KAREN TIAGO DOS SANTOS

**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**

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

Área de Concentração: **Farmacologia**

Orientadora: **Prof^a Dr^a Soraia Kátia P. Costa**

São Paulo
2009

RESUMO

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 [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Existe atualmente uma estreita relação entre a emissão de poluentes atmosféricos e as respostas imunes maternas, que parecem contribuir para maior susceptibilidade da prole à inflamação alérgica. Contudo, pouco se sabe sobre a influência direta de poluentes, i.e. 1,2-naftoquinona (1,2-NQ), no sistema imunológico de neonatos e crianças. O enfoque inédito deste estudo consistiu em avaliar comparativamente se camundongos neonatos e adultos, quando expostos à 1,2-NQ, um dos contaminantes do material particulado eliminado da exaustão do diesel, exibiriam susceptibilidade aumentada à inflamação alérgica pela ovalbumina (OVA), esclarecendo ainda os possíveis mecanismos de ação. Camundongos adultos (20 – 25 g) ou neonatos (2 – 3 g) foram expostos, por 15 min durante 3 dias, à solução de 1,2-NQ (100 nM; 10 ml) ou veículo ([PBS; 99,008%, Tween 80 e DMSO [ambos 0.001%]). Tanto os camundongos adultos, após 24 h da exposição, quanto neonatos, após 59 dias da exposição, foram sensibilizados (10 µg/mL; 0,2 mL) e desafiados com OVA (1%) e os parâmetros funcionais e inflamatórios destes foram avaliados 24 h após o último desafio. Em animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, o desafio alérgico na idade adulta causou potente influxo de leucócitos (linfócitos e eosinófilos) no lavado broncoalveolar, sangue periférico e maior maturação eosinofílica na medula óssea, mas não afetou a hiperresponsividade das vias aéreas (Penh) quando comparado com o grupo alérgico. Esta resposta foi consistente com a maior biossíntese de mediadores no pulmão (citocinas Th2, INF- γ , LTB₄ e IgE), ativação de mastócitos e apresentação das CD11c esplênica, independentemente de moléculas co-estimuladoras CD86, CD80, CD40 e MHC-II. Ao contrário, a 1,2-NQ em animais adultos não amplificou a inflamação alérgica, Penh ou produção de mediadores inflamatórios quando comparado ao grupo alérgico. Em conclusão, a exposição de camundongos neonatos, mas não adultos, à 1,2-NQ favorece maior susceptibilidade destes à inflamação alérgica na idade adulta. O mecanismo de ação parece depender da ação da 1,2-NQ sobre mastócitos, apresentação de CD11c esplênica, do balanço da biossíntese de citocinas Th1 e Th2 e outros mediadores inflamatórios, i.e. LTB₄ e IgE.

Palavras-chave: 1,2-naftoquinona. Citocinas Th2. CD11c. Asma. Neonato. Penh.

ABSTRACT

Santos KT. Pharmacological contribution of early-lifetime exposure of mice to 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) to increase pulmonary susceptibility of allergic response at a late stage of life [Master thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

There is a close correlation between increasing pollutant emission and maternal immune responses, which seems to increase newborn susceptibility to asthma. However, little is known about the direct influence of pollutants such as 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) in the immune system control of neonate. Thus, this study was designed to comparatively investigate whether exposure of neonates and adults mice to 1,2-NQ, a contaminant found in the diesel exhaust particles (PED), increases their susceptibility to allergic inflammation evoked by ovalbumin (OVA) and mechanisms possibly involved. Adults or neonate mice were nebulized with 1,2-NQ (100 nM; 10 mL) or corresponding vehicle ([PBS; 99,008%], Tween 80 and DMSO [both 0.001%]) over 3 days during 15 min. Following 24 h or eight weeks, adult or neonate mice were sensitized (10 µg/mL; 0,2 mL) and challenged with OVA (1%) and both the functional and inflammatory parameters were evaluated 24 h after the last OVA challenge. The allergic challenge in mice exposed to 1,2-NQ as neonates caused a potent influx of leukocytes (lymphocytes and eosinophils) in bronchoalveolar lavage, peripheral blood and increased eosinophil maturation in the bone marrow, without affecting airways hyperresponsiveness (Penh) compared with the allergic group. This response was correlated with increased presentation of splenic CD11c, mast cell activation and increased biosynthesis of inflammatory mediators in the lung (ex.: Th2 cytokines, INF- γ , LTB₄ and IgE), independently of costimulatory molecules expression (CD86, CD80, CD40 and MHC-II). In contrast, adult mice exposure to 1,2-NQ failed to significantly increase OVA-induced allergic response, Penh and inflammatory mediators production when compared to allergic group. We conclude that exposure to 1,2-NQ during neonatal period is critical to enhance susceptibility of asthma at a later stage of life, and that sensitization of lymphocytes, mast cell and increased expression of splenic CD11c and inflammatory mediators i.e. Th2 cytokines, LTB₄ and IgE contribute to this effect.

Key words: 1,2-naphthoquinone. Th2 cytokines. CD11c. Asthma. Neonate. Penh.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anátomofisiologia dos pulmões e das vias aéreas

O sistema respiratório é responsável pela mecânica ventilatória, cujo processo envolve a condução do oxigênio do exterior para o interior dos pulmões, a transferência deste para o sangue e tecidos adjacentes, e remoção do dióxido de carbono por trocas gasosas entre os alvéolos e o sangue (Guyton e Hall, 2006).

As vias aéreas são divididas em superior e inferior: a via superior compreende a cavidade nasal, laringe e faringe, enquanto a traquéia e pulmões (brônquios, bronquíolos e alvéolos) constituem a via aérea inferior (Fig. 1). Nos brônquios, as células musculares lisas são consideradas fonte importante de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão (CAMs) e, por conta disto, são responsáveis pela perpetuação e intensidade da resposta inflamatória pulmonar (Tliba et al., 2008). Nessas estruturas o parassimpático inerva a maioria das fibras musculares lisas, com ação constritora que varia de ligeira a moderada. Elas são frequentemente ativadas por reflexos de origem pulmonar (tosse e espirro). Em doenças como a asma ou doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), esse mecanismo revela-se hiperativo, podendo levar à hiperreatividade das vias aéreas (Bussue et al., 2007; Mauad et al., 2008). As fibras nervosas simpáticas exercem um controle fraco nas vias aéreas, muito embora estimulam diretamente as glândulas submucosa, os gânglios parassimpáticos e a musculatura lisa vascular. A presença de receptores β_2 localizados nos pulmões interage com as catecolaminas circulantes, causando broncodilatação (Schuurman, 2003).

Os pulmões podem ser funcionalmente divididos em tecido da mucosa e parênquima pulmonar (constituído pelos alvéolos). Na mucosa pulmonar reside uma população de células (ex.: macrófagos alveolares [MA], células dendríticas [CDs], plasmocitárias [pDC] e mielóides [moDCs]), que se desenvolvem já na primeira etapa da vida, e são responsáveis pela apresentação antigênica. As vias aéreas possuem um leito vascular rico em células T marginadas e uma extensa camada de células epiteliais, na qual a re-oxidação do sangue ocorre para a sobrevivência, de forma ininterrupta. O epitélio da mucosa das vias aéreas é composto por células ciliares e caliciformes (produtoras de muco) que, juntas, possuem a função mantenedora da umidade das vias aéreas, além de aprisionar pequenas partículas, fornecendo um provável mecanismo para depuração mucociliar de antígenos inalados. Contudo, partículas menores de 6 μm

(ex.: poeira, material particulado [MP] fino e ultrafino, fumaça de cigarro e outros) podem difundir-se nas pequenas vias aéreas, ou penetrarem nas paredes dos alvéolos e então chegarem aos pulmões. O acúmulo dessas partículas resulta na diminuição da função respiratória, pois obstrui as vias aéreas (Wichmann et al., 2008) ou causa exacerbação de doenças inflamatórias pulmonares de caráter alérgico (ex.: asma) (Holguin, 2008) e não alérgica (ex.: COPD, enfisema pulmonar e bronquite crônica) (Schikowski et al., 2005). Assim, o epitélio representa uma barreira física ativa, que contribui para a homeostase e integridade das vias aéreas.

Figura 1: Anatomia da vias aéreas. Caracterização e subdivisão dos componentes das vias aéreas superiores e inferiores. Adaptada: National Cancer Institute (NCI) (<http://www.healthlinkbc.ca/kbase/nci/ncicdr0000062947.htm>).

1.2 Resposta inflamatória

A inflamação pode ser definida como a resposta do tecido conjuntivo vascularizado (eventos celulares e moleculares) às agressões, que podem ser de origem química, física ou biológica, capaz de levar ao aumento de permeabilidade vascular, formação de edema (aumento de permeabilidade vascular) e acúmulo de leucócitos. Essa tem como objetivo principal remover o agente etiológico/lesivo e reparar o tecido lesado (Cotran et al., 1999). Caracteriza-se por uma resposta imediata (aguda) e generalizada (inata) que, na maioria das vezes, segue um padrão de resposta mais específica (adaptativa). A ativação persistente do sistema imune pode resultar em uma

inflamação crônica com consequências importantes. Ambos componentes da resposta imunológica inata e adaptativa interagem (interações célula-célula e célula-mediador) em conjunto para a gênese das respostas imunológica antígeno-específica (Averbeck et al., 2007). No que tange à resposta inata, os elementos constitutivos incluem: 1) barreiras físicas e químicas, como o epitélio (ex.: superfícies epiteliais da mucosa respiratória) e substâncias antimicrobianas produzidas em superfícies epiteliais; 2) células fagocíticas (mononucleares: macrófagos, monócitos e polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos, eosinófilos) e as células exterminadoras naturais (células “*natural killers*” - NK), e 3) proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema do complemento e outros mediadores inflamatórios (ex.: citocinas). A resposta inata é responsável primariamente pelo reconhecimento de padrões moleculares associados ao patógeno (ex.: específicos para microorganismos) e reconhecida pelos receptores *toll* (TLR), expressos na superfície de quase todas as células da imunidade inata (ex.: monócito/macrófagos, neutrófilos, células epiteliais), além de CDs (Romani, 2004).

A resposta inflamatória (inata) evocada por microorganismos (ex. lipopolissacarídeo, *Mycobacterium tuberculosis*) e mediada via receptores TLR tipo 4 (TLR₄) pode exacerbar processos inflamatórios alérgicos na vigência concomitante de um antígeno, como a ovalbumina (OVA) (Schröder e Mauer, 2007; Schröder, 2009). Outras células de origem hematopoiéticas, como a NK, o linfócito T $\gamma\delta$ e outras de origem distinta, como as células endoteliais, exercem um papel bastante relevante na imunidade inata. Quando estimuladas, as células residentes tais como as células vasculares (células do músculo liso e endotélio), mastócitos e macrófagos, levam à geração e/ou liberação subsequente de mediadores inflamatórios (ex.: aminas como a histamina, eicosanóides como a prostaglandina E₂ [PGE₂] ou leucotrienos, citocinas, quimiocinas e óxido nítrico [NO]). Por outro lado, a resposta imune adaptativa fornece um padrão de resposta mais eficiente e específica ao patógeno (antígeno ou substâncias não-comuns ao organismo) que, classicamente, pode ser dividido em resposta adaptativa celular ou humoral. A imunidade humoral é orquestrada pelas células T auxiliar/helper do tipo 2 (Th2), anticorpos produzidas por linfócitos B, que depois se diferenciam em plasmócitos ou em células de memória. Essas responderão mais rapidamente a um próximo contato com o antígeno. A imunidade humoral é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas (Abbas e Janewa, 2000). A imunidade celular é regulada pela subpopulação de linfócitos T auxiliar/helper CD4⁺1

(Th1) (Schuurman, 2003), que têm capacidade para reconhecer antígenos que se ligam a marcadores da superfície de células imunitárias, como os macrófagos.

As respostas de defesa do organismo (inata e adquirida) são de extrema relevância no desencadeamento e/ou progressão de diversas doenças. A propósito, a inflamação é uma das respostas comuns para uma variedade de doenças pulmonares, incluindo a COPD e asma (Hammad e Lambrecht, 2008).

1.3 Asma e componentes da resposta alérgica

A asma é atualmente definida como uma síndrome/condição inflamatória crônica das vias aéreas inferiores, cujas características predominantes incluem diferentes níveis de obstrução parcialmente “reversível” e recorrente das vias aéreas (ou hiperreatividade brônquica [HB]) em resposta a estímulos variados que, *per se*, não afetariam indivíduos não-asmáticos (Iniciativa Global para Asma – Gina; 2008). Isto resulta, a longo prazo, em alterações ultraestruturais locais refratárias ou não à terapia atual, que pode evoluir para o remodelamento e fibrose das vias aéreas (Burgess et al., 2008; Tulic e Hamid, 2006; Bai e Knight, 2005).

