mais do que uma barreira física. Ele mantém a homeostase tecidual, mas quando a barreira imunológica é ativada, leva a uma resposta inflamatória aguda que pode se tornar patológica face a uma ativação crônica. Fatores de crescimento como o fator transformador de crescimento β (TGF- β) ou o fator de crescimento epidermal (EGF) passam por uma transição epitelial-mesenquimal (EMT) que leva à diminuição de *tight junctions* e ao aumento da

expressão de MMPs e componente da matriz extracelular (Doerner et al., 2009; Hackett et al., 2009).

O TGF- β é uma citocina produzida por varias células pulmonares incluindo células epiteliais, macrófagos, fibroblastos, linfocitos e eosinófilos. Ele induz à expressão de α -actina pelo fibroblasto e dessa forma, assume o fenótipo de miofibroblasto. Além disso, estimula a expressão e secreção de proteínas da ECM que inibem sua degradação. O nível elevado de TGF- β resulta no excesso de tecido fibroso e dessa forma, compromete a função do órgão e está relacionada à fibrose subepitelial, aumento do numero de fibroblastos nas vias aéreas e com a gravidade da doença (Flooge-Page et al., 2003; Kumar et al., 2004).

A espessura da parede das vias aéreas tem sido relacionada à gravidade da asma, considerando-se que em casos fatais, a espessura está aumentada até 230% quando comparada à indivíduos saudáveis e 150% em casos não fatais. As mudanças na espessura resultam das alterações de células epiteliais, fibrose subepitelial, aumento da camada muscular e de vascularização. O espessamento parece se correlacionar com a hiperresponsividade brônquica (HB) à metacolina (MCh).

Um dos fatores mais importantes relacionados a hiperresponsividade brônquica in vivo e in vitro e também à gravidade da asma, é o aumento da massa das células musculares lisas brônquicas (MLB) (James et al., 2012, Yick et al., 2012; Gosens, Grainge, 2015). Esse aumento pode resultar de hiperplasia (aumento no número de miócitos) ou de hipertrofia (aumento no tamanho do miócito), bem como da diferenciação e migração de miofibroblastos (Bara et al. 2010).

A hiperplasia muscular está correlacionada com o espessamento da membrana basal reticular (MB) e eosinofilia, mas não neutrofilia (Wilson et al., 2013, Elliot et al., 2015). Essas alterações incluem o aumento da deposição de proteínas da matriz extracelular (EMC) abaixo da membrana basal da camada muscular das vias aéreas e contribuem para o estreitamento e reversibilidade incompleta da obstrução do fluxo das vias aéreas em pacientes com asma.

O principal componente com papel integral no aumento da massa do MBL das vias aéreas de asmáticos, são os mitógenos. Os mitógenos são substancias químicas que estimulam a divisão celular e desencadeiam a mitose. Eles se ligam

aos receptores de tirosina quinase (RTK), receptores acoplados à proteína G (GPCR) e receptores de citocinas. Há inúmeros mitógenos como: TGF- β , IL-1 β , IL-6, tromboxanos, leucotrieno, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros. A regulação da mitogênese ocorre primariamente via sinalização PI3K e ERK, que ativam fatores de transcrição.

O TGF- β , é produzido por várias células como macrófagos, fibroblastos, linfócitos, células epiteliais e eosinófilos. Ele também é capaz de induzir a expressão e secreção de proteínas de ECM e inibir sua degradação. Isso pode levar à fibrose.

As MMPs pertencem à uma família de endopeptidases capazes de degradar moléculas de ECM. E o equilíbrio dinâmico entre MMP e seus inibidores, é o determinante do remodelamento de ECM. Na asma, a molécula de metaloproteinase mais importante é a MMP9 e seu inibidor, inibidor de metaloproteinase tecidual (TIMP-1). A ativação do TGF- β é dependente de MMP9. Por esse motivo, níveis elevados de MMP-9 podem estar relacionados à ativação de TGF- β e consequentemente, à produção de fibrose subseptal.

1.3 Receptor toll da imunidade inata e inflamação pulmonar

As células e moléculas da resposta inata não possuem memória; todavia, reconhecem imediatamente estruturas comuns compartilhadas pela grande maioria das ameaças, denominados padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), tais como LPS, resíduos de manose, dentre outras encontradas na superfície de microorganismos. Os PAMPs ativam a resposta imune inata, por interação com diferentes receptores conhecidos como Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais estão os receptores da família tipo Toll-like (TLRs), cujo mecanismo de interação relembra a reação antígeno e anticorpo (Vidya et al.,2018).

Os receptores TLRs pertencem à uma grande família de proteínas transmembrana do tipo 1, possuindo um domínio extracelular (ectodomínio-ECD) e cuja região C-terminal contém um domínio intracelular receptor Toll/IL-1 (TIR) (Kawai, Akira, 2011). Estão também amplamente distribuídos no interior de uma variedade de células, particularmente, fagócitos como os macrófagos e os leucócitos polimorfonucleares (PMN). Pelo menos 10 tipos de TLRs já foram identificados em seres humano, e 13 tipos foram identificados em camundongos.

Na membrana celular estão expressos os tipos TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 e TLR11, enquanto no interior das células estão os tipos TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 e TLR13 (Andrade et al., 2013; Vidya et al., 2018). As principais vias de sinalização dos TLRs dependem da ativação da molécula adaptadora proteína 88 de resposta primária de diferenciação mieloide (MyD88) ou da molécula adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon β (IFN- β) (TRIF), que culmina na ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e do fator de transcrição regulador de interferon do tipo 3 (IRF-3) que, subsequentemente, leva à gênese de citocinas pró-inflamatórias e do IFN- β (Hirotsu et al., 2005). O IFN- β , por seu turno, apresenta aspectos pró-inflamatórios, podendo exacerbar a inflamação mediada por células Th17 (Axtell et al., 2011), bem como estimular a adesão de eosinófilos à cultura de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) (Kobayashi et al., 2008).

Os receptores toll 4 (TLR4) foram inicialmente reconhecidos pela capacidade destes reconhecerem os PAMPs, mas atualmente sabe-se que essa sinalização não é restrita aos PAMPs, e se estende a uma variedade de sinais e estímulos, incluindo as proteínas de choque térmico [HSP] (Ohashi et al., 2000), marcadores de estresse oxidativo, elastase de neutrófilos (Frantz et al., 2001; Gerahgty et al., 2007) a fumaça do cigarro e outros poluentes como o material particulado (MP) presente na PAA (Doz et al., 2008; 2009; Maes et al., 2006; Mercer et al., 2006; Woodward et al., 2017; Zhang et al., 2006).

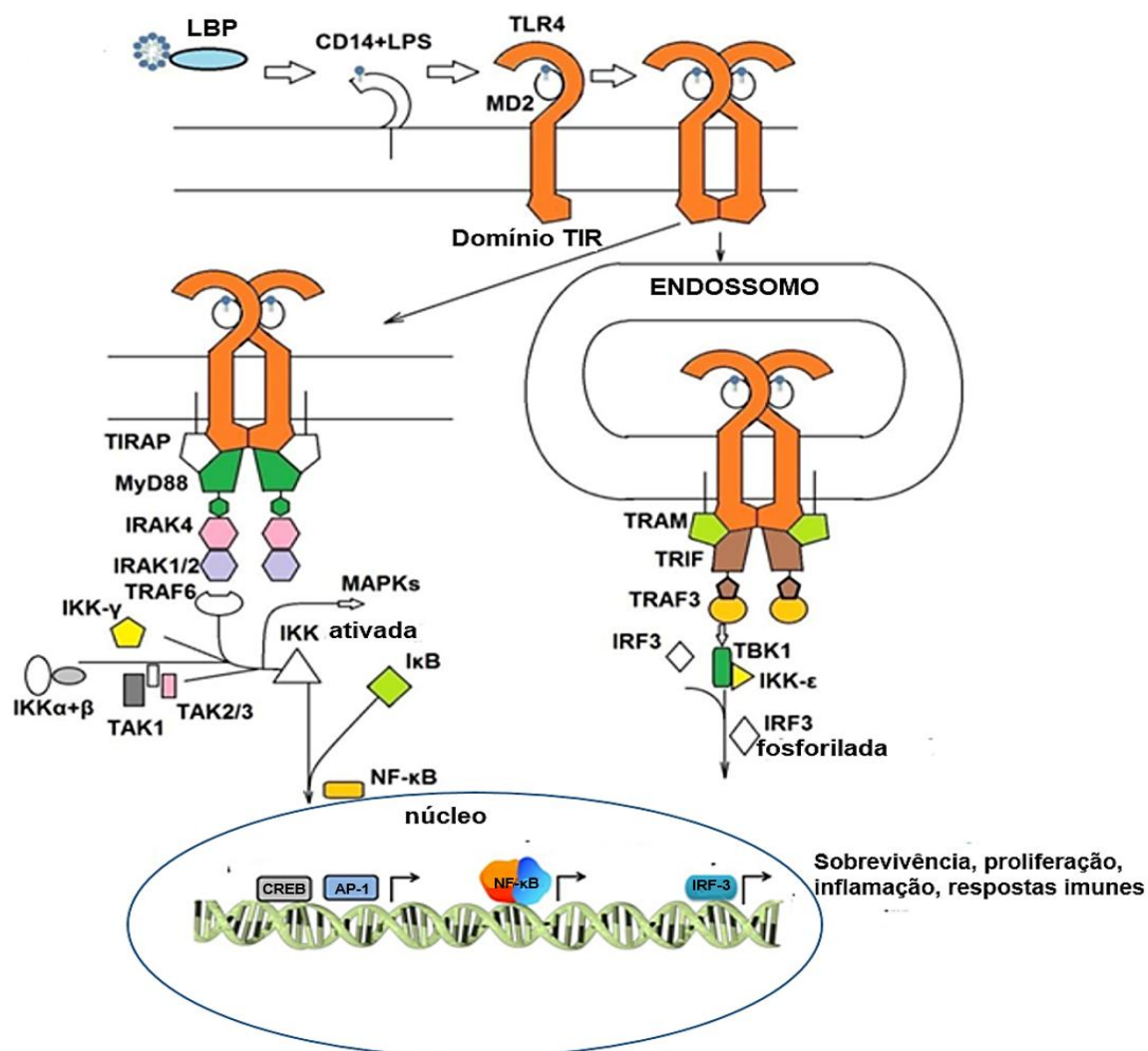
Classicamente, o LPS é reconhecido como um dos principais ligantes dos TLR4, capaz de promover a dimerização do receptor ou oligomerização via ligação do LPS à proteína de diferenciação mielóide 2 (MD-2) (Saitoh et al., 2004). O domínio intracelular do TLR4, na vigência do dímero ativado, recruta as moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF. Quando ativada, a via dependente de MyD88 estimula a biossíntese de alguns fatores de transcrição, incluindo o fator NF κ B e o fator de transcrição ativador de proteína (AP-1). Por sua vez, estes estimulam a biossíntese de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β). A estimulação da via dependente de TRIF ativa o IRF-3, o qual regula o IFN- β e a proteína 10 induzível por IFN- γ (Figura 4).

Alguns TLRs, incluindo o TLR4, podem ser ativados por ligantes endógenos, tais como as proteínas de choque térmico (HsP60, HsP70 e HsP90), fibrinogênio,

proteína surfactante A, fibronectina, sulfato de heparina e elastase (Bulut et al., 2002; Vabulas et al., 2002; Smiley et al., 2001; Guillot et al., 2002; Okamura et al., 2001; Johnson et al., 2002). Esses receptores, exceto TLR3, também compartilham mecanismos comuns de sinalização via molécula MyD88, que também participa da via de sinalização de receptores para IL-1 (IL-1RI e IL-18R). Quando estimulados, os TLRs recrutam MyD88 que, associada à quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK4), pode iniciar a ativação de outras moléculas como a IRAK1, o fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF 6) e o complexo quinase ativada pelo TGF- β /quinase dependente de TGF β (TAK1/TAB) (Figura 4). Essas moléculas fosforilam outras proteínas, como a proteína quinase ativada por mitógeno/ quinase regulada por sinal extracelular 1 e 2 (MAP/ERK1/2 - MEK1/2), MAP quinase quinase 3/6 (MKK 3/6), complexo I Kappa B quinase (IKK), levando consequentemente à ativação das quinases p38, JUN N-terminal quinase (JNK) e NF- κ B e proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (CREB) e, também, do AP-1 (Arthur, Ley, 2013; Li et al., 2010).

O mecanismo de ativação e sinalização alternativo para o TLR4 é dependente da ativação da molécula adaptadora contendo domínio TIR (TIRAP), que também resulta na ativação do NF- κ B, da p38, JNK e da ERK (Newton, Dixit, 2012). A ativação do TLR4 pode ainda ocorrer independentemente da via de MyD88, via TRIF, levando à ativação IRF-3 e NF- κ B (O'neil e Bowie, 2007), conhecido indutores da transcrição de genes para as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12. (Figura 1; Kuzmich et al., 2017).

Figura 1: Vias de sinalização TLR4.



As principais vias de sinalização dos receptores TLR4 pelo LPS envolvem o recrutamento das moléculas adaptadoras MyD88 e TRIF. Mecanismo de transdução de sinal pelo TLR4: o LPS não se liga diretamente ao TLR4, mas à proteína adaptadora MD-2 que reconhece e liga-se diretamente à parte lipofílica do LPS (lipídeo A) formando um complexo que se associa não-covalentemente ao TLR4 para formar o heterodímero ativado (LPS/MD-2/TLR4)₂. Este, por sua vez, inicia a sinalização intracelular. A interação com os adaptadores via TRIF ou MyD88 leva à ativação de NFκB e IRF3.

Chaves: MD-2 = proteína de diferenciação mielóide 2, TIRAP = proteína adaptadora contendo domínio TIR, TRIF = proteína adaptadora contendo domínio TIR indutora de interferon-β, TRAM = molécula adaptadora relacionada ao TRIF, IRF3 = fator de transcrição regulador de interferon do tipo 3, NFκB = fator nuclear κB fator de transcrição, AP-1 = fator ativador de proteína, IRAK4 = quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1, TRAF = fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral, TAK1/TAB = quinase ativada pelo fator de transformação de crescimento β/quinase dependente de TGFβ, MAPKs = proteína quinase ativada por mitógeno, IKK = complexo I Kappa B quinase, CREB = proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc (Adaptado de Kuzmich et al., 2017)

Em mamíferos, a família do NFκB compreende cinco fatores de transcrição intimamente relacionados, que atuam como homodímeros ou heterodímeros: p50/p105 (NF-κB1), p52/100 (NF-κB2), RelA (p65), c-Rel e RelB (Hayden e Ghosh, 2004, 2008). Em comum, os cinco membros compartilham um domínio homólogo Rel (RHD), responsável pela dimerização, translocação nuclear, ligação ao DNA e, também, pela interação com os inibidores de NFκB. Os fatores RelA (p65), c-Rel e RelB possuem também domínios de transativação na região C-terminal. Dentre as principais funções desses fatores, está bem estabelecido que o NFκB regula respostas imune e inflamatória, desenvolvimento, proliferação e sobrevivência celular frente à estímulos pró-inflamatórios, como as citocinas (Hayden e Ghosh, 2004, 2008).

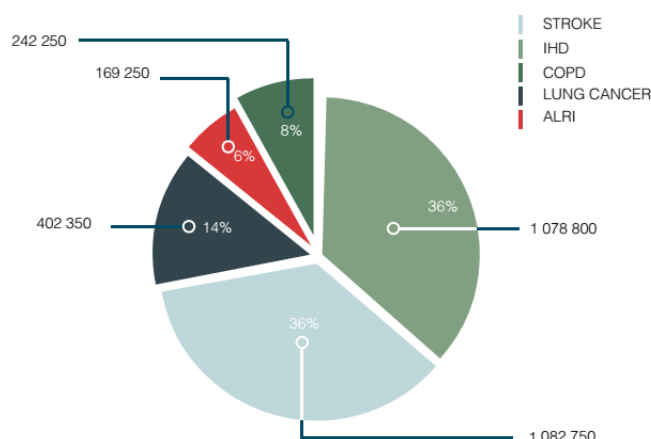
Dados epidemiológicos, genéticos, clínicos e experimentais indicam o potencial para o TLR4 iniciar ou exacerbar doenças alérgicas das vias aéreas (Simpson, Martinez, 2010; Zhu e tal, 2010). A prevalência da asma e alergias aumentou durante as décadas passadas e estudos epidemiológicos demonstram a ligação entre a rápida urbanização e industrialização e doenças respiratórias devido ao aumento da poluição do ar e exposição da população (He et al., 2017; Postma et al., 2017). O MP é um dos principais poluentes do ar e pode atuar como ligante dos TLR, modificando sua responsividade a outros ligantes e também a natureza do efeito inflamatório.

1.4 Poluição atmosférica e epidemiologia

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental (EPA), o ar ambiente é definido como aquele ar (porção da atmosfera) exterior aos edifícios em que os seres humanos e outros organismos em geral respiram ou têm acesso. Por sua vez, quando essa qualidade do ar é alterada por concentrações altas de substâncias contaminantes (poluentes atmosféricos) em relação ao do ambiente normal (atmosfera limpa), além da saúde humana, todos os tipos de ecossistemas tornam-se vulneráveis aos seus efeitos (Lovett et al., 2009, Dirnböck et al., 2017, Li et al., 2017).

Estudos sistemáticos de Carga de Doença Global (Global Burden of Disease Study, GDB, 2017), mostram que em 2016, a poluição do ar atmosférico (PAA) foi responsável por promover, aproximadamente, 4,1 milhões de mortes resultantes, principalmente, de complicações com doenças que afetam o sistema cardiovascular (72%) e, em torno de 28% daquelas associadas às doenças do aparelho respiratório, tais como as patologias infecciosas do aparelho respiratório inferior, doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) e o câncer de pulmão (Figura 2, adaptada WHO, 2016). Essa magnitude vem superando as mortes causadas alcoolismo (2,3 milhões), acidentes de trânsito (4,1 milhões) e desnutrição materna e infantil (1,4 milhões), indicando que, atualmente, a poluição do ar ambiente (PAA) representa um dos principais riscos à saúde humana a qual, paralelamente, onera o sistema público de saúde (HEI, 2018).

Figura 2: Óbitos atribuídos à poluição do ar ambiente (PAA) global no ano de 2016 com base em doenças cardiovasculares e pulmonares



O valor em % representa a fração de óbitos para cada doença com base no total (100%) de óbitos atribuídos à PAA (4,2 milhões de indivíduos). Adaptada do relatório da organização mundial da saúde publicado em 2016. WHO, 2016. **ALRI**=doença infecciosas do aparelho respiratório inferior, **lung cancer**= câncer de pulmão, **COPD**= doença pulmonar obstrutiva crônica, **stroke**= acidente vascular, **IHD**= isquemia cardíaca.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2016), uma grande porcentagem de vítimas (88%) reside em países de baixa e média renda, que representam 82% da população mundial. Nas regiões do Pacífico Ocidental e do Sudeste Asiático, 1,67 milhões e 936.000 mil óbitos, respectivamente, associados à PAA foram registrados, liderando assim o ranque das regiões mais afetadas pelos

efeitos fatais da PAA. As regiões do Mediterrâneo Oriental registraram 236.000 casos de óbitos relacionados à PAA, enquanto nos países em desenvolvimento da Europa, África e Américas, os registros de óbitos relacionados à PAA totalizaram 200.000, 176.000 e 58.000, respectivamente. Apesar do maior rigor no controle da poluição ambiental, os países mais ricos da Europa, Américas, Pacífico Ocidental e Mediterrâneo Oriental também registraram elevado número de óbitos associados à PAA, a saber: 280.000, 94.000, 67.000 e 14.000, respectivamente (OMS, 2014). Acrescenta-se ainda à essa estatística, o registro de óbitos na população rural afetada pela PAA, que previamente não era considerada. Compete ressaltar que o aumento global de óbitos resultantes dos efeitos tóxicos da PAA no ano de 2012 em relação à estimativa (1,3 milhões de óbitos) divulgada pela OMS, em 2008, se deve, principalmente, às formas de medidas mais efetivas disponíveis atualmente, que determinam a relação entre a exposição ao PAA e o impacto na saúde, além do uso de funções integradas de exposição e respostas.

No que tange ao dimorfismo sexual e o impacto da PAA, as análises global de óbitos relacionados às doenças decorrentes da PAA revelam que os homens (> 25 anos) são mais afetados do que as mulheres da mesma idade e as crianças com idade < 5 anos de idade (Global Burden of Diseases 2013, Lim et al., 2012; OMS, 2014).

Os ecossistemas em todo o planeta estão expostos a níveis críticos de PAA gerada, principalmente, por atividades humana, como a geração de energia, agricultura, o crescimento populacional e as mudanças nos padrões de consumo. Está bem estabelecido que os PAA podem ser liberadas de fontes naturais e antropogênicas (produzidas pelo homem), como a queima de combustíveis fósseis, dentre outras. Classificam-se, majoritariamente, em três categorias: material particulado suspenso (MP), poluentes gasosos (gases e vapores) e poluentes odoríferos. Por seu turno, o MP suspenso no ar compreende três tamanhos: partículas grossas MP_{10} ($> 2.5 \mu m$) “torácicas”, que penetram no trato respiratório inferior, as partículas finas $MP_{2.5}$ ($< 2.5 \mu m$) “respiráveis”, comumente liberadas por exaustão de motores a diesel (PED), queima/cinzas de carvão, poeiras minerais (ex.: amianto, calcário, cimento), dentre outros, capazes de alcançar regiões de trocas gasosas pulmonares. As partículas ultrafinas ($MP < 0.1 \mu m$), por sua vez, podem se

translocar das vias aéreas para outros compartimentos, via circulação sistêmica, a como o trato urinário, tireoide e glândulas salivares e outros locais distantes (Nemmar et al., 2002, Oberdorster et al., 2009, Terzano et al., 2010, Li et al., 2015, Hopkins et al., 2018).

Os PAA gasosos compreendem compostos de enxofre (ex.: dióxido de enxofre [SO₂]), azoto (ex.: óxido nítrico [NO]), orgânicos (ex.: hidrocarbonetos [HC], orgânicos voláteis [VOC] e aromáticos policíclicos [HAP]). Os compostos de enxofre, tais como o sulfeto de hidrogênio (H₂S), o dissulfeto de carbono (CS₂) e os mercaptanos constituem os agentes odoríferos mais conhecidos. A composição de PAA varia de acordo com a fonte de emissão e de fatores ambientais, tais como as condições meteorológicas, os dias da semana, atividades industrial e a densidade do tráfego dos veículos automotores (Miller et al., 2012). Ainda, a abrangência da PAA depende da distribuição e localização geográfica da fonte de emissão, bem como do t_{1/2} vida deste, podendo ocorrer em escala local (fluoreto de hidrogênio), urbana (óxidos de nitrogênio e CO), regional (partículas finas e O₃) ou hemisférica e global (CO₂, NO e CH₃OH).

1.5 Material particulado e o efeito biológico do contaminante eletrofilico 1,2-naftoquinona

Dentre as principais fontes emissoras urbanas do MP, estão a queima de combustível de fontes móveis (veículos) e estacionárias (indústrias). O MP além da sua heterogeneidade (MP_{0,1-10} µm), atua como verdadeiros “vetores” de substâncias químicas poluentes e materiais biológicos (microrganismos e alérgenos; Sandstrom et al., 2005, Oravisjärvi et al., 2014; Popovicheva et al., 2014). Particularmente, o MP_{2,5} (fino) liberado pela queima do diesel (PED; 20%) constitui um dos agentes mais danosos (Aphekom et al., 2011, WHO, 2013b), pois atua como vetor de mais de cem substâncias orgânicas e inorgânicas, metais, nitrato e outros elementos (Riva et al., 2011, Bates et al., 2015, Karavalakis et al., 2017). Ainda, a presença de núcleos carbônicos na composição das PED, favorece a adsorção de substâncias carcinogênicas, como o óxido de nitrogênio, monóxido de carbono, aldeídos e as quinonas. Vale ressaltar que a alta volatilidade das quinonas, favorece toxicidade seletiva para as vias respiratórias (Lin et al. 2005, Lyu et al., 2018).

Nesse contexto, os estudos experimentais (*in vivo* e *in vitro*) mostram que a exposição (aguda ou crônica) ao MP eliminado da combustão do diesel (PED) aumenta a morbidade e a co-morbidade de doenças respiratórias, como a fibrose pulmonar, alveolite crônica, reações alérgicas e o câncer de pulmão (Chang et al., 2004; Nikasinovic et al., 2004; Takizawa, 2004; Mauderly, 2010; Hazari et al., 2011; Wagner et al., 2012, Leiva et al., 2013). Assim, baseado em estudos de saúde ocupacional a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) re-classificou o DEP como carcinogênico para humanos (IARC, 2012, 2013).

Em termos mecanísticos, os efeitos adversos das PED sobre os distúrbios pulmonares se devem, em parte, à geração de espécies reativas que, consequentemente, induz ao dano celular causado por estresse oxidativo (Miura et al., 2011, Shang et al., 2014, Bates et al., 2015). Outros postulam que as ações tóxicas das PED são altamente influenciadas pela presença de substâncias aderidas à superfície do MP, particularmente as substâncias orgânicas (Benbrahim-Tallaa et al., 2012, Wierzbicka, et al., 2014). Destacam-se nessa classe, as naftoquinonas, derivadas do naftaleno (Figura 2; adaptada: Kumagai et al., 2012), o hidrocarboneto aromático polinuclear (HAP) simples e mais volátil, formado por dois anéis benzeno e amplamente distribuído na natureza.

A exposição ambiental às naftoquinonas é muito comum, pois a exposição ao seu precursor é significativa, uma vez que o naftaleno corresponde a mais de 99% da massa total de HAP presente na atmosfera e são componentes da PAA oriundas da engenharia de veículos pela queima incompleta de combustíveis fósseis, (ex.: petróleo), fumaça do cigarro e queima de biomassa (Kautzman et al., 2010, Vojtisek-Lom et al., 2015, Vu et al., 2015, Weichenthal et al., 2017). Vale ressaltar que o naftaleno encontra-se na lista dos 16 HPAs prioritários da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US Environmental Protection Agency, US EPA, 2005), sendo ainda considerado um dos principais responsáveis pela carcinogênese dos fumantes, conforme relatos da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (Grupo 2B, International Agency for Research on Cancer - IARC) (IARC, 2002, IARC, 2010).

O metabolismo do naftaleno resulta em duas formas isoméricas de substâncias altamente reativas: 1,4-naftoquinonas (1,4-NQ) e 1,2-naftoquinonas

(1,2-NQ) que são associadas aos efeitos tóxicos do naftaleno. A formação atmosférica das quinonas pode ocorrer via oxidação dos HAPs adsorvidos na superfície do MP pelo ozônio. Dessa forma, níveis da 1,2-NQ são detectadas em amostras de MP (Cho et al., 2004, Delgado-Saborit et al., 2013, Sousa et al., 2015, Verma et al., 2015).

