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

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.

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 peribrônquico, 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).

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.

Figura 3: Ativação metabólica do naftaleno à 1,2-NQ

Biotransformação e destino bioquímico da 1,2-naftoquinona (1,2-NQ). Os conjugados GSH são associados com detoxificação, enquanto a via EH é associada com a toxicidade. GSH: glutationa; 1,2-NQH2: 1,2-dihidroxi-naftaleno; 1,2-NQHG: monoglucuronídeo do 1,2-NQH2; 1,2-NQR: radical semiquinona da 1,2-NQ; 1,2-NQ-SG: aduto glutaciona (GSH) da 1,2-NQ; AKR: aldo-ceto redutase; GST: GSHT-transferase; MRP: proteína associada à resistência multidroga; NQO1: NAD(P)H quinona oxidoreductase 1; Nrf2: fator eritróide nuclear 2 relacionado ao fator 2; P450R: citocromo P450 redutase; UGT: uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferase. Adaptada de Kumagai et al., 2012.

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.

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, Bacsi 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.