Subdivide-se em asma extrínseca e intrínseca: a forma extrínseca é decorrente de uma reação de hipersensibilidade (tipo I) frente a um alérgeno passível de ser identificado. Em geral, essa forma está associada à asma alérgica (atópica), a qual é desencadeada por antígenos encontrados no meio ambiente, tais como o pólen, pêlo de animais, poeira domiciliar, fumaça e odores, dentre outros (Kauffman et al., 2005; Wichmann et al., 2008). A asma intrínseca caracteriza-se como uma doença obstrutiva não atópica, parcialmente contínua e associada às infecções recorrentes ou outros fatores como o frio, drogas e estresse (Corrigan, 2004). Neste caso, os níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) apresentam-se normais nos pacientes que também exibem um histórico negativo para alergia a testes cutâneos (Jayaratnam et al., 2005).

Além da asma, outras doenças de fundo alérgico, como a rinite e dermatite alérgica, estão associadas à inflamação do tipo aguda e crônica importante. Apesar da complexidade dos processos que as desencadeiam, o componente genético atua como um dos fatores mais importantes nas doenças alérgicas (Teerlink et al., 2008). De fato, está bem estabelecido que na asma ocorre aumento na expressão de múltiplos genes inflamatórios, os quais são regulados por fatores de transcrição gênica pró-inflamatórios, como o fator nuclear kappa B (fator NF- κ B) (Barnes et al., 2005). A

asma caracteriza-se como um processo multicelular (Fig. 2), que envolve, principalmente, eosinófilos, células Th2, células apresentadoras de antígeno (APCs), como as CDs e macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD4+, mastócitos e diversos mediadores inflamatórios, como a histamina, citocinas (ex.: interleucinas [IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13]), quimiocinas (CCL11, CCL24, CCL26, CCL7, CCL13, CCL17 e CCL22), eicosanóides (ex.: prostaglandinas D₂ [PGD₂], tromboxanos A₂ [TXA₂], cisteinil-leucotrieno-4 [LTC₄], leucotrieno D₄ [LTD₄]) e fatores de crescimento (ex.: fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito [GM-CSF], fator transformador de crescimento β [TGF- β]) e outros (Holgate, 2008; Garcia et al., 2005; Kallinich et al., 2005; Bradding et al., 2006; Kay, 2006).

Figura 2: Inflamação alérgica. Representação esquemática da cascata inflamatória na asma alérgica (Adaptada: Bradding et al., 2006).

Os eosinófilos são formados na medula óssea (MO) a partir das mesmas células progenitoras do basófilo e mastócitos (CD34⁺) (Rådinger e Lötvall, 2009). Caracterizam-se como uma das principais células efetoras envolvidas na inflamação (inicial e tardia) da asma induzida por alérgenos. Isto se deve à capacidade dessas células sintetizar e liberar, de seus grânulos, substâncias com atividades enzimática e citotóxica, tais como a proteína catiônica eosinofílica (ECP), proteína básica principal (MBP) e peroxidase eosinofílica (EPO). Tanto a ECP quanto a MBP produzem

eicosanóides, como a prostaciclina I_2 (PGI_2) e LTC. A EPO causa esfoliação epitelial, enquanto o acúmulo de MBP nas vias aéreas amplifica e perpetua a inflamação via produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e lisoenzimas por neutrófilos. Tais enzimas também contribuem para o remodelamento das vias aéreas via ativação de células residentes, como os fibroblastos (Kariyawasam e Robinson, 2006; Puxeddu et al., 2009).

No pulmão, tanto o acúmulo quanto a ativação dos eosinófilos é orquestrado por moléculas de adesão e diversas citocinas e quimiocinas liberadas de mastócitos residentes, células T e pela própria ativação eosinofílica. Em particular, a IL-5 participa dos diferentes aspectos do comportamento eosinofílico, incluindo crescimento, apoptose, aderência e secreção dessas células. De fato, compostos biológicos anti-IL-5 reduziram, em até 50%, a eosinofilia observada no quadro inflamatório da asma e, assim, atuam como terapia promissora na sintomatologia dessa doença (Flood-Page et al., 2003a; Phipps et al., 2004). Outras citocinas, incluindo a IL-4, induzem a ativação dos eosinófilos. Já a mobilização de novos eosinófilos para circulação ocorre mediante o aumento da IL-13 e diversos outros mediadores endógenos, como a quimiocina regulada na ativação e secretada por células T normais (RANTES) e eotaxinas (1, 2 e 3), além de proteínas quimiotáticas para monócitos/macrófagos 3 e 4 (MCP-3 e MCP-4), via estimulação de seus receptores CCR3 e CCR5 (Das et al., 2006). Participam ainda desse mecanismo o GM-CSF e fator ativador de plaquetas (PAF) (Renauld et al., 2001).

Os linfócitos Th2 (células T), desenvolvidos no microambiente do timo, são formados por quatro subgrupos e depois diferenciados com base na expressão de antígenos dos tipos 3 (CD3), 4 (CD4), 8 (CD8) e 25 (CD25). De grande importância na apresentação antigênica, os linfócitos CD4 e CD8 estão intimamente ligados ao complexo antígeno-anticorpo, o qual efetua o reconhecimento antigênico por meio de associação ao complexo principal de histocompatibilidade de classe I ou II (MHC-I e MHC-II) presentes nas células antigênicas. Além disto, os linfócitos CD8 estão envolvidos na produção de linfócitos citotóxicos e reconhecimento do antígeno via MHC-I. Por seu turno, os linfócitos CD4 estão relacionados à ativação de células Th e reconhecimento do antígeno via MHC-II (Larché, 2007). No evento da asma, a ativação das células Th2 resulta, com o auxílio das citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), na estimulação e proliferação das células B. Após maturação em plasmócitos, essas células iniciam a produção de anticorpos (principalmente IgE) que eventualmente se fixam à membrana dos

mastócitos e eosinófilos e, por desgranulação destas, liberam seus conteúdos endógenos (ex.: histamina, heparina, proteases neutras [quinase e/ou triptase]), além de produzirem PGs, PAF e citocinas (IL-5 e IL-13), responsáveis pela resposta alérgica imediata (broncoconstrição e edema) (Schuurman et al., 2003). As células T e seus produtos atuam diretamente no recrutamento de eosinófilos, visto que o aumento da expressão de citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13) pelos linfócitos T é um sinal essencial para a indução da eosinofilia nas vias aéreas (Sampson, 2000). De fato, provou-se que a gravidade dos sintomas e sinais da asma, incluindo eosinofilia, está relacionada à população de células T ativadas no tecido brônquico ou lavado broncoalveolar (Hutchison et al., 2009). Curiosamente, níveis elevados de citocinas Th1 (ex.: fator de necrose tumoral α [TNF- α], IL-1 β e do interferon- γ [INF- γ]) foram detectados em vias aéreas de pacientes com asma grave, contrastando, portanto, a teoria de participação irrelevante das células Th1 na asma (Cazola et al., 2006).

Além dos linfócitos, a hematopoiese resulta na produção de CDs com funções importantes na asma, tanto na fase indutora quanto efetora. Com relação à fase indutora, as CDs requerem especial atenção visto que algumas migram para o timo, onde atuam como APCs (Belz et al., 2002). Outras penetram na circulação e distribuem-se entre tecidos e órgãos. Por exemplo, na pele (epiderme), essas são conhecidas como células de Langerhans (LC). Subclasses de CDs foram identificadas em humanos, muito embora o verdadeiro papel destas não está totalmente esclarecido. No epitélio, mucosa e submucosa das vias aéreas superiores e inferiores, essas células são abundantes. Nos tecidos não-linfóides as CDs estão em estado latente (forma imatura) e, assim, são consideradas estimulantes fracos de linfócitos T. As CDs são consideradas as únicas APCs capazes de ativar células T naíves (Van Rijn et al., 2005). Pelo menos quatro subtipos de CDs derivadas das CDs34⁺ hematopoiéticas foram descritas em humanos: LC, CDs dermais ou intersticiais (DDC, IDC), CDs14⁺ derivadas dos monócitos sanguíneos (ou moDCs) e pDCs (Tabela 1) (Rossi e Young, 2005). A subdivisão das CDs baseia-se na capacidade que cada uma destas produz (*in vitro*) citocinas específicas, bem como expressa determinados marcadores de superfície. Recentemente, um novo subtipo de CD com atividade citolítica foi identificado e denominado CD assassina produzida por interferon (IKDCs) (Chan et al., 2006). Tanto as células NK quanto as CDs apresentam marcadores moleculares para IKDCs, os quais são responsáveis pela produção de interferons (INF- γ , e INF- α) e IL-12. A produção de

proteínas, como a MHC –II e de moléculas co-estimuladoras de CDs (B-7; B7-1 [CD89] e B7-2 [CD86]), é regulada por CDs expressas constitutivamente (Tabela 1).

As CDs especializadas na captação de antígenos o fazem via três mecanismos: 1) endocitose mediada por receptor, 2) macropinocitose e, 3) fagocitose particulada (Lambrecht, 2001). Para os aeroalérgenos interagirem com as CDs, esses devem atravessar o epitélio. Na ocorrência da sensibilização alérgica primária, as CDs provenientes da MO são atraídas para outros tecidos sob a influência de quimiocinas (proteína inflamatória do tipo 3α produzida por macrófagos [MIP- 3α]) e, ao chegar aos tecidos, capturam os antígenos. O reconhecimento do alérgeno constitui sinal de alerta, que também leva à maturação das CDs. Estas migram para o compartimento linfático e tornam-se responsivas à MIP- 3β . Além disto, atraem e interagem com células Th, promovendo a resposta imunológica primária, onde geram células Th2 efectoras e células T-reguladoras (Treg), que controlam a síntese de IgE pelos linfócitos B (Masten et al., 2000). A ativação das células T $CD4^+$ depende da interação antígeno-específica dos receptores de superfície (TRC) com o complexo MHC-peptídeo, bem como de moléculas co-estimulatórias (CD80 e CD86) via ligação com receptores de superfície CD28 e CTLA-4. A maioria das células T expressa o receptor CD28, enquanto o receptor CTLA-4 é somente encontrado na célula T ativada. Além das CDs, os ligantes CD80 e CD86 são encontrados em vários tipos de CDs (moDCs, MHC II^{bright}, $CD80^+$, $CD86^+$, $CD83^+$), além de monócitos/macrófagos e $CD14^-$ (Jaffar et al., 1999). Em vias aéreas e interstício pulmonar de camundongos sensibilizados e desafiados, o número de células $CD11b^+$ encontra-se aumentado durante a fase aguda da resposta (Beatty et al., 2007), enquanto nas vias aéreas de asmáticos, o desafio antigênico leva ao acúmulo de moDCs, mas não de pDCs. Isto sugere que em humanos o recrutamento dessas células frente ao desafio alérgico predomina (Jahnsen et al., 2001).

Tabela 1: Epítomos que distinguem os tipos de células dendríticas humanas.

Co-estimuladoras	LC	DDC-IDCs	moDCs	Pdc
CD1a	+	+	+	-
CD1d	-	+	+	NR
CD11b	-	+	+	-
CD11c	+	+	+	-
CD52	-	-	+	+/-
CD83	+	+	+	+
e-cadherin	+	-	-	-
CD207, Langerin	+	-	-	-
CD208, DC-LAMP	+	+	+	-
CD123	+	+	+	++
BDCA-2, 4	NR	NR	-/+	+

Fonte: Adaptada de Rossi e Young, 2005. Para: + = presente; - = ausente e NR: não reportado.

Por seu turno, o monoblasto constitui a primeira célula da linhagem macrófaga. Após subsequente diferenciação do monoblasto em pró-monócito que, por sua vez, se diferencia em monócito, o mesmo segue da MO para circulação sanguínea, onde permanece por um período compreendido entre um a três dias. Mediante um estímulo adequado, o monócito submete-se ao processo de rolagem sobre o endotélio e adesão à parede do vaso por meio de selectinas, integrinas e outros receptores da superfamília das imunoglobulinas e, finalmente, migra para os diferentes tecidos e cavidades do organismo, onde então é denominado macrófago residente (Van Furth, 1998). É na vigência do GM-CSF que os monócitos se diferenciam em macrófagos e/ou CDs (Gajewska et al., 2003). Os macrófagos classificam-se em: 1) residente, pois apresenta baixa atividade metabólica; 2) estimulado ou inflamatório, devido sua alta capacidade secretora de enzimas (proteases neutras) e baixa atividade citotóxica e microbicida e, 3) ativado, que apresenta atividade microbicida e tumoricida devido sua alta capacidade de produzir espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs).