A primeira etapa do metabolismo do naftaleno (Figura 3, Kumagai et al., 2012), via citocromo P450, resulta na formação do 1,2-epóxido, substância instável em pH fisiológico, capaz de reagir com a glutathione, formando conjugados ou pode ser convertida aos metabólitos 1-naftol (via isomerização química) ou trans-1,2-diidróxido-1,2-diidronaftaleno (1,2-DDN) via epóxido hidrolase. Estes produtos podem ser oxidados metabolicamente a 1,2-diidroquinaftaleno (1,2-DHN) ou ao seu produto oxidado eletrofílico, 1,2-NQ. A 1,2-NQ por sua vez, forma adutos depurinantes (1,2-DHN-1-N3Ade e 1,2-DHN-1-N7Gua) após sua reação com o DNA que constitui o mecanismo de iniciação do câncer (DeStefano et al., 2010; Saeed et al., 2007, 2009). O 1,2-di-hidroquinaftaleno e metabólitos conjugados são excretados na urina como glucuronídeos. Os conjugados de glutathione e de cisteína são excretados na biliar.

Achados prévios deste grupo mostram que a co-administração, pela via intra-traqueal (i.tr.), da 1,2-NQ com baixas doses da PED, causou potente inflamação neurogênica nas vias aéreas inferiores (traqueia e brônquios) de ratos, comparado com o efeito desses poluentes administrados isoladamente, via mecanismo dependente da ativação de canais receptores de potencial transitório vaniloide (TRPV1) presentes em fibras sensoriais C, que inervam as vias respiratórias que, leva à subsequente liberação de neuropeptídeos, como a substância P (Teles et al., 2010). Previamente, Kikuno e colaboradores (2006) observaram que a aplicação da 1,2-NQ em traqueia isolada de cobaia *in vitro*, induziu contração nessa estrutura, via mecanismo dependente da fosforilação de proteínas tirosina quinase (PTKs), que subsequentemente causa transativação do receptor de Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). Esse receptor, quando ativado, estimula vias de sinalização do TRPV1 presentes em fibras C, além de ativar as enzimas fosfolipase A₂ (PLA₂) e a lipoxigenase (LO), que contribuem para elevar a [Ca²⁺]. De forma mecânica semelhante, outro estudo em cultura de células de linhagem humana (A431), transfectada com a enzima β-galactosidase lacZ (pcDNA/His-lacZ), usada como gene repórter, ou com a proteína tirosina fosfatase 1B [PTP1B] (pcDNA/His-PTP1B), demonstrou que a adição da 1,2-NQ nessa cultura, promoveu transativação persistente do receptor EGFR, possivelmente via inativação irreversível da PTP1B (Iwamamoto et al., 2007). Em várias culturas de células comuns ao aparelho respiratório (ex.: macrófagos alveolares, linhagem celular murino [RAW 264.7], células epiteliais pulmonares [Il A549, humana (THP-1)], a adição da 1,2-NQ, 2-metil-1,4-NQ e outras quinonas promoveu nessas células, estresse oxidativo e apoptose (Miura et al., 2011; Shang et al., 2013; Shimada et al., 2012).

Mais recentemente, outros estudos do grupo revelaram susceptibilidade diferencial conforme a idade (neonato vs. adulto) e sexo (dimorfismo sexual) para os efeitos deletérios da exposição ao poluente 1,2-NQ sobre as vias aéreas. De acordo com Florenzano e colaboradores (2017), a exposição inalatória precoce (fase neonatal) de camundongos machos e fêmeas ao poluente 1,2-NQ promoveu maior susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar em camundongos machos na fase juvenil comparado ao respectivo grupo de fêmeas expostas ao mesmo tratamento. Nos camundongos machos, esta inflamação foi caracterizada pelo maior infiltrado de

eosinófilos no parênquima e lavado broncoalveolar (LBA), maior concentração de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5), supressão das defesas antioxidantes e ativação dos canais receptores de potencial transitório com repetições de anquirina (TRPA1), reforçando assim o possível dimorfismo sexual ao impacto da 1,2-NQ e o papel dos TRP como potencial alvo do PAA 1,2-NQ e/ou das EROs formadas por estes (Deering-Rice et al., 2011, 2016).

Segundo achados parcialmente publicados do grupo por Santos e colaboradores (2014a,b), a exposição (inalatória) aguda de camundongos C57BL/6 adultos e neonatos ao poluente 1,2-NQ potencializou a inflamação alérgica pulmonar somente no grupo de animais adultos expostos ao poluente na fase neonatal, indicando que os neonatos apresentam maior risco de complicações respiratórias dependentes desse PAA. Ainda, segundo os autores, essa exacerbação da inflamação alérgica foi caracterizada por intensa eosinofilia no LBA associada à elevada concentração pulmonar de LTB₄, resposta humoral (IgE), maior expressão do PDL-1 e dos fatores de transcrição (GATA3, T-bet), da população de células T CD8⁺, além de estimular a translocação nuclear da subunidade p50 do NF-κB, e a expressão proteica da HSP70, descrito previamente como ligante dos TLR. Os autores concluíram que essa resposta pulmonar evocada pela 1,2-NQ é também regulada por ativação direta e indireta dos receptores de resposta imune inata TLR4. Outras evidências reforçam os resultados do grupo e sugerem que a amplificação de genes que codificam os TLR4 frente ao PAA, regula também o reconhecimento da resposta imune inata (inflamação), reforçando assim a importância do TLR4 como alvo regulador das alterações da função respiratória promovidas pela PAA (Vawda et al., 2014).

Em contrapartida, estudos do grupo do Prof. Kumagai (Inoue et al., 2007a) sugerem que a exposição de camundongos ICR adultos à naftoquinona ou fenantraquinona potencializa, de forma dose-dependente, a inflamação pulmonar alérgica, concomitantemente com o aumento da expressão local de citocinas Th2 (IL-4, IL-5), eotaxina e proteína quimiotática de macrófagos-1 (MCP-1). Ainda, em baixas doses a hidroquinona (HQ), metabolito tóxico do benzeno comum na fumaça de cigarro, afeta a função de neutrófilos circulantes, suprimindo assim a resposta imune inata a gênese de mediadores inflamatórios (ex.: citocinas) frente à injeção de

lipopolissacarídeos (LPS) ou à infecção bacteriana, via mecanismo regulado pela supressão da translocação nuclear do NF- κ B, independentemente de efeito apoptótico ou de mecanismos de sinalização regulados por TLR4 (Hebeda et al., 2012; Shimada et al., 2012). Em ratos, a exposição por via inalatória à HQ (12,5-50 ppm durante 1h por cinco dias) também aumentou a expressão de integrinas (β 2 e β 3) e da molécula glicoproteica PECAM-1 (CD31) em neutrófilos (Ribeiro et al., 2011).

2 JUSTIFICATIVA DESTE ESTUDO

O impacto da poluição atmosférica, particularmente das PED, na saúde humana, associados aos achados prévios do grupo e de outros poucos vem demonstrando que o contaminante químico das PED, a 1,2-NQ, pode representar um dos principais PAA, capaz de promover aumento de susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar e outros efeitos lesivos,

Apesar da 1,2-NQ possuir propriedades químicas de interesse toxicológico, como a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), favorecimento de ligações covalentes com proteínas nucleofílicas (ex.: cisteína, histidina e lisina) e inativação de proteínas celulares (Endo et al., 2011, Kumagai et al., 2002), as ações adversas desse PAA na saúde ainda é pouco explorada.

Em vista disto, esta proposta conta com apelo translacional, pois visa estabelecer/validar *in vitro* em linhagem celular humana (HUVEC) se a exacerbação da inflamação alérgica pulmonar em camundongos, oriunda da exposição na fase neonatal ao poluente ambiental 1,2-NQ, afeta os mecanismos de adesão e quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos (do sangue de voluntários sadios) ao endotélio (HUVEC).

Acredita-se ser pertinente aprofundar esse conhecimento, uma vez que resultados prévios do grupo (e outros) sugerem que os TLR4 atuam como elos críticos nos efeitos deletérios da 1,2-NQ no sistema imune inato de roedores e, assim, representam potenciais alvos farmacológicos para o controle de doenças inflamatórias associadas à exposição aos poluentes ambientais, como as quinonas.

3 OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS PARA ALCANÇÁ-LOS

1. Avaliar comparativamente os efeitos causados pela exposição na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ camundongos selvagens C57BL/6, na fase adulta, sobre a mecânica respiratória
2. Caracterizar o perfil (expressão e funcionalidade) das moléculas de adesão de superfície celular no pulmão de camundongos adultos selvagens e nocautes TLR4 expostos a 1,2-NQ na fase neonatal;
3. Avaliar o remodelamento no pulmão de camundongos adultos selvagens e nocautes TLR4 expostos a 1,2-NQ na fase neonatal
4. Averiguar a influência do poluente 1,2-NQ nas funções (quimiotaxia e adesão) de leucócitos PMN (eosinófilos e neutrófilos) periféricos obtidos de voluntários sadios à cultura de HUVEC, bem como correlacionar o efeito com a expressão/geração de moléculas (quimiocinas/citocinas) envolvidas no recrutamento de eosinófilos (ex.: eotaxina/fMLP);

Estratégias

1. A mecânica respiratória foi avaliada quanto à alterações na resistência das vias aéreas (Rn), resistência do tecido (G) e elastância do parênquima pulmonar(H).
2. Para avaliar a expressão das moléculas de adesão no parênquima pulmonar foi empregado técnicas de imunohistoquímica para identificar a ICAM-1 (CD54), VCAM-1 (CD106) e PECAM (CD31)
3. Para análise do remodelamento foram empregadas as técnicas de imunohistoquímica (MMP9 e IL13) colorações específicas para visualização de muco (PAS-AB), deposição de fibras colágenas (picrossírius red), análise morfométrica (H&E).
4. A funcionalidade de PMN humano frente à 1,2-NQ foi avaliada pela técnica de quimiotaxia in vivo e por WB para avaliar transcrição and translação de genes e proteínas que codificam o receptor TLR4.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Ética em pesquisa: animais e seres humanos*

Neste estudo foram realizados ensaios experimentais em modelo animal bem como em material biológico obtido de seres humanos. Para tanto, os experimentos em animais foram realizados mediante a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 48/2016. Os protocolos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os experimentos realizados com o material humano (sangue) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas (CEPSH/ICB) da Universidade de São Paulo, sob o protocolo número 1200/CEPSH.

4.2 *Ensaio em modelo animal*

4.2.1 *Animais e exposição ao poluente 1,2-NQ*

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens e nocautes para receptores TLR4, de acordo com estudo prévio do grupo (Santos et al., 2014).

Grupos de camundongos C57BL/6 neonatos selvagens ou TLR4^{-/-} foram expostos, via inalatória, à solução do poluente 1,2-NQ (100 nM, 10 mL; 15 min -10 µg/m³ na câmara) ou seu veículo (0.001:0.001:99.998% DMSO:Tween:PBS) durante 3 dias alternados (6º, 8º e 10º dias de vida) (Figura 4) de forma randômica. Para isto, no máximo, 4 a 5 camundongos neonatos foram colocados numa cuba de polietileno hermeticamente fechada (área de 600 cm²) e acoplada ao inalador ultrassônico (Mod. Respiramax - NS, São Paulo, Brasil) cuja capacidade de nebulização é de 1 mL/min. Após cada exposição ao poluente ou veículo, os animais foram colocados nas caixas de origem em racks ventilados AL20, ALESCO, SP, Brasil) com as respectivas mães em área específica do laboratório até o período do desmame (22

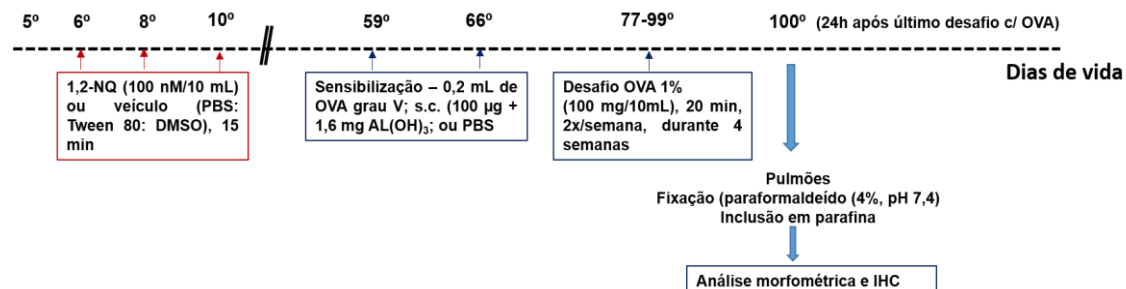
dias de vida), quando então foram separados por gênero em grupos de 4 a 5 animais e mantidos até a fase adulta.

4.2.2 Indução da inflamação alérgica pulmonar

Os camundongos adultos (25 g) inalados previamente (fase neonatal) com a 1,2-NQ ou respectivo veículo foram sensibilizados, via subcutânea (s.c.), com a OVA (Grau V; 10 µg em 0,2 ml de PBS adsorvida em 1,6 mg de Al(OH)₃) ou veículo (PBS/ Al(OH)₃) no 59º e 66º dias de vida. A partir do 77º dia de vida, os animais foram desafiados, via inalatória, com a solução de OVA (1%, 10 ml, 20 min) ou veículo (10 ml de PBS, 20 min), duas vezes por semana durante quatro semanas (Figura 4).

Ao final dos tratamentos (100 dias de vida), os animais foram divididos em quatro grupos experimentais e empregados nos ensaios descritos a seguir.

Figura 4: Representação esquemática do protocolo experimental



Camundongos neonatos (selvagens e nocautes) foram expostos à solução de 1,2-NQ (100 nM; 10 mL; 15 min) ou veículo e submetidos, na fase adulta, ao estímulo alérgico com OVA (sensibilização s.c., dia 0 e 7 e desafio 2x/semana; 4 semanas pela via nasal). Após 24h do último desafio, os pulmões foram fixados em paraformaldeído (4%, pH 7,4) e incluídos em parafina para posterior análise morfométrica e imunohistoquímica.

Tabela 1: Relação dos grupos experimentais:

GRUPOS	TRATAMENTOS	DESAFIO	ABREVIATURA	n
Controle	Veículo (PBS:Tween80:DMSO)	PBS	Veículo	3
Poluente	1,2-NQ (100 nM)	PBS	1,2-NQ	4
Alérgico	Veículo (PBS:Tween80:DMSO)	OVA 1%	V+OVA	4
Poluente alérgico	1,2-NQ (100 nM)	OVA 1%	1,2NQ+OVA	6

4.2.3 Avaliação da mecânica respiratória *in vivo*:

O aparelho de ventilação mecânica (FlexiVent, SCIREQ, Montreal, Quebec, Canadá) foi utilizado para avaliar o sistema respiratório, utilizando o modelo matemático de fase constante (Hantos *et al.*, 1992), onde o sistema respiratório é considerado como multicompartimental e as vias aéreas são avaliadas separadamente do parênquima pulmonar. Nesse modelo, calcula-se a impedância do sistema respiratório (Z_{rs}) dos animais de cada grupo, utilizando-se um sinal de perturbação de 3s e os seguintes dados foram coletados: a posição do pistão (V_{cyl}) e a pressão interna do cilindro (P_{cyl}) durante os 3 s da perturbação. A perturbação de 3 s é composta por uma soma de senóides com frequências primas que vão de 1 a 20,5 Hz. Para o cálculo dos dados foram feitas correções, considerando-se as perdas devido à compressibilidade dos gases. V_{cyl} foi corrigido para obter-se o volume que efetivamente chega ao animal (V) e P_{cyl} foi corrigido, originando o valor da pressão de abertura das vias aéreas (P_{ao}). Através da derivação no tempo V , obteve-se o fluxo (V').

Para a análise das impedâncias obtidas, utilizou-se a seguinte equação descrita por Hantos (1992):

$$Z_{rs}(f) = R_{aw} + \frac{i \cdot 2 \cdot \pi \cdot f \cdot I_{aw} + G - i \cdot H}{(2 \cdot \pi \cdot f)^\alpha}$$

onde $Z_{rs}(f)$ é a impedância da via aérea em função da frequência, R_{aw} é a resistência das vias aéreas, i é a unidade imaginária, f é a frequência, I_{aw} é a inertância das vias aéreas, G caracteriza a dissipação de energia no tecido pulmonar, H caracteriza a energia acumulada no tecido pulmonar e α onde \arctan é o arco tangente.

$$\alpha = \frac{2}{\pi} \cdot \arctan \left[\frac{H}{G} \right]$$

Os parâmetros avaliados por este modelo foram a resistência das vias aéreas (R_n), resistência (G) e elastância (H) do parênquima pulmonar. Nesse modelo matemático, como em outros, há o controle de um coeficiente de determinação

(COD), que avalia se o modelo matemático foi aplicado corretamente. O COD é fornecido na forma numérica, onde 1 representa uma concordância de 100% entre os dados obtidos experimentalmente e o ajuste na aplicação do modelo matemático. Foram considerados válidos os dados obtidos que apresentaram COD maior ou igual a 0,85.

4.2.3.1 Preparo dos animais

Os animais foram anestesiados com cetamina (144 mg/kg) e xilazina (13,8 mg/kg) por via intraperitoneal e permaneceram nesta condição durante todo o procedimento experimental da avaliação da mecânica respiratória. Quando necessário, houve suplementação anestésica (30% da dose inicial). Os animais foram traqueostomizados para inserção de uma cânula metálica (0,838 mm de diâmetro interno e 12,7 mm de comprimento). Paralelamente, a veia jugular direita foi canulada com um cateter de polietileno. Encerrado estes procedimentos os animais foram conectados ao FlexiVent e submetidos aos seguintes parâmetros de ventilação pulmonar: volume corrente, 10 ml/kg; frequência, 150 ciclos/ minuto e PEEP (positive end-expiratory pressure), 3 cm/H₂O. A seguir os animais receberam uma dose de relaxante muscular (Pancuron®, 1 mg/kg, *ip*).

Decorridos 7 min da injeção do relaxante muscular, o volume de 20 µL de uma solução salina tamponada com fosfato (PBS) por 10 g de peso animal foi injetado por meio de uma cânula inserida na veia jugular direita dos animais. A seguir, foi realizada uma curva dose-resposta frente à injeção endovenosa (veia jugular) do agonista de receptor muscarínico, metacolina (MCh), nas doses de: 30, 100, 300 e 1000 µg/kg em um volume de 20 µL/10 g de peso de camundongo. Os parâmetros avaliados por este modelo foram a resistência das vias aéreas (R_n), resistência (G) e elastância (H) do parênquima pulmonar, e os dados utilizados foram o pico de resposta para cada dose.

4.2.4 Preparo do tecido pulmonar e caracterização dos perfis histopatológico e imunohistoquímico

Após 24 h da última exposição à OVA , os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de isoflurano (3% em oxigênio, via inalatória) e a cavidade torácica foi exposta. A artéria pulmonar foi canulada e o pulmão foi perfundido com 5 ml de salina heparinizada (5 UI/ml). A seguir, o pulmão limpo foi removido, seccionado e fixado por 24 h em solução de paraformaldeído (4%, pH 7,4). Os espécimes pulmonares obtidos foram então incluídos em parafina (paraplast; Histosec, Merck; EUA) e depois seccionados no sentido transversal (5 µm) com o auxílio de micrótomo (American Optical Corporation - modelo Spencer 820; EUA). Após montadas em lâminas de vidro, as seções foram desidratadas e diafinizadas em concentrações crescentes de álcool (70%-100%) e xilol 100% (2x). Quando necessário, as amostras foram submetidas às colorações específicas para análises morfométricas/remodelamento pulmonar e observação das características histológicas gerais (hematoxilina e eosina; H&E), produção de muco (alcian blue /ácido periódico de Schiff (AB/PAS) em pH2,5 ou imunorreação para quantificação de moléculas de adesão.

4.2.5 Análise morfométrica - remodelamento pulmonar

Foram utilizadas cinco vias aéreas de cada amostra do corte pulmonar corada com H&E obtida dos diferentes grupos experimentais de camundongos. Cinco bronquíolos com 150-200 µm de diâmetro foram selecionados e analisados em cada seção. As áreas da camada epitelial (WAt) e da camada de músculo liso (WAm) foram determinadas por análise morfométrica (Image pro Plus 4.5, MediaCybernetics Co., Bethesda, MD, USA) em seções transversas. O perímetro da membrana basal foi medido para normalização das áreas do epitélio e camada muscular. A espessura da camada muscular foi medida do limite mais interno até o limite mais externo em 4 sítios pré-determinados (12, 3, 6 e 9 horas) dos 5 bronquíolos selecionados, obtendo-se um valor médio da espessura. Da mesma forma, a espessura do epitélio foi medida em 4 sítios, da membrana basal até a região apical das células epiteliais,

obtendo-se a média. A quantificação da área do epitélio e da camada muscular foi determinada selecionando-se manualmente toda a área do epitélio ou da camada muscular e esta foi calculada por meio do software pela razão: WAt/Pbm e WAm/Pbm, de acordo com Chen et al (2011). Os resultados foram expressos como $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ (área) e μm (espessura).

4.2.6 Determinação da produção de muco

A mensuração do conteúdo de muco (ácido ou neutro) do epitélio respiratório (pulmões) de camundongos dos diferentes grupos experimentais (Tabela 01) foi realizada via coloração dos cortes com o ácido periódico e reativo de Schiff/alcian blue (PAS/AB), com coloração de fundo pela hematoxilina, em pH 2,5, conforme descrito previamente. Esta técnica cora glicoproteínas ácidas em azul e as neutras em vermelha.

Após desparafinização hidratação (xilol absoluto I e II, etanol 100-70%), as lamínas foram submersas em solução de Alcian blue 1% (pH, 2,5) por 5 minutos. Após lavar em água corrente por 5 minutos, as lamínas foram submersas em solução de ácido periódico por 40 minutos. As lamínas foram lavadas rapidamente em água e submersas em reativo de Schiff por 1h e em seguida em água sulfurosa 3 minutos. Após, as lamínas foram lavadas em água corrente por 1h e submersas em hematoxilina de Meyer.

Para quantificação, cinco bronquíolos (150-200 μm de diâmetro) foram selecionados e as imagens foram obtidas com auxílio de microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japan) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). Utilizando o software Image Pro Plus 4.5 (MediaCybernetics Co., Bethesda, MD, USA), a área a ser examinada foi selecionada e um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado para quantificação da produção de muco. O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total.

4.2.7 Determinação de fibras colágenas

Foi utilizado o kit Picosírius-hematoxilina (Easy Path). Após desparafinização e reidratação, os cortes foram cobertos com Picosírius por uma hora. Após esse

período, foram lavados com água corrente por 3 minutos. Os cortes foram então, cobertos com solução de hematoxilina de Carazzi por 4 minutos. Em seguida, as lamínas foram lavadas por 5 minutos em água corrente, desidratadas em série de álcool ascendente até xilol e montadas. As imagens foram analisadas sob luz polarizada.

Para quantificação, cinco bronquíolos (150-200 µm de diâmetro) foram selecionados e as imagens foram obtidas com auxílio de microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japan) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). Utilizando o software Image Pro Plus 4.5 (MediaCyberneticsCo.,Bethesda, MD, USA), a área a ser examinada foi selecionada e um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado para quantificação da deposição de fibras colágenas. O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total.

4.2.8 Expressão de moléculas de adesão VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, MMP9 e IL-13

Após desparafinização e reidratação, os cortes histológicos foram incubados em tampão contendo citrato de sódio (0,05% tween, pH 6.0; 96 °C, 10 min) para recuperação antigênica. Após resfriamento e para o bloqueio da peroxidase endógena, as seções foram tratadas com H₂O₂ 1% (v/v) em tampão PBS (22 °C, 45 min). Cada uma das etapas posteriores foi seguida por lavagem das amostras em tampão PBS (100 mL, 5 minutos), exceto antes da incubação com o anticorpo primário, feito em câmara úmida. Os sítios inespecíficos foram bloqueados com soro de coelho (doador do anticorpo secundário) diluído PBS/BSA 10% por 1h, em temperatura ambiente 22 °C. Em seguida, as seções tratadas foram incubadas durante toda a noite com o anticorpo Rabbit polyclonal anti-VCAM-1 (1:100), anti-ICAM-1 (1:400) e anti-PECAM-1 (1:200) (R&D Systems, Ann Arbor, EUA) ou Goat polyclonal anti-MMP9 (1:500) e anti-IL13 (1:500) Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) com diluído em PBS/Tween 20 0,3% a 4°C, *overnight*. Adiante, as seções foram incubadas por 1h com anticorpo secundário cabra anti-coelho conjugado com biotina (1:2000) (Rockland Immunochemicals Inc., USA) ou coelho anti-cabra conjugado com biotina (1:1000) (Sigma, St. Louis, MO, USA) diluído em PBS, em temperatura ambiente. A reação de imunoperoxidase foi seguida pela

incubação com o complexo estreptavidina (Vectastin ABC Kit; Vector Laboratories, USA) para amplificação do sinal por 1h em temperatura ambiente. A reação foi visualizada após adição de 1 gota de 3-3'-diaminobenzidina (Pierce, Rockford, EUA) em PBS com H₂O₂ 0,03% (v/v) durante 3 minutos e contra-coradas com hematoxilina de Harris.

Para quantificação, cinco bronquíolos (150-200 µm de diâmetro) ou 5 áreas do parênquima pulmonar foram selecionados e as imagens foram obtidas com auxílio de microscópio Nikon Eclipse E600 (Nikon, Japan) acoplado à câmera digital Olympus DP-72 (Olympus, Japão). Utilizando o software Image Pro Plus 4.5 (MediaCyberneticsCo.,Bethesda, MD, USA), a área a ser examinada foi selecionada e um filtro de cores pré-estabelecidas foi aplicado para quantificação da área positiva para ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1. O resultado foi expresso como porcentagem de área positiva em relação à área total.

4.3 Ensaios translacionais - Material biológico de voluntários

4.3.1 Obtenção de células polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico de voluntários sadios

Eosinófilos

O sangue periférico de voluntários adultos do sexo feminino e masculino (idade média:35 anos) foi coletado, conforme Hansel et al., 1991, e deste, isoladas as células polimorfonucleares (PMN; neutrófilos e eosinófilos) via centrifugação em gradiente de Percoll (Sigma Chem. Co., EUA).

Para obtenção dos eosinófilos, o volume de 60 ml de sangue total obtido via canulação da veia do antebraço com escalpe safety lock e tubo para coleta a vácuo contendo heparina (Becton, Dickinson&Co., New Jersey, USA). O sangue foi diluído em meio RPMI pH 7.4 (1:1). Para cada gradiente, 15 ml da solução de Percoll ($\rho = 1.089$) preparada (percoll 9,5 ml + HBSS [10x] 1,5 ml e água destilada 4 ml) foi misturada ao volume de 30 ml do sangue diluído e submetido à centrifugação (700x g; 4°C, 20 min). O botão celular (PMN) formado foi tratado com o tampão de lise

contendo cloreto de amônia (NH_4Cl ; 35 mL; 4°C , 15 min) para lise das hemácias e novamente submetido à centrifugação ($300 \times g$; 4°C , 10 min) e a duas sessões de lavagens com PBS. Quando necessário, choques hipotônicos foram aplicados às amostras celulares para eliminação de potencial contaminação com hemácias (3 mL de água destilada e após 25 segundos, foi adicionado 1 mL de NaCl 3,6%), seguida por centrifugação ($300 \times g$; 4°C , 10 min). A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer, enquanto a análise diferencial destas foi feita, via análise de microscopia ótica, em esfregaço preparado pela técnica de citocentrífuga e corada com Diff-Quick.

A suspensão celular foi conservada (em temperatura igual a 4°C) até a separação dos eosinófilos via emprego do sistema magnético de separação de células (MACS; Miltenyi Biotec Inc., Bergisch-Cladbach, Alemanha), conforme Hansel et al. (1991).

Para isto, a suspensão de PMN obtida acima foi centrifugada e o botao celular formado foi ressuspenso no volume de 27 μL de partículas magnéticas ligadas ao anticorpo anti-CD16 para a proporção de 5×10^7 células. A mistura foi mantida resfriada (4°C ; 30 min), à qual foi adicionada 1 mL do tampão PBS/BSA (0,5%/EDTA, 2 mM). Esta mistura foi transferida para coluna de separação (VariosMAC, Miltenyi Biotec Inc., Bergisch-Cladbach, Alemanha) e, após passagem das células, a coluna foi lavada com 30 mL do PBS/BSA/EDTA. O efluente coletado da coluna foi lavado ($300 \times g$; 20°C , 10 min) e amostras de células submetidas à contagem diferencial em lâmina preparada em citocentrífuga e corado com Diff-Quick. A viabilidade dos eosinófilos foi mensurada em câmara de Neubauer para uma suspensão preparada com 50 μL da suspensão de eosinófilos/neutrófilos e 50 μL do corante vital azul de trypan (0.25% em salina). O resultado de viabilidade dessas células foi calculado baseando-se no número de células mortas (corada de azul) em cada 100 células (Strober, 2001). As células foram ajustadas na concentração desejada (4×10^6 ou 7×10^4 células/mL) para cada ensaio.

Neutrófilos

Os neutrófilos foram isolados do sangue (20 mL) coletado como descrito anteriormente e imediatamente esse volume foi disposto sobre o gradiente de Ficoll ($\rho = 1.077$; 10 mL) histopaque ($\rho = 1.119$ g/L; 10 mL) em tubo plástico (50 ml). Após centrifugação (700 g; 20°C, 30 min), a camada de PM N situada entre as fases do 1.077 e 1.119 foi lavada em PBS e as hemácias foram lisadas com o tampão de lise contendo cloreto de amônia (NH_4Cl ; 35 ml; 4°C, 15 min) para lise das hemácias e novamente submetido à centrifugação (300 x g; 4°C, 10 min) e a duas sessões de lavagens com PBS. Quando necessário, foi realizada a lise hipotônica (3 mL de água destilada e após 25 segundos, foi adicionado 1 mL de NaCl 3,6%), seguida por centrifugação (300 x g; 4°C, 10 min). As células lavadas foram ressuspensas em meio RPMI sem o vermelho de fenol. Amostras de 100 μL células (2×10^6 células) foi disposta em lamina de vidro via técnica de citocentrífuga para contagem diferencial e para contagem total, as células foram diluídas 1:20 e, líquido de Türk e a leitura foi efetuada em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi feita utilizando-se a técnica de exclusão do Trypan blue, conforme descrito anteriormente e as células foram ajustadas na concentração desejada (4×10^6 ou 1×10^6 células/mL) para cada ensaio.

4.3.2 Detecção de apoptose em eosinófilos e neutrófilos do sangue periférico de voluntários sadios

Foi realizado conforme o protocolo do kit PE Annexin V Apoptosis Detection (BD Pharmingen™). Eosinófilos ou neutrófilos foram isolados, conforme item 5.3.1. As suspensões celulares (10^6 células/tubo) foram incubadas com 1,2-NQ (10,30 e 100 nM) ou veículo por 20 minutos a 37 °C e 5% de CO_2 . Após a incubação as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação de anexina V. Adicionou-se 5 μL de anexina V PE e 5 μL de 7-Amino-Actinomycin (7-AAD). Incubou-se por 15 minutos a temperatura ambiente (25 °C) ao abrigo da luz. Após este período, adicionou-se 400 μL de tampão de ligação. Como controles para compensação e determinar os quadrantes, foram utilizadas células não marcadas, células marcadas com anexina V (sem 7-AAD) e células marcadas com 7-AAD (sem anexina V). As células não marcadas foram usadas para definir o

nível basal de células apoptóticas e mortas. A leitura foi realizada no citômetro Navios (Beckman&Coulter), onde foram coletados 10.000 eventos.

As células com membranas intactas excluem o 7AAD, enquanto as membranas de células danificadas e mortas são permeáveis ao 7AAD. A associação dos reagentes (anexina V + 7AAD) é capaz de identificar: células em processo de apoptose precoce (anexina V positivas e 7AAD negativas) e no estágio final de apoptose, em necrose, ou já mortas (anexina V e 7AAD positivas). As análises foram realizadas utilizando-se o software FACS Diva (BD-Bioscience; EUA).

4.3.3 Ensaio de quimiotaxia de PMN *in vitro*

Os ensaios de quimiotaxia *in vitro* foram realizados via emprego de placas de microquimiotaxia de 96 poços (ChemoTx 101-5, Neuroprobe; EUA; Figura 5), conforme Frevert (1998). Os poços foram preenchidos com o agente quimiotático eotaxina (29 μ L; 100 ng/mL) ou fMLP (5×10^{-8} M) e o filtro de polycarbonato (5 μ m) foi colocado sobre os poços da placa de microquimiotaxia. Paralelamente, amostras de eosinófilos ou neutrófilos foram submetidas aos seguintes protocolos:

Protocolo1: o volume de 25 μ L das suspensões de eosinófilos ou neutrófilos (4×10^6 células/mL) foi disposto sobre o filtro de polycarbonato em placa cujos poços foram preenchidos com o poluente 1,2-NQ (10 a 100 nM) como agente quimiotático e incubada por 2 horas em estufa (5% de CO₂, 37°C).

Protocolo2: As suspensões de eosinófilos e neutrófilos (4×10^6 cel/mL) foram incubadas com o poluente 1,2-NQ (10-300 nM), veículo ou RPMI (37 °C, 20 min) em estufa (5% CO₂).

Protocolo 3: As suspensões de eosinófilos (4×10^6 cel/mL) foram incubadas com o poluente 1,2-NQ (10-300 nM), veículo ou RPMI (37 °C, 20 min) em estufa (5% CO₂). Algumas amostras foram pré-incubadas com o antagonista de TLR4 LPS-RS 10 ng/mL por 30 minutos (5% de CO₂, 37°C), depois foram centrifugadas (300 x g, 5 min, 20 °C) e ressuspensas em meio RPMI (suplementado com soro e antibiótico) e tratadas com 1,2-NQ (10-300 nM) por 24h (5% de CO₂, 37°C),

Em seguida, as amostras foram centrifugadas (300 x g, 5 min, 20 °C) e as células foram ressuspensas em meio RPMI (suplementado com 10% de soro fetal

bovino (FBS) e penicilina (100 UI/mL) - estreptomicina (100 µg/mL)) e incubadas com 1,2-NQ (10-300 nM) por 24 h.

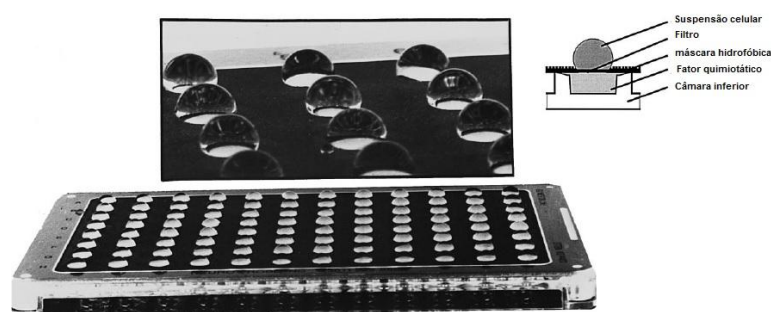
Tabela 2: Esquema de tratamento das suspensões celulares (eosinófilos/neutrófilos)

	Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3
Agente quimiotático	1,2-NQ (10-100 nM)	Eotaxina (100 ng/mL)	Eotaxina (100 ng/mL)
Tratamento células	-----	1,2-NQ (10-300 nM) - 24h	LPS-RS (30 min) 1,2-NQ (10-300 nM)-24h
Suspensão celular	25 µL	25 µL	25 µL

Após os tratamentos dos protocolos 2 e 3, o volume de 25 µL das suspensões de eosinófilos ou neutrófilos (4×10^6 células/mL) foi disposto sobre o filtro de polycarbonato e a placa foi incubada por 2 horas em estufa (5% de CO₂, 37°C; Figura 4). Ao mesmo tempo, a quimiotaxia espontânea foi verificada substituindo-se o agente quimiotático (eotaxina ou fMLP) pelo RPMI 1640. Após essa etapa, a suspensão celular residual (parte superior do filtro) foi removida e a placa submetida à centrifugação (200 x g; 5 min à 20 °C). O filtro foi cuidadosamente removido e o volume restante de poço corrigido para o volume de 29 µL. As placas de quimiotaxia de eosinófilos foram reservadas à temperatura de -20 °C para posterior quantificação via dosagem da atividade de EPO.

Nas placas de quimiotaxia dos neutrófilos, o volume de 29 µL foi transferido para uma placa de 96 poços, ao qual foi acrescentado o volume de 14,5 µL de brometo de hexadeciltrimetil-amônio (HTAB). A placa foi reservada à temperatura de -20 °C para posterior dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO).

Figura 5: Esquema da placa de quimiotaxia.



Dosagem de peroxidase eosinofílica (EPO)

Para quantificação da quimiotaxia de eosinófilos, 15 µl do volume de cada poço foi transferido para a placa de 96 poços e o volume ajustado para 50 µl com RPMI para dosagem de peroxidase eosinofílica (EPO). A cada poço foi adicionado o volume de 50 µL do substrato da EPO (1mM H₂O₂, 1mM OPD e 0.1% Triton X-100 em tampão Tris, pH 8). Após 30 min de incubação (22 °C), a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄, 4M. A absorbância foi medida a 490 nm no leitor de microplaca (VersaMax, Molecular Devices). O número de células que migraram para a parte inferior da placa foi determinado via medida residual da EPO. As placas foram mantidas em freezer -20°C por uma noite antes da verificação do conteúdo de EPO. Em cada experimento, os ensaios foram realizados em triplicata. O volume de 50 µL da suspensão de eosinófilos em diferentes concentrações (0,7-7x10⁴ cél/mL) foi adicionado em cada poço da placa de 96 poços para construção da curva padrão. A concentração celular foi calculada comparando-se a absorbância das amostras com as obtidas na curva padrão.

Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

Aliquotas de 10 µL da suspensão as amostras congeladas em HTAB foram transferidas para microplaca de 96 poços e adicionou-se 190 µL de solução de dihidroclorato de o-dianisidina (16,7 mg de o-dianisidina + 90 mL de H₂O bidestilada + 10 mL de tampão fosfato de potássio pH 6,0 + 50 µL de H₂O₂ (1%)). Após 15 min de incubação (22 °C), a reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 4M. A absorbância foi medida a 460 nm no leitor de microplaca (VersaMax, Molecular Devices). O número de células que migraram para a parte inferior da placa foi determinado via medida residual da MPO. Os ensaios foram realizados em triplicata. O volume de 10 µL da suspensão de neutrófilos em diferentes concentrações (0,1-1x10⁶ cél/mL) foi adicionado em cada poço para construção da curva padrão. A concentração celular foi calculada comparando-se a absorbância das amostras com as obtidas na curva padrão.

4.3.4 Viabilidade celular das PMNs via ensaio de MTT

Neste ensaio colorimétrico, as células viáveis reduzem o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais produzindo o sal formazan que é insolúvel em água, mas solúvel em solventes orgânicos. A suspensão de eosinófilos e neutrófilos (4×10^6 cel/mL) foram incubadas com 1,2 NQ (10, 30 ou 100 nM) ou seu veículo 2 h (eosinófilos e neutrófilos) a 37 °C e 5% CO₂. Após o períodos de incubação, os poços foram lavados com PBS pH 7,4 e adicionou-se 100 µL/poço de MTT (0,5 mg/mL em PBS), em triplicata. Incubou-se por 3 horas à 37°C, 5% CO₂, ar úmido. Após a incubação, a placa foi centrifugada (1800 RPM, 20 °C, 10 min) e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados 100 µL/poço de DMSO puro. Após 15 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, homogeneizou-se o conteúdo de cada poço e o volume de 100 µL foi transferido para outra placa. A leitura foi realizada a 590 nm em leitor de placa SpectraMax e o valor expresso como densidade óptica (O.D).

4.3.4.5 Avaliação do perfil de expressão das moléculas de adesão em PMN humanos

Eosinófilos ou neutrófilos foram isolados, conforme itens 4.3.1.1 e 4.3.1.2, e então lavados com PBS. As suspensões celulares (10^6 células) foram ressuspensas em 200 µL do tampão PBS (0,01% de BSA e 0,1% de azida; Sigma, EUA) e incubadas com anticorpos monoclonais fluorescentes, anti-CD49d (cadeia $\alpha 4$ da integrina VLA-4; 5 µL) conjugado R-PE, anti-CD11a (cadeia α do LFA-1; 5µL) conjugado com PE-CY7, anti-CD11b conjugado com FITC (10 µL) durante por 30 minutos, à 4°C, ao abrigo da luz.

4.4 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 estatísticas foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (software GraphPad Prism 5.03). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos parâmetros funcionais em camundongos selvagens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal

5.1.1 Exposição precoce a 1,2-NQ aumenta a resistência das vias aéreas

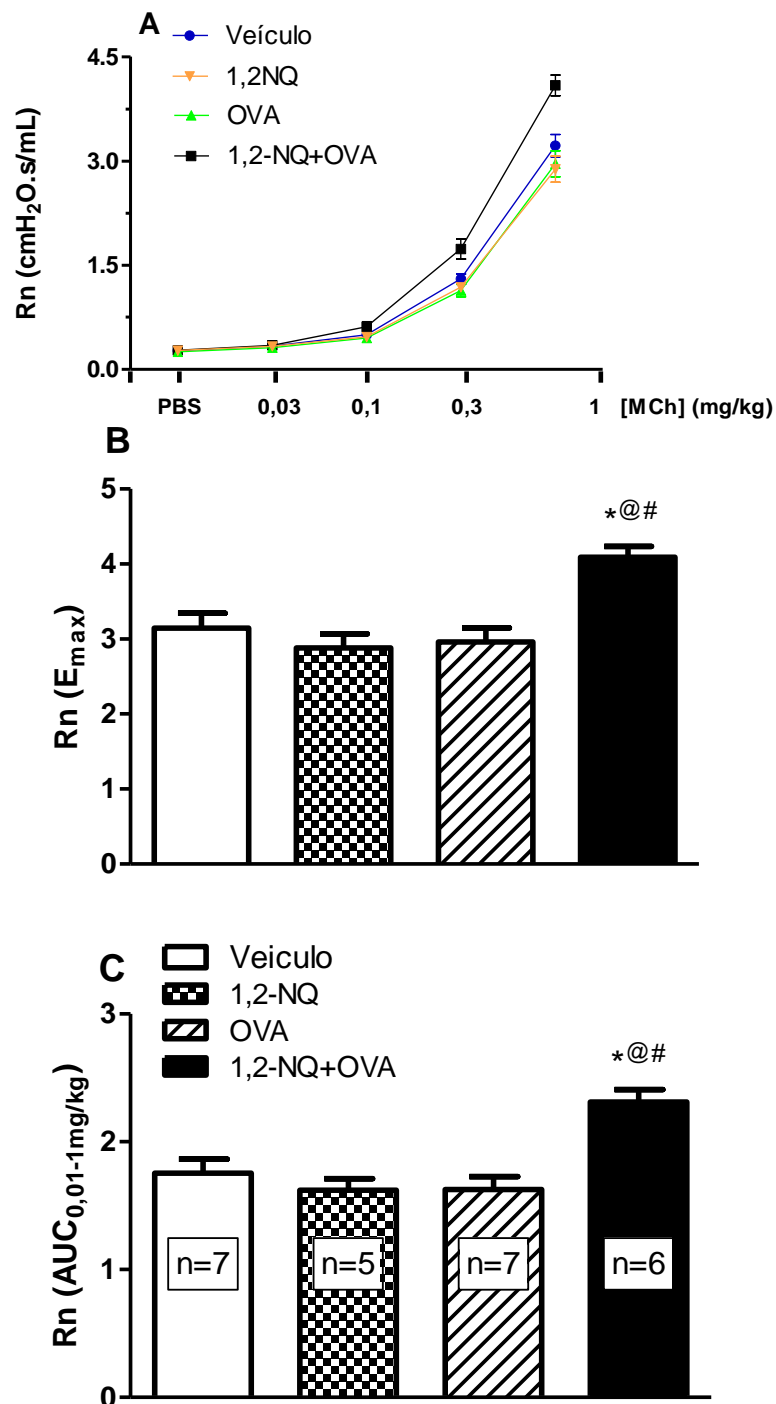
Em camundongos selvagens alérgicos e expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ, a administração e.v. de MCh (0,01 – 1 mg/kg) na fase adulta promoveu aumento significativo na resistência das vias aéreas (R_n) destes (Figura 6, painel A), conforme avaliado pela resposta máxima (E_{max} ; Figura 6, painel B) e área sob a curva (AUC; Figura 6, painel C), e comparado aos respectivos grupos de animais controle (veículo do poluente), expostos ao poluente (1,2-NQ) e veículo da OVA ou expostos ao veículo do poluente e OVA (Figura 6, painéis A, B e C).

Da mesma forma, o estímulo alérgico com OVA em camundongos adultos expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ promoveu aumento significativo na resistência do parênquima (G) destes (Figura 7, painel A) frente à curva-dose resposta à MCh, conforme também avaliado pela resposta máxima (E_{max} ; Figura 7, painel B) e área sob a curva (AUC; Figura 7, painel C), em relação aos respectivos grupos de animais controle (veículo do poluente), expostos a 1,2-NQ e veículo ou expostos ao veículo do poluente e OVA (Figura 7, painéis A, B e C).

O estímulo alérgico com OVA em camundongos adultos expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ não promoveu aumento significativo na elastância do tecido (H) destes (Figura 8, painel A) frente à curva-dose resposta à MCh, conforme também avaliado pela resposta máxima (E_{max} ; Figura 8, painel B) e área sob a curva (AUC; Figura 8, painel C), em relação aos respectivos grupos de animais controle (veículo do poluente), expostos a 1,2-NQ e veículo ou expostos ao veículo do poluente e OVA (Figura 8, painéis A, B e C).

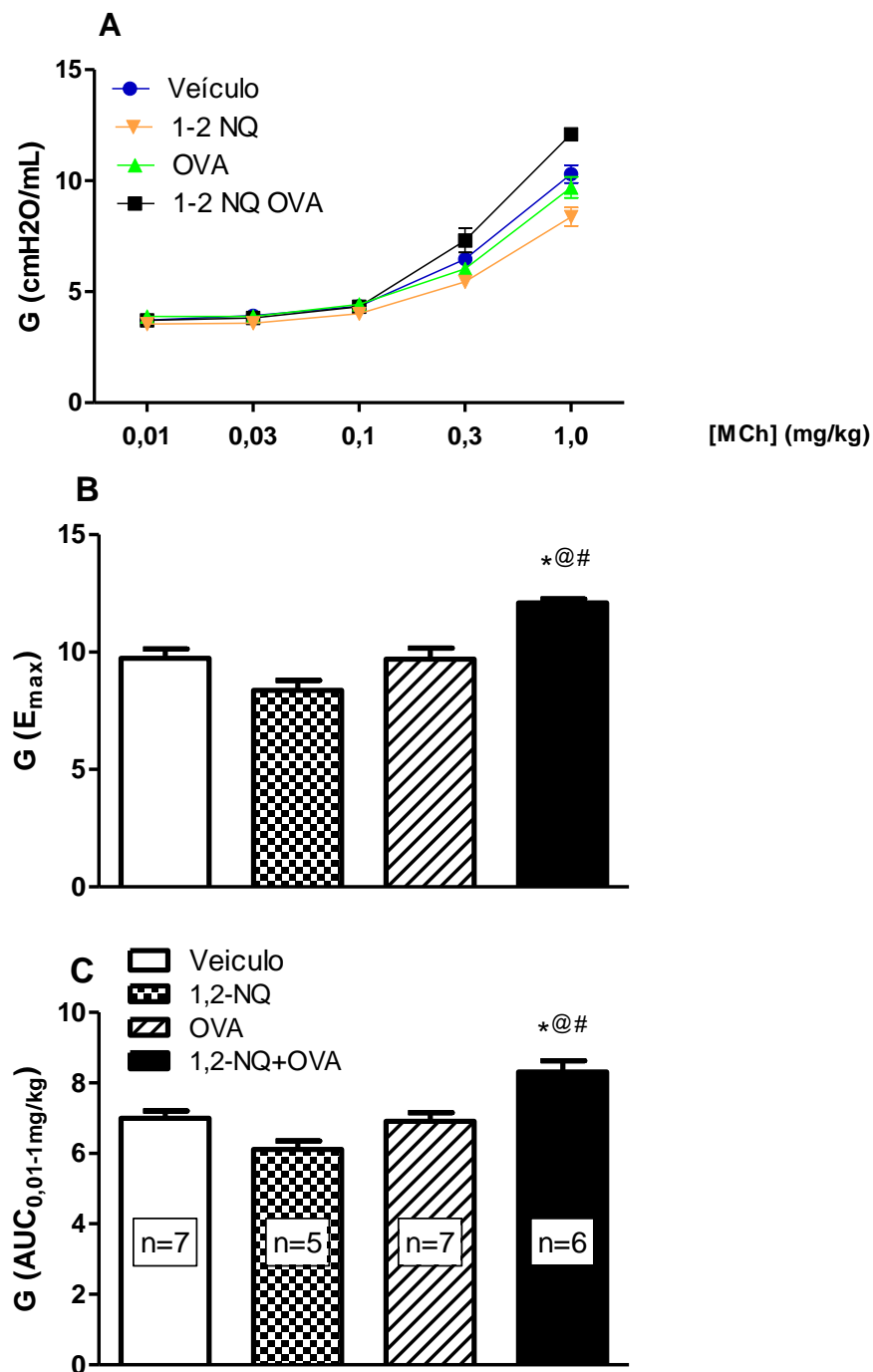
Em todos os grupos experimentais, a injeção e.v. prévia de PBS não alterou os parâmetros de R_n (colocar os valores), G (colocar os valores) ou H (colocar os valores).

Figura 6: Avaliação da mecânica respiratória (resistência das vias aéreas; Rn) após 24 h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal.



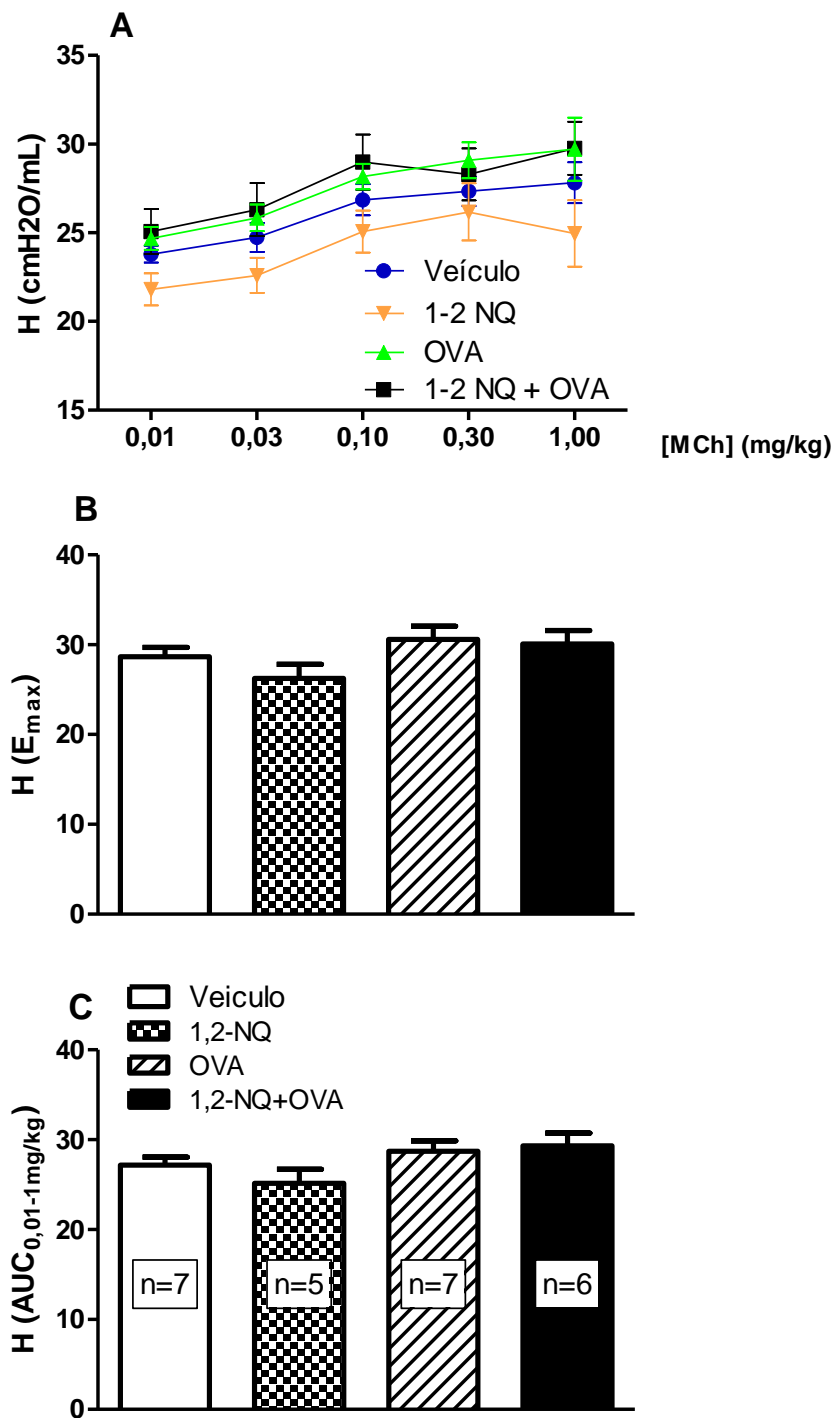
A medida de Rn foi realizada por curva dose-resposta frente à metacolina, também expressa como valores absolutos (painel A), efeito máximo (Emax, painel B) e área sob a curva (AUC, painel C). Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. para n=5-7 animais. Valores de *P<0,05 vs. veículo, @P<0,05 vs. 1,2-NQ e #P<0,05 vs. OVA.