Em vista de suas propriedades, os macrófagos caracterizam-se como uma das principais células envolvidas nos diversos estágios da resposta inflamatória (Smit e

Lukacs, 2006). Quando requisitados, migram para o foco inflamatório, onde desempenham suas funções de macrófagos ativados: fagocitose e destruição de restos celulares de eventuais parasitas e outros agentes estranhos presentes na lesão. Além disto, interferem na troca gasosa, liberam seus mediadores que agem sobre si próprios e outras células, proporcionando ativação dessas e, também, servindo como APCs para linfócitos T, dando início à resposta específica do processo inflamatório (Rappolee e Werb, 1989). Em suas membranas encontram-se os receptores para porção Fc dos anticorpos da classe IgG (Unkeless et al., 1988) e para o componente C3 do sistema complemento. Outros dois receptores presentes na membrana dos macrófagos, o CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18), reconhecem o terceiro componente do sistema complemento (C3b) e fragmentos C5a. O receptor para C3b age na adesão de partículas recobertas por ele à superfície do macrófago, dando início ao processo de fagocitose. Somente na vigência de um segundo sinal, que é fornecido pela ativação do receptor para Fc de IgG ligado ao antígeno, ocorre a internalização da partícula. O receptor para C3b amplifica a resposta quando a quantidade de anticorpo ainda é pequena e, em casos de bloqueio do receptor Fc, o receptor para C3b pode ativar a fagocitose com o auxílio de linfocinas que agem sobre o macrófago (Grinffin, 1984).

Os macrófagos encontram-se amplamente distribuídas na mucosa das vias aéreas de indivíduos asmáticos e, portanto, participam na regulação das reações imunes contra os alérgenos, ativando mediadores envolvidos tanto na proteção quanto na propagação dessa doença (Rosenwasser, 2000). Trabalhos de Tang et al. (2001) mostram que a depleção de MA em modelo murino utilizando camundongos Balb/c resultou em maior apresentação antigênica das CDs e da resposta humoral, além de promover hiperreatividades das vias aéreas. Isto porque mediante interação com o alérgeno, os MA são ativados e liberam grandes quantidades de seus mediadores inflamatórios de fase aguda, incluindo os eicosanóides (TXA₂, PGE₂, LTB₄, LTD₄), PAF, ácido 5-hidroeicosatetraenóico (5-HETE), O₂[•], enzimas (lisozima, colagenase e elastase) e IL-6. Na fase crônica, essas células secretam citocinas, quimiocinas (ex.: IL-1β, IL-8, IL-10, TNF-α, MIP), fatores de crescimento (GM-CSF, fator de crescimento derivado de plaquetas [PDGF] e TGF-β), fator ativador de eosinófilos (EAF) e IFN-γ (Balbo et al., 2001; Di Stefano et al., 2004; Moniuszko et al., 2007).

As citocinas e quimiocinas constituem proteínas ou polipeptídeos, com pequeno peso molecular, secretadas por células imunocompetentes ativadas, e cuja ação principal inclui a capacidade destas atuarem como mediadores intercelulares na regulação da

ativação e diferenciação celular, particularmente no sistema imunológico. Produzidas por uma variedade de tecidos e células (e não exatamente glândulas especializadas), as citocinas/quimiocinas atuam, em geral, no local (forma parácrina ou autócrina) e com frequentes ações aditivas ou sinérgicas. A produção desses mediadores é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição ou transdução, tal como o processo inflamatório (Larché et al., 2003).

Conforme descrito anteriormente, algumas citocinas atuam como mediadores responsáveis por orquestrar a resposta inflamatória alérgica nas vias aéreas de humanos e vários animais de experimentação. Dentre elas, destacam-se as citocinas derivadas das células Th2: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-25. A IL-5 possui um papel relevante na diferenciação, maturação e ativação de eosinófilos. A princípio, acreditava-se que a IL-5 originava-se exclusivamente das células T (Takatsu et al., 1994); entretanto, atualmente sabe-se que a síntese e liberação da IL-5 é também observada em mastócitos desgranulados (Rothenberg et al., 2006). Com relação ao papel biológico da IL-4, destaca-se a capacidade desta atuar sobre a diferenciação de células Th0 em células Th2, e posterior cooperação na ativação das células B/plasmócitos, responsáveis pela produção e liberação de IgE (Murphy e Reiner, 2002). Devido a atividade autócrina da IL-4, esta possui também uma função importante na fase efetora, participando no recrutamento de eosinófilos, diferenciação de mastócitos, secreção de muco e aumento da expressão de moléculas de adesão vascular (VCAMs) (Larché et al., 2003). Igualmente, a IL-13 desempenha um papel chave na resposta inflamatória alérgica, pois além de atuar sobre as células epiteliais, estimulando-as para a produção de muco, esta citocina também atua sobre células musculares lisas, levando à HB (Walter et al., 2001). Ademais, a IL-13 juntamente com a IL-4, atua na gênese de IgE à partir das células B/plasmócitos, e também estimulam a expressão de receptores de IgE na superfície dos mastócitos e eosinófilos (Wynn, 2003). Quanto à importância da IL-9 na asma e outras doenças inflamatórias das vias aéreas, já se sabe que esta participa da HB, produção de mastócitos e hiperplasia de células caliciformes (Temann et al., 2000; Townsend et al., 2000). No que tange aos efeitos regulados pela IL-25, esta molécula estimula a produção de outras citocinas (IL-4, IL-5 e IL-13), estimula a produção de IgE e o influxo de eosinófilos nas vias aéreas, contribuindo para exacerbação da resposta inflamatória na asma (Tamachi et al., 2006).

Outro importante aspecto diz respeito à participação das citocinas de origem Th1 (IL-12, IL-18, IL-27, IL-1 β e INF- γ), as quais estão envolvidas na evolução da doença

inflamatória alérgica com ações que, em geral, levam ao aumento (ou redução) na taxa da proliferação celular e mudanças no estado de diferenciação celular (Nakajima e Takatsu, 2007). Apresentam-se como contraponto na regulação da asma e, assim, desviam a produção de células Th2, regulando negativamente a resposta inflamatória alérgica. De fato, provou-se que a IL-12, IL-18 e IL-27 agem sinergicamente inibindo a HB e a síntese de IgE dependente de IL-4, além de induzirem a produção de INF- γ (Sugimoto et al., 2004; Hunter et al., 2005). As citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α são, na grande maioria, produzidas por macrófagos, monócitos e células epiteliais (Gupta e Collapudi, 2005). Segundo Babu (2004), o TNF- α tem ação específica sobre o recrutamento de leucócitos e, também, sobre as células endoteliais. Nestas células foram registrados aumentos na expressão de moléculas de adesão (ex.: VCAM-1 e molécula de adesão intercelular [ICAM]) e indução de citocinas (ex. IL-8, IL-6) e quimiocinas (ex.: MCP-1, eotaxinas) envolvidas na resposta alérgica. Quanto à ação das citocinas antiinflamatórias, conhecidas como moléculas imunoreguladoras que controlam as respostas das citocinas inflamatórias, a IL-10 é a mais importante na resposta imunológica. Ela inibe a função de monócitos e macrófagos e, conseqüentemente, a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e quimiocinas como MIP-1 α e IL-8 (Clarke et al., 1998; Yokoyama et al., 2004). Neste sentido, estudos *in vivo* mostram que o aumento da IL-10 regula a resposta inflamatória tardia e o influxo de eosinófilos (Gudmundsson et al., 1998; Shanley et al., 2000; Ogawa et al., 2008). Em contrapartida, o bloqueio da IL-10 leva ao aumento da produção de TNF- α do recrutamento de neutrófilos e, conseqüentemente, dos danos pulmonares (Shanley et al., 1996). Outros trabalhos sugerem que a IL-10 interfere na diferenciação de CDs, limitando assim a capacidade destas promoverem a diferenciação e resposta celular (Maynard e Weaver, 2008).

Os interferons tipos I e II compreendem as citocinas que apresentam papel central na defesa do organismo contra patógenos. O interferon do tipo I (INF- α e IFN- β) é secretado por células infectadas por vírus, enquanto o tipo II ou IFN- γ é produzido por linfócitos T e células NK. O IFN- γ age de modo sinérgico com TNF- α e IL-1 β , promovendo a formação local de exsudato inflamatório (Kelchtermans et al., 2008). O INF- γ é crucial para resolução da asma em modelos alérgicos, pois reduz o desenvolvimento antígeno-induzido, eosinofilia e HB. Isto ocorre, possivelmente, devido a capacidade desta citocina contrabalancear a inflamação alérgica via ativação de células Th1 (Murphy e Reiner, 2002). Por outro lado, sugere-se que a coexistência de

células de origem Th1 em inflamações severas, ao invés de contrabalancear a resposta, acaba por agravar o processo alérgico mediado por células Th2 (Cazzola et al., 2006; Calderon et al., 2009).

As quimiocinas, denominadas citocinas com baixo peso molecular e propriedades quimiotáticas, compreendem a grande família das eotaxinas (1, 2 e 3), MCP-1, 2, 3 e 4, MIP-1 α e MIP-3 α e RANTES (Gale e Mccoll, 1999). São produzidas transitoriamente em sítios inflamados e, além de promoverem a migração celular, elas também funcionam como potentes ativadores celulares, podendo induzir desgranulação de neutrófilos, eosinófilos e basófilos, liberação de O₂^{•-}, NO e outros mediadores (Oliveira et al., 2003). Nas vias aéreas, as maiores fontes de MCP-1 são os MA e células tipo II (Kunkel et al., 1995). As ações das quimiocinas na asma restringem-se, principalmente, ao recrutamento e desgranulação de eosinófilos e mastócitos, via receptores específicos presentes em suas superfícies (CCRs) (Garcia, 2005). As quimiocinas da família das CC interagem com um ou mais receptores, desencadeando respostas distintas que dependem do receptor e do local no qual este está situado. A estimulação dos receptores CCR1 pela MIP-1 α (CCL3) promove a migração de eosinófilos e monócitos. Quando essa quimiocina atua em receptores CCR3, promove quimiotaxia e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos (Oliveira et al., 2003). Em particular, a MCP-1 participa de processos inflamatórios no pulmão, de ordem alérgica e infecciosa (Kunkel et al., 1991; Chensue et al., 1996; Kopydlowski et al., 1999; Conti e Digioacchino, 2001; Wang et al., 2005). Outros trabalhos recentes demonstram que a estimulação dos receptores CCR7 pela MIP-3 β (CCL19), secretada de mastócitos, promove migração de fibroblastos e miofibroblastos, contribuindo provavelmente para a hiperplasia da musculatura lisa e remodelamento das vias aéreas na asma (Kaur, 2006).

Finalmente, outra célula importante é o mastócito, oriundo de células CD34⁺ progenitoras e pluripotentes na MO. Penetra na circulação e depois nos tecidos, incluindo as vias aéreas, sob influência das citocinas IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, TNF- α e o fator de crescimento neuronal (NGF). Tais mediadores estimulam o desenvolvimento dos mastócitos (Galli et al., 2000) e, nos tecidos, essas células sofrem o processo de maturação até adquirirem seu fenótipo final. Subdividem-se em dois grupos: 1) mastócito tissular (MCT), presente nos pulmões, intestino e pele e, 2) mastócito de tecido conjuntivo (MCTC), encontrado predominantemente nesse tecido. O segundo tipo difere do primeiro quanto a variedade de produtos estocados/formados no seu interior, que incluem o LTC₄, histamina, PGD₂, TXA₂ e proteases (Schuurman et al.,

2003). Nos pulmões, a reação induzida por antígeno promove a desgranulação de mastócitos localizados na luz brônquica, via mecanismo dependente dos receptores FcεRI localizados na superfície destas. Isto resulta na liberação de seus conteúdos endógenos, levando ao aumento da permeabilidade vascular, edema e broncoconstrição, contribuindo para resposta inflamatória tardia da asma (Kawakami e Stephen, 2002).

No conjunto, esses mediadores possuem um papel crítico no desenvolvimento das reações inflamatórias (aguda e crônica) nas vias aéreas, que acabam por causar danos no epitélio brônquico, contribuindo para o quadro de hiperreatividade e disfunção destas. Compete também ressaltar que apesar destes mediadores e do componente genético representarem fatores relevantes no desencadeamento e progressão da asma (Teerlink et al., 2008), atualmente outros fatores importantes, tais como a função endócrina, fatores climáticos e a poluição ambiental vêm merecendo grande destaque em vários estudos experimentais e epidemiológicos (Holguin, 2008; Garcia-Marcos et al., 2009; Clerisme-Beaty e Rand, 2009).

1.4 Características dos poluentes atmosféricos e o impacto sobre a saúde

A poluição ambiental constitui atualmente um dos maiores problemas de saúde pública, não apenas pela sua influência na mudança climática do mundo, mas também pela sua ação nociva à saúde humana (Samet, 2007).