Figura 7: Avaliação da mecânica respiratória (resistência do parênquima; G) após 24 h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal..



A medida de G foi realizada frente à curva dose-resposta da metacolina (MCh), também expressa como valores absolutos (painel A), efeito máximo (E_{max}, painel B) e área sob a curva (AUC, painel C). Os resultados estão expressos como a média ± E.P.M. para n=5-7 animais. Valores de *P<0,05 vs. veículo, @P<0,05 vs. 1,2-NQ e #P<0,05 vs. OVA

Figura 8: Avaliação da mecânica respiratória (Elastância; H) após 24h do último desafio com ovalbumina (OVA) em camundongos C57BL/6 selvagens adultos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) na fase neonatal.



Medida da H em todos os grupos experimentais frente à curva dose-resposta de metacolina (MCh; e.v.) expressa como valores absolutos (painel A), efeito máximo (E_{max} , painel B) e área sob a curva (AUC, painel C). Os resultados estão expressos como a média \pm E.P.M. para $n=5-7$ animais. Valores de * $P<0,05$ vs. veículo, @ $P<0,05$ vs. 1,2-NQ e # $P<0,05$ vs. OVA.

5.2 Avaliação de parâmetros inflamatórios e celulares em camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal

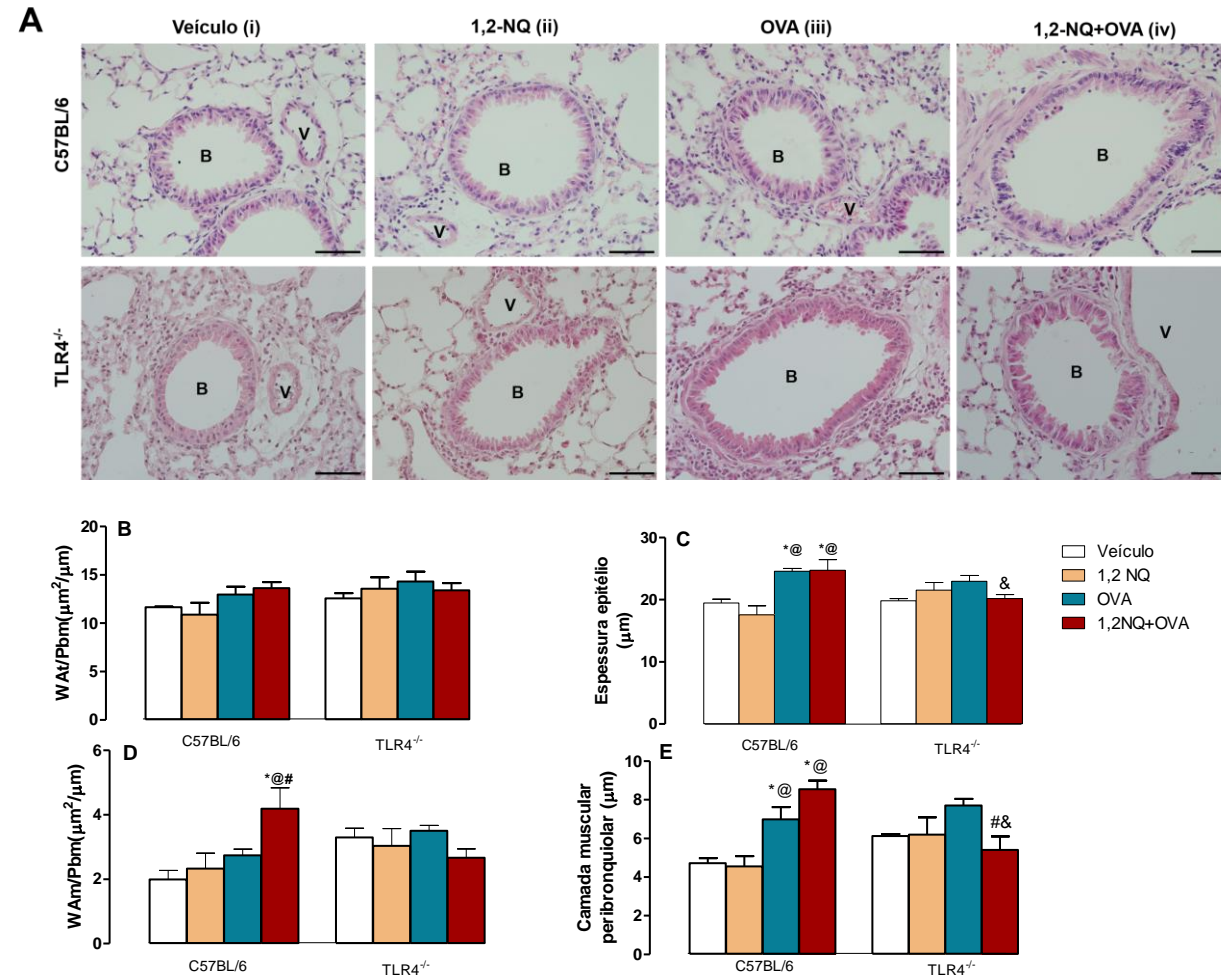
5.2.2 Exposição precoce à 1,2-NQ estimula o remodelamento das vias aéreas em camundongos via TLR4: análise morfométrica

Em pulmões de camundongos selvagens ou nocautes TLR4 alérgicos expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ, não foram observadas alterações na área do epitélio (WAt; Figura 9, painel A) em relação aos respectivos grupos controle (veículo), 1,2-NQ ou OVA isoladamente (Figura 9, painéis A-B). Contudo, a espessura do epitélio dos camundongos selvagens alérgicos (ou não) expostos a 1,2-NQ na fase neonatal aumentou marcadamente quando comparado aos respectivos grupos expostos somente ao veículo ou ao poluente 1,2-NQ (Figura 9, painéis A-C). Ao contrário, os animais nocautes alérgicos e também pré-expostos ao 1,2-NQ não exibiram aumento da espessura do epitélio, sendo essa medida significativamente menor do que àquela observada nos respectivos grupos de camundongos selvagens (Figura 9, painéis A-C).

A exposição precoce de camundongos selvagens ao poluente 1,2-NQ e, na fase adulta, ao estímulo alérgico promoveu aumento significativo da área total (WAm/Pbm, $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) da camada muscular (μm) das vias aéreas em relação ao respectivo grupo selvagem controle (veículo) e alérgico (OVA). Esse efeito não foi observado no respectivo grupo de animais nocautes TLR4 (Figura 9, painéis A-D).

Em pulmões de camundongos selvagens alérgicos pré-expostos (ou não) a 1,2-NQ, ocorreu um aumento significativo da espessura da camada muscular ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) em relação ao grupo controle (veículo). Tal efeito foi marcadamente reduzido na camada muscular dos animais nocautes TLR4 alérgicos expostos a 1,2-NQ (Figura 9, painéis A-E). O grupo de camundongos selvagens exposto somente ao poluente 1,2-NQ não apresentou diferenças significativas na área das vias aéreas, espessura do epitélio ou da camada muscular em relação ao respectivo grupo controle (Figura 9, painéis A e E).

Figura 9: Receptores TLR4 regula o remodelamento das vias aéreas induzido pela exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ.

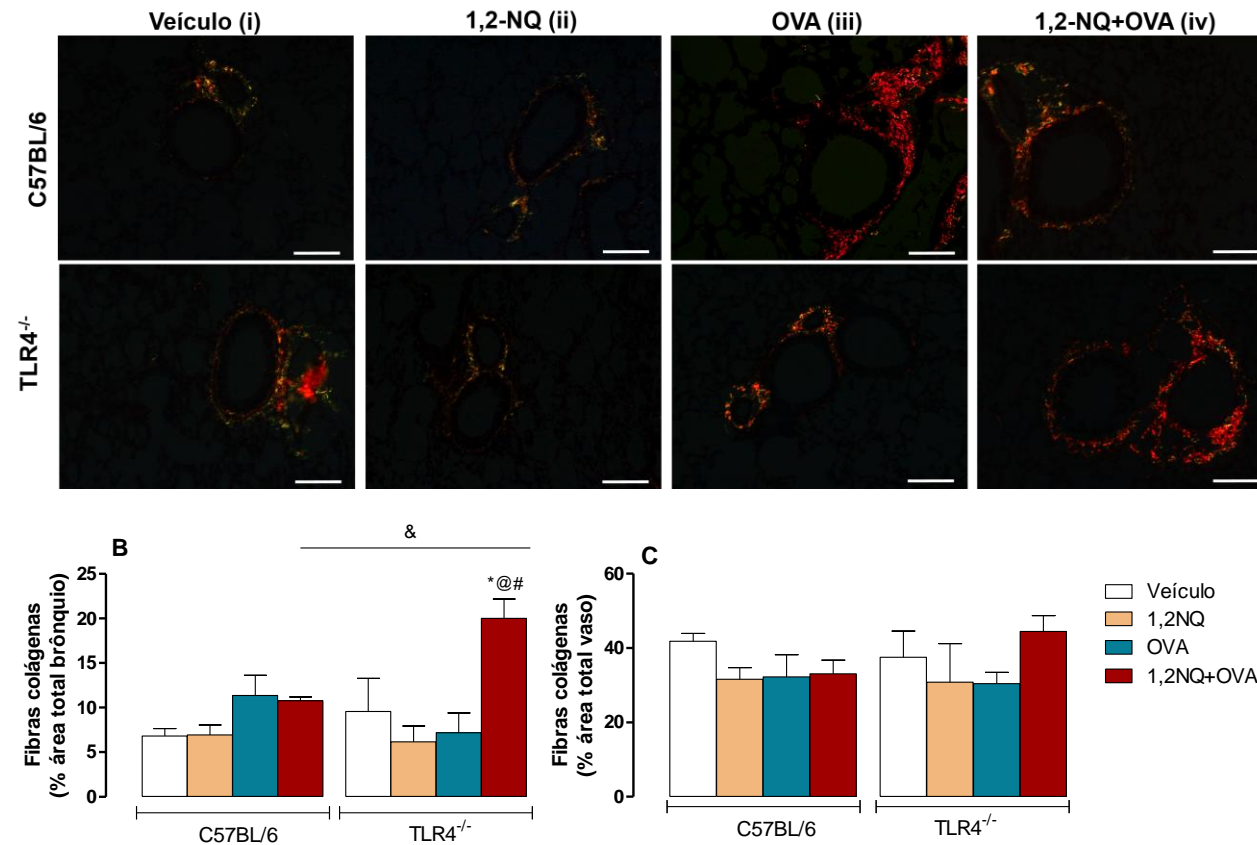


As fotomicrografias A (i, ii, iii e iv), superior e inferior, mostram o padrão histopatológico das vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4, respectivamente, expostos ao veículo, 1,2-NQ (100 nM), OVA e 1,2-NQ + OVA, respectivamente. Os painéis B, C, D e E ilustram a média \pm EPM da área da via aérea (WAt/Pbm), da espessura do epitélio brônquico (μm), da área da camada muscular (WAm/Pbm) e espessura da camada muscular (μm) para $n=3$ animais/grupo. ANOVA 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. B = bronquíolo, v = vaso. Barra = 50 μm . * $P<0,05$ vs. veículo, @ $P<0,05$ vs. 1,2-NQ e # $P<0,05$ vs. OVA. & $P<0,05$ vs. C57BL/6/KO

5.2.3 Receptor TLR4 regula a deposição de fibras colágenas em vias aéreas e vasos de camundongos expostos precocemente ao poluente 1,2-NQ

Em vias aéreas (brônquios) ou em vasos locais de camundongos selvagens alérgicos (ou não) pré-expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a deposição de fibras colágenas não diferiu do respectivo grupo controle (veículo) ou exposto isoladamente a 1,2-NQ, conforme ilustra a figura 10 A-C (painéis i, ii, iii e iv). Em animais nocautes TLR4 alérgicos e pré-expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a deposição de fibras colágenas aumentou marcadamente em torno dos brônquios ($20,0 \pm 2,2\%$), mas não dos vasos, quando comparada à deposição de fibras colágenas nas vias aéreas dos respectivos grupos controle, alérgico e 1,2-NQ ($9,5 \pm 3,7$, $7,2 \pm 2,2$ e $6,2 \pm 1,8\%$, respectivamente) (Figura 10, painéis A-C).

Figura 10: TLR4 regula a deposição de fibras colágenas em vias aéreas de camundongos alérgicos expostos a 1,2-NQ no período neonatal.

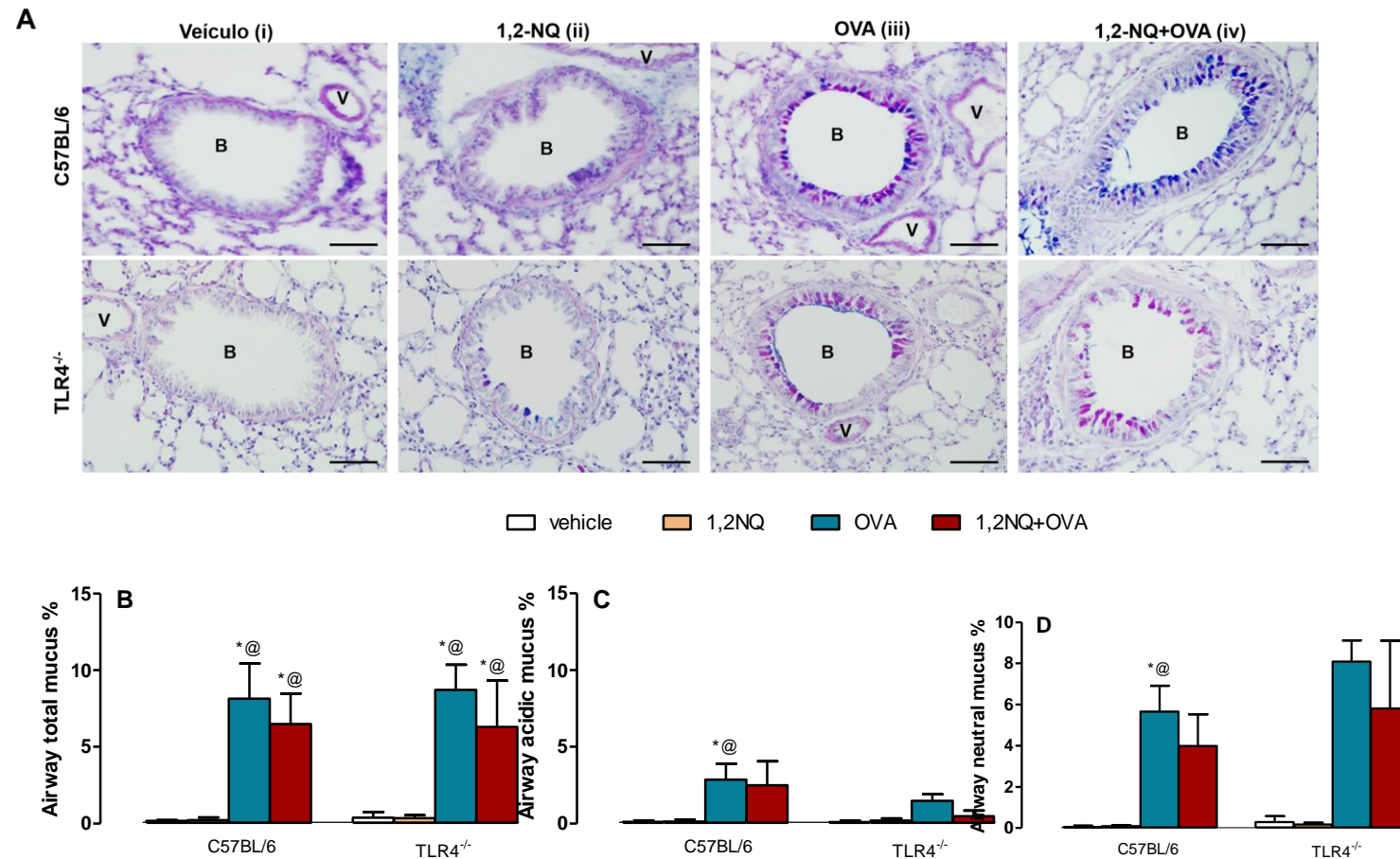


As fotomicrografias representativas **A** (i, ii, iii e iv), mostram o padrão histopatológico da deposição de colágeno (coloração de picrossírius red; análise sob luz polarizada) em torno dos brônquios e vasos em vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4 (superior e inferior, respectivamente), expostos ao veículo, 1,2-NQ (100 nM), OVA ou 1,2-NQ + OVA. Os painéis B e C representam a média \pm EPM da porcentagem da área de deposição de fibras colágenas nas vias painel B) e vasos (C). Teste ANOVA de 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. Barra = 50 μ m. *P<0,05 vs. veículo, [@]P<0,05 vs. 1,2-NQ e [#]P<0,05 vs. OVA. [&]P<0,05 vs. C57BL/6/KO

5.2.4 Produção de muco em camundongos expostos a 1,2-NQ: papel dos TLR4

Em vias aéreas de camundongos alérgicos selvagens previamente expostos à 1,2-NQ, a produção de muco total, neutro ou ácido aumentou quando comparada aos respectivos grupos controle (veículo) e 1,2-NQ (Figura 11; painéis Ai-iv-D). Essa resposta não foi estatisticamente diferente do grupo selvagem exposto somente ao estímulo alérgico (Figura 11, painéis A-D). Da mesma forma, em vias aéreas de camundongos alérgicos nocautes TLR4 previamente expostos à 1,2-NQ ou somente alérgico (OVA), a produção de muco total também aumentou em relação ao respectivo controle, mas não diferiu da produção de muco do respectivo grupo 1,2-NQ + OVA selvagem (Figura 11; painéis Ai-iv-B). Nos animais nocautes TLR4, a produção de muco neutro e ácido aumentou, embora não de forma estatisticamente significativa em relação aos respectivos grupos controle nocautes TLR4 (Figura 11, painéis B e D).

Figura 11: Efeito da exposição neonatal à 1,2-naftoquinona sobre a produção de muco no epitélio das vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4.

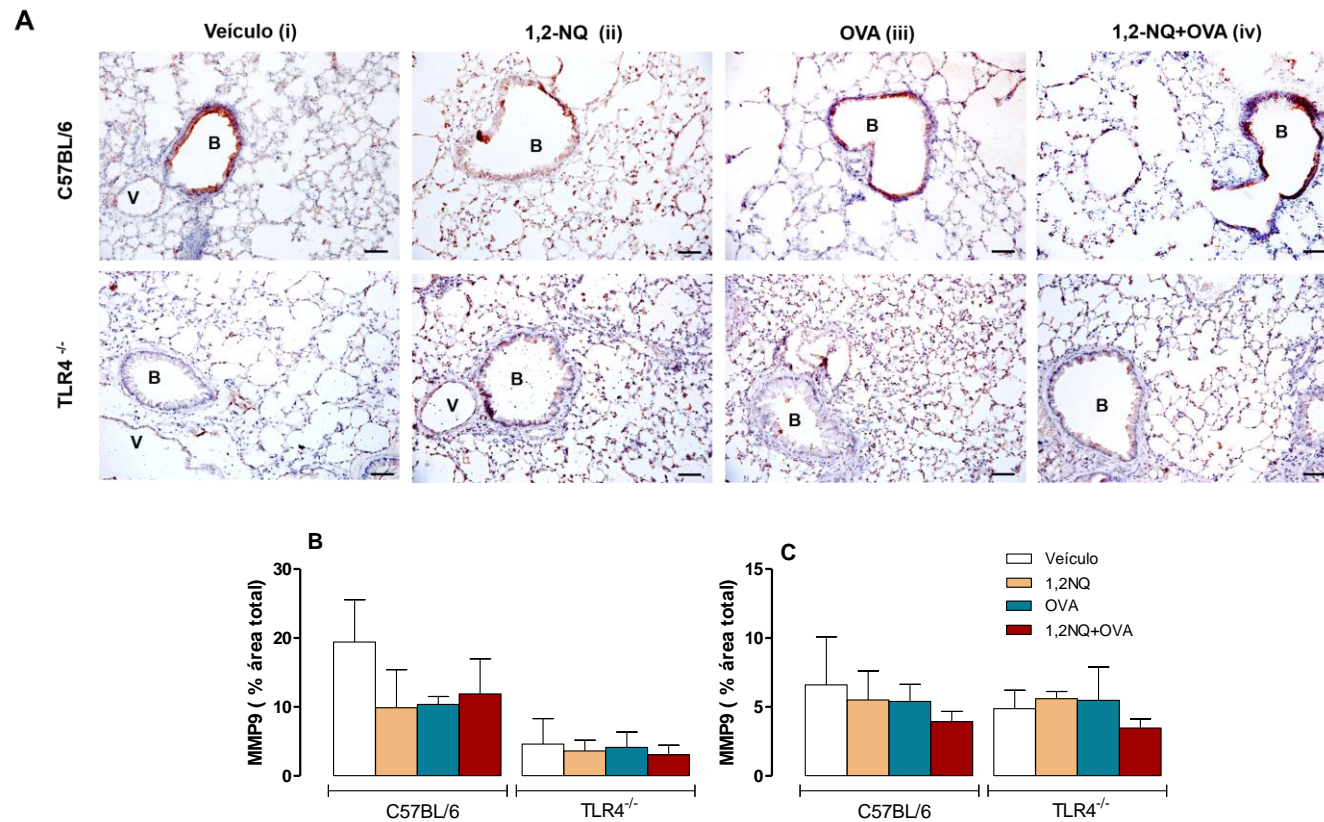


A coloração de PAS/AB pH 2,5 (n=3-7 animais/grupo). Paineis **A (i-iv)** Fotomicrografias representativas dos diferentes grupos experimentais, a saber: Paineis **B** ilustra a produção de muco total no epitélio brônquico. Paineis **C**, representa a produção de muco ácido e painéis **D**, representa a produção de muco neutro. ANOVA 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. B = bronquíolo, v = vaso. Barra = 50 μ m. *P<0,05 vs. veículo, @P<0,05 vs. 1,2-NQ

5.2.5 Papel da metaloproteinase 9 (MMP-9) e TLR4 no aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar em camundongos expostos à 1,2-NQ

Pela análise das reações imunohistoquímicas ilustradas na Figura 12 (painéis i, ii, iii e iv; A-C) foi possível constatar que a expressão da metaloproteinase 9 (MMP9) em vias aéreas e parênquima de camundongos selvagens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal e, depois ao estímulo alérgico com OVA, não foi grandemente afetada, uma vez que a média (\pm EPM) da imunorreação para MMP9 nas vias aéreas e parênquima desses animais mantêm-se estatisticamente inalterada em comparação aos animais controle (veículo), poluente ou OVA isolados (Figura 12i-iv, painéis A-C). Importante referir que, da mesma forma, em vias aéreas e parênquima pulmonar dos camundongos nocautes TLR4 alérgicos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal, a imunorreação para MMP9 nessa interfaces não diferiu dos respectivos grupos nocautes TLR4 controle, OVA ou 1,2-NQ ou ainda quando comparado com o respectivo grupo selvagem 1,2-NQ e OVA (Figura 12, painéis A-C).

Figura 12: Análise imunohistoquímica para MMP9 em vias aéreas e parênquima de camundongos selvagens e nocautes TLR4 adultos pré-expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal.



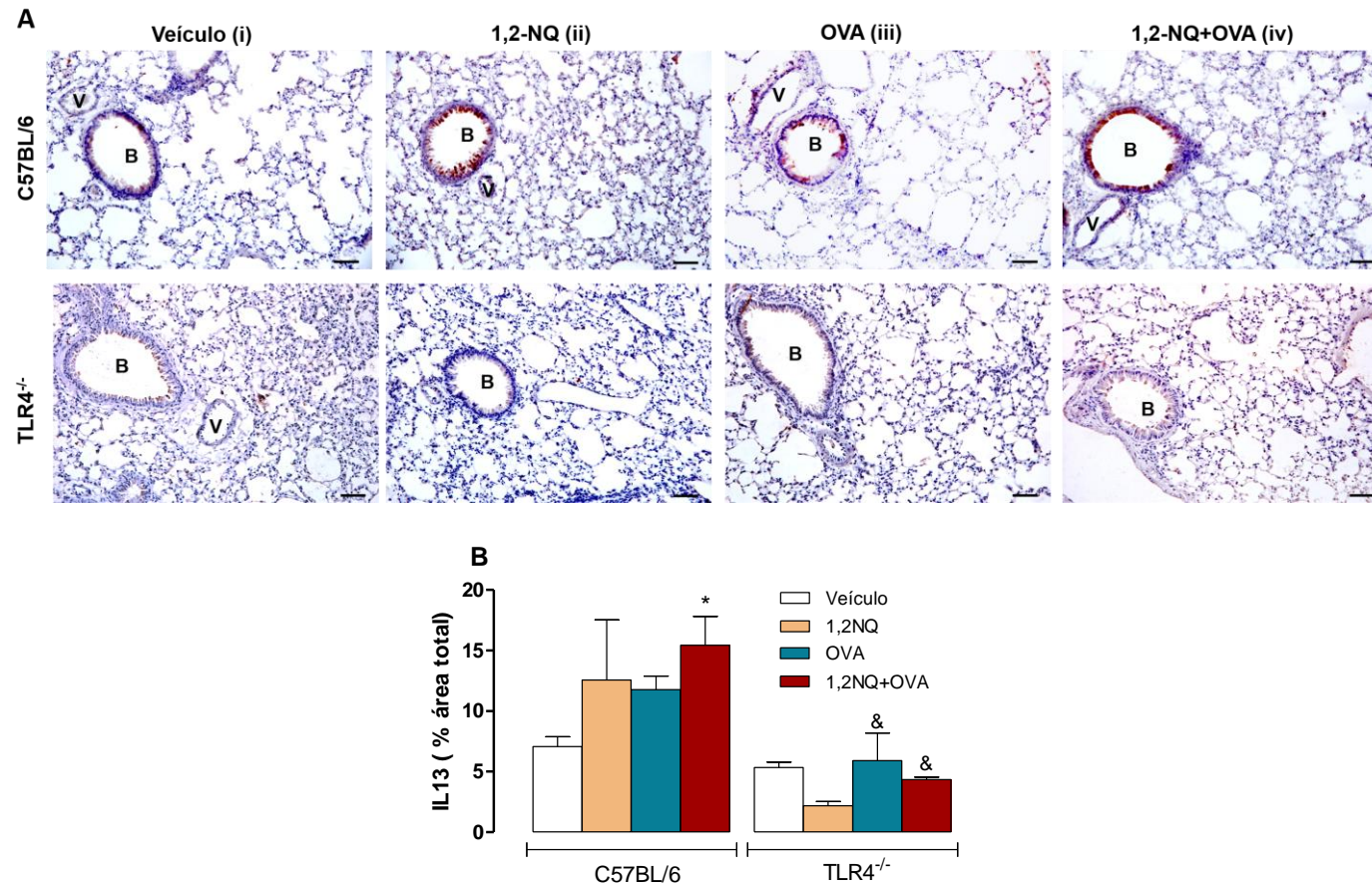
Fotomicrografias representativas de imunoperoxidase para MMP9 dos diferentes grupos controle, 1,2-NQ, OVA e 1,2-NQ + OVA (painéis i, ii, iii e iv, respectivamente). Painel B mostra a média \pm EPM da % de expressão por área total da MMP9 nas vias aéreas (B) e parênquima (C) dos grupos controle, 1,2-nq, ova, 1,2-NQ + OVA selvagens e nocautes TLR4. Imunoperoxidase e contra-coloração com Hematoxilina de Haris (n=3-7 animais/grupo). Painel **A (i-iv)** Fotomicrografias representativas dos diferentes grupos experimentais. ANOVA 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. B = bronquíolo, v = vaso. Barra =50 μ m.

5.2.6 Papel da IL-13 na exacerbação da inflamação alérgica pulmonar em animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Pela análise das reações imunohistoquímica ilustradas na Figura 13 (Ai, ii, iii e iv; painel B) foi possível observar que a % de imunorreação para IL-13 nas vias aéreas de camundongos selvagens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal, foi significativamente aumentada pela presença de estímulo inflamatório alérgico (OVA) na fase adulta destes, uma vez que a média (\pm EPM) da % de imunorreação para IL-13 foi estatisticamente aumentada em comparação com os animais controle (veículo) (Figura 13Ai-iv, painel B). Embora não estatisticamente diferente, ambos os grupos de animais selvagens expostos somente à 1,2-NQ ou OVA exibiram aumento da % de expressão para IL-13 (Figura 13Ai-iv, painel B).

Importante notar que, em vias aéreas dos camundongos nocautes TLR4 alérgicos e expostos ao poluente 1,2-NQ ou somente submetidos ao estímulo alérgico (OVA), a imunorreação para MMP9 nestes foi significativamente reduzida em relação aos respectivos grupos selvagem (Figura 13Ai-iv, painel B). Resultado semelhante foi observado com o grupo nocaute TLR4 exposto somente ao 1,2-NQ; entretanto, essa resposta não foi estatisticamente distinta do grupo selvagem (Figura 13Ai-iv, painel B).

Figura 13: Análise imunohistoquímica para IL-13 em vias aéreas de camundongos selvagens e nocautes TLR4 expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.



Fotomicrografias representativas da expressão de IL-13 Ai, ii, iii e iv para os grupos controle, 1,2-NQ, OVA e 1,2-NQ e OVA, respectivamente). Painei B mostra a média \pm EPM da % de expressão da IL13 em vias aérea dos grupos experimentais selvagens e nocautes TLR4 controle, 1,2-NQ, OVA e 1,2-NQ + OVA, respectivamente. Imunoperoxidase e contra-coloração com Hematoxilina de Haris (n=3-7 animais/grupo). ANOVA 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. B = brônquiólo, v = vaso. Barra =50 μ m. *P<0,05 vs. Veículo e &P<0,05 vs. C57BL/6/KO.

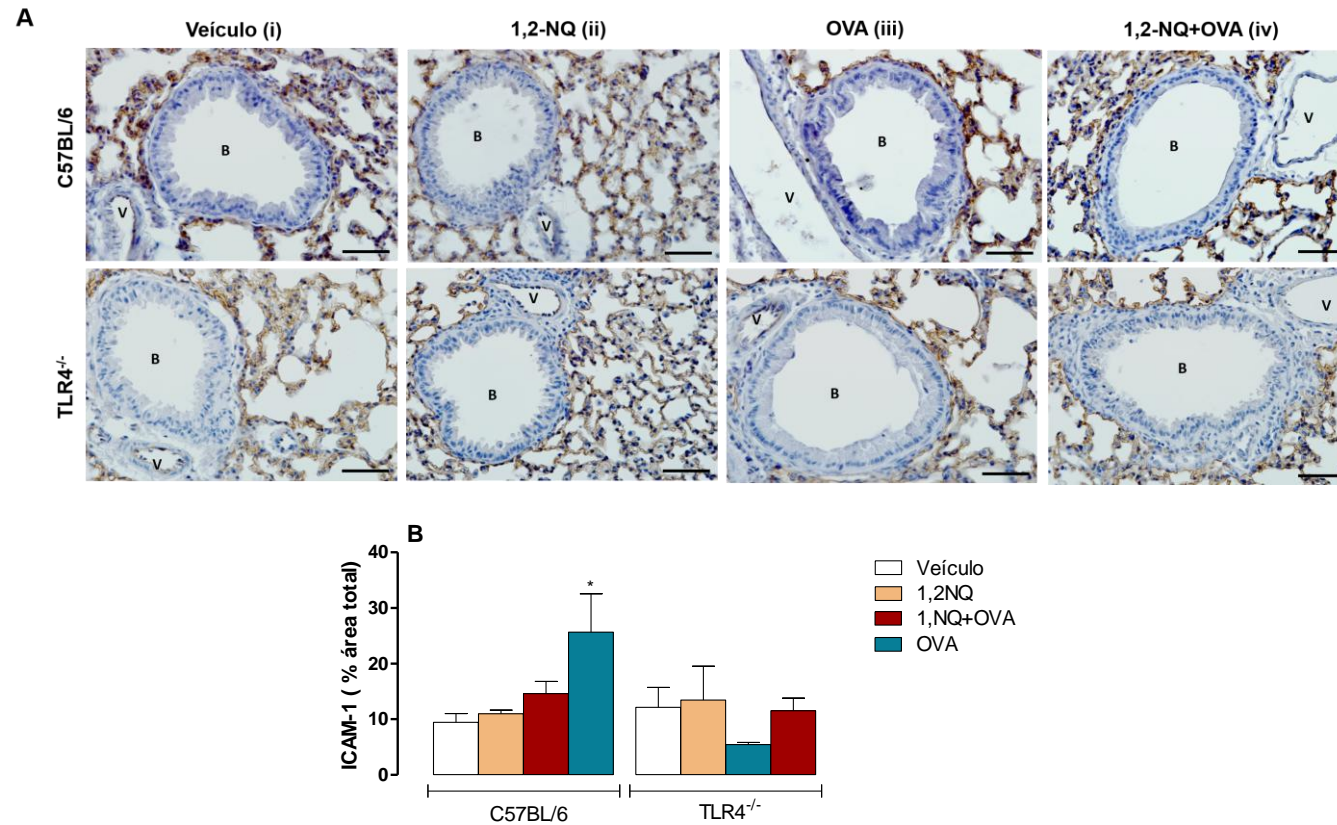
5.2.7 Regulação da expressão de moléculas de adesão no pulmão de camundongos expostos à 1,2-NQ quando neonatos: papel do TLR4

As análises de imunorreação para ICAM-1 evidenciaram que, no parênquima pulmonar dos camundongos selvagens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a indução da inflamação alérgica com OVA na idade adulta, promoveu valores de imunorreatividade mais elevados para essa molécula quando comparados com o respectivo grupo controle/veículo (Figura 14 Ai, ii, iii, iv; painel B). Os valores de imunorreatividade para essa molécula nos grupos de camundongos selvagens expostos somente ao poluente 1,2-NQ ou OVA não foram diferentes dos valores de expressão observados no respectivo grupo controle/veículo (Figura 14 Ai, ii, iii, iv; painel B). Em contrapartida, valores inferiores de imunorreatividade para ICAM-1 foram evidenciados no parênquima de camundongos alérgicos nocautes TLR4 expostos à 1,2-NQ, mas não diferiu estatisticamente (Figura 14 Ai, ii, iii, iv; painel B). Verificou-se que a imunorreatividade para ICAM-1 nos animais nocautes TLR4 expostos somente ao poluente ou OVA não foi distinta do respectivo grupo controle ou respectivos grupos de camundongos selvagens (Figura 14 Ai, ii, iii, iv; painel B).

Analisando os gráficos de imunorreação para VCAM-1 no parênquima pulmonar de camundongos selvagens alérgicos, expostos no período neonatal à 1,2-NQ, foi possível observar um aumento significativo dessa molécula em vasos peribronquiolares, no parênquima pulmonar e região peribrônquica, quando comparado com os respectivos grupos controle e, também, os respectivos grupos de animais nocautes TLR4 (Figura 15 A-Di, ii, iii, iv; painéis E-F). Verificou-se que a imunorreatividade para VCAM-1 nos animais nocautes TLR4 expostos somente ao poluente ou OVA não foi distinta dos respectivos grupos controle ou daqueles respectivos selvagens (Figura 15 A-Di, ii, iii, iv; painéis E-F).

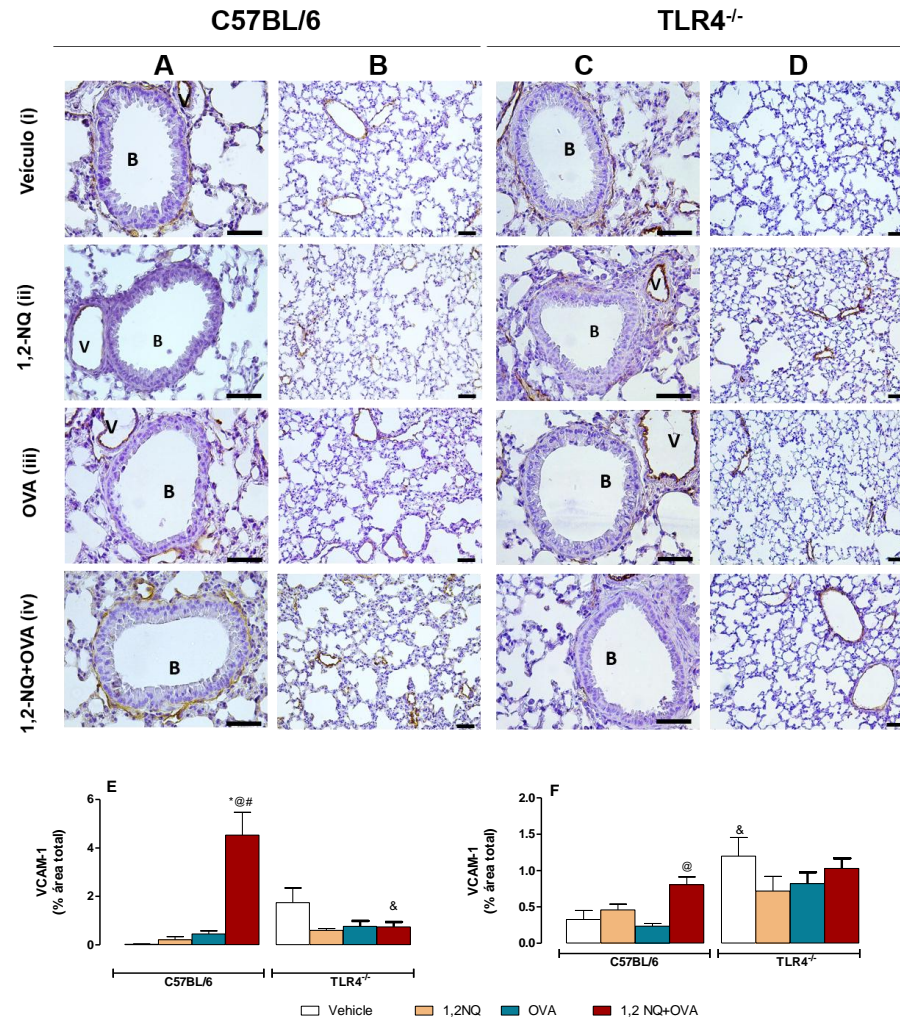
A imunomarcção para PECAM-1 no parênquima pulmonar dos camundongos selvagens com inflamação alérgica e expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ mostrou-se marcadamente elevada em relação ao respectivo grupo controle, 1,2-NQ ou OVA (Figura 16A-Di, ii, iii e iv; painéis A-D). Nos vasos peribronquiolares de camundongos nocautes TLR4 expostos à 1,2-NQ e OVA, OVA ou 1,2-NQ isolados, os valores de imunorreação foram ($P < 0,05$) elevados e estatisticamente diferentes dos respectivos grupos selvagens (Figura 16i, ii, iii e iv; painéis A-D).

Figura 14: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 (selvagens e nocautes TLR4) expostos à 1,2-NQ na fase neonatal.



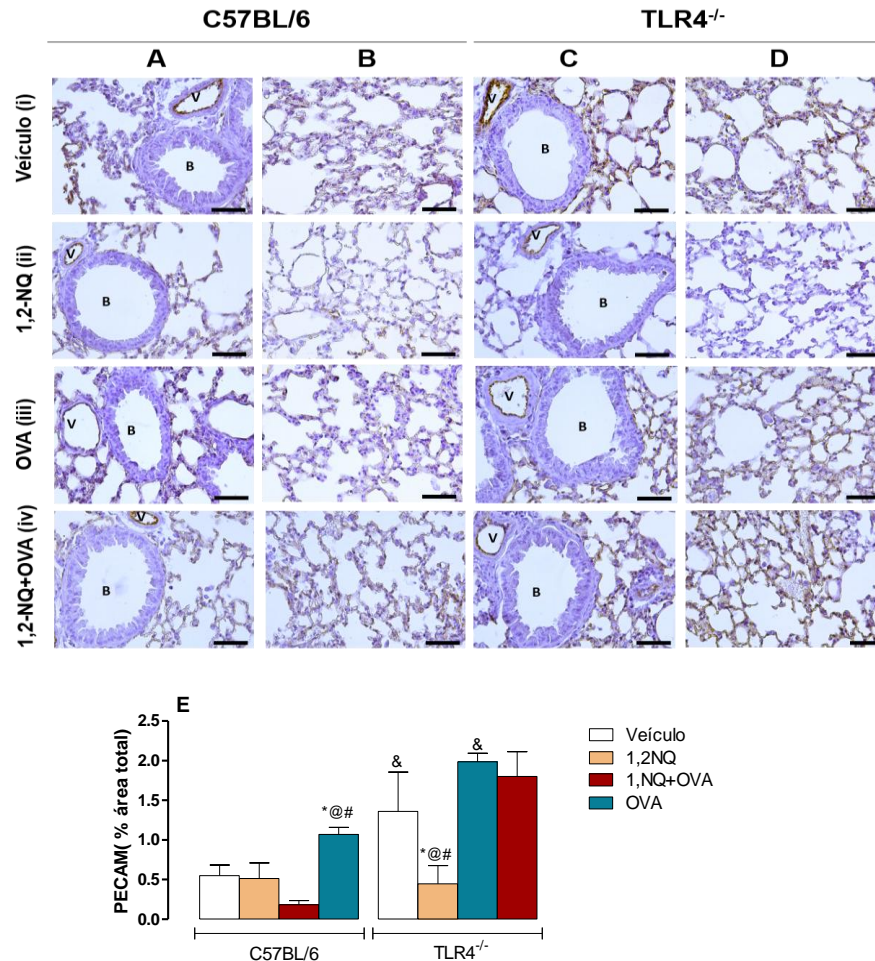
Fotomicrografias representativas da expressão de ICAM-1 Ai, ii, iii e iv para os grupos controle, 1,2-NQ, OVA e 1,2-NQ e OVA, respectivamente. Painel B mostra a média \pm EPM da % de expressão da ICAM-1 no parênquima pulmonar dos grupos experimentais selvagens e nocautes TLR4 controle, 1,2-NQ, OVA e 1,2-NQ + OVA, respectivamente. Imunoperoxidase e contra-coloração com Hematoxilina de Haris (n=3-7 animais/grupo). ANOVA 2 vias seguido do teste de múltiplas comparações Bonferroni. B = bronquíolo, v = vaso. Barra = 50 μ m. *P<0,05 vs. veículo

Figura 15: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 (selvagens e nocautes TLR4) expostos à 1,2-NQ na fase neonatal



Fotomicrografias de imunoperoxidase para VCAM-1 representativas (painéis 15A-Di-iv) de cortes transversais do pulmão de camundongos expostos ao veículo, 1,2-NQ, OVA ou 1,2-NQ + OVA, respectivamente. Nas vias aéreas observa-se maior intensidade da coloração acastanhada, que representa a alta imunorreatividade à molécula VCAM-1. O predomínio da coloração azul, indica baixa imunorreatividade à VCAM-1. Painéis E-F; gráfico representativo das médias \pm EPM (n=3-7/grupo) da imunorreatividade à VCAM-1 nas vias aéreas e parênquima pulmonar de todos os grupos experimentais; bronquíolo (b); vaso (V). Barra 50 μ m. *P<0,05 vs. veículo, @P<0,05 vs. 1,2-NQ e #P<0,05 vs. OVA. &P<0,05 vs. C57BL/6/KO

Figura 16: Papel do TLR4 no aumento da imunorreatividade ao anticorpo para molécula de adesão plaqueta-célula endotelial 1 (PECAM-1) no tecido pulmonar de camundongos C57BL/6 (selvagens e nocautes TLR4) expostos à 1,2-NQ na fase neonatal



Fotomicrografias de imunoperoxidase para PECAM-1 representativas (painéis 15A-Di-iv) de cortes transversais do pulmão de camundongos expostos ao veículo, 1,2-NQ, OVA ou 1,2-NQ + OVA, respectivamente. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris. No parênquima pulmonar observa-se maior intensidade da coloração acastanhada, que representa a alta imunorreatividade à molécula VCAM-1. O predomínio da coloração azul, indica baixa imunorreatividade à PECAM-1. Painel E; gráfico representativo das médias \pm EPM (n=3-7/grupo) da imunorreatividade à PECAM-1 no parênquima pulmonar de todos os grupos experimentais; bronquíolo (b); vaso (V). Barra 50 µm. *P<0,05 vs. veículo, @P<0,05 vs. 1,2-NQ e #P<0,05 vs. OVA. &P<0,05 vs. C57BL/6/KO

5.3 Estudos *in vitro*: Impacto da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade de PMN obtidos do sangue periférico de voluntários sadios

5.3.1 Determinação, via citometria de fluxo, da viabilidade celular de PMN obtidos do sangue periférico de voluntários sadios frente o poluente 1,2-NQ

No intuito de investigar o impacto que o poluente 1,2-NQ exerce sobre a funcionabilidade (quimiotaxia) das células PMN (eosinófilos e neutrófilos) obtidas do sangue periférico de voluntários sadios, a caracterização da viabilidade destas células foi inicialmente avaliada após a incubação (30 min) com concentrações crescentes do poluente 1,2-NQ (10, 30 e 100 nM), utilizando a técnica de citometria de fluxo, empregando como controle as células sem marcação (Figura 17).

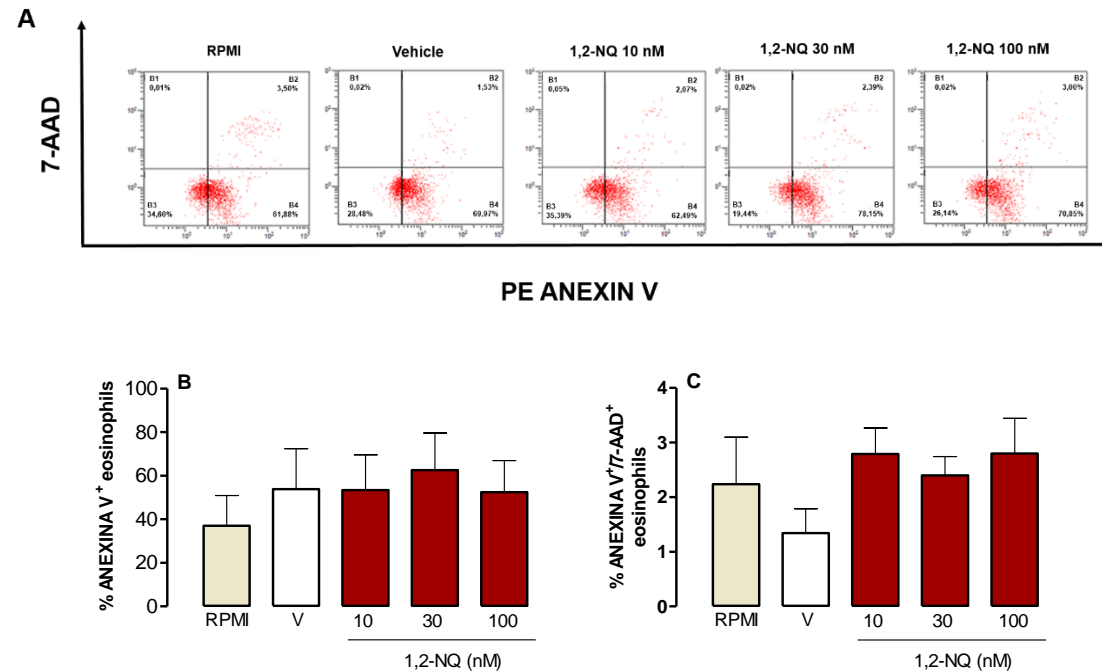
A população de eosinófilos (Figura 17) ou neutrófilos (Figura 18) foi selecionada com base no gráfico de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC). A seguir o gráfico de (7AAD) versus Anexina V foi construído e, com esta estratégia, foi possível observar a população de eosinófilos (Figura 17, painel A) ou neutrófilos (Figura 18, painel A) 7AAD e Anexina V negativa (B3) e, portanto, células consideradas viáveis. As células em processo de apoptose precoce são anexina-V positivas e 7AAD negativas (B4), enquanto as células em apoptose tardia são 7AAD e Anexina V positivas (B2).

Conforme a figura 17 (painéis A-C), a porcentagem de eosinófilos humanos em apoptose precoce foi elevada tanto em células controle RPMI quanto em células expostas ao poluente 1,2-NQ, nas concentrações de 10, 30 e 100 nM, e ao veículo do poluente. A porcentagem de células em apoptose tardia foi similar entre os grupos (Figura 17, painel C).

Em neutrófilos humanos, a porcentagem de PMN em apoptose precoce e tardia foi semelhante (Figura 18, painel A-C).

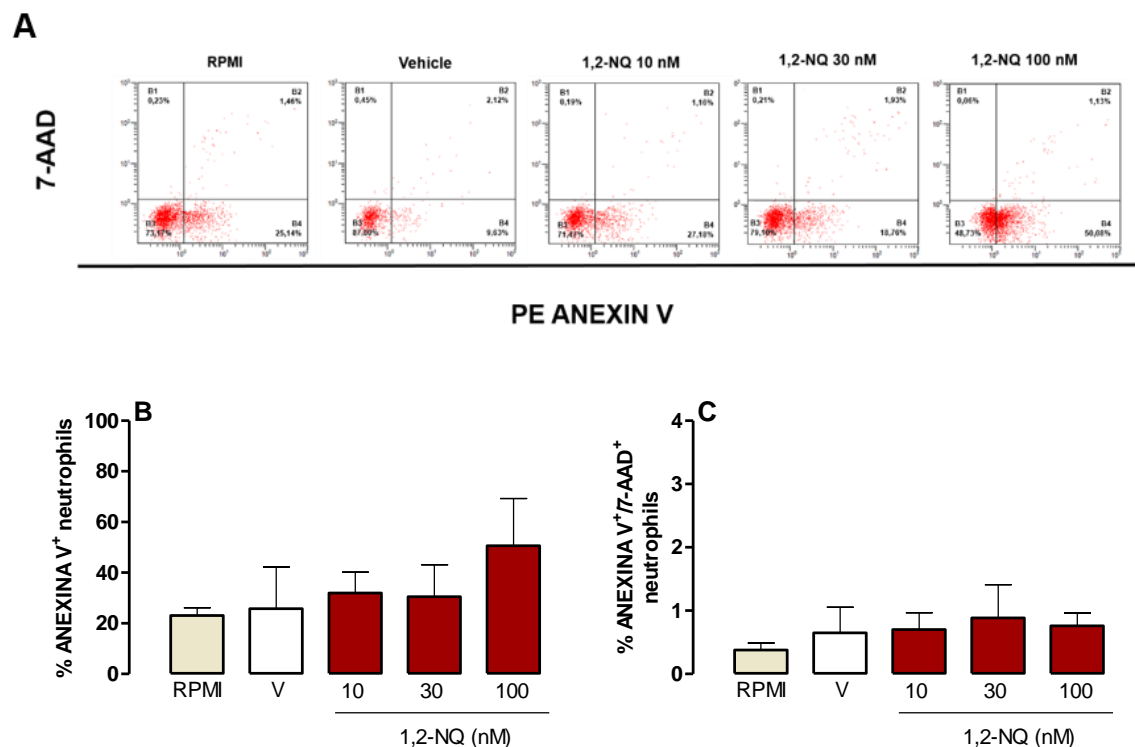
Em suma, os resultados demonstraram a apoptose dos eosinófilos e neutrófilos foi semelhante em todas as concentrações após exposição ao poluente 1,2-NQ nessas condições experimentais.

Figura 17: Percentagem de apoptose inicial e tardia das células PMN (eosinófilos) após incubação com concentrações crescentes do poluente 1,2-NQ durante 20 minutos



Análise de apoptose de eosinófilos humanos expostos ao poluente 1,2-NQ (10, 30 e 100 nM) por 20 minutos, à 37 °C, em ambiente com 5% CO₂/95% O₂. As células foram incubadas com Anexina V-PE em tampão contendo 7-amino-actinomicina (7-AAD) e analisadas por citometria de fluxo. Painéis **A**: Análise 7-AAD versus PE anexina V em eosinófilos onde é possível observar as regiões B1 (células 7-AAD positivas), B2 (células 7-AAD e Anexina V positivas – apoptose tardia), B3 (células 7-AAD e Anexina V negativas-viáveis) e B4 (células Anexina V positivas – apoptose precoce). Painéis **B**: Gráfico representativo da porcentagem de eosinófilos em apoptose precoce (inicial). Painéis **C**: Gráfico representativo da porcentagem de eosinófilos em apoptose tardia. Os resultados dos gráficos B-F estão apresentados como média ± E.P.M de 3 experimentos independentes.

Figura 18: Percentagem de apoptose inicial e tardia das células PMN (neutrófilos) após incubação com concentrações crescentes do poluente 1,2-NQ durante 20 min



Análise de apoptose de neutrófilos humanos expostos ao poluente 1,2-NQ (10, 30 e 100 nM) por 20 minutos, à 37 °C, em ambiente com 5% CO₂/95% O₂. As células foram incubadas com Anexina V-PE em tampão contendo 7-amino-actinomicina (7-AAD) e analisadas por citometria de fluxo. Painéis **A**: Análise 7-AAD versus PE anexina V em neutrófilos, onde é possível observar as regiões B1 (células 7-AAD positivas), B2 (células 7-ADD e Anexina V positivas – apoptose tardia), B3 (células 7-ADD e Anexina V negativas-viáveis) e B4 (células Anexina V positivas – apoptose precoce). Painéis **B**: Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos em apoptose precoce (inicial). Painéis **C**: Gráfico representativo da porcentagem de neutrófilos em apoptose tardia. Os resultados dos gráficos B-F estão apresentados como média ± E.P.M de 3 experimentos independentes.