O termo poluição atmosférica pode ser definido como a contaminação do ar com uma ou mais substâncias produzidas naturalmente ou pelo homem, que leva o ar a tornar-se prejudicial à saúde (Tattersfield, 1996). Os poluentes atmosféricos são oriundos de fontes variáveis, podendo ser classificados de acordo com sua origem, composição química, tamanho ou forma de liberação em ambientes internos e externos (Bernstein, 2004). Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. – EPA; 2003), dentre a complexa mistura de poluentes ambientais em áreas urbanas, destacam-se o ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO), óxidos de nitrogênio (NO_x) e outros poluentes (ex.: dióxido de enxofre [SO₂], material particulado [MP], dióxido de nitrogênio [NO₂]), classificados como "tóxicos do ar". A concentração desses na atmosfera varia de acordo com suas interações físico-químicas, do tráfego, de sua absorção e das condições meteorológicas para dispersão das mesmas. Sofrem ainda a influência cíclica, a qual pode ser diurna, diária, semanal ou sazonal. A dispersão delas

depende de fatores como vento, precipitações, umidade relativa do ar, inversões térmicas e localização geográfica (Boubel et al., 1994).

Os poluentes emitidos diretamente na atmosfera são chamados de primários (ex.: SO₂, CO e MP), enquanto os poluentes resultantes de reações químicas com outros compostos, tais como os gases atmosféricos, são denominados poluentes secundários (ex.: O₃, NO₂). Os poluentes presentes no ar atmosférico podem ser também classificados conforme a ocorrência natural (ex.: provenientes de vulcões, queimadas em florestas, tempestades de areia e outros) ou de ocorrência antropogênica, que são provenientes principalmente da queima de combustível fóssil por indústrias, veículos automotores e usinas de geração de energia. As substâncias antropogênicas atingem a atmosfera a partir de fontes estacionárias (chaminés de fábricas e indústrias, caldeiras, queima de lixo, fornos) e móveis (veículos automotores).

Dentre os principais componentes formados durante a combustão do combustível fóssil, destaca-se o MP, que compreende um complexo número de elementos que se agregam ao mesmo. Pode ser classificado em três categorias: MP₁₀ grosso ou bruto (<10 µm), MP_{2,5}, fino (<2,5 µm) e nano particulados ou ultrafinos (<1 µm). O tamanho destes interfere no local e na distribuição nas vias aéreas, podendo se depositar na porção superior (MP₁₀ grosso) ou inferior (<2,5 µm) do trato respiratório. Acredita-se que as partículas ultrafinas alcançam mais facilmente a circulação sistêmica e exercem maior toxicidade devido ao alto poder de transição de metais e indução de estresse oxidativo (Valavanidis et al., 2008). Já as partículas finas, incluindo as partículas eliminadas na exaustão do diesel (PEDs), são também consideradas vilãs importantes no desencadeamento de reações inflamatórias locais e sistêmicas, pois são mais facilmente encontradas em áreas urbanas e grandes rodovias. Ainda, possuem a capacidade de adsorver diferentes compostos químicos suspensos na atmosfera, tornando-as mais tóxicas (Sandstrom et al., 2005). Segundo Ho et al. (2002), pelo menos 27 compostos químicos foram encontrados na superfície das PED da atmosfera de grandes avenidas de Hong-Kong.

As PED compreendem um núcleo de carbono e inúmeros compostos químicos, como hidrocarbonetos poliaromáticos, heterocíclicos e compostos químicos, incluindo as quinonas (Inoue et al., 2007a). Em recente estudo, Cho et al. (2004) demonstraram que, aproximadamente 13,7 µg de 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) incorporam-se a cada grama de PED.

As quinonas compreendem uma classe de compostos ambíguos, constituintes do metabolismo endógeno das catecolaminas e/ou bioquimicamente via metabolismo das hidroquinonas. Podem ser também encontradas na dieta alimentar (corantes alimentícios), em medicamentos (ex.: antibióticos e drogas anti-tumorais) e, principalmente, como contaminante de MP em áreas urbanas (Bolton et al., 2002; Kumagai et al., 2002; Valderrama et al., 2008). Nomeadas a partir do seu sistema aromático progenitor, sendo as naftoquinonas (NQ) derivadas do naftaleno (Fig. 3).

Figura 3: Naftaleno e seu derivado 1,2-Naftoquinona. O composto 1,2-NQ é gerado via metabolismo de auto-oxidação e/ou pela reação com compostos derivados do meio ambiente.

As quinonas sofrem ação enzimática (P450/P450 redutase) ou não enzimática (auto-oxidação), gerando semi-quinonas e $O_2^{\bullet-}$ (Endo et al., 2007). Assim, a reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formado enzimaticamente ou por dismutação espontânea de $O_2^{\bullet-}$, com envolvimento de pequenas concentrações de ferro (Fe^{2+}) ou outros metais de transição (ex.: cobre; Cu^{2+}), leva à formação do radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), que atua como potente agente oxidante, capaz de causar danos em macromoléculas essenciais, como os lipídeos e proteínas. A interação com lipídeos cataliza a oxidação da $OH^{\bullet}$, gerando hidroperóxidos lipídicos que levam à formação de peróxidos derivados de lipídios, como o malonildialdeído, o qual se liga à proteínas, causando danos estruturais nas mesmas (Fig. 4) (Bolton et al., 2002). No entanto, as quinonas *per se* desempenham funções tóxicas importantes, visto que atuam como agentes alquilantes em sítios nucleofílicos em peptídeos e ácidos nucleicos. Isto ocorre devido sua característica estrutural como potentes aceptores de elétrons e, assim, através de grupos carbonílicos contidos em suas estruturas, estabelecem ligações covalentes com tióis, levando à inativação de proteínas e comprometimento da integridade celular e função (Kumagai et al., 2002). Ainda, reagem com outros agentes nucleófilos, como a glutathione redutase (GR), comprometendo o balanço redox (Lin et al., 2007).

Contudo, inúmeros artigos em jornais e revistas têm relacionado a crise na produção de alimentos em todo o mundo com o plantio de variedades geradoras de biocombustíveis. Ademais, os ecologistas ainda não estão bem convencidos do papel do biocombustível quanto às emissões de poluentes locais. Segundo alguns estudos, o uso do biodiesel reduz em, aproximadamente, 78% as emissões de CO, 27% de MP, 20% de SOx e de grande parte dos hidrocarbonetos totais (HC) e tóxicos (Sharp et al., 2000; Graboski et al., 2003; Laboratório de Desenvolvimento de Tecnologias Limpas dos Estados Unidos – Doe, 2009). Em contrapartida, outros estudos mostram o aumento das emissões de NOx associado ao biodiesel em relação às do diesel de petróleo (Swanson et al., 2007a; Swanson et al., 2007b). Segundo a EPA (EUA, 2002a), uma seleção de "agregados tóxicos" (ex.: acetaldeído, acroleína, benzeno, 1,3-butadieno, etilbenzeno, n-hexano, naftaleno, estireno, tolueno, xileno e aldeídos [ex.: formaldeído e acetaldeído]) foram identificados dentre os produtos liberados na combustão do biodiesel, mostrando assim a face obscura dos compostos bioenergéticos. Ademais, evidências indicam que o biodiesel é um dos principais precursores do ozônio troposférico, um dos mais graves contaminantes e problemas de qualidade do ar em grandes cidades brasileiras, como São Paulo.

É de conhecimento que o Brasil consome cerca de 35 milhões de toneladas de óleo diesel por ano (Ferrari et al., 2005). Por conta disto, os efeitos secundários a esse consumo na saúde da população continuam pontuando as estatísticas e estudos com outras fontes de combustíveis vem sendo feito como alternativa para substituição do petróleo, bem como para tentar minimizar o impacto da crescente produção das emissões de poluentes derivados da combustão do diesel e etanol. Vale ressaltar que embora haja grande variação nos efeitos à saúde pelos poluentes ambientais, o que cada composto tóxico provoca individualmente, a quantidade de estudos disponíveis sobre o total dos compostos tóxicos ou cada um deles, ainda é irrelevante e pouco informativo. Neste sentido, Medeiros et al. (2009) observaram que bebês de gestantes residentes em locais de alto tráfego no município de São Paulo sofreram morte perinatal ou não sobreviveram após seis dias de vida. Não obstante, outro aponta que em países da Europa Ocidental e América do Norte, com níveis elevados de poluição atmosférica, as mulheres com idade reprodutiva apresentaram maiores riscos reprodutivos, incluindo as anomalias congênitas e o aumento na mortalidade da sua prole (Dejmek et al., 2000; Lewtas, 2007).

Estudos epidemiológicos estimam que nos próximos vinte anos, a ausência de uma política séria no controle da poluição ambiental em cidades da América Latina tais como Santiago, São Paulo e México, poderá ocasionar consequências desastrosas para tais países. Acredita-se que em torno de 156.000 mortes estarão associadas à poluição, por volta de 4 milhões de ataques de asma, 300.000 consultas médicas de crianças e, aproximadamente, 48.000 casos de bronquite. Se isto for evitado, calcula-se que cifras em torno de 21 à 165 bilhões de dólares serão economizadas desses países (Bell et al., 2006). Segundo um estudo mais direcionado à cidade de São Paulo, o custo indireto com problemas de saúde de crianças e idosos, decorrente da exposição à poluição ambiental, resulta na quantia de U\$ 3.222.676 (Miraglia et al., 2005).

É importante ressaltar que fatores de susceptibilidade, como a idade, atuam como co-fatores para o agravamento das patologias respiratórias e cardiovasculares (Pattenden et al., 2006; Chen et al., 2008). De fato, animais neonatos nascidos de mães expostas à fumaça do cigarro exibiram graves efeitos funcionais e toxicológicos no aparelho respiratório e tecido hematopoiético (Penn et al., 2007; Rouse et al., 2007; De Flora et al., 2008). Outros também evidenciaram efeitos tóxicos exacerbados na inflamação alérgica da prole de animais expostos a fumaça do cigarro, do MP derivado da fuligem industrial (*residual oil fly ash*; ROFA) ou exaustão do diesel (Seymour et al., 2002; Hamada et al., 2007; Fedulov et al., 2008).

1.5 Aspectos epidemiológicos, experimentais e ambientais da asma

Estudos epidemiológicos e clínicos retratam a asma como um grave problema global, visto que cerca de 300 milhões de indivíduos em todo planeta são acometidos por essa doença (Cooper et al., 2006; Gina, 2008; Clerisme-Beaty e Rand, 2009). O atendimento emergencial bem como o número de internações para pacientes asmáticos e outras doenças alérgicas (ex.: dermatite, rinite) continua crescendo e, praticamente, duplicou em países da África, América Latina e Ásia (King et al., 2004; Pearce e Douwes, 2006; Pearce et al., 2007). Paralelamente, o registro de casos fatais decorrente desta doença também aumentou (Herrick e Bottomly, 2003). Nos Estados Unidos, a asma é reconhecida como uma das doenças mais importantes, pois afeta cerca de 16 milhões de habitantes (Centro de controle e prevenção de doenças - CDC, 2004).

Em parte, isto se deve ao aumento da urbanização mundial, a qual elevou o número de rodovias e da frota de automóveis. De fato, o aumento na incidência de

doenças alérgicas (ex.: asma, rinite) na população destes países vem sendo registrado nos últimos vinte anos, constituindo-se um dos grandes problemas de Saúde Pública (Arshad, 2005; Sandstrom et al., 2005; Ko et al., 2007; Gina, 2008; Datasus, 2009). Neste sentido, a China destaca-se como um dos principais provedores de poluentes ambientais no mundo e, por conta disto, um grande contingente da população deste país é acometido com doenças respiratórias, como a asma e COPD (Wilson et al., 2008). Como consequência, o custo atual (direto e indireto) com o tratamento de doenças respiratórias na população da China é bastante elevado, chegando ao patamar de 52 bilhões de dólares anuais (Banco mundial e Administração estadual de proteção ambiental - Wb e Sepa, 2007). Igualmente no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS – Datasus, 2009), uma grande parcela dos pacientes (190.317 do total de 1.275.822 pacientes) com problemas respiratórios atendida pela rede pública foi diagnosticada com asma. Aproximadamente 80% dessas internações concentraram-se na região metropolitana de São Paulo, posicionando a asma como a primeira causa de internação, superando assim outras patologias importantes, como as doenças cardiovasculares e diabetes (Datasus, 2009). Outro estudo mais direcionado de Rio et al. (2002) revelou que, nos períodos de 1983 a 1985 e de 1993 a 1995, a asma contribuiu com 6,5% dos óbitos no município de São Paulo, cuja prevalência incluiu indivíduos jovens na faixa etária entre 20 a 34 anos. Apesar desta doença afetar indivíduos de diferentes faixas etárias, a ocorrência em crianças, do sexo masculino, com idade inferior a 10 anos é maior (Osman et al., 2003; Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia, 2006; Van Weel et al., 2008). Embora raros, os casos de asma ocorrem preferencialmente em adultos do sexo feminino com idade superior a 50 anos (Chen et al., 2005; Ko et al., 2007; Chen et al., 2008).