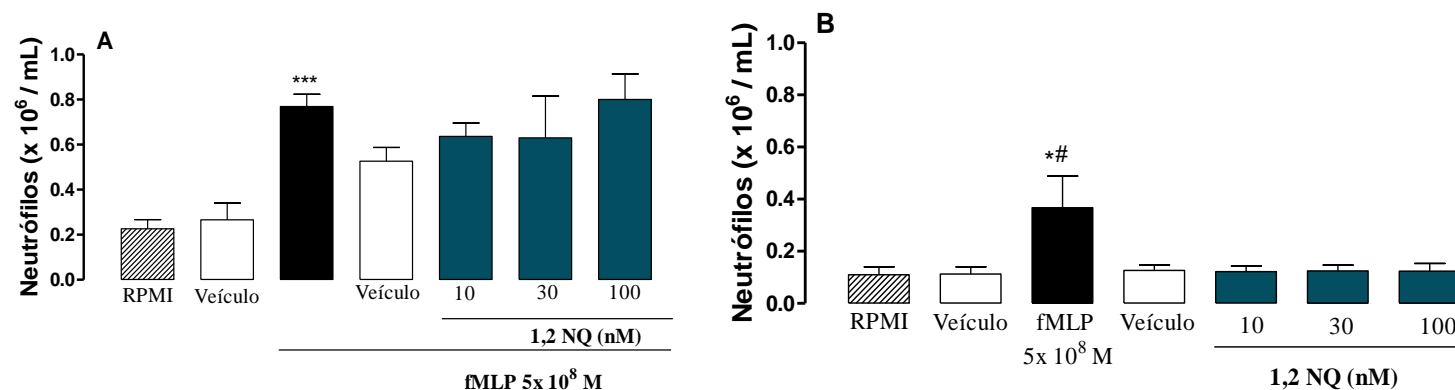
5.3.2 Efeito da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade (atividade quimiotática) dos neutrófilos obtidos de voluntários sadios frente ao fMLP

A fim de averiguar se o poluente 1,2-NQ afeta atividade quimiotática de neutrófilos, a capacidade de migrar dessas células foi inicialmente testada frente ao fMLP (Figura 19). A pureza obtida do sangue humano, que consiste da suspensão final correspondeu a 88-90% de neutrófilos.

De acordo com a Figura 19, os ensaios realizados na placa de microquimiotaxia de 96 poços mostram que a capacidade de migrar (quimiotaxia) dos neutrófilos (4×10^6 células/mL) frente ao fMLP aumentou significativamente ($0,77 \pm 0,06 \times 10^6$ células/mL; Figura 19, painel A) comparada com a quimiotaxia espontânea dessas células frente ao meio de cultura RPMI (basal; $0,22 \pm 0,04 \times 10^6$ cels/mL) bem como da quimiotaxia espontânea de células incubadas frente ao veículo do poluente ($0,27 \pm 0,07 \times 10^6$ cels/mL).

A pré-incubação (- 20 min) dos neutrófilos humanos com o poluente 1,2 NQ, nas concentrações de 10 a 100 nM, não estimulou de forma significativa a quimiotaxia dos eosinófilos ativados por fMLP (5×10^{-8} M). Da mesma forma, quando avaliado como agente quimiotático, a 1,2-NQ (10-100 nM) não foi capaz de estimular a migração neutrófilica (quimiotaxia) *per se* (Figura 19, painel B).

Figura 19: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.



Os neutrófilos foram obtidos do sangue periférico de voluntários saudáveis e a quimiotaxia foi realizada em microplaca frente ao fMLP (5×10^{-8} M). Paine **A** ilustra a quimiotaxia de neutrófilos (4×10^6 cél/mL) frente ao pré-tratamento (20 min) com a 1,2-NQ (10-100 nM; 37 °C, 5% CO₂). Após, as células migraram em resposta ao fMLP durante 2h (37 °C, 5% CO₂). Paine **B** ilustra a migração neutrofílica (4×10^6 cél/mL) induzida pela 1,2-NQ (10-30 nM; 37 °C, 5% CO₂), veículo do poluente ou o meio de cultura (basal). Resultados foram quantificados pela dosagem de mieloperoxidase e interpolados com uma curva padrão de neutrófilos. Os dados foram expressos como média \pm EPM para $n = 5$ /grupo. * $P < 0,05$ versus migração espontânea (RPMI) e # $P < 0,05$ comparado ao veículo.

5.3.3 Efeito da 1,2-NQ sobre a funcionabilidade (atividade quimiotática) dos eosinófilos obtidos de voluntários sadios frente à eotaxina

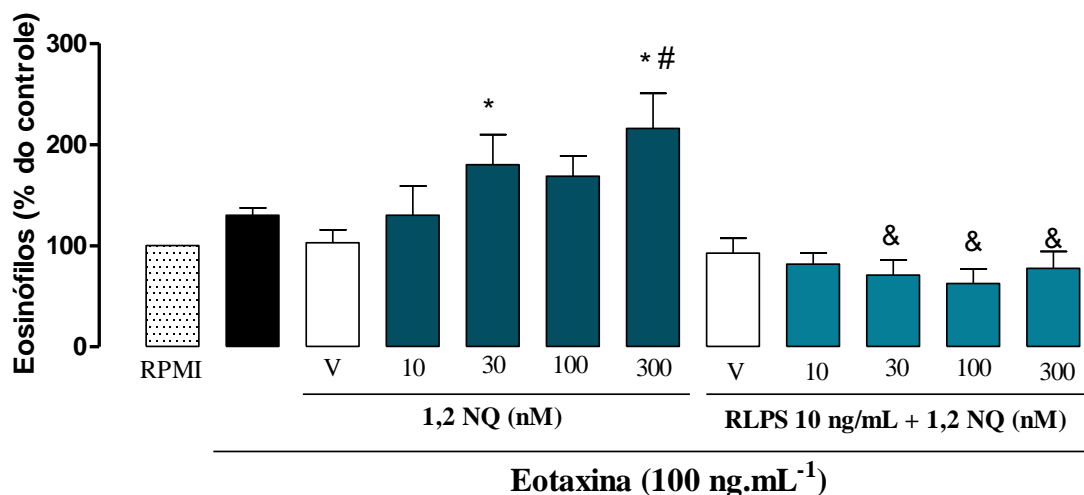
A capacidade do poluente 1,2-NQ afetar a migração dos eosinófilos foi testada frente à eotaxina 100 ng/mL (Figura 20). A suspensão final (pureza) obtida do sangue humano correspondeu em média 92 a 98% de eosinófilos.

Conforme demonstra a figura 20, os ensaios realizados na placa de microquimiotaxia de 96 poços mostram que a migração (quimiotaxia) dos eosinófilos (4×10^6 células/mL) frente à eotaxina aumentou significativamente (**$395,0 \pm 105,1\%$**) comparada com a quimiotaxia espontânea de células frente ao RPMI (100%) ou frente ao veículo do poluente.

Quando a 1,2-NQ (10-100 nM) foi empregada como agente quimiotático, observou-se um aumento da migração (quimiotaxia) de eosinófilos de forma concentração-dependente, muito embora essa resposta não tenha apresentado diferença estatística em comparação com o veículo ou o meio (Figura 21).

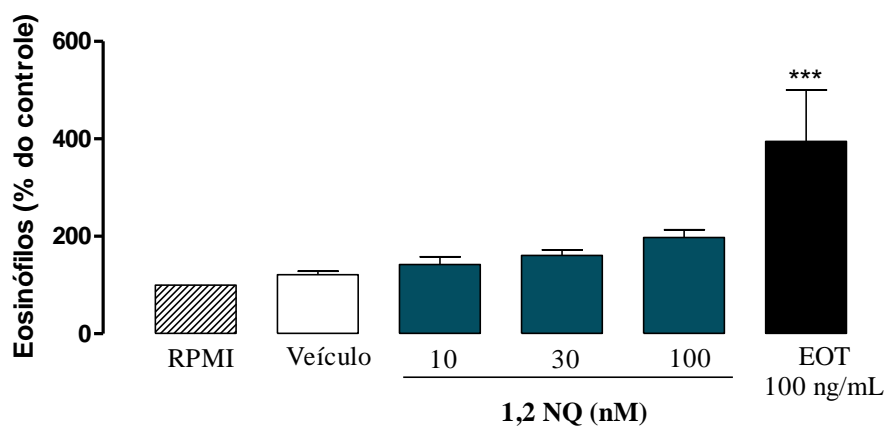
Importante notar que a pré-incubação (24 h) dos eosinófilos com a 1,2-NQ aumentou de forma significativa a migração dos eosinófilos induzida pela eotaxina ($130, \pm 7,3\%$ e $216,0 \pm 34,7\%$, 100 e 300 ng/mL, respectivamente; $n=7$) quando comparado à migração espontânea e à eotaxina. Este efeito foi inibido pela pré-incubação com o antagonista de TLR4, LPS-RS (10 ng/mL; $77,7 \pm 16,5\%$; Figura 21).

Figura 20: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro*.



Os eosinófilos foram obtidos do sangue periférico de voluntários saudáveis e a quimiotaxia foi realizada em microplaca frente à eotaxina (100 ng/mL). A quimiotaxia de eosinófilos (4×10^6 células/mL) frente ao pré-tratamento (24 h) com a 1,2-NQ (10-100 nM; 37 °C, 5% CO₂). Após, as células migraram em resposta à eotaxina durante 2h (37 °C, 5% CO₂). Resultados foram quantificados pela dosagem de peroxidase eosinofílica e interpolados com uma curva padrão de eosinófilos. Os dados foram expressos como média \pm EPM para $n = 5$ /grupo. * $P < 0,05$ versus migração espontânea (RPMI), # $P < 0,05$ versus migração induzida por eotaxina e & $P < 0,05$ versus tratamento 1,2-NQ/inibição LPS-RS

Figura 21: Efeitos da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre a quimiotaxia de eosinófilos *in vitro*.



Os eosinófilos foram obtidos do sangue periférico de voluntários saudáveis e a quimiotaxia foi realizada em microplaca frente à eotaxina (100 ng/mL). A migração eosinofílica (4×10^6 células/mL) foi induzida pela 1,2-NQ (10-30 nM; 37 °C, 5% CO_2), veículo do poluente ou o meio de cultura (basal). Resultados foram quantificados pela dosagem de peroxidase eosinofílica e interpolados com uma curva padrão de eosinófilos. Os dados foram expressos como média \pm EPM para $n = 5$ /grupo. * $P < 0,05$ versus migração espontânea (RPMI)

6 DISCUSSÃO

Conforme bem estabelecido, a inflamação alérgica pulmonar (asma) é uma doença complexa, cuja característica morfológica inclui remodelamento e inflamação eosinofílica, muitas vezes associada a uma perda irreversível da função pulmonar (GINA, 2017; Papi et al., 2018). Nesse contexto, achados prévios do nosso grupo demonstraram que a exposição precoce (fase neonatal), mas não tardia (fase adulta), de camundongos selvagens ao poluente eletrofílico 1,2-NQ promoveu exacerbação da inflamação alérgica pulmonar e aumento da hiperresponsividade ao agonista colinérgico MCh *in vivo* (Penh) nesses animais; entretanto, diferentemente da inflamação eosinofílica no pulmão, a hiperresponsividade à MCh não foi estatisticamente distinta do grupo com inflamação alérgica pulmonar exposto somente ao veículo do poluente (Santos et al., 2014). Subsequentemente, estudo ainda não publicado do grupo revelou que os receptores TLR4 estão envolvidos no controle da inflamação eosinofílica exacerbada, via ativação direta ou indireta (ex.: aumento de proteínas ativadas por estresse; HSP70), uma vez que a transmigração transendotelial (eosinofilia) para o LBA (parênquima pulmonar) foi substancialmente reduzida no grupo correspondente de camundongos nocautes para os receptores TLR4.

Sabe-se que famílias distintas de moléculas de adesão celular (CAMs) participam ativamente da resposta inflamatória e, em particular, na manutenção da homeostase epitelial e endotelial no pulmão. Dentre estas, estão as caderinas, mucinas, família das selectinas, família das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas, conforme a similaridade estrutural e funcional. Nesse contexto, a família das integrinas atua tanto nas interações célula-matriz como célula-célula, enquanto as caderinas servem como importantes receptores células-células, essenciais na manutenção da integridade epitelial. As integrinas leucocitárias, as selectinas, os membros da superfamília das imunoglobulinas e determinados carboidratos favorecem as interações entre os leucócitos e as células endoteliais e entre os leucócitos e o epitélio, muito embora essa última interação é menos discutida. No processo de interação leucócito-epitélio, as integrinas também

participam (Pilewski e Albelda, 1993; Choi et al 2013; vide revisão Griffith et al., 2014).

Presentes na membrana celular, as integrinas são ativadas por quimiocinas originadas no local da inflamação e são importantes para migração de eosinófilos (VLA-4; CD49d/CD29; $\alpha 4\beta 1$) e neutrófilos (Mac-1; CD11b/CD18; $\alpha M\beta 2$). No endotélio, a molécula VLA-4 se liga à imunoglobulina molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1), enquanto o Mac-1 e o LFA-1 se ligam à molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1) (vide revisão: Sanz e Kubes, 2012). Com exceção do mecanismo de marginação dos leucócitos, as demais etapas de migração transendotelial das células inflamatórias (ex.: captura, rolamento, adesão e transmigração/diapedese) do sangue (microcirculação) para o foco da inflamação são regulados pelas CAMs (vide Sanz e Kubes, 2012). Além isto, as CAMs atuam como estimulantes da atividade leucocitária,

Em virtude da relevância das CAMs nos mecanismos celulares de PMN nas vias aéreas, foi avaliado no tecido pulmonar dos camundongos selvagens com exacerbação da inflamação alérgica pulmonar expostos na fase neonatal ao poluente 1,2-NQ, o perfil de expressão para ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1, assim como para a citocina (Th2) pleiotrópica IL-13, cujo papel central na patogênese da asma vem sendo demonstrado (Corren, 2013),

Os resultados deste estudo mostram que os camundongos selvagens com asma induzida pelo antígeno expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal exibem no tecido pulmonar aumento significativo da imunorreatividade para IL-13, ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 no nas vias aéreas e no parênquima pulmonar quando comparado com a imunorreatividade observada na região correspondente dos animais expostos ao veículo ou 1,2-NQ ou somente alérgicos (OVA). A IL-13 no tecido pulmonar, juntamente com as IL-4 e IL-5, aumenta a sobrevivência, ativação e migração de eosinófilos. Nesse sentido, vale acrescentar que aumento na concentração dessas citocinas foi observado no LBA de camundongos selvagens

alérgicos expostos a 1,2-NQ no período neonatal (Florenzano et al., 2018; dados ainda não publicados).

Considerando que as imunoglobulinas CAMs participam ativamente do processo de recrutamento de leucócitos para o local da lesão/inflamação, podemos inferir que essa maior imunorreatividade para ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 justifica a eosinofilia observada no LBA e parênquima pulmonar dos animais selvagens (Santos et al., et al., 2014; 2018 dados não publicados). Ademais, estes resultados indicam que a IL-13 atua como mediador contribuinte importante no aumento da susceptibilidade à inflamação alérgica pulmonar frente à exposição pós-natal ao poluente 1,2-NQ. De fato, a participação da IL-13 tem sido sugerida na diferenciação das células caliciformes, ativação de fibroblastos, aumento da hiperresponsividade brônquica, regulação de IgE e, particularmente, ativação e transmigração eosinofílica, aumento na produção de muco e fibrose (Corren, 2013; Rael, Lockey, 2011;).

As CAMs, como a ICAM-1, são também reguladas pela expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral (TNF- α). Esta citocina pode ativar a c-Src quinase e o NF- κ B e dessa forma, pode regular a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (Lin et al., 2015). Ademais, outros sugerem que a indução de VCAM-1 e ICAM-1 ocorre via sinalização dependente de fatores de transcrição NF κ B e AP-1 mediada por proteína quinase C e MAPKs (Guijarro-Muñoz et al., 2014, Lee et al., 2012). Vale ressaltar que, no pulmão dos camundongos selvagens com exacerbação da inflamação alérgica pulmonar devido à exposição precoce ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal, ocorreu um aumento significativo nas concentrações de TNF- α e da atividade do fator de transcrição NF κ B (Santos et al (2018; dados ainda não publicados do grupo), Assim, os resultados deste estudo sugerem e complementam dados anteriores do grupo, ressaltando a importância das CAMs (ICAM-1, VCAM e PECAM-1) e da estimulação da resposta imune Th1/Th2 na regulação desse fenômeno observado no pulmão dos animais expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal.

Outra correlação positiva importante observada neste estudo foi demonstrada entre o aumento da imunorreatividade para as CAMs/eosinofilia/IL-13 com os sinais de remodelamento no pulmão dos animais selvagens alérgicos pré-expostos ao poluente 1,2-NQ. Tais sinais foram caracterizados morfológicamente pelo aumento significativo na espessura do epitélio brônquico, da área da camada muscular e, também, na espessura da camada muscular. Coletivamente, estes resultados indicam que o aumento da expressão para as CAMs e IL-13 favoreceu a eosinofilia e o remodelamento no tecido pulmonar desses animais. Similarmente, recente estudo de Liu et al. (2018) revelaram que o MP_{2,5}, comumente contaminado por quinonas (ex.: 1,2-NQ), quando instilado nas vias aéreas de camundongo C57BL/6 induziu maior imunorreatividade para ICAM-1 no pulmão destes, via mecanismo dependente da ativação da IL-6/AKT/STAT3/p65 que, subsequentemente promove maior adesão dos leucócitos às células epiteliais alveolares.

Vale acrescentar que mediadores lipídicos, como a cis-leucotrienos (Cis-Lts) participa ativamente no recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, além de promover aumento de permeabilidade vascular e regular a expressão de antígeno tardio (VLA-4) e a expressão da molécula VCAM-1 na circulação local pulmonar (Hur et al., 2018; Leff, 2000). Importaneamente, dados ainda não publicados do nosso grupo (Santos et al., em preparação) também revelaram um aumento significativo na concentração do mediador lipídico LTB₄ no LBA dos animais selvagens com exacerbação da inflamação alérgica pulmonar expostos ao poluente 1,2-NQ na fase pós-natal. Tais resultados podem explicar e contribuir, também, para estimular maior expressão de VCAM-1.

Durante a reação inflamatória, os mediadores inflamatórios podem causar alterações e disfunções celulares, capazes de comprometer a integridade epitelial, afetar o controle neural (sensitivo e autonômico), produção do muco e da função mucociliar, que levam ao aumento da reatividade (hiperresponsividade) do músculo liso das vias aéreas. Nesse cenário, a hiperresponsividade das vias aéreas consiste numa das principais características do modelo de asma alérgica crônica frente a um agonista colinérgico, por exemplo, a MCh (Dai et al., 2017; Santos et al., 2014).

Experimentalmente, a medida da função pulmonar em camundongos continua sendo um desafio que até o momento, nenhum método tem sido eleito como ideal quanto à precisão. O pletismógrafo de corpo inteiro é um método não-invasivo, que permite medidas repetidas e sem a necessidade de anestesia, mas tem validade e precisão questionáveis (Bates e Irvin, 2003, Santos et al., 2014; Zhang et al., 2009). Em contrapartida, os métodos invasivos, como o Flexvent, conseguem medir diretamente a mecânica pulmonar e aérea, resultante de variáveis fisiológicas mais precisas; todavia, possui como principal inconveniente a traqueostomia e o término consequente do experimento e eutanásia do animal, impedindo assim um monitoramento dos animais ao longo do tempo em caso de protocolos crônicos. Por outro lado, alguns autores vêm contornando essa limitação (De Vleeschauwer et al., 2011).

De acordo com estudo prévio do grupo, quando a hiperresponsividade (Penh) em resposta à MCh foi avaliada em vias aéreas de camundongos selvagens com exacerbação da inflamação alérgica pulmonar, previamente expostos na fase neonatal à 1,2-NQ, Santos et al (2014) observaram aumento significativo dessa hiperresponsividade em comparação ao grupo controle. Todavia, diferentemente da inflamação eosinofílica no pulmão desses animais, a hiperresponsividade frente à MCh não foi diferente da resposta obtida no respectivo grupo de camundongos selvagens submetidos à asma e exposto somente ao veículo do poluente (Santos et al., 2014). Neste estudo, com o intuito de validar essa discrepância, os animais expostos ao poluente 1,2-NQ e OVA foram submetidos à medida da função pulmonar pela técnica de Flexvent, uma metodologia de oscilação forçada, que conforme citado anteriormente permite a medida de parâmetros fisiologicamente relevantes, incluindo as propriedades mecânicas do sistema respiratório (parâmetros de resistência das vias aéreas, do parênquima pulmonar, elastância do parênquima pulmonar), distinguindo ainda a mecânica das vias aéreas e do tecido pulmonar (Vanoirbeek et al., 2010).

Curiosamente, os resultados desta análise invasiva utilizando Flexvent revelou que, ao contrário dos resultados prévios (Santos et al., 2014), os

camundongos com inflamação alérgica pulmonar pré-expostos à 1,2-NQ na fase neonatal, exibiram um aumento significativo da responsividade à MCh nas vias aéreas destes em relação aos camundongos com inflamação alérgica expostos somente ao veículo do poluente e, também, em relação à responsividade observada no grupo controle (veículo) ou exposto somente ao poluente 1,2-NQ. Nesses animais, foi possível observar alterações nos parâmetros de resistência das vias aéreas (R_n) e do parênquima pulmonar (G), não sendo observada nenhuma diferença quanto à elastância (H) do parênquima pulmonar em relação ao controle. Em conclusão, esses resultados discordam dos resultados anteriores e corroboram os achados de parâmetros inflamatórios no pulmão dos animais (infiltração eosinófila, aumento de citocinas e outros mediadores inflamatórios) e de vários estudos publicados (Cho et al., 2004b; Dai et al., 2017, Sjöberg et al., 2017). Contudo, é importante ressaltar que o pulmão, apesar de ser altamente influenciado pelas propriedades mecânicas do sistema respiratório, este pode frequentemente continuar exercendo suas funções sob condições de volume corrente, apesar das evidências inflamatórias e histopatológicas (eosinofilia, remodelamento etc.) significativas.

Em geral, o remodelamento atua como fator determinante para a obstrução das vias aéreas durante o processo inflamatório crônico. Este se deve, em grande parte, à ativação e proliferação das células epiteliais e miofibroblastos, estimulando assim a deposição intersticial de colágeno e de proteoglicanos na lâmina reticular da membrana basal. Isto leva ao subsequente espessamento, Ademais, a hipertrofia e hiperplasia do músculo liso, bem como o aumento do número de células calciformes, glândulas e vasos sanguíneos submucosos, além de alteração no depósito/degradação dos componentes da matriz extracelular, constituem fatores clínicos relevantes para a progressão e instalação do quadro de remodelamento das vias aéreas, que interferem na estrutura das vias aéreas e, subsequentemente, na disfunção e obstrução brônquica. Ademais, as células Th-17, contribuem para a fisiopatologia da asma e o remodelamento e obstrução das vias aéreas (Wang et al., 2010).

Vale ressaltar que, segundo Santos et al (2018; dados ainda não publicados), em células esplênicas de camundongos C57BL/6 selvagens expostos a 1,2-NQ no período neonatal e re-estimulada *in vitro* com PMA e ionomicina, a porcentagem de linfócitos Th17 (CD4⁺/IL-17⁺) aumentou significativamente, indicando que o poluente 1,2-NQ *per se* contribui para a exacerbação da fisiopatogenia da inflamação alérgica pulmonar e, conseqüentemente, na indução da hiperresponsividade nas vias aéreas deste frente à MCh, possivelmente por promover o remodelamento das vias aéreas.

Reforçando essas sugestões, a análise morfométrica neste estudo, revelou aumento significativo da área da camada muscular peribronquiolar bem como da espessura da camada muscular nos camundongos selvagens com exacerbação da inflamação alérgica pulmonar expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal em relação ao grupo controle, independentemente de alterações no epitélio brônquico. Vale ressaltar que, tanto experimentalmente em modelos de asma quanto em exames *post mortem* de pacientes com asma, a eosinofilia contribui grandemente para o espessamento da musculatura lisa peri-brônquica, fibrose sub epitelial e aumento da produção de muco, possivelmente pelo aumento na liberação do fator de crescimento fibrótico (TGF- β). Em modelo animal, observou-se que, além do espessamento da musculatura lisa, ocorreu aumento de fibrose, que não foram completamente abolidas em animais deficientes de IL-5 indicando que outros mecanismos podem estar envolvidos no remodelamento observado (Cho JY et al., 2004, Elliot et al., 2015).

Associado a isto, sabe-se que a hipersecreção de muco formado dentro das vias aéreas por uma matriz polimérica de glicoproteínas denominadas mucinas, associada a hipertrofia e hiperplasia de células caliciformes acaba por limitar o fluxo aéreo dentro das vias aéreas. A função do muco é, em geral, proteger, hidratar e lubrificar a superfície das mucosas, bem como remover substâncias irritantes por meio do *clearance* mucociliar. Mudanças na composição da glicoproteína secretada (neutra ou ácida) alteram as propriedades reológicas do muco. Assim, o aumento de glicoproteína ácida resulta em maior viscosidade do muco, dificultando assim a

defesa pulmonar, pois favorece maior resposta inflamatória e aumento da resistência das vias aéreas (Wagner et al., 2001).

Ao avaliar os pulmões dos camundongos selvagens alérgicos expostos à 1,2-NQ na fase neonatal, observou-se aumento significativo na produção de muco ácido e neutro em relação aos respectivos grupos controle expostos ao veículo; entretanto, esse aumento não diferiu estatisticamente do respectivo grupo alérgico, Inoue et al. (2007 a,b) demonstraram hiperplasia de células caliciformes e aumento da expressão (RNAm) de mucina (MUC5A) e IL-13, independentemente de estímulos secundários, após a administração i.tr. de doses repetidas de 1,2-NQ em camundongos adultos. Apesar de relevantes, este resultado não corrobora a sugestão de que a exposição precoce ao poluente 1,2-NQ exacerba as ações do antígeno em vias aéreas de camundongos, pelo menos, no que tange à produção de muco. Entretanto, outros estudos demonstram o efeito deletério da PAA sobre a produção de muco, tanto *in vitro* em cultura de células humanas quanto em modelos animais (Alessandrini et al., 2006; Künzi et al., 2013).

Em continuidade ao estudo, sabendo que a deposição de fibras colágenas é outro parâmetro observado no remodelamento e ainda na estrutura e função das vias aéreas, averiguou-se a presença de colágeno no pulmão dos animais. As fibras colágenas mantêm a estabilidade alveolar, vascular e das vias aéreas, limitando a expansão pulmonar; contudo, alterações na sua deposição nos pulmões consistem, em geral, em sinônimo de fibrose. Observamos aqui que a exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ não alterou significativamente a deposição de colágeno nas vias aéreas ou vasos peribronquiolares de camundongos selvagens alérgicos expostos à 1,2-NQ. Em contrapartida, Ma et al. (2014) revelaram que a exposição crônica de animais ao MP liberado na exaustão do diesel (a PEDs) causou fibrose pulmonar. A discrepância desses resultados pode estar relacionada às diferenças de linhagens, bem como o tipo de PAA, uma vez que o MP é sabidamente capaz de estimular o TGF β por sua vez, estimula a fisiopatogenia do remodelamento (Zheng et al., J Hepatol. 2015 Dec; 63(6): 1397–1404.).