Felizmente, considerando o proveitoso consórcio entre a farmacologia, bioquímica, técnicas moleculares/genéticas e inúmeras ferramentas imunológicas e farmacológicas, a pesquisa nessas áreas tem contribuído sobremaneira na elucidação de vários aspectos do sistema biológico em patologias inflamatórias, como a asma. Adicionalmente, a expansão de modelos animais, principalmente em camundongos, tem auxiliado consideravelmente na melhor compreensão da doença e desenvolvimento de novos alvos terapêuticos. Os trabalhos desse gênero sobre outras espécies (ex.: ratos, cobaias, coelhos, primatas e cachorros) são de extrema importância e preferíveis, quer pela existência de ampla variedade de anticorpos existentes para citocinas, quimiocinas e outros mediadores, quer pela disponibilidade de inúmeras linhagens de camundongos

geneticamente modificados ou transgênicos (nocautes), usados para delinear os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da asma (Kumar et al., 2002; Stvenson et al., 2006). Usando-se camundongos nocautes da IL-5, alguns trabalhos mostram a importância desta na asma (Kobayashi et al., 2003; Tanaka et al., 2004), enquanto outros, usando camundongos nocautes para metaloproteinases (MMP-9 e MMP-12), apontam a importância dessas enzimas na atividade das CDs, no tráfego das células T e sobre o remodelamento das vias aéreas (McMillan et al., 2004; Warner et al., 2004). Além disto, a escolha dos diferentes alérgenos na sensibilização, bem como do tipo de desafios (agudo ou crônico), contribuem como fatores determinantes na resposta final da asma. Em que pese o grande interesse pela OVA na maioria desses modelos (Kullowatz et al., 2008; Zhu et al., 2009), alguns estudos têm frequentemente utilizado, além da sensibilização com a OVA, outros alérgenos (ex.: poeira domiciliar, microorganismos [*Dermatophagoides pteronyssinus*], antígenos derivados de insetos [ex. barata]) no sentido de tentar mimetizar, cada vez mais, as características essenciais da asma em humanos, tais como a eosinofilia, presença de linfócitos Th2, maior expressão de MA e CDs, níveis sorológicos elevados de IgE, excesso de muco e, por fim, o remodelamento e HB (Cates et al., 2004). Vale acrescentar que em estudos desenvolvidos por Shinagawa e Kojima (2003), a instilação crônica do alérgeno OVA (3 dias/semana por 12 semanas), mas não a inalação deste (OVA; 5 dias/semana por 4 semanas), produziu um modelo de remodelamento em camundongos A/J e pouco ou nenhum efeito em camundongos das linhagens BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ, reforçando a importância da susceptibilidade das espécies e o tipo de tratamento. No que tange à medida de HB em animais *in vivo* (invasiva e não invasiva) ou sistema *in vitro*, todas essas técnicas possuem vantagens e desvantagens. Dentre os métodos de medida de HB não-invasivos, a medida de Penh (*pause enhanced*) é bastante empregada (Hao et al., 2003; Stevens et al., 2009).

Curiosamente, embora ainda não exista um consenso reconhecido sobre o efeito direto da poluição no desencadeamento da asma e outros efeitos adversos na saúde da população, várias evidências epidemiológicas e poucas experimentais têm demonstrado alguns dos efeitos deletérios de substâncias poluentes presentes na atmosfera, incluindo as PED, sobre as vias aéreas e sistema cardiovascular (Nemmar et al., 2004; Pope et al., 2006; Nemmar et al., 2007). Ademais, o desenvolvimento de neoplasias pulmonares e o agravamento das doenças inflamatórias e cardiopulmonares vem sendo associado às maiores concentrações de compostos químicos mutagênicos e carcinogênicos, incluindo

os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos [PAH] e quinonas, que se incorporam à superfície do MP, tal como as PED (Pope et al., 2002; Pope et al., 2004; Cho et al., 2004; Goto, et al., 2004; Moller et al., 2008).

1.6 Caracterização e justificativa do projeto

Os efeitos adversos decorrentes da inalação de poluentes ambientais gasosos e particulados sobre o trato respiratório e aparelho cardiovascular têm sido sugeridos em diversos estudos epidemiológicos (Adar e Kaufman, 2007; Chen et al., 2008; Dales et al., 2009; Halonen et al., 2009; Delfino et al., 2009) e, paralelamente, demonstrados em estudos experimentais (Wallenborn et al., 2007; Valavanidis et al., 2008; Seagrave et al., 2008; Yokota et al., 2008; Maatz et al., 2009; Kolarik et al., 2009). Ademais, existe uma estreita correlação entre a emissão de poluentes em grandes centros urbanos e o agravamento de doenças respiratórias, principalmente em indivíduos mais susceptíveis (Shima et al., 2003; Romieu et al., 2006; Liu et al., 2009). Sabidamente, tanto as crianças quanto os idosos possuem, em comum, a imunidade comprometida e, portanto, maior susceptibilidade ao efeito da poluição ambiental e outros estímulos lesivos (Pearce e Douwes, 2006). De fato, alguns trabalhos propõem que poluentes ambientais, como as PED, ROFA (Suzaki et al., 2007; Hougaard et al., 2008; Fedulov et al., 2008; Arantes-Costa et al., 2008) e fumaça de cigarro (Brian et al., 2002; Penn et al., 2007; De Flora et al., 2008) contribuem grandemente para exacerbação e desenvolvimento da asma brônquica e outras doenças inflamatórias das vias aéreas ou cardiovasculares na prole de mães expostas à tais poluentes. Recentemente, estudo epidemiológico de Romieu et al. (2008) demonstrou que crianças asmáticas residentes em áreas de alto tráfego na Cidade do México exibiram concentrações elevadas de biomarcadores da asma (ex.: aumento do malondialdeído e do volume expiratório forçado/minuto [FEV1]). Ainda, Shima et al. (2003) observaram, em estudo comparativo, que crianças residentes em grandes áreas urbanas apresentaram maior predisposição ao desenvolvimento de asma brônquica do que crianças que moravam em zonas rurais.

Outros poucos estudos postulam que, mesmo em baixas concentrações, a associação entre diferentes tipos de poluentes é ainda mais prejudicial à saúde (Becker et al., 1996), muito embora os mecanismos envolvidos não sejam bem esclarecidos. Dados anteriores do nosso laboratório mostram que a adição de baixas concentrações da quinona 1,2-NQ à suspensão de PED, quando administrado pela via intratraqueal de

ratos, resultou em maior extravasamento plasmático e influxo de leucócitos nas vias aéreas destes quando comparado ao efeito isolado de cada poluente, via mecanismo dependente, pelo menos em parte, de um componente neurovascular (Teles et al., 2009).

Até o presente momento, pouco se sabe sobre os efeitos isolados da 1,2-NQ no sistema imunológico de adultos ou crianças, independentemente (ou não) do estímulo antigênico, e a susceptibilidade tardia deste à inflamação alérgica. Hipotetizamos neste estudo um modelo experimental que mimetizasse as condições de exposição de um neonato à baixa concentração da 1,2-NQ, um dos contaminante das PED, e a repercursão dessa exposição na vida adulta destes mediante um estímulo antigênico.

2 CONCLUSÕES

1. A exposição de camundongos neonatos à 1,2-NQ amplificou a inflamação alérgica, mas não a hiperresponsividade das vias aéreas, destes na fase adulta.
2. Este efeito é consistente com a ativação de mastócitos e elevação da biossíntese de mediadores inflamatórios no pulmão, incluindo citocinas Th2 (IL-5, IL-13), INF- γ e IgE, independentemente da produção de citocinas Th1 e TBARS;
3. A exposição de camundongos neonatos à 1,2-NQ também favoreceu a apresentação das CD11c esplênicas destes na idade adulta. Tal ativação não foi suficiente para aumentar a expressão de moléculas co-estimuladoras no baço, como a CD86, CD80, CD40 e MHC-II, mas reduziu a expressão de IL-10;
4. Ao contrário, em camundongos adultos, a exposição à 1,2-NQ não amplificou a inflamação alérgica nestes animais, mas causou *per se* inflamação equipotente à da mistura 1,2-NQ e OVA. A quantificação da população de CDs, moléculas co-estimuladoras, mastócitos ativados e da produção de mediadores inflamatórios (citocinas Th2 ou Th1, LTB₄ e IgE) não foi diferente entre os grupos;
5. Este estudo mostra, pela primeira vez, que a exposição aguda de camundongos neonatos à 1,2-NQ, mas não em adultos, aumentou a susceptibilidade destes à inflamação alérgica na idade adulta. Conclui-se que este mecanismo depende, em parte, da ação lesiva deste poluente sobre a apresentação antigênica (CD11) e mastócitos e, possivelmente, no balanço da biossíntese de citocinas Th1 e Th2 e outros mediadores inflamatórios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Abbas AK, Janeway CA Jr. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell*. 2000;100(1):129-38. Review.

Abel K, La Franco-Scheuch L, Rourke T, Zhong-Min MA, Silva V, Fallert B, Beckett L, Reinhart TA, Miller CJ. Gamma Interferon-Mediated Inflammation Is Associated with Lack of Protection from Intravaginal Simian Immunodeficiency Virus SIVmac239 Challenge in Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6-Immunized Rhesus Macaques. *J Virol*. 2004;78(2):841-854.

Adar SD, Kaufman JD. Cardiovascular disease and air pollutants: evaluating and improving epidemiological data implicating traffic exposure. *Inhal Toxicol*. 2007;19 Suppl 1:135-49.

Alving K, Sundstrom C, Matran R, Panula P, Hokfelt T, Lundberg JM. Association between histamine-containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tissue Res*. 1991;264:529-538.

Anderson CC, Chan WF. Mechanisms and models of peripheral CD4 T cell self-tolerance. *Front Biosci*. 2004;9:2947-63. Review.

Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008;36(5):680-6.

Arshad SH. Primary prevention of asthma and allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(1):3-14; quiz 15. Review.

Associação nacional dos fabricantes de veículos automotores. Anuário estatístico da indústria Brasileira 2008, [Relatório on-line]. Disponível em: <http://www.anfavea.com.br/anuario.html> [2009 maio 19].

Averbeck M, Gebhardt C, Emmrich F, Treudler R, Simon JC. Immunologic principles of allergic disease. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2007;5(11):1015-28. Review.

Babu KS, Davies DE, Holgate ST. Role of tumor necrosis factor γ in asthma. *Immunol Allergy Clin North Am*. 2004;24:583-597.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. C2003 – Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Bachmann J. Will the circle be unbroken: a history of the U.S. National Ambient Air Quality Standards. *J Air Waste Manag Assoc.* 2007;57(6):652-97. Review.

Bagchi M, Balmoori J, Ye X, Bagchi D, Ray SD, Stohs SJ. Protective effect of melatonin on naphthalene-induced oxidative stress and DNA damage in cultured macrophage J774A.1 cells. *Mol. Cell. Biochem.* 2001;221:49-55.

Bai TR, Knight DA. Structural changes in the airways in asthma: observations and consequences. *Clin Sci.* 2005;108:463-477.

Balbo P, Silvestri M, Rossi GA, Crimi E, Burastero SE. Differential role of CD80 and CD86 on alveolar macrophages in the presentation of allergen to T lymphocytes in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2001;31:625-36.

Barnes KC, Grant AV, Gao P. A review of the genetic epidemiology of resistance to parasitic disease and atopic asthma: common variants for common phenotypes? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005;5(5):379-85.

Beatty SR, Rose CE, Sung SS. Diverse and potent chemokine production by lung CD11bhi dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J Immunol.* 2007;178:1882-1895.

Bedada GB, Heinrich J, Gotschi T. Urban background particulate matter and allergic sensitization in adults of ECRHS II. *Int J Hyg Environ Health.* 2007;210(6):691-700.

Bell ML, Davis DL, Gouveia N, Borja-Aburto VH, Cifuentes LA. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. *Environ Res.* 2006;100:431-40.

Belz GT, Carbone FR, Heath WR. Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol.* 2002;22(5-6):439-48.

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Nel A, Peden D, Diazsanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1116-1123. Review.

Beutler B. Toll-like receptors and their place in immunology. Where does the immune response to infection begin? *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):498.

Bharadwaj AS, Bewtra AK, Agrawal DK. Dendritic cells in allergic airway inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* 2007;85(7):686-99.

Bijl-Hofland ID, Cloosterman SG, Folgering HT, Akkermans RP, Van Schayck CP. Relation of the perception of airway obstruction to the severity of asthma. *Thorax.* 1999;54(1):15-19.

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

Borland C, Higenbottam T. Nitric oxide yields of contemporary UK, US and French cigarettes. *Int J Epidemiol*. 1987;16(1):31-4.

Bose R, Sutherland GR, Pinsky, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochem Res*. 1989;14:217-220.

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

Bråbäck L, Forsberg B. Does traffic exhaust contribute to the development of asthma and allergic sensitization in children: findings from recent cohort studies. *Environ Health*. 2009;16;8:17.

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

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

Busse PJ, Zhangw TF, Srivastavaw K, Schofieldz B, Liw XM. Effect of ageing on pulmonary inflammation, airway hyperresponsiveness and T and B cell responses in antigen-sensitized and -challenged mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:1392–1403.

Cadenas E, Hochstein P, Ernster L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1992;65:97-146. Review.

Calderon C, Rivera L, Hutchinson P, Dagher H, Villanueva E, Ghildyal R, BARDIN PG, Freezer NJ. T-cell cytokine profiles are altered in childhood asthma exacerbation. *Respirology*. 2009;23-29.

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

Cates EC, Fattouh R, Wattie J, Inman MD, Goncharova S, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC, Jordana M. Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism. *J Immunol*. 2004;173(10):6384-92.

Cazzola M, Polosa L. Anti-TNF- α and Th1 cytokine directed therapies for the treatment of asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol*. 2006;6:43.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Asthma prevalence and control characteristics by race/ethnicity-United States, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2004;53(7):145-8.

Chan RC, Wang M, Li N, Yanagawa Y, Onoé K, Lee JJ, Nel AE. Pro-oxidative diesel exhaust particle chemicals inhibit LPS-induced dendritic cell responses involved in T-helper differentiation. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118(2):455-65.

Chen H, Goldberg MS, Villeneuve PJ. A systematic review of the relation between long-term exposure to ambient air pollution and chronic diseases. *Rev Environ Health*. 2008;23(4):243-97.

Chen LH, Knutsen SF, Shavlik D, Beeson WL, Petersen F, Ghamsary M, Abbey D. The association between fatal coronary heart disease and ambient particulate air pollution: Are females at greater risk? *Environ Health Perspect*. 2005;113:1723-9. Erratum in: *Environ Health Perspect*. 2005;114:A21.

Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy*. 2008;63(11):1418-27.

Chensue SW, Warmington KS, Ruth JH, Sanghi PS, Lincoln P, Kunkel SL. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in Th1 (mycobacterial) and Th2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression, and IL-12 production. *J Immunol*. 1996;157(10):4602-8.

Cheraim AB, Xavier-Elsas P, De Oliveira SH, Batistella T, Russo M, Gaspar-Elsas MI, Cunha FQ. Leukotriene B4 is essential for selective eosinophil recruitment following allergen challenge of CD4+ cells in a model of chronic eosinophilic inflammation. *Life Sci*. 2008;83(5-6):214-22.

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

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

Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur J Immunol*. 1998;28(5):1719-26.

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

Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo 2001. São Paulo; 2002. p.130.

Conti P, DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy Asthma Proc.* 2001;22(3):133-7. Review.

Cooper PJ, Chico ME, Vaca MG, Rodriguez A, Alcântara-Neves NM, Genser B, Carvalho LP, Stein RT, Cruz AA, Rodrigues LC, Barreto ML. Risk factors for asthma and allergy associated with urban migration: background and methodology of a cross-sectional study in Afro-Ecuadorian school children in Northeastern Ecuador (Esmeraldas-SCAALA Study). *BMC Pulm Med.* 2006;6:24-30.

Corrigan CJ. Mechanisms of intrinsic asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2004;4:53–6.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, Robbins SL. Pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, 6th ed., 1999.

Dales R, Chen L, Frescura AM, Liu L, Villeneuve PJ. Acute effects of outdoor air pollution on FEV1: a panel study of schoolchildren with asthma. *Eur Respir J.* 2009;27-35.

D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Holgate S. Environmental risk factors and allergic bronchial asthma. *Clin Exp Allergy.* 2005;35(9):1113-24.

Das AM, Griswold DE, Torphy TJ, Li L. Biopharmaceutical therapeutics for asthma remodeling. *Curr Pharm Des.* 2006;12(25):3233-40.

De Flora S, D'Agostini F, Balansky R, Camoirano A, Cartiglia C, Longobardi M, Travaini G, Steele VE, Pesce C, Izzotti A. High susceptibility of neonatal mice to molecular, biochemical and cytogenetic alterations induced by environmental cigarette smoke and light. *Mutat Res.* 2008;659(1-2):137-46.

De mayer DG. The cytokine handbook. In: Thomson AW, editor. Cytokine handbook. San Diego: Academic Press; 1998. p. 491-516.

De Metz J, Hack CE, Romijn JA, Levi M, Out TA, Ten Berge IJ, Sauerwein HP. Interferon-gamma in healthy subjects: selective modulation of inflammatory mediators. *Eur. J. Clin. Investig.* 2001;31:536-543.

Dejmek J, Solansky I, Benes I, Lenicek J, Sram RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect.* 2000;108:1159–1164.

Delfino RJ, Chang J, Wu J, Ren C, Tjoa T, Nickerson B, Cooper D, Gillen DL. Repeated hospital encounters for asthma in children and exposure to traffic-related air pollution near the home. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2009;102(2):138-44.

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

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

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

Departamento estadual de trânsito de São Paulo. Frota de veículos 2008. Fonte: Departamento estadual de trânsito de São Paulo. Disponível em <http://www.detran.sp.gov.br/frota/frota.asp> [2009 fev. 14].

Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. *Clin. Exp Allergy*. 2004;34:1156-67.

Diaz-Sanchez D, Penichet-Garcia M, Saxon A. Diesel exhaust particles directly induce activated mast cells to degranulate and increase histamine levels and symptom severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;106(6):1140-6.

Dietert RR, Etzel RA, Chen D, Halonen M, Holladay SD, Jarabek AM, Landreth K, Peden DB, Pinkerton K, Smialowicz RJ, Zoetis T. Workshop to Identify Critical Windows of Exposure for Children's Health: Immune and Respiratory Systems Work Group Summary. *Environ Health Perspect*. 2000;108(3):483-90.

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

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

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

Ewart SL, Kuperman D, Schadt E, Tankersley C, Grupe A, Shubitowski DM, Peltz G, Wills-Karp M. Quantitative trait loci controlling allergen induced airway hyperresponsiveness in inbred mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000;23:537–545.

Fahy O, Sncha S, Pne J, Scherpree A, Lassalle P, Tonnel AB, Yssel H, Wallaert B, Tscopoulos A. Exposure Favors Th2 Cell Recruitment by Mononuclear Cells and Alveolar Macrophages from Allergic Patients by Differentially Regulating Macrophage-Derived Chemokine and IFN--Induced Protein-10 Production. *The J Immunol.* 2002;168:5912-5919.

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

Ferrari RA, Oliveira VS, Scabio A. Biodiesel de soja – Taxa de converso em steres etlicos, caracterizao fsicoqumica e consumo em gerador de energia. *Quim. Nova.* 2005;289(1):19-23.

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

Florenzano J; Yshii LM; Teixeira SA; Muscar MN, Costa SKP. The environmental contaminant 1,2-naphthoquinone causes polymorphonuclear leukocytes influx in murine air pouch. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Farmacologia; Ribeiro Preto; 2007. Abstract. So Paulo; 2007. p. 39.

Fujishima H, Fukagawa K, Okada N, Takano Y, Tsubota K, Hirai H. Prostaglandin D2 induces chemotaxis in eosinophils via its receptor CRTH2 and eosinophils may cause severe ocular inflammation in patients with allergic conjunctivitis. *Cornea.* 2005;24:66–70.

Gajewska BU, Wiley RE, Jordana M. GM-CSF and dendritic cells in allergic airway inflammation: basic mechanisms and prospects for therapeutic intervention. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2003;2:279–92.

Gale LM, McColl SR. Chemokines: extracellular messengers for all occasions? *Bioessays.* 1999;21(1):17-28.

Galli SJ. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol.* 2000;7:32–39.

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

Garca-Marcos L, Batlls-Garrido J, Blanco-Quirs A, Garca-Hernndez G, Guilln-Grima F, Gonzlez-Daz C, Garca-Merino A, Arnedo-Pena A, Busquets-Monge RM, Morales-Surez-Varela M, Lpez-Silvarrey-Varela A, Garca-Andoin N. Influence of two different geo-climatic zones on the prevalence and time trends of asthma symptoms among Spanish adolescents and schoolchildren. *Int J Biometeorol.* 2009;53(1):53-60.

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

Goodarzi K, Goodarzi M, Tager AM, Luster AD, Von Andrian UH. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol*. 2003;4:965–973.

Goto Y, Hogg JC, Shih CH, Ishii H, Vincent R, Van Eeden SF. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. *Am J Physiol Lung Cell. Mol Physiol*. 2004;287:79–85.

Graboski MS, McCormick RL, Alleman TL, Herring AM. The Effect of Biodiesel Composition on Engine Emissions from a DDC Series 60 Diesel Engine. NREL/SR-510-31461. Golden, CO: Colorado Institute for Fuels and Engine Research, Colorado School of Mines; 2003.

Griffin FM Jr. Activation of macrophage complement receptors for phagocytosis. *Contemp Top Immunobiol*. 1984;13:57-70. Review.

Gudmundsson G, Bosch A, Davidson BL, Berg DJ, Hunninghake GW. Interleukin-10 modulates the severity of hypersensitivity pneumonitis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998;19(5):812-8.

Gupta S, Gollapudi S. Molecular mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in aging human T cell subsets. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(5):1034-42.

Guyton AC, Hall JE. Tratado de fisiologia médica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Halonen JI, Lanki T, Yli-Tuomi T, Tiittanen P, Kulmala M, Pekkanen J. Particulate air pollution and acute cardiorespiratory hospital admissions and mortality among the elderly. *Epidemiology*. 2009;20(1):143-53.

Hamada K, Goldsmith CA, Goldman A, Kobzik L. Resistance of very young mice to inhaled allergen sensitization is overcome by coexposure to an air-pollutant aerosol. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;161:1285-93.

Hamada K, Goldsmith CA, Kobzik L. Increased airway hyperresponsiveness and inflammation in a juvenile mouse model of asthma exposed to air-pollutant aerosol. *J Toxicol Environ Health A*. 1999;58(3):129-43.

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

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

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

Hao M, Comier S, Wang M, Lee JJ, Nel A. Diesel exhaust particles exert acute effects on airway inflammation and function in murine allergen provocation models. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;112(5):905-14.

Hatch GE, Slade R, Boykin E, Hu PC, Miller FJ, Gardner DE. Correlation of effects of inhaled versus intratracheally injected males on susceptibility to respiratory infection in mice. *Am Rev Respir Dis*. 1981;124(2):167-73.

Heaton T, Rowe J, Turner S, Aalberse RC, Klerk N, Suriyaarachchi N, Serralha M, Holt BJ, Hollams E, Yerkovich S. An immunoepidemiological approach to asthma: identification of in vitro T-cell response patterns associated with different wheezing phenotypes in children. *Lancet*. 2005;365:142–149.

Herrick CA, Bottomly K. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):405-12. Review.

Hiyoshi K, Takano H, Inoue K, Ichinose T, Yanagisawa R, Tomura S, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. Effects of a single intratracheal administration of phenanthraquinone on murine lung. *J Appl Toxicol*. 2005a;25(1):47-51.

Hiyoshi K, Takano H, Inoue KI, Ichinose T, Yanagisawa R, Tomura S, Kumagai Y. Effects of phenanthraquinone on allergic airway inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2005b;35(9):1243-8.

Ho KF, Lee SC, Yu JC, Zou SC, Fung K. Carbonaceous characteristics of atmospheric particulate matter in Hong Kong. *Sci Total Environ*. 2002;300(1-3):59-67.

Holgate ST. Pathogenesis of Asthma. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:872–897.

Holguin F. Traffic, Outdoor Air Pollution, and Asthma. *Immunol Allergy Clin N Am*. 2008;28:577–588.

Hoshino T, Okamoto M, Takei S, Sakazaki Y, Iwanaga T, Aizawa H. Redox-regulated mechanisms in asthma. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(4):769-83.

Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:521–531.

Hutchison S, Choo-Kang BS, Gibson VB, Bundick RV, Leishman AJ, Brewer JM, McInnes IB, Garside P. An investigation of the impact of the location and timing of antigen-specific T cell division on airways inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2009;155(1):107-16.

Ichinose T, Takano H, Miyabara Y, Sadakane K, Sagai M, Shibamoto T. Enhancement of antigen-induced eosinophilic inflammation in the airways of mast-cell deficient mice by diesel exhaust particles. *Toxicology*. 2002;180(3):293-301.

Inoue K, Koike E, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Yoshikawa T. Effects of Diesel Exhaust Particles on Antigen-Presenting Cells and Antigen-Specific Th Immunity in Mice. *Exp Biol Med*. 2009;234:200-209.

Inoue K, Koike E, Yanagisawa R, Takano H. Impact of diesel exhaust particles on th2 response in the lung in asthmatic mice. *J Clin Biochem Nutr*. 2008;43(3):199-200.

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(2):259-67.

Inoue K, Takano H, Ichinose T, Tomura S, Yanagisawa R, Sakurai M, Sumi D, Cho AK, Hiyoshi K, Kumagai Y. Effects of naphthoquinone on airway responsiveness in the presence or absence of antigen in mice. *Arch Toxicol*. 2007b;81(8):575-81.

Jaffar ZH, Stanciu L, Pandit A, Lordan J, Holgate ST, Roberts K. Essential Role for Both CD80 and CD86 Costimulation, But Not CD40 Interactions, in Allergen-Induced Th2 Cytokine Production from Asthmatic Bronchial Tissue: Role for $\alpha\beta$, But Not $\gamma\delta$, T Cells. *J Immunol*. 1999;163(11):6283-91.