As metaloproteinases (MMPs) compreendem uma família de pró-enzimas proteolíticas, principalmente durante a inflamação alérgica, que são produzidas por células inflamatórias, mas também por outras células pulmonares, como as células epiteliais e fibroblastos. A MMP-9 é amplamente produzida por leucócitos, sendo capazes de degradar material colágeno e, assim, danificar as células e tecido pulmonar. O aumento da expressão de MMP-9, MMP-12 e fibronectina tem sido associado ao agravamento da asma em indivíduos asmáticos. Essas alterações de matriz, podem levar ao espessamento da parede muscular, redução do lúmen e fibrose.

A ausência de diferenças na expressão das MMP-9 no parênquima ou vias aéreas de animais expostos a 1,2-NQ e OVA em relação aos respectivos controles (veículo ou alérgico), sugerem que neste modelo experimental, a MMP-9 não exerce papel relevante na exacerbação do infiltrado de células inflamatórias (leucócitos) no pulmão dos animais expostos a 1,2-NQ, pelo menos no período avaliado. Por outro lado, o aumento da expressão para MMP-9 tem sido demonstrado no endotélio associado com endotelina 1 em modelo animal exposto ao MP eliminado na exaustão do diesel (Amie et al., 2009).

Receptores TLR4 e 1,2-NQ

De acordo com várias evidências, a exacerbação da sinalização mediada por TLR4, leva à produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias e , consequentemente, à lesão tecidual. Assim, a regulação negativa ou o bloqueio da sinalização TLR4, representa um excelente alvo farmacológico para diversos processos inflamatórios (ref. revisão).

Vale ressaltar, em termos mecanísticos, que um papel parcial para o receptor TLR4, capaz de atenuar a eosinofilia alérgica, foi demonstrado para os camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal (Santos et al., 2018; dados ainda não publicados). Neste estudo, os resultados reforçam essa sugestão e mostram que no pulmão dos animais nocautes TLR4 expostos ao poluente 1,2-NQ e

estímulo antigênico (OVA), foi observado menor Imunorreatividade para as CAMs ICAM-1 e VCAM-1, mas não PECAM-1, em relação ao respectivo grupo selvagem.

Ao contrário dos achados obtidos nos camundongos selvagens, observamos que, assim como a supressão da inflamação alérgica pulmonar em camundongos nocautes TLR4 expostos ao poluente 1,2-NQ, as alterações estruturais no pulmão destes animais foram inibidas (espessamento da camada muscular brônquica e produção de muco ácido), sugerindo que tais receptores estão envolvidos nos mecanismos que deflagram as alterações estruturais nas vias aéreas dos camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ. Da mesma forma, a deleção dos receptores TLR4 contribuiu para reduzir a produção de muco (mucina acida) no pulmão dos camundongos submetidos ao poluente 1,2-NQ e OVA, reforçando assim a sugestão de que a ausência ou bloqueio dos TLR4 inibe a eosinofilia que, conseqüentemente, suprime sinais de remodelamento das vias aéreas, incluindo a produção de muco.

O mecanismo envolvido é dependente, em parte, da inibição de respostas Th2, visto que a imunorreação para IL-13 foi também reduzida no pulmão dos camundongos nocautes TLR4 expostos ao poluente e OVA. Corroborando esses achados, Santos et al (2018; dados não publicados) também observaram, via citômetro de fluxo, redução significativa da população de células Th17 (CD4+/IL-17+) e Th2 (CD4+/IL-4+) em esplenócitos obtidos de camundongos nocautes TLR4 expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal e, depois, estimuladas *in vitro* com OVA. Em conjunto, esses dados reforçam que o estímulo (exposição) neonatal frente ao poluente 1,2-NQ, leva à ativação (direta/indiretamente) dos receptores TLR4 que, subsequentemente, promove ativação de respostas Th2. Outros estudos mostram correlação semelhante entre a hipersecreção de muco induzido por LPS e os receptores TLR4, no qual foi demonstrado que o bloqueio dos receptores TLR4 promove redução no aumento da expressão de MUC5AC induzida por proteínas S100 em cultura de células do epitélio brônquico humano (Chen et al., 2009, Kang et al., 2015). O efeito estimulante da PAA sobre a produção de muco, tanto em cultura de células humanas quanto em modelos animais foi demonstrado em vários estudos, sendo a redução deste efeito também observado em animais nocautes de

TLR4 (Alessandrini et al., 2006; Künzi et al., 2013). Curiosamente, Drug et al (2011) demonstraram que as mucinas são capazes de solubilizar hidrocarbonetos aromáticos (PHA) presentes em PM e, assim, facilitar o transporte e acúmulo destas substâncias no citoplasma das células.

No remodelamento, a deposição de fibras colágenas é outro parâmetro que contribui para esse quadro, que pode evoluir para disfunção brônquica nas vias aéreas. Assim, alterações na sua deposição nos pulmões consiste, em geral, em sinônimo de fibrose. Neste estudo, muito embora sinais de remodelamento associados à eosinofilia e hiperresponsividade foram mensurados nos pulmões dos camundongos selvagens com inflamação alérgica exacerbada, resultante da exposição precoce ao poluente 1,2-NQ, não foi detectado aumento significativo da porcentagem de fibras colágenas na região peribronquiolar ou dos vasos. Curiosamente, nos camundongos nocautes expostos ao mesmo tratamento, um aumento marcante na deposição de fibras colágenas foi observado. Esse resultado é curioso sugere potencial resposta reparativa frente à inflamação alérgica induzida pelo antígeno. De fato, esse resultado corrobora outros achados, que mostram que a atividade do TLR4 é crítica no evento de resolução da inflamação aguda e crônica e fibrose pulmonar em modelos animais de lesão pulmonar, uma vez que a inibição genética ou farmacológica do TLR4 pode exacerbar estas respostas (Canale-Zambrano et al., 2010; John et al., 2010, Yang et al., 2012, Liang et al., 2016).

Por seu turno, apesar da MMP-9 ser produzida por leucócitos e, sua função está correlacionada com a degradação material colágeno e lesão de células e tecido pulmonar, a expressão da MMP-9 não foi alterada no parênquima ou vias aéreas de animais selvagens ou nocautes TLR4 expostos a 1,2-NQ e OVA. Estes resultados sugerem que as MMP-9 não participam na exacerbação do infiltrado de células inflamatórias (leucócitos) no pulmão dos animais expostos a 1,2-NQ.

Em conjunto, os resultados deste estudo corroboram a hipótese de que a eosinofilia exacerbada nas vias aéreas de camundongos selvagens expostos na fase pós-natal ao poluente 1,2-NQ resultam, em parte, de alterações estruturais e mecanismos celulares desencadeadas pelo aumento da expressão das CAMs (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) e citocinas Th2 (IL-13), Como consequência, isto

contribui para promover e estimular sinais de remodelamento pulmonar (aumento na produção de muco, deposição de colágeno e hiperresponsividade relacionada ao espessamento da camada muscular brônquica) que, subsequentemente, promove hipersensibilidade das vias aéreas. Conclui-se que, na presença dos TLR4, o aumento da imunorregulação das CAMs (ICAM-1 e VCAM-1, mas não PECAM) funciona como *feedback* positivo na exacerbação da eosinofilia em camundongos sensibilizados na fase neonatal com o poluente 1,2-NQ. Portanto, o poluente eletrofílico 1,2-NQ representa um fator importante no agravamento da asma alérgica, ao primar respostas Th2.

Avaliação translacional do impacto celular da 1,2-NQ sobre a funcionalidade de PMN de voluntários sadios

Como objetivo de correlacionar e validar (com apelo translacional) se a ação lesiva do poluente 1,2-NQ sobre a resposta imune inata (células e receptores TLR4) de roedores (camundongos) afetaria também a funcionalidade de células inflamatórias (PMN) obtidas de sangue humano, foi realizado ensaios funcionais (migração) em células PMN (neutrófilos e eosinófilos) isoladas de voluntários sadios.

Sabe-se que a eotaxina-1 (quimiocina CCL11) promove a mobilização dos eosinófilos e sua liberação da medula óssea. Liga-se ao receptor CCR3, expresso nos eosinófilos e em basófilos (em humanos). A ligação entre CCR3 e eotaxina desencadeia mecanismos que levam ao influxo de Ca^{2+} , ocorrendo ativação da quinase da cadeia leve da miosina (MLCK) que leva ao rearranjo do citoesqueleto de actina e assim, à quimiotaxia. Em ensaios de quimiotaxia *in vitro* é utilizada para induzir um gradiente quimiotático que leva à migração celular.

Com o intuito de especular se a pré-incubação com a 1,2-NQ é capaz de alterar a funcionalidade dos eosinófilos, foi realizado o ensaio de quimiotaxia *in vitro* em favor do gradiente frente à eotaxina. A pré-incubação dos eosinófilos com 1,2-NQ, foi capaz de modificar a migração induzida pela eotaxina, aumentando a quimiotaxia dessas células. Essa resposta foi abolida pelo rS-LPS, um antagonista de TLR4, que regula as vias de sinalização JNK/p38 MAPKs e p65-NF- κ B, além de mediar a inibição do gene de expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80,

CD86 e CD40) de quimiocinas e seus receptores (Gaikwad et al., 2015). Quando a 1,2-NQ foi testada como agente quimiotático, ocorreu aumento da migração dessas células, embora não estatisticamente relevante em relação ao controle RPMI.

Por sua vez, o N-formilmetionina-leucil-fenilalanina (fMLP) é um conhecido quimiotático para neutrófilos. Representa uma variedade de peptídeos derivados de bactéria. O fMLP Liga-se à receptores de superfície celular acoplados à proteína G_{12} (Iiri et al., 1989) e a estimulação dos neutrófilos por esse agente, ativa as vias de sinalização intracelular mediadas por fosfolipase C (PLC), fosfolipase A_2 , fosfolipase D (PLD) e MAPKs que, sabidamente, regulam varias funções celulares (Nicki et al., 1997, Selvatici et al., 2006). Neste estudo, a quimiotaxia dos neutrófilos frente ao fMLP foi significativamente aumentada quando comparada à quimiotaxia espontânea (RPMI) ou ao veículo do poluente. No entanto, a pré-incubação dos neutrófilos na microplaca com a 1,2-NQ não foi capaz de modificar a migração induzida por fMLP e, da mesma forma, a 1,2-NQ não foi capaz de induzir per se a quimiotaxia dos neutrófilos, excluindo assim o potencial quimiotático para esse poluente.

Para investigar se esta resposta da capacidade migratória foi devida a um possível processo de apoptose, avaliou-se a viabilidade de eosinófilos e neutrófilos após tratamento com 1,2-NQ in vitro utilizando células marcadas com anexina V e 7-AAD. A apoptose é um processo fisiológico normal para manutenção da homeostase tecidual. É caracterizada por certas características morfológicas que incluem perda de assimetria da membrana plasmática, condensação do citoplasma e núcleo e fragmentação internucleossômica de DNA.

Em células apoptóticas, o fosfolípídeo de membrana fosfatidilserina (PS) é exposto na superfície externa da membrana plasmática, durante o estágio inicial do processo. A anexina V, uma proteína de ligação para fosfolípídeos dependente de Ca^{2+} se liga à PS. Por outro lado, células mortas são permeáveis ao 7-AAD.

A pré-incubação com 1,2-NQ por 20 minutos não induziu apoptose tardia (células anexina V e 7-AAD positivas) em eosinófilos ou neutrófilos humanos. No entanto, essas células apresentaram alta porcentagem no estágio inicial de apoptose (células anexina V positivas/7-AAD negativas). Ressalta-se que as células controles apresentaram o mesmo perfil. Acredita que esse resultado decorra do

tempo levado para realizar as leituras após a incubação com os marcadores, que ocorreu após 1 hora da incubação.

Os resultados apresentados, sugerem que o mecanismo dependente do receptor TLR4 ajuda a suprimir a exacerbação da inflamação alérgica pulmonar após exposição neonatal à 1,2-NQ sem afetar a fibrose via perda de moléculas de adesão (PECAM-1 e VCAM-1), importantes nos processos de adesão e migração celular.

Da mesma forma que os efeitos quimiotáticos da 1,2-NQ nas vias aéreas murinas, a exposição de PMN humano com o poluente levou ao aumento da quimiotaxia de eosinófilos, mas não de neutrófilos. E essa resposta não se deve a um processo de apoptose. Assim, os resultados sugerem que o contato precoce com 1,2-NQ, um contaminante de partículas, possa ser um indutor potencial de inflamação.

7 RESUMO E CONCLUSÕES

1. A exposição de camundongos neonatos à 1,2-NQ foi capaz de induzir a hiperresponsividade das vias aéreas destes na fase adulta.
2. Este efeito correlaciona-se com o remodelamento observado nos pulmões destes animais, caracterizado pelo aumento da área e espessura da musculatura lisa peri-brônquica e do epitélio das vias aéreas em camundongos selvagens alérgicos. Essas alterações não foram observadas em camundongos nocaute TLR4-/-.
3. A eosinofilia nas vias aéreas de camundongos selvagens expostos à 1,2-NQ pode ser explicada pelo aumento da expressão das CAMs (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) e da citocinas Th2 (IL-13), e desse modo, essas alterações em conjunto promovem o remodelamento, que foi inibido em camundongos nocaute.
4. Este estudo mostra, também, que a 1,2-NQ é capaz de ativar eosinófilos humano (mas não neutrófilos) e aumentar a quimiotaxia induzida pela eotaxina. E este efeito, é bloqueado pelo LPS-RS, um antagonista do TLR4. Tais resultados, mostram que, assim como demonstrado no modelo animal, o mecanismo do poluente 1,2-NQ em células humanas, envolve o TLR4.

REFERÊNCIAS

Alves CA, Barbosa C, Rocha S, Calvo A, Nunes T, Cerqueira M, Pio C, Karanasiou A, Querol X. Elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in exhaust particles emitted by light-duty vehicles. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2015. Aug;22(15):11526-42.

Amie et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Apr; 29(4): 511–517

Andersson C, Tufvesson E, Diamant Z, Bjermer L. Revisiting the role of the mast cell in asthma. *Curr Opin Pulm Med*. 2016 Jan;22(1):10-7. doi: 10.1097/MCP.0000000000000228.

Aphekom. (2011). Improving knowledge and communication for decision making on air pollution and health in Europe. Summary report of the Aphekom project 2008–2011.

Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013 Sep;13(9):679-92. doi: 10.1038/nri3495.

Asher M.I., Montefort S., Bjorksten B. et al. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, vol. 368, p.733-43, 2006.

Aubier M, Thabut G, Hamidi F, Guillou N, Brard J, Dombret MC, Borensztajn K, Aitilaine B, Poirier I, Roland-Nicaise P, Taillé C, Pretolani M. Airway smooth muscle enlargement is associated with protease-activated receptor 2/ligand overexpression in patients with difficult-to-control severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Sep;138(3):729-739.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2015.12.1332.

Baines KJ, Simpson JL, Wood LG, Scott RJ, Gibson PG. Transcriptional phenotypes of asthma defined by gene expression profiling of induced sputum samples. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 127:153–60, e9.

Barbato A, Turato G, Baraldo S, Bazzan E, Calabrese F, Panizzolo C, Zanin ME, Zuin R, Maestrelli P, Fabbri LM et al.: Epithelial damage and angiogenesis in the airways of children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006, 174:975-981.

Barros MB, César CL, Carandina L, Torre GD. Desigualdades sociais na prevalência de doenças crônicas no Brasil, PNAD-2003. *Ciênc Saúde Coletiva* 2006; 11: 911–26.

Barthel SR, Johansson MW, McNamee DM, Mosher DF. Roles of integrin activation in eosinophil function and the eosinophilic inflammation of asthma. *J Leukoc Biol*. 2008 Jan;83(1):1-12.

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

Bhandari V, Choo-Wing R, Chapoval SP, Lee CG, Tang C, Kim YK, et al. Essential role of nitric oxide in VEGF-induced, asthma-like angiogenic, inflammatory, mucus, and physiologic responses in the lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:11021-6.

Birring SS, Patel RB, Parker D, et al. Airway function and markers of airway inflammation in patients with treated hypothyroidism. *Thorax* 2005;60:249–53.

Boldogh I, Bacsı A, Choudhury BK, Dharajiya N, Alam R, Hazra TK, Mitra S, Goldblum RM, Sur S. ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation. *J Clin Invest.* 2005;115:2169–2179.

Bolton J.L., Trush M.A., Penning T.M., Dryhurst G., Monks T.J. Role of quinones in toxicology, *Chem. Res. Toxicol.* 13 (2000) 135–160.

Bowatte G, Lodge C, Lowe AJ, Erbas B, Perret J, Abramson MJ, Matheson M, Dharmage SC. The influence of childhood traffic-related air pollution exposure on asthma, allergy and sensitization: a systematic review and a meta-analysis of birth cohort studies. *Allergy.* 2015 Mar;70(3):245-56. doi: 10.1111/all.12561.

Brightling CE, Bradding P, Symon FA, Holgate ST, Wardlaw AJ, Pavord ID. Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *N Engl J Med* 2002; 346:1699-705.

Broide DH, Humber D, Sullivan S, Sriramaraio P. Inhibition of eosinophil rolling and recruitment in P-selectin- and intracellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Blood.* 1998 Apr 15;91(8):2847-56.

Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res.* 2006;7:135.

Busse WW. The Relationship of Airway Hyperresponsiveness and Airway Inflammation: Airway Hyperresponsiveness in Asthma: Its Measurement and Clinical Significance. *Chest.* 2010;138(2 Suppl):4S-10S. doi:10.1378/chest.10-0100.

Carman, C.V. & T.A. Springer. 2008. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr. Opin. Cell Biol.*20: 533–540.62.

Chang CC et al. Effects of concentrated ambient particles on heart rate, blood pressure, and cardiac contractility in spontaneously hypertensive rats. *Inhalation Toxicology*, 2004, 16:421–429.

Chen M, Lv Z, Jiang S. The effects of triptolide on airway remodelling and transforming growth factor- β 1/Smad signalling pathway in ovalbumin-sensitized mice. *Immunology*, 2011, 132: 376–384.

Chen L, Wang T, Zhang JY, Zhang SF, Liu DS, Xu D, Wang X, Chen YJ, Wen FQ. Toll-like receptor 4 relates to lipopolysaccharide-induced mucus hypersecretion in rat airway. *Arch Med Res.* 2009 Jan;40(1):10-7.

Cho A.K., Stefano E.D., You Y., Rodriguez C.E., Schmitz D.A., Kumagai Y., Miguel A.H., Eiguren-Fernandez A., Kobayashi T., Avol E., Fronines J.R. Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649a and atmospheric PM_{2.5}, *Aerosol. Sci. Technol.* 2004a; 38, 1–14.

Cho JY, Miller M, Baek KJ, et al. Inhibition of airway remodeling in IL-5–deficient mice. *Journal of Clinical Investigation.* 2004b;113(4):551-560.

Choi CH, Thomason PA, Zaki M, Insall RH, Barber DL. Phosphorylation of actin-related protein 2 (Arp2) is required for normal development and cAMP chemotaxis in *Dictyostelium*. *Journal of Biological Chemistry.* 2013;288:2464–2474.

Chung MY, Lazaro RA, Lim D, Jackson J, Lyon J, et al. 2006. Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. *Environ. Sci. Technol.* 40:4880–86

Cokugras H, Akcakaya N, Seckin, Camcioglu Y, Sarimurat N, Aksoy F: Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 2001, 56:25-29.

Cookson W. The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:978–988.

Cooper PJ, Chico ME, Bland M, Griffin GE, Nutman TB. Allergic symptoms, atopy, and geohelminth infections in a rural area of Ecuador. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 313–17.

Cooper PJ, Rodrigues LC, Cruz AA, Barreto ML. Asthma in Latin America: a public health challenge and research opportunity. *Allergy* 2009; 64: 5–17.

Croft M, Dubey C. Accessory Molecule and Costimulation Requirements for CD4 T Cell Response. *Crit Rev Immunol.* 2017;37(2-6):261-290. doi: 10.1615/CritRevImmunol.v37.i2-6.60

Corren J. Role of interleukin-13 in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013ct;13(5):415-20. doi: 10.1007/s11882-013-0373-9.

Dai R, Liu J, Cai S, Zheng C, Zhou X. Delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates airway responsiveness and inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *American Journal of Translational Research.* 2017;9(5):2421-2428.

Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Huguen 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 Jun 20;24(6):950-9. doi:10.1021/tx200123z.

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 Dec;53(6):893-901. doi: 10.1165/rcmb.2015-0086OC.

[Delgado-Saborit](#), JM, [Alam](#), MS, [Pollitt](#), KJG, Stark, C, Harrison, RM. Analysis of atmospheric concentrations of quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons in vapour and particulate phases. *Atmospheric Environment Volume 77*, October 2013, Pages 974-982

Dent G, Hadjicharalambous C, Yoshikawa T, Handy RL, Powell J, Anderson IK, Louis R, Davies DE, Djukanovic R. Contribution of eotaxin-1 to eosinophil chemotactic activity of moderate and severe asthmatic sputum. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004 May 15;169(10):1110-7.

DeStefano-Shields C, Morin D, Buckpitt A. 2010. Formation of covalently bound protein adducts from the cytotoxicant naphthalene in nasal epithelium: species comparisons. *Environ. Health Perspect*. 118:647–52.

Dirnböck T, Djukic I, Kitzler B, Kobler J, Mol-Dijkstra JP, Posch M, Reinds GJ, Schlutow A, Starlinger F, Wamelink WGW. Climate and air pollution impacts on habitat suitability of Austrian forest ecosystems. *PLoS One*. 2017 Sep 12;12(9):e0184194.

Doerner AM, Zuraw BL. TGF- β 1 induced epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells is enhanced by IL-1 β but not abrogated by corticosteroids. *Respiratory Research*. 2009;10(1):100. doi:10.1186/1465-9921-10-100.

Doherty T, Broide D. Cytokines and growth factors in airway remodeling in asthma. *Curr Opin Immunol* 2007;19:676-80.

Eiguren-Fernandez A, Miguel A, Di Stefano E, Schmitz D, Cho AK, et al. 2008. Atmospheric distribution of gas- and particle-phase quinones in Southern California. *Aerosol Sci. Technol*. 42:854–61

Eiguren-Fernandez A, Miguel AH, Froines JR, Thurairatnam S, Avol EL. 2004. Seasonal and spatial variation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vapor-phase and PM_{2.5} in Southern California urban and rural communities. *Aerosol Sci. Technol*. 38:447–55

Elliot JG, Jones RL, Abramson MJ, Green FH, Mauad T, McKay KO, Bai TR, James AL. Distribution of airway smooth muscle remodelling in asthma: relation to airway inflammation. *Respirology*. 2015 Jan;20(1):66-72.

Elshaw SR, Henderson N, Knox AJ, Watson SA, Buttle DJ, Johnson SR. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol* 2004;142:1318–1324.

Endo, A., Sumi, D., Iwamoto, N., and Kumagai, Y. Inhibition of DNA binding activity of cAMP response element-binding protein by 1,2-naphthoquinone through chemical modification of Cys-286. *Chem.-Biol. Interact.* 2011; 192, 1117–1122.

Fedorov IA, Wilson SJ, Davies DE, Holgate ST: Epithelial stress and structural remodelling in childhood asthma. *Thorax* 2005, 60:389-394.

Finlayson-Pitts B, Pitts J. 2000. *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere: Theory, Experiments, and Applications*. San Diego, CA: Academic

Flood-Page P, Menzies-Gow A, Phipps S, et al. Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics. *J Clin Invest* 2003; 112:1029–1036.

Frevert CW, Wong VA, Goodman RB, Goodwin R, Martin TR. Rapid fluorescence-based measurement of neutrophil migration in vitro. *J Immunol Methods*. 1998 Apr 1;213(1):41-52.

Freyer, AM, Johnson, SR, Hall, IP. Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 25, no. 5, pp. 569–576, 2001.

Gaikwad S, Agrawal-Rajput R. Lipopolysaccharide from *Rhodobacter sphaeroides* Attenuates Microglia-Mediated Inflammation and Phagocytosis and Directs Regulatory T Cell Response. *International Journal of Inflammation*. 2015;2015:361326. doi:10.1155/2015/361326.

GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2015;385:117–71.

Gibson PG, Simpson JL, Saltos N. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma. *Chest* 2001; 119:1329–36.

Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA) 2012. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.

Gregory B, Kirchem A, Phipps S, Gevaert P, Pridgeon C, Rankin SM, Robinson DS. Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. *J Immunol*. 2003 Jun 1;170(11):5359-66.

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD. Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:659-702. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.

Hackett TL. Epithelial-mesenchymal transition in the pathophysiology of airway remodelling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2012 Feb;12(1):53-9. doi: 10.1097/ACI.0b013e32834ec6eb.

Haj-Salem I, Plante S, Gounni AS, Rouabhia M, Chakir J. Fibroblast-derived exosomes promote epithelial cell proliferation through TGF- β 2 signalling pathway in severe asthma. *Allergy*. 2018 Jan;73(1):178-186. doi: 10.1111/all.13234.

Haldar P, Brightling CE, Hargadon B, et al. Mepolizumab and exacerbations of refractory eosinophilic asthma. *N Engl J Med* 2009; 360:973–984.

Hansel TT, De Vries IJ, Iff T, Rihs S, Wandzilak M, Betz S, et al. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J Immunol Methods* 1991;145:105–10.

Hartley RA, Barker BL, Newby C, et al. Relationship between lung function and quantitative computed tomographic parameters of airway remodeling, air trapping, and emphysema in patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease: A single-center study. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2016;137(5):1413-1422.e12. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.001.

Hazari, M. S., Haykal-Coates, N., Winsett, D. W., Krantz, Q. T., King, C., Costa, D. L., and Farraj, A. K. (2011) TRPA1 and sympathetic activation contribute to increased risk of triggered cardiac arrhythmias in hypertensive rats exposed to diesel exhaust. *Environ Health Perspect*. 10.1289/ehp.1003200.

He M, Ichinose T, Yoshida Y, Arashidani K, Yoshida S, Takano H, Sun G, Shibamoto T. Urban PM_{2.5} exacerbates allergic inflammation in the murine lung via a TLR2/TLR4/MyD88-signaling pathway. *Sci Rep*. 2017 Sep 8;7(1):11027.

Health Effects Institute. 2018. State of Global Air 2018. Special Report. Boston, MA:Health Effects Institute Hirota R, Akimaru K, Nakamura H. In vitro toxicity evaluation of diesel exhaust particles on human eosinophilic cell. *Toxicol In Vitro*. 2008 Jun;22(4):988-94.

Hirst, S. J., Martin, J. G., Bonacci, J. V. et al., "Proliferative aspects of airway smooth muscle," *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 114, no. 2, pp. S2–S17, 2004.