Jahnsen FL. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*. 2001;56:823–826.

Jakab GJ. The toxicologic interactions resulting from inhalation of carbon black and acrolein on pulmonary antibacterial and antiviral defenses. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993 Aug;121(2):167-75.

Jayaratnam A, Corrigan CJ, Lee TH. The continuing enigma of nonatopic asthma. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:835–7.

Jin MS, Lee JO. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*. 2008;29(2):182-91. Review.

Jung S, Unutmaz D, Wong P, Sano G, De los Santos K, Sparwasser T, Wu S, Vuthoori S, Ko K, Zavala F, Pamer EG, Littman DR, Lang RA. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*. 2002;17(2):211-20.

Kallinich T, Schmidt S., Hamelmann E. Chemokine-receptor expression on T cells in lung compartments of challenged asthmatic patients. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:26–33.

Kariyawasam HH, Robinson DS. The eosinophil: the cell and its weapons, the cytokines, its locations. *Semin Respir Crit Care Med*. 2006;27:117–27.

Kauffman HK, Tamm M, Timmerman JA, Borger P. House dust mite major allergens Der p 1 and Der p 5 activate human airway-derived epithelial cells by protease-dependent and protease-independent mechanisms. *Clin Mol Allergy*. 2006;4:5.

Kaur D, Saunders R, Berger P. Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1179–88.

Kawakami T, Galli SJ. Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol*. 2002;1:773–86

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

Kelchtermans H, Billiau A, Matthys P. How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. *Trends Immunol*. 2008;29(10):479–86.

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

Kim JC, Kim SH, Shin DH, Ahn TH, Kim HC, Kim YB, Jiang CZ, Han J, Chung MK. Effects of prenatal exposure to the environmental pollutant 2-bromopropane on embryo-fetal development in rats. *Toxicology*. 2004;196(1-2):77–86

King ME, Mannino DM, Holguin F. Risk factors for asthma incidence. A review of recent prospective evidence. *Panminerva Med*. 2004;46(2):97–110.

King MR, Ismail AS, Davis LS, Karp DR. Oxidative Stress Promotes Polarization of Human T Cell Differentiation Toward a T Helper 2 Phenotype1. *J Immunol*. 2006;176:2765–2772.

Kinney PL, Aggarwal M, Northridge ME, Janssen NA, Shepard P. Airborne concentrations of PM(2.5) and diesel exhaust particles on Harlem sidewalks: A community-based pilot study. *Environ. Health Perspect*. 2000;108:213–218.

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

Kobayashi T, Iijima K, Kita H. Marked airway eosinophilia prevents development of airway hyper-responsiveness during an allergic response in I-5 transgenic mice. *J Immunol.* 2003;170:5756-5763.

Koch A, Knobloch J, Dammhayn C, Raidl M, Ruppert A, Hag H, Rottlaender D, Müller K, Erdmann E. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF-gamma and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. *Clin Immunol.* 2007; 125(2):194-204.

Koh YI, Choi IS, Lim H. Airway responsiveness as a direct factor contributing to the dyspnoea perception in asthma. *Respir Med.* 2001;95(6):464-70.

Kolarik B, Lagercrantz L, Sundell J. Nitric oxide in exhaled and aspirated nasal air as an objective measure of human response to indoor air pollution. *Indoor Air.* 2009;19(2):145-52.

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

Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol.* 1999;163(3):1537-44.

Kulowatz A, Rosenfield D, Dahme B, Magnussen H, Kannies F, Ritz T. Stress effects on lung function in asthma are mediated by changes in airway inflammation. *Psychosom Med.* 2008;70(4):468-75.

Kumagai Y, Koide S, Taguchi K, Endo A, Nakai Y, Yoshikawa T, Shimojo N. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(4):483-9.

Kumar RK, Foster PS. Modeling allergic asthma in mice. Pitfalls and opportunities. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27:267-272.

Kunkel SL, Standiford T, Kasahara K, Strieter RM. Stimulus specific induction of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene expression. *Adv Exp Med Biol.* 1991;305:65-71. Review.

Kunkel SL, Strieter RM, Lindley JJ, Westwick J. Chemokines: new ligands, receptors and activities. *Immunol Today.* 1995;16(12):559-61.

Lagorio S, Forastiere F, Pistelli R. Air pollution and lung function among susceptible adult subjects: a panel study. *Environ Health.* 2006;5:11.

Lambrecht BN. Allergen uptake and presentation by dendritic cells. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2001;1(1):51-9. Review.

Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol*. 2000;1(4):311-6.

Larché M, Robinson DS, Kay AB. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Allergy Clin Immunol*. 2003;111(3):450-63.

Larché M. Regulatory T cells in allergy and asthma. *Chest*. 2007;132(3):1007-1014.

Larsson BM, Kumlin M, Sundblad BM, Larsson K, Dahlén SE, Palmberg L. Effects of 5-lipoxygenase inhibitor zileuton on airway responses to inhaled swine house dust in healthy subjects. *Respir Med*. 2006;100(2):226-37.

Lewtas J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Res*. 2007;636:95–133.

Lin CH, Huang CC, Wang TW, Wang YJ, Lin PH. Disparity in the induction of glutathione depletion, ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and apoptosis by quinonoid derivatives of naphthalene in human cultured cells. *Chem Biol Interact*. 2007;165:200–210.

Lin PH, Pan WC, Kang YW, Chen YL, Lin SH, Lee MC, Chou YH, Nakamura J. Effects of naphthalene quinonoids on the induction of oxidative DNA damage and cytotoxicity in calf thymus DNA and in human cultured cells. *Chem Res Toxicol*. 2005;18:1262–1270.

Lino dos Santos Franco A, Damazo AS, Beraldo de Souza HR, Domingos HV, Oliveira-Filho RM, Oliani SM, Costa SK, Tavares de Lima W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;214(1):35-42.

Lino dos Santos Franco A. Estado funcional de fagócitos após a exposição de ratos ao formaldeído: relevância para a inflamação alérgica pulmonar [Tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo. São Paulo; 2008.

Liu L, Poon R, Chen L, Frescura AM, Montuschi P, Ciabattoni G, Wheeler A, Dales R. Acute effects of air pollution on pulmonary function, airway inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect*. 2009;117(4):668-74.

Longhini E, Fanari P, Giacomotti E, Palmulli P, Gabrione M, Gori D, Barlera S, Tognoni G, Salvadori A. Lung function and methacholine responsiveness among adolescents in an air-polluted area. *Respiration*. 2004;71(1):51-9.

Lundblad LK, Irvin CG, Hantos Z, Sly P, Mitzner W, Bates JH. Penh is not a measure of airway resistance! *Eur Respir J*. 2007;30(4):805.

Macedo SM, Vaz SC, Lourenço EL, de Sousa Mda G, Ligeiro-Oliveira AP, Ferreira JM Jr, Almeida SR, de Lima WT, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicology*. 2007; 241(1-2):47-57.

Masten BJ, Lipscomb MF. Dendritic cells: pulmonary immune regulation and asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2000;55(3):225-30.

Mauad T, Dolhnikoff M. Pathologic similarities and differences between asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med*. 2008;14(1):31-8.

Maynard CL, Weaver CT. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *Immunol Rev*. 2008;226:219-33.

McMillan SJ, Kearley J, Capmpbell JD, Zhu XW, Larbi KY, Shipley JM, Senior RM, Nourashargh S, Lloyd CM. Matrix metalloproteinase-9 deficiency results in enhanced allergen-induced airway inflammation. *J Immunol*. 2004;172:2586-2594.

Medeiros AP, Gouveia N, Machado RP, Souza MR, Alencar GP, Novaes HM, Almeida MF. Traffic-Related Air Pollution and Perinatal Mortality: A Case-Control Study. *Environ Health Perspect*. 2009;117(1):127-132.

Medina LF, Hertz PF, Stefani V, Henriques JA, Zanotto-Filho A, Brandelli A. Aminonaphthoquinone induces oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Cell Biol*. 2006;84(5):720-7.

Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001;106(3):255-8. Review.

Miraglia SG, Saldiva PH, Bohm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in Sao Paulo, Brazil. *Environ Manage*. 2005;35:667-76.

Miyahara N, Miyahara S, Takeda K, Gelfand EW. Role of the LTB₄/BLT1 pathway in allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Allergol Int*. 2006;55(2):91-7. Review.

Møller P, Folkmann JK, Forchhammer L, Bräuner EV, Danielsen PH, Risom L, Loft S. Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2008;266(1):84-97. Review

Moniuszko M, Bodzenta-Lukaszyk A, Kowal K, Dabrowska M. Bronchial macrophages in asthmatics reveal decreased CD16 expression and substantial levels of receptors for IL-10, but not IL-4 and IL-7. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(3):181-9.

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

Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:933–944.

Nakajima H, Takatsu K. Role of Cytokines in Allergic Airway Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol*. 2007;142:265–273

Nakamura T, Lee RK, Nam SY, Podack ER, Bottomly K, Flavell RA. Roles of IL-4 and IFN-gamma in stabilizing the T helper cell type 1 and 2 phenotype. *J Immunol*. 1997;158:2648–53.

National Cancer Institute - NCI. Lung cancer, small cell: Treatment - Patient Information. Available from: <http://www.healthlinkbc.ca/kbase/nci> [2009 May 20].

National Energy Technology Laboratory of United States – Doe. Available from: <http://www.netl.doe.gov/> [2009 June 15].

Nemmar A, Al-Maskari S, Ali BH, Al-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(3):L664-70.

Nemmar A, Hoet PH, Vermeylen J, Nemery B, Hoylaerts MF. Pharmacological stabilization of mast cells abrogates late thrombotic events induced by diesel exhaust particles in hamsters. *Circulation*. 2004;110:1670-7.

Ogawa Y, Duru EA, Ameredes BT. Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation. *Curr Mol Med*. 2008;8(5):437-45.

Oliveira SH, Lukacs NW. The role of chemokines and chemokine receptors in eosinophil activation during inflammatory allergic reactions. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(11):1455-1463. Review.

Osman M. Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy. *Arch Dis Child*. 2003;88:587–590.

O'Sullivan S, Roquet A, Dahlén B, Dahlén S, Kumlin M. Urinary excretion of inflammatory mediators during allergen-induced early and late phase asthmatic reactions. *Clin Exp Allergy*. 1998;28(11):1332-9.

Pattenden S, Antova T, Neuberger M, Nikiforov B, De Sario M, Grize L, Heinrich J, Hrubá F, Janssen N, Luttmann-Gibson H, Privalova L, Rudnai P, Splichalova A, Zlotkowska R, Fletcher T. Parental smoking and children's respiratory health: independent effects of prenatal and postnatal exposure. *Tob Control*. 2006;15(4):294-301.

Pearce N, Ait-Khaled N, Beasley R, Mallol J, Keil U, Mitchell E, Robertson C; The ISAAC phase. Three Study Group. Worldwide trends in the prevalence of asthma

symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Thorax*. 2007;62(9):758-66.

Pearce N, Douwes J. The global epidemiology of asthma in children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10:125-32.

Penn AL, Rouse RL, Horohov DW, Kearney MT, Paulsen DB, Lomax L. In utero exposure to environmental tobacco smoke potentiates adult responses to allergen in BALB/c mice. *Environ Health Perspect*. 2007;115(4):548-55.

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

Pinkerton KE, Joad JP. Influence of air pollution on respiratory health during perinatal development. *Clinic and Exp Pharmacol and Phys*. 2006;33:269–272

Pope CA III, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Godleski JJ. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004;109:71–77.

Pope CA III, Dockery DW. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J Air Waste Manag Assoc*. 2006;56:709–742.

Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc*. 2002;287:1132-1141.

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

Proust B, Nahori MA, Ruffie C, Lefort J, Vargaftig BB. Persistence of bronchopulmonary hyper-reactivity and eosinophilic lung inflammation after anti-IL-5 or -IL-13 treatment in allergic BALB/c and IL-4Ralpha knockout mice. *Clin Exp Allergy*. 2003;33(1):119-31.

Puxeddu I, Berkman N, Nissim BEN Efraim AH, Davies DE, Ribatti D, Gleich GJ, Levi-Schaffer F. The role of eosinophil major basic protein in angiogenesis. *Allergy*. 2009;64:368–374.

Rådinger M, Lötvall J. Eosinophil progenitors in allergy and asthma — Do they matter? *Pharmacol Ther*. 2009;121(2):174-84.

Rage E, Jacquemin B, Nadif R, Oryszczyn MP, Siroux V, Aguilera I, Kauffmann F, Künzli N. Total serum IgE levels are associated with ambient ozone concentration in

asthmatic adults. Epidemiological Study on the Genetics Environment of Asthma (EGEA). *Allergy*. 2009;64(1):40-6.