Hizume DC, Toledo AC, Moriya HT, Saraiva-Romanholo BM, Almeida FM, Arantes-Costa FM, Vieira RP, Dolhnikoff M, Kasahara DI, Martins MA. Cigarette smoke dissociates inflammation and lung remodeling in OVA-sensitized and challenged mice. *Respir Physiol Neurobiol*. 2012 Apr 30;181(2):167-76.

Hodge S, Holmes M, Banerjee B, Musk M, Kicic A, Waterer G, Reynolds PN, Hodge G, Chambers DC. Posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome is associated with bronchial epithelial to mesenchymal transition. *Am J Transplant* 2009;9:727–733.

Hopkins LE, Laing EA, Peake JL, Uyeminami D, Mack SM, Li X, Smiley-Jewell S, Pinkerton KE. Repeated Iron-Soot Exposure and Nose-to-brain Transport of Inhaled Ultrafine Particles. *Toxicol Pathol*. 2018 Jan;46(1):75-84.

Howarth, PH, Knox, AJ, Amrani, Y, Tliba, O, Panettieri, RA, Johnson, M. Synthetic responses in airway smooth muscle. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 114, no. 2, supplement 1, pp. S32–S50, 2004.

IARC: Diesel Engine Exhaust Carcinogenic, World Health Organization Press Release No. 213, June 12, 2012.

IARC – International Agency for Research on Cancer and World Health Organization IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Diesel and Gasoline Engine Exhaust and Some Nitroarenes, vol. 105 (2013)

IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures, IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum., 92 (2010), p. 773

IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene, IARC Monogr Eval. Carcinog. Risks Hum., 82 (2002), pp. 1-556

Inoue K, Takano H, Hiyoshi K, Ichinose T, Sadakane K, Yanagisawa R, Tomura S, Kumagai Y. Naphthoquinone enhances antigen-related airway inflammation in mice. *Eur Respir J* (2007a) 29:259–267

Inoue K, Takano H, Ichinose T, Tomura S, Yanagisawa R, Sakurai M, Sumi D, Cho AK, Hiyoshi K, Kumagai Y. Effects of naphthoquinone on airway responsiveness in the presence or absence of antigen in mice. *Arch Toxicol* (2007b) 8:575–581

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Hirano S, Ichinose T, Shimada A, et al. The role of toll-like receptor 4 in airway inflammation induced by diesel exhaust particles. *Arch Toxicol* 2006;80:275-9.

Iiri T, Tohkin M, Morishima N, Ohoka Y, Ui M, Katada TJ Chemotactic peptide receptor-supported ADP-ribosylation of a pertussis toxin substrate GTP-binding protein by cholera toxin in neutrophil-type HL-60 cells. *Biol Chem*. 1989 Dec 15; 264(35):21394-400.

Iwamoto N, Sumi D, Ishii T, Uchida K, Cho AK, et al. Chemical knockdown of protein tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem*. 2007. 282:33396–404

[Jacobsen](#), EA [Doyle](#), AD, [Colbert](#), DC [Zellner](#), KR, [Protheroe](#), CA, [LeSuer](#), WE, [Lee](#), NA, [Lee](#), JJ. Differential Activation of Airway Eosinophils Induces IL-13 Mediated Allergic Th2 Pulmonary Responses in Mice. *Allergy*. 2015 Sep; 70(9): 1148–1159.

Jakober CA, Riddle SG, Robert MA, Destailats H, Charles MJ, Green PG, et al. 2007. Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles. *Environ Sci Technol* 41(13):4548–4554.

Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.* 2009. Jun;61(2):198-223. doi: 10.1124/pr.109.001289.

James AL, Wenzel S: Clinical relevance of airway remodelling in airway diseases. *Eur Respir J* 2007, 30:134-155.

Kampen GT, Stafford S, Adachi T, Jinqun T, Quan S, Grant JA, Skov PS, Poulsen LK, Alam R. Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood.* 2000 Mar 15;95(6):1911-7.

Kang JH, Hwang SM, Chung IY. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B pathways. *Immunology.* 2015 Jan;144(1):79-90.

Karavalakis G, Gysel N, Schmitz DA, Cho AK, Sioutas C, Schauer JJ, Cocker DR, Durbin TD. Impact of biodiesel on regulated and unregulated emissions, and redox and proinflammatory properties of PM emitted from heavy-duty vehicles. *Sci Total Environ.* 2017 Apr 15;584-585:1230-1238.

Kariyawasam HH, Robinson DS (2007) The role of eosinophils in airway tissue remodelling in asthma. *Curr Opin Immunol* 19: 681–686.

Kautzman KE, Surratt JD, Chan MN, Chan AWH, Hersey SP, et al. 2010. Chemical composition of gas- and aerosol-phase products from the photooxidation of naphthalene. *J. Phys. Chem. A* 114:913–34

Kikuno S, Taguchi K, Iwamoto N, Yamano S, Cho AK, et al. 2006. 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210:47–54.

Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology.* 2003 Dec;8(4):432-46.

Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy* 1997; 27: 246–251.

Kumagai, Y. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Quinones as Redox and Electrophilic Chemicals Contaminated in the Atmosphere. *Journal of Health Science* [Vol. 55](#) (2009) [No. 6](#) P 887-894.

Kumagai, Y., Koide, S., Taguchi, K., Endo, A., Nakai, Y., Yoshikawa, T., and Shimojo, N. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. *Chem. Res. Toxicol.* 2002; 15, 483–489.

Kumar RK, Herbert C, Foster PS. Expression of growth factors by airway epithelial cells in a model of chronic asthma: regulation and relationship to subepithelial fibrosis. *Clin Exp Allergy.* 2004 Apr;34(4):567-75.

Kuzmich NN, Sivak KV, Chubarev VN, Porozov YB, Savateeva-Lyubimova TN, Peri F. TLR4 Signaling Pathway Modulators as Potential Therapeutics in Inflammation and Sepsis. *Vaccines* (Basel). 2017 Oct 4;5(4). pii: E34. doi:10.3390/vaccines5040034.

Lagente V, Le Quement C, Boichot E. Macrophage metalloelastase (MMP-12) as a target for inflammatory respiratory diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2009. Mar;13(3):287-95.

Leff, *Thorax* 55 (Suppl 2) (2000) S32–S37; Hur et al., *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 48 (2018) 5–14).

Leiva G MA, Santibañez DA, Ibarra E S, Matus C P, Seguel R. A five-year study of particulate matter (PM_{2.5}) and cerebrovascular diseases. *Environ Pollut.* 2013 Oct;181:1-6.

Li R, Navab K, Hough G, et al. Effect of Exposure to Atmospheric Ultrafine Particles on Production of Free Fatty Acids and Lipid Metabolites in the Mouse Small Intestine. *Environmental Health Perspectives.* 2015;123(1):34-41. doi:10.1289/ehp.1307036.

Li W, Xu L, Liu X, et al. Air pollution–aerosol interactions produce more bioavailable iron for ocean ecosystems. *Science Advances.* 2017;3(3):e1601749. doi:10.1126/sciadv.1601749.

Lintomen, L, Franchi, G, Nowill, A, Condino-Neto, A, de Nucci, G, Zanesco, A, Antunes, E. Human eosinophil adhesion and degranulation stimulated with eotaxin and RANTES *in vitro*: Lack of interaction with nitric oxide. *BMC Pulmonary Medicine* 2008, 8:13, 11 pág.

Liu CW, Lee TL, Chen YC, Liang CJ, Wang SH, Lue JH, Tsai JS, Lee SW, Chen SH, Yang YF, Chuang TY, Chen YL. PM_{2.5}-induced oxidative stress increases intercellular adhesion molecule-1 expression in lung epithelial cells through the IL-6/AKT/STAT3/NF- κ B-dependent pathway. *Part Fibre Toxicol.* 2018 Jan 12;15(1):4. doi: 10.1186/s12989-018-0240-x.

Liu, T., M.E. Marlier, R.S. DeFries, D.M. Westervelt, K.R. Xia, A.M. Fiore, L.J. Mickley, D.H. Cusworth, and G. Milly, 2018: Seasonal impact of regional outdoor biomass burning on air pollution in three Indian cities: Delhi, Bengaluru, and Pune. *Atmos. Environ.*, 172, 83-92, doi:10.1016/j.atmosenv.2017.10.024.

Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmscher S, Luttmann W, Renz H, Braun A, Virchow JC. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:91–97.

Lovett G M, Tear T H, Evers D C, Findlay S E G, Cosby B J, Dunscomb J K, Driscoll C T and Weathers K C 2009 Effects of air pollution on ecosystems and biological diversity in the eastern United States *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1162:99–135

Lou, O., P. Alcaide, F.W. Luscinskas & W.A. Muller. 2007. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J. Immunol*. 178: 1136–1143.

Lu H, Zhu L. 2007. Pollution patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons in tobacco smoke. *J. Hazard. Mater*. 139:193–98

Lyu Y, Guo H, Cheng T, Li X. Particle Size Distributions of Oxidative Potential of Lung-Deposited Particles: Assessing Contributions from Quinones and Water-Soluble Metals. *Environ Sci Technol*. 2018 Jun 5;52(11):6592-6600.

Ma, D., Huang, H. & Huang, Z. *Chin. Sci. Bull.* (2010) 55: 1032. <https://doi.org/10.1007/s11434-010-0030-9>

Maier E, Duschl A, Horejs-Hoeck J. STAT6-dependent and -independent mechanisms in Th2 polarization. *European Journal of Immunology*. 2012;42(11):2827-2833. doi:10.1002/eji.201242433.

Malmström K, Malmberg LP, O'Reilly R, Lindahl H, Kajosaari M, Saarinen KM, Saglani S, Jahnsen FL, Bush A, Haahtela T, Sarna S, Pelkonen AS, Mäkelä MJ. Lung function, airway remodeling, and inflammation in infants: outcome at 8 years. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2015 Feb;114(2):90-6. doi: 10.1016/j.anai.2014.09.019.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519-31. doi: 10.1038/nri3024.

Mauderly, J. L. (2010) Current status of the toxicology of diesel engine exhaust - and the ACES project. *ZBL Arbeitsmed*. 50, 412–417.

McKinley L, Alcorn JF, Peterson A, Dupont RB, Kapadia S, Logar A, Henry A, Irvin CG, Piganelli JD, Ray A, Kolls JK. TH17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol*. 2008 Sep 15;181(6):4089-97.

McParland BE, Macklem PT, Pare PD: Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol* 2003, 95:426-434.

Mitchell PD, O'Byrne PM. Epithelial-Derived Cytokines in Asthma. *Chest*. 2017 Jun;151(6):1338-1344. doi: 10.1016/j.chest.2016.10.042.

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 Apr 18;24(4):559-67.

Monks TJ, Jones DC. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr. Drug Metab*. 2002;3:425–38

Munakata M: Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma. *Allergol Int* 2006, 55:235-243.

Nakagome K., Matsushita S., Nagata M. Neutrophilic inflammation in severe asthma. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2012;158(Supplement 1):96–102. doi: 10.1159/000337801.

Nagase H, Okugawa S, Ota Y, Yamaguchi M, Tomizawa H, Matsushima K, Ohta K, Yamamoto K, Hirai K. Expression and function of Toll-like receptors in eosinophils: activation by Toll-like receptor 7 ligand. *J Immunol*. 2003 Oct 15;171(8):3977-82.

Nightingale JA, Maggs R, Cullinan P, et al. Airway inflammation after controlled exposure to diesel exhaust particulates. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:161–6.

Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 1999;54:1061–9.

Nightingale JA, Rogers DF, Hart LA, et al. Effect of inhaled endotoxin on induced sputum in normal, atopic, and McKinley atopic asthmatic subjects. *Thorax* 1998;53:563–71.

Nikasinovic L, Momas I, Just J. A review of experimental studies on diesel exhaust particles and nasal epithelium alterations. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2004; 7: 81–104.

Oberdorster G., Elder A., Rinderknecht A. (2009). Nanoparticles and the brain: Cause for concern? *J. Nanosci. Nanotechnol* . 9, 4996–5007.

Oh K, Seo MW, Lee GY, et al. Airway epithelial cells initiate the allergen response through transglutaminase 2 by inducing IL-33 expression and a subsequent Th2 response. *Respiratory Research*. 2013;14(1):35. doi:10.1186/1465-9921-14-35.

Ohnishi S, Hiraku Y, Hasegawa K, Hirakawa K, Oikawa S, Murata M, Kawanishi S. Mechanism of oxidative DNA damage induced by metabolites of carcinogenic naphthalene. *Mutat Res*. 2018 Mar;827:42-49. doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.01.005.

Oravijärvi K, Pietikäinen M, Ruuskanen J, Niemi S, Lauren M, Voutilainen A, Keiski RL, Rautio A: Diesel particle composition after exhaust after-treatment of an off-road diesel engine and modeling of deposition into the human lung. *Journal of Aerosol Science*, 2014, 69: 32-47

Orsini, MJ, Krymskaya, VP, Eszterhas, AJ, Benovic, JL, Panettieri, RA, Penn, RB. MAPK superfamily activation in human airway smooth muscle: mitogenesis requires prolonged p42/p44 activation. *American Journal of Physiology*, vol. 277, no. 3, pp. L479–L488, 1999.

Page, k, Li, j, Wang, y, Kartha, S, Pestell, RG, Hershenson, MB. Regulation of cyclin D(1) expression and DNA synthesis by phosphatidylinositol 3-kinase in airway smooth muscle cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 23, no. 4, pp. 436–443, 2000.

Pavord ID, Birring SS, Berry M, et al. Multiple inflammatory hits and the pathogenesis of severe airway disease. *Eur Respir J* 2006;27:884–8.

Postma DS, Bush A, van den Berge M. Risk factors and early origins of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2015 Mar 7;385(9971):899-909. doi:10.1016/S0140-6736(14)60446-3.

Rael e Lockey, *World Allergy Organ J*. 2011 Mar; 4(3): 54–64; Corren, *Curr Allergy Asthma Rep*. 2013 Oct;13(5):415-20. doi: 10.1007/s11882-013-0373-9)

Reece P, Baatjes AJ, Cyr MM, Sehmi R, Denburg JA. Toll-like receptor-mediated eosinophil-basophil differentiation: autocrine signalling by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in cord blood haematopoietic progenitors. *Immunology*. 2013 Jun;139(2):256-64.

Ribeiro AL, Shimada AL, Hebeda CB, de Oliveira TF, de Melo Loureiro AP, Filho Wdos R, Santos AM, de Lima WT, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology*. 2011 Oct 9;288(1-3):1-7. doi: 10.1016/j.tox.2011.05.009.

Rifas L, Cheng SL. IL-13 regulates vascular cell adhesion molecule-1 expression in human osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2003 May 15;89(2):213-9.

Royce SG, Cheng V, Samuel CS, Tang ML. The regulation of fibrosis in airway remodeling in asthma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Apr 4;351(2):167-75.

Saglani S, Payne DN, Zhu J, Wang Z, Nicholson AG, Bush A, Jeffery PK: Early detection of airway wall remodeling and eosinophilic inflammation in preschool wheezers. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176:858-864.

Saeed M, Higginbotham S, Gaikwad N, Chakravarti D, Rogan E, Cavalieri E. Depurinating naphthalene-DNA adducts in mouse skin related to cancer initiation. *Free Radic Biol Med*. 2009 Oct 1;47(7):1075-81.

Sandstrom T, Nowak D, Van Bree. Health effects of coarse particles in ambiente air: messages for research and decision-making. *Eur Respir J*. 2005: 26:187-188.

Santos, KT. Contribuição farmacológica do estudo da exposição de camundongos na fase neonatal ao poluente 1,2-Naftoquinona (1,2-NQ) e sua repercussão na

resposta inflamatória na fase adulta. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

Santos KT, Florenzano J, Rodrigues L, Favaro RR, Ventura FF, Ribeiro MG, Teixeira AS, Ferreira HHA, Brain SD, Damazo AS, Zorn TM, Camara NO, Muscara MN, Peron JP, Costa SK. Early postnatal, but not late, exposure to chemical ambiente pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. *Arch Toxicol*. 2014;20.

Sanz MJ, Kubes P. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. *Eur J Immunol*. 2012 Feb;42(2):278-83

Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*. 2010 Jan;339(1):237-46. doi:10.1007/s00441-009-0821-y.

Schei MA, Hessen JO, Smith KR, et al. Childhood asthma and indoor woodsmoke from cooking in Guatemala. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004; 14 (suppl 1): S110–17.

Schenkel, A.R., E.M. Dufour, T.W. Chew, et al. 2007. The murine CD99-related molecule CD99-like 2 (CD99L2) is an adhesion molecule involved in the inflammatory re-sponse. *Cell Commun. Adhesion* 14: 227–237.

Selvatici R, Falzarano S, Mollica A, Spisani S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol*. 2006, 534: 1–11

Semlali A, Jacques E, Rouabhia M, Milot J, Laviol ette M, Chakir J. Regulation of epithelial cell proliferation by bronchial fibroblasts obtained from mild asthmatic subjects. *Allergy*. 2010;65:1438-1445.

[Shifren](#), A, [Witt](#), C, [Christie](#), C, [Castro](#), M. Mechanisms of Remodeling in Asthmatic Airways. *Journal of Allergy* Volume 2012, Article ID 316049, 12 pages

Shoda T, Futamura K, Orihara K, Emi-Sugie M, Saito H, Matsumoto K, Matsuda A. Recent advances in understanding the roles of vascular endothelial cells in allergic inflammation. *Allergol Int*. 2016 Jan;65(1):21-9. doi:10.1016/j.alit.2015.08.001.

Silva ECF. Asma Brônquica. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*. 2008;7(2):33-57

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Oliveira LF, Corrêa-Oliveira R. High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006 Sep;101 Suppl 1:345-51.

Simpson A, Martinez FD. The role of lipopolysaccharide in the development of atopy in humans. *Clin Exp Allergy*. 2010 Feb;40(2):209-23. doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03391.x.

Simpson JL, Grissell TV, Douwes J, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Innate immune activation in neutrophilic asthma and bronchiectasis. *Thorax*. 2007; 62 (3): 211 - 218

Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Differential proteolytic enzyme activity in eosinophilic and neutrophilic asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172: 559–65. *Care Med* 2000;161:9–16.

Simpson JL, Scott RJ, Boyle MJ, Gibson PG. Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum. *Respirology*. 2006; 11 (1): 54 -61.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia (SBPT). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia para o Manejo da Asma - J Bras Pneumol. v.38, Suplemento 1, p.S1-S46 Abril 2012.

Sousa, E. T.; Cardoso, M. P.; Silva, L. A.; de Andrade, J. B. Direct determination of quinones in fine atmospheric particulate matter by GC–MS. *Microchemical Journal*. 2015, 118, 26.

Sjöberg LC, Nilsson AZ, Lei Y, Gregory JA, Adner M, Nilsson GP. Interleukin 33 exacerbates antigen driven airway hyperresponsiveness, inflammation and remodeling in a mouse model of asthma. *Sci Rep*. 2017 Jun 26;7(1):4219. doi:10.1038/s41598-017-03674-0.

STEERING COMMITTEE ISAAC. Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC – The international study of asthma and allergies in childhood. *Lancet*, vol.35, p.1225-32, 1998.

Tagaya E, Tamaoki J. Mechanisms of airway remodeling in asthma. *Allergology International*, vol. 56, no. 4, pp. 331–340, 2007.

Takizawa H. Diesel exhaust particles and their effect on induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2004; 4: 355–359.

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 Feb;84(2):109-17.

Terzano C., Di Stefano F., Conti V., Graziani E., Petroianni A. (2010). Air pollution ultrafine particles: Toxicity beyond the lung. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 14, 809–821.

Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Overbergh L, Dupont LJ, Ceuppens JL, et al. Evaluation of airway inflammation by quantitative Th1/Th2 cytokine mRNA measurement in sputum of asthma patients. *Thorax*(2006) 61(3):202–8. doi:10.1136/thx.2005.052399

Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*(2009) 180(5):388–95. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC

Ulfman LH, Joosten DP, van der Linden JA, Lammers JW, Zwaginga JJ, Koenderman L. IL-8 induces a transient arrest of rolling eosinophils on human endothelial cells. *J Immunol*. 2001 Jan 1;166(1):588-95.

U.S. Environmental Protection Agency. 2002. Health assessment document for diesel engine exhaust. Washington, DC: U.S.Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment.

USEPAGuidelines for Carcinogen Risk Assessment, EPA/630/P-03/001F US Environmental Protection Agency, Washington, D.C., United States of America(2005) http://www.epa.gov/raf/publications/pdfs/CANCER_GUIDELINES_FINAL_3-25-5.pdf (accessed in Maio de 2017)

Vawda S, Mansour R, Takeda A, Funnell P, Kerry S, Mudway I, Jamaludin J, Shaheen S, Griffiths C, Walton R. Associations between inflammatory and immune response genes and adverse respiratory outcomes following exposure to outdoor air pollution: a HuGE systematic review. *Am J Epidemiol*. 2014 Feb 15;179(4):432-42. doi: 10.1093/aje/kwt269.

Verma, Vishal & Wang, Ying & El-Afifi, Rawan & Fang, Ting & Rowland, Janessa & Russell, Armistead & Weber, Rodney. (2015). Fractionating Ambient Humic-like Substances (HULIS) for their reactive oxygen species activity - Assessing the importance of quinones and atmospheric aging. *Atmospheric Environment*. 120. 10.1016/j.atmosenv.2015.09.010.

Vestweber D: Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Ann NY Acad Sci* 2012;1257: 184–192.

Vidya MK, Kumar VG, Sejian V, Bagath M, Krishnan G, Bhatta R. Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. *Int Rev Immunol*. 2018 Jan 2;37(1):20-36. doi: 10.1080/08830185.2017.1380200.

Vojtisek-Lom M, Pechout M, Dittrich M, Beránek V, Kotek M, Schwarz J, Vodička P, Milcová A, Rossnerová A, Ambrož A, Topinka J. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and their genotoxicity in exhaust emissions from a diesel engine during extended low-load operation on diesel and biodiesel fuels. *Atmos Environ*. 2015;109:9–18. doi: 10.1016/j.atmosenv.2015.02.077

von Klot S, Wolke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz DA, et al: Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* 2002, 20:691–702.

Vu AT, Taylor KM, Holman MR, Ding YS, Hearn B, Watson CH. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Mainstream Smoke of Popular U.S. Cigarettes. *Chemical research in toxicology*. 2015;28(8):1616-1626. doi:10.1021/acs.chemrestox.5b00190.

Wagner JG, Hotchkiss JA, Harkema JR. Effects of ozone and endotoxin coexposure on rat airway epithelium: potentiation of toxicant-induced alterations. *Environmental Health Perspectives*. 2001;109(Suppl 4):591-598.

Wagner JG, Morishita M, Keeler GJ, Harkema JR. Divergent effects of urban particulate airpollution on allergic airway responses in experimental asthma: a comparison of field exposure studies. *Environmental Health* 2012, 11:45

Wang Q, Li H, Yao Y, Xia D, Zhou J. The overexpression of heparin-binding epidermal growth factor is responsible for Th17-induced airway remodeling in an experimental asthma model. *J Immunol*. 2010 Jul 15;185(2):834-41. doi:10.4049/jimmunol.0901490.

Weichenthal S, Kulka R, Lavigne E, et al. Biomass Burning as a Source of Ambient Fine Particulate Air Pollution and Acute Myocardial Infarction. *Epidemiology (Cambridge, Mass)*. 2017;28(3):329-337. doi:10.1097/EDE.0000000000000636.

Wen T, Besse JA, Mingler MK, Fulkerson PC, Rothenberg ME. Eosinophil adoptive transfer system to directly evaluate pulmonary eosinophil trafficking in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*(2013) 110(15):6067–72. doi:10.1073/pnas.1220572110

WHO. IARC: Outdoor air pollution a leading environmental cause of cancer deaths. PRESS RELEASE N° 221, 2013.a

Wierzbicka,A, Nilsson, PT, Rissler, J, Sallsten, G, Xu, Y, Pagels, JH, Albin, M, Österberg, K, Strandberg, B, Eriksson, A, Bohgard, M, Bergemalm-Rynell, K, Gudmundsson, A. Detailed diesel exhaust characteristics including particle surface area and lung deposited dose for better understanding of health effects in human chamber exposure studies, *Atmospheric Environment*, Volume 86, 2014, Pages 212-219

Wilson SJ, Rigden HM, Ward JA, Laviolette M, Jarjour NN, Djukanović R. The relationship between eosinophilia and airway remodelling in mild asthma. *Clin Exp Allergy*. 2013 Dec;43(12):1342-50. doi: 10.1111/cea.12156.

Wood LG, Baines KJ, Fu J, Scott HA, Gibson PG. The neutrophilic inflammatory phenotype is associated with systemic inflammation in asthma. *Chest*. 2012 Jul;142(1):86-93.

Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S: Recent developments and complexities in neutrophil transmigration. *Curr Opin Hematol* 2010;17:9–17

Woodward NC, Levine MC, Haghani A, Shirmohammadi F, Saffari A, Sioutas C, Morgan TE, Finch CE. Toll-like receptor 4 in glial inflammatory responses to air pollution in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation*. 2017 Apr 14;14(1):84. doi:10.1186/s12974-017-0858-x.

Woodruff PG, Modrek B, Choy DF, Jia G, Abbas AR, Ellwanger A, et al. T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*(2009) 180(5):388–95. doi:10.1164/rccm.200903-0392OC

World Health Organisation (WHO) Regional Office for Europe. (2013b). Health effects of particulate matter: Policy implications for countries in Eastern Europe, Caucasus and central Asia.

Wyzga, RE, Rohr, AC. Long-term particulate matter exposure: Attributing health effects to individual PM components, *Journal of the Air & Waste Management Association*. 2015, 65:5, 523-543.

Yick CY, Ferreira DS, Annoni R, von der Thüsen JH, Kunst PW, Bel EH, Lutter R, Mauad T, Sterk PJ. Extracellular matrix in airway smooth muscle is associated with dynamics of airway function in asthma. *Allergy*. 2012 Apr;67(4):552-9.

Yang T, Li Y, Lyu Z, et al. Characteristics of Proinflammatory Cytokines and Chemokines in Airways of Asthmatics: Relationships with Disease Severity and Infiltration of Inflammatory Cells. *Chinese Medical Journal*. 2017;130(17):2033-2040. doi:10.4103/0366-6999.213428.

Zhang Q, Lai K, Xie J, Chen G, Zhong N. Does unrestrained single-chamber plethysmography provide a valid assessment of airway responsiveness in allergic BALB/c mice? *Respiratory Research*. 2009;10(1):61. doi:10.1186/1465-9921-10-61.

Zheng M, Cass GR, Ke L et al. Source apportionment of daily fine particulate matter at Jefferson Street, Atlanta, GA, during summer and winter. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 57(2), 228–242 (2007).

Zhu Z, Oh SY, Zheng T, Kim YK. Immunomodulating effects of endotoxin in mouse models of allergic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2010 Apr;40(4):536-46. doi:10.1111/j.1365-2222.2010.03477.x.