Ramírez-Prieto MT, García-Río F, Villamor J. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. *Med Clin (Barc)*. 2006;127(10):386-96.

Rappolee DA, Web Z. Macrophage secretions: a functional perspective. *Bull Inst Pasteur (Paris)*. 1989;87:361-394.

Reibman J, Hsu Y, Chen LC, Bleck B, Gordon T. Airway epithelial cells release MIP-3alpha/CCL20 in response to cytokines and ambient particulate matter. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(6):648-54.

Renauld JC. New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol*. 2001;54:577-589.

Riffo-Vasques Y, Oliveira APL, Page CP, Spina D, Tavares De Lima W. Role of sex hormones in allergic inflammation in mice. *Clin Exp Allergy*. 2007;37:459-470.

Rio EM, Gallo PR, Siqueira AA. Asthma mortality in the city of São Paulo, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2002;36(2):149-54.

Ripperton LA, Kornreich L, Worth JJ. Nitrogen dioxide and nitric oxide in non-urban air. *J Air Pollut Control Assoc*. 1970;20(9):589-92.

Roland DM, Macchia WM, Grim KS, Kimble EF, White DH, Kowalski TJ. Leukotriene biosynthesis inhibition by aryl and aroyl substituted naphthoquinones. *Agents Actions*. 1991 Sep;34(1-2):145-7.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(1):1-23. Review.

Romieu I, Barraza-Villarreal A, Escamilla-Núñez C, Almstrand AC, Diaz-Sanchez D, Sly PD. Exhaled breath malondialdehyde as a marker of effect of exposure to air pollution in children with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2008;121:930-939.

Romieu I, Ramirez-Aguilar M, Sienna-Monge JJ. GSTM1 and GSTP1 and respiratory health in asthmatic children exposed to ozone. *Eur Respir J*. 2006;28(5):953-9.

Rosenwasser LJ. New immunopharmacologic approaches to asthma: role of cytokine antagonism. *J Allergy Clin Immunol*. 2000;105:586-591.

Rossi M, Young JW. Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity. *J Immunol*. 2005;175(3):1373-81.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:147-174.

Rouse RL, Boudreaux MJ, Penn AL. In utero environmental tobacco smoke exposure alters gene expression in lungs of adult BALB/c mice. *Environ Health Perspect.* 2007;115(12):1757-66.

Samet JM, Brauer M, Schlesinger RB. Particulate matter. In: *Air Quality Guidelines: Global Update 2005—Particulate Matter, Ozone, Nitrogen Dioxide and Sulfur Dioxide.* Copenhagen:World Health Organization; 2006. p. 217–305.

Samet JM. Traffic, Air Pollution, and Health. *Inhal Toxicol.* 2007;19:1021–1027.

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

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

Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Krämer U. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res.* 2005;6:152

Schröder NW, Maurer M. The role of innate immunity in asthma: leads and lessons from mouse models. *Allergy.* 2007;62:579–590.

Schröder NWJ. The role of innate immunity in the pathogenesis of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2009;9:38–43.

Schuchardt U, Sercheli R, Vargas RM. Transesterification of vegetable oils: a review. *J Braz Chem Soc.* 1998; 9(3):199–212.

Schuurman HJ, Quesnia UX. Development and maturation of T-and B-cells. In: Nijkamp FP, Parnaham MJ. *Principles of Immunopharmacology.* Edinburgh, UK: Birkhauser; 2003. Cap. A2. p. 23–39.

Seagrave J, Campen MJ, Mcdonald JD, Mauderly JL, Rohr AC. Oxidative stress, inflammation, and pulmonary function assessment in rats exposed to laboratory-generated pollutant mixtures. *J Toxicol Environ Health A.* 2008;71(20):1352-62.

Seymour BW, Friebertshauser KE, Peake JL, Pinkerton KE, Coffman RL, Gershwin LJ. Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. *Dev Immunol.* 2002;9(1):47-54.

Shanley TP, Peters JL, Jones ML, Chensue SW, Kunkel SL, Ward PA. Regulatory effects of endogenous interleukin-1 receptor antagonist protein in immunoglobulin G immune complex-induced lung injury. *J Clin Invest.* 1996;97(4):963-70.

Shanley TP, Vasi N, Denenberg A. Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. *Cytokine*. 2000;12(7):1054-64.

Sharp C, Howell S, Jobe J. The Effect of Biodiesel Fuels on Transient Emissions from Modern Diesel Engines, Part II Unregulated Emissions and Chemical Characterization. Technical Paper 2000-01-1968. Warrendale, PA: SAE; 2000.

Shima M, Nitta Y, Adachi M: Traffic-related air pollution and respiratory symptoms in children living along trunk roads in Chiba Prefecture, Japan. *J Epidemiol* 2003, 13:108-119.

Shinagawa K, Kojima M. Mouse Model of Airway Remodeling Strain Differences. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:959-967.

Smit JJ, Lukacs NW. A closer look at chemokines and their role in asthmatic responses. *Eur J Pharmacol*. 2006;533:277-288.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. IV Diretrizes Brasileiras para o Manejo da Asma. *J Bras Pneumol*. 2006;32(Supl 7):S447-S474.

Stevens T, Cho SH, Linak WP, Gilmour MI. Differential potentiation of allergic lung disease in mice exposed to chemically distinct diesel samples. *Toxicol Sci*. 2009;107(2):522-34.

Stvenson SC, Marshall LA, Morgan DW. *In vivo Models of inflammation*. 2nd Ed.: Switzerland: Birkhauser; 2006. vol. 2.

Sugimoto T, Ishikawa Y, Yoshimoto T, Hayashi N, Fujimoto J, Nakanishi K. IL-18 acts on memory Th1 cells to induce airway inflammation and hyperresponsiveness in a naïve, 2004. *J Exp Med*. 2004;199(4):535-45.

Swanson KJ, Kado N, Madden MC, Ghio, AJ. Release of IL-8 and IL-6 by BEAS-2B cells following in vitro exposure to biodiesel PM extracts. *Toxicologist*. 2007(a);96:813.

Swanson KJ, Madden MC, Ghio AJ. Biodiesel exhaust: the need for health effects research. *Environ Health Perspect*. 2007(b);115(4):496-9.

Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003 Aug-Sep;69(2-3):123-34. Review.

Takano H, Yanagisawa R, Inoue K. Components of diesel exhaust particles diversely enhance a variety of respiratory diseases related to infection or allergy: extracted organic chemicals and the residual particles after extraction differently affect respiratory diseases. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(2):101-7.

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

Takatsu K, Takaki S, Hitoshi Y. Interleukin-5 and its receptor system: implications in the immune system and inflammation. *Adv Immunol*. 1994;57:145–190.

Takeda K, Akira S. Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol*. 2003;5(3):143-53. Review.

Tamachi T, Maezawa Y, Ikeda K, Kagami SI, Hatano M, Seto Y, Suto A, Suzuki K, Watanabe N, Saito Y, Tokuhisa T, Iwamoto I, Nakajima H. IL-25 enhances allergic airway inflammation by amplifying a Th2 cell dependent pathway in mice. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118:606–614.

Tanaka H, Komai M, Nagao K, Ishizaki M, Kajiwarra D, Takatsu K, Delespesse G, Nagai H. Role of interleukin-5 and eosinophils in allergen-induced airway remodeling in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:62-68.

Tang C, Inman MD, Van Rooijen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, O'Byrne PM. Th type 1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2-mediated allergic airway inflammation by an IFN-gammadependent mechanism. *J Immunol*. 2001;166:1471–1481.

Tattersfield AE. Air pollution: brown skies research. *Thorax*. 1996;51(1):13-22. Review.

Teerlink CC, Camp NJ, Bansal A, Crapo R, Hughes D, Kort E, Rowe K, Cannon-Albright LA. Significant evidence for linkage to chromosome 5q13 in a genome-wide scan for asthma in an extended pedigree resource. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(5):636-43.

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*. 2009;Apr 28. [Epub ahead of print].

Teles AM, Lima C, Boletini-Santos D, Teixeira AS, Muscara MN, Kumagai Y, Costa SKP. Diesel exhaust particles exert acute effects on airways inflammation. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia; Rio de Janeiro; 2006. Abstract. Rio de Janeiro: Caderno de resumos; 2006. p. 42.

Temann UA, Geba GP, Rankin JA, Flavell RA. Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness. *J Exp Med*. 2000;188:1307–1320.

Terawaki K, Yokomizo T, Nagase T, Toda A, Taniguchi M, Hashizume K, Yagi T, Shimizu T. Absence of Leukotriene B4 Receptor 1 Confers Resistance to Airway Hyperresponsiveness and Th2-Type Immune Responses¹. *J Immunol.* 2005;175:4217–4225.

The world bank and The State Environmental Protection Administration - Wb e Sepa. Cost of pollution in China - Economic estimates of physical damages. Coference edition. China: The world bank and The State Environmental Protection Administration; 2007.

Tliba O, Amrani Y, Panettieri RA. Is Airway Smooth Muscle the “Missing Link” Modulating Airway Inflammation in Asthma? *Chest J.* 2008;133(1):236-242.

Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Smith P, Jolin HE, Mckenzie AN. IL-9 deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. *Immunity.* 2000;13:573–583.

Trezena AG, da Silva ZL, Oliveira-Filho RM, Damazo AS, Straus AH, Takahashi HK, Oliani SM, de Lima WT. Differential regulation of the release of tumor necrosis factor- α and of eicosanoids by mast cells in rat airways after antigen challenge. *Mediators Inflamm.* 2003;12(4):237-46.

Tsukue N, Tsubone H, Suzuki AK. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. *Inhal Toxicol.* 2002;14:635-651.

Tulic MK, Hamid Q. New Insights into the Pathophysiology of the Small Airways in Asthma. *Clin Chest Med.* 2006;27:41–52.

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

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

U.S. Environmental Protection Agency. The particle pollution report: Current understanding of air quality and emissions through 2003. U.S. Environmental Protection Agency Office of Air Quality Planning and Standards, Research Triangle Park, NC; 2004b.

Unkeless JC, Scigliano E, Freedman VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol.* 1988;6:251-81. Review.

Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for

oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2008;26(4):339-62.

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

Van Furth R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol.* 1998;149(7-8):719-20. Review.

Van Rijt LS, Jung S, Jan AK, Vos N, Willart M, Duez C, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. In vivo depletion of lung CD11+ dendritic cells during allergen challenge abrogates the characteristic features of asthma. *J Exp Med.* 2005;201(6):981-91

Van Weel C, Bateman ED, Bousquet J, Reid J, Grouse L, Schermer T, Valovirta E, Zhong N. Asthma management pocket reference 2008. *Allergy.* 2008;63(8):997-1004.

Von Garnier C, Nicod LP. Immunology taught by lung dendritic cells. *Swiss Med Wkly.* 2009;1-9.

Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol.* 1991;88(6):935-42.

Wallenborn JG, Schladweiler MC, Nyska A, Johnson JA, Thomas R, Jaskot RH, Richards JH, Ledbetter AD, Kodavanti UP. Cardiopulmonary responses of Wistar Kyoto, spontaneously hypertensive, and stroke-prone spontaneously hypertensive rats to particulate matter (PM) exposure. *J Toxicol Environ Health A.* 2007;70(22):1912-22.

Walter DM, McIntire JJ, Berry G, McKenzie AN, Donaldson DD, Dekruyff RH, Umetsu DT. Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *J Immunol.* 2001;167:4668-4675.

Wang LY, Zhong Y, Wheeler L. Direct and indirect costs of asthma in school-age children. *Prev Chronic Dis.* 2005;2(1):A11.

Warner RL, Lukacs NW, Shapiro SD, Bhagarvathula N, Nerusu KC, Varani J, Johnson KJ. Role of metalloproteinase in a model of allergic lung responses induced by cockroach allergen. *Am J Pathol.* 2004;165:1921-1930.

Wichmann FA, Muller A, Busi LE, Ciann N, Massolo L, Schlink U, Porta A, Sly PD. Increased asthma and respiratory symptoms in children exposed to petrochemical pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2009;123(3):632-8.

Wills-Karp M. Immunological basis of antigen-induced airways hyperresponsiveness. *Annu. Rev Immunol.* 1999;17:255-281.

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

Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:425–456.

Yokota S, Ohara N, Kobayashi T. The effects of organic extract of diesel exhaust particles on ischemia/reperfusion-related arrhythmia and on pulmonary inflammation. *J Toxicol Sci*. 2008;33(1):1-10.

Yokoyama Y, Kitchens WC, Toth B, Schwacha MG, Rue III LW, Bland KI, et al. Role of IL-10 in regulating proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;286:G942–6.

Yu C, Cantor AB, Yang H, Browne C, Wells RA, Fujiwara Y, et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med*. 2002;195:1387–1395.

Zhang Y, Lamm WJ, Albert RK, Chi EY, Henderson WR Jr, Lewis DB. Influence of the route of allergen administration and genetic background on the murine allergic pulmonary response. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;155(2):661-9.

Zhu W, Gilmour MI. Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen.