AILA MIRTES TELES

CONTRIBUIÇÃO FARMACOLÓGICA À GÊNESE DA INFLAMAÇÃO
NEUROGÊNICA EM VIAS AÉREAS DE RATOS FRENTE A DOIS
POLUENTES: PARTÍCULAS ELIMINADAS NA EXAUSTÃO DO DIESEL
(PED) E 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ)

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

São Paulo
2007

AILA MIRTES TELES

CONTRIBUIÇÃO FARMACOLÓGICA À GÊNESE DA INFLAMAÇÃO
NEUROGÊNICA EM VIAS AÉREAS DE RATOS FRENTE A DOIS
POLUENTES: PARTÍCULAS ELIMINADAS NA EXAUSTÃO DO DIESEL
(PED) E 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ)

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

Área de Concentração:
Farmacologia

Orientador (a):
Prof^a. Dr^a. Soraia Kátia Pereira Costa

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Aila Mirtes Teles

TÍTULO DA TESE: Contribuição Farmacológica à Gênese da Inflamação Neurogênica em Vias Aéreas de Ratos Frente a Dois Poluentes: Partículas Eliminadas na Exaustão do Diesel (PED) e 1,2-naftoquinona (1,2-NQ)

Orientador (a): Soraia Kátia Pereira Costa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a..... / /, considerou

() Aprovado (a)

() Reprovado (a)

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador (a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **127** nas fls. **21** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Soraia Kátia P. Costa, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Efeitos e consequências de toxinas animais e substâncias tóxicas ou irritantes sobre as respostas neurovasculares em roedores**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Aila Mirtes Teles, Juliano Fernandes de Oliveira, Lídia Mitiko Yshii, Mônica Magalhães C. Dantas, Livia de Lucca Camargo, Juliana Florenzano e o pesquisador Marcelo N. Muscará**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa)** em **24.10.2005**.

São Paulo, 08 de novembro de 2005.

P/

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEa - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEa

Dedicatória

*Aos meus pais,
pela dedicação incondicional.*

Agradecimentos

- ✓ Prof^a. Dr^a. **Soraia Kátia Pereira Costa**, por ter me recebido para realização do meu doutorado, orientação, serviço e dedicação a minha formação científica.
- ✓ Prof. Dr. **Marcelo Nicolás Muscará**, pela abertura do seu laboratório.
- ✓ Dr^a. **Sandra Sampaio**, pela indispensável ajuda nos experimentos de fagocitose.
- ✓ Dr^a. **Carla Lima**, pela ajuda nas dosagens de citocinas e discussões, e Dr^a. **Mônica Lopes Ferreira**, pela abertura das portas do seu laboratório no Instituto Butantã.
- ✓ Dr^a. **Simone Aparecida Teixeira** e **Ana A. Varriano**, pela indispensável ajuda na realização das técnicas *in vitro*.
- ✓ Dr^a. **Maria Teresa Ribela**, pela marcação da albumina bovina com ¹²⁵I.
- ✓ Prof. Dr. **Humberto Miguel Garay**, pela realização das técnicas de PCR em tempo real.
- ✓ Prof. Dr. **Edson Antunes** (UNICAMP), pelas sugestões e doação de animais.
- ✓ Dr. **Enilton Camargo**, pelo tratamento dos ratos com capsaicina.
- ✓ Prof. Dr. **Wothan Tavares de Lima**, pelas inúmeras discussões.
- ✓ Aos colegas do laboratório, **Juliana Florenzano, Juliano Oliveira, Lídia Yshii, Lígia Val, Livia de Lucca**, pelo apoio ao longo da jornada.
- ✓ Sra. **Maria Alice Barreto**, pelo importante apoio técnico durante este período.
- ✓ Sra. **Selma Rigonati**, secretária de pós-graduação deste Departamento, por seu apoio administrativo.
- ✓ Sras. **Maria José Carvalho** e **Eva Oliveira**, bibliotecárias do Instituto de Ciências Biomédicas, pela revisão bibliográfica.
- ✓ Aos órgãos de fomento FAPESP, CNPq e Capes pelo apoio financeiro.

*Louvai ao SENHOR, porque ele
é bom, porque a sua
benignidade dura para sempre.*
Salmo 107.

RESUMO

Os efeitos irritantes da interação entre o material particulado (MP) liberado da exaustão do diesel (PED) e o composto reativo 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre as vias aéreas não são bem conhecidos. Os objetivos deste estudo foram: 1) efetuar uma análise comparativa dos efeitos produzidos pela administração intratraqueal (i.tr.) das PED, isoladas ou em associação com a 1,2-NQ, sobre as vias aéreas (traquéia, brônquio principal e pulmão) de ratos; 2) avaliar a participação de mecanismos neurogênicos nas respostas evocadas por estes poluentes; 3) investigar o efeito dos poluentes sobre as características funcionais de macrófagos alveolares. Medidas *in vivo* (aumento de permeabilidade vascular e influxo de leucócitos na traquéia, brônquio principal e pulmão) e *in vitro* (quantificação dos níveis de citocinas e genes RNAm para receptores vanilóides (TRPV1), de taquicininas e citocinas, sinalizadores e mediadores inflamatórios) foram realizadas conforme técnicas bioquímicas e moleculares específicas. Aplicando diferentes doses i.tr. das PED (1 e 5 mg/kg) ou 1,2-NQ (35 e 100 nmol/kg) observou-se extravasamento plasmático (edema), de maneira dose-dependente, mas sem aumento da atividade da MPO (influxo de neutrófilos) na traquéia e brônquio principal de ratos. A menor dose das PED não causou edema significativo, mas quando associada a menor dose do composto 1,2-NQ, causou efeito aditivo sobre o edema e aumento de MPO, indicando que o edema e influxo de células frente ao MP do diesel é altamente influenciado pela presença de compostos reativos no ambiente. A fagocitose por macrófagos bem como o aumento na produção de IL-1 β por tais células foi mais evidente nos animais expostos à mistura de poluentes em comparação ao grupo tratado com o veículo. A inflamação induzida pela mistura dos poluentes não envolveu, no período avaliado, a participação do NF- κ B ou de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mas foi modulada pela biossíntese de neuropeptídeos, maior expressão de receptores NK₁, NK₂ e TRPV1 e aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) no brônquio principal. A redução do edema induzido pelos poluentes nas vias aéreas de animais pré-tratados com capsaicina ou com antagonistas de receptores NK₁ e NK₂ sugere que tais poluentes estimularam diretamente as fibras C presentes nas vias aéreas, levando à liberação de taquicininas responsáveis pelo edema. Ao contrário, a fagocitose por macrófagos bem como a atividade da MPO no brônquio frente aos poluentes foi exacerbada em ratos pré-tratados com capsaicina ou antagonistas de receptores de taquicininas. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que na ausência da sinalização aferente taquicininérgica, embora tenha ocorrido redução do edema induzido pela mistura dos poluentes nas vias aéreas de ratos, houve uma piora do quadro inflamatório caracterizado pelo maior aumento da atividade da MPO nas vias aéreas e fagocitose por macrófagos alveolares. Tais efeitos podem ser atribuídos à regulação aumentada da gênese de citocinas pró-inflamatórias nesses animais, favorecendo maior influxo de neutrófilos nas vias aéreas bem como exacerbação da atividade funcional dos macrófagos alveolares.

Palavras-chave: inflamação neurogênica, 1,2-naftoquinona, partículas de exaustão do diesel, receptor TRPV1, vias aéreas de rato, capsaicina.

ABSTRACT

Teles AM. Pharmacological contribution to the genese of neurogenic inflammation in the rat airways evoked by two ambient pollutants: diesel exhaust particles and 1,2-naphthoquinone.

Pharmacological approaches on the healthy side effects evoked by the interaction between environmental pollutants are poorly studied. We tested the hypothesis that the environmental chemical 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) is implicated in the exacerbation of airways diseases induced by exposure to particulate matter (PM) released by diesel (DEP), and that involves a neurogenic-mediated mechanism. Plasma extravasation in trachea, main bronchus and lung was measured as the local ¹²⁵I-bovine serum albumin accumulation. The concentration of pro-inflammatory cytokines via Elisa, RT-PCR quantification of TNF- α (and its receptors), transcription factor NF- κ B, iNOS and both TRPV1 and tachykinin receptors gene expression, and Western blot for 3-nitrotyrosine (3-NT)-containing proteins have also been carried out in the rat bronchi. Intra-tracheal (i.tr.) injection of DEP (1 and 5 mg/kg) or 1,2-NQ (35 and 100 nmol/kg) caused oedema in trachea and bronchus. DEP (at a dose unable to produce significant oedema) markedly increased the 1,2-NQ-induced responses in the rat airways in an additive rather than synergistic manner. Likewise, the mixture of pollutants accounted to evoke a marked increase in the activity of myeloperoxidase (MPO), an effect exacerbated in rats treated with capsaicin as neonates. The oedema, but not the MPO activity, was significantly reduced by the NK₁ receptor antagonist (L-732,138) and in a lesser extent by the NK₂ antagonist SR48968. Capsaicin treatment also markedly reduced DEP and 1,2-NQ-induced oedema but accounted to increase the MPO activity. By RT-PCR analysis we demonstrate that authentic increase of TRPV1, NK₁ and NK₂ receptors are present in bronchus of rats exposed to PED and 1,2-NQ, since the capsaicin treatment reduced these receptors expression and markedly changed the pollutants-induced airways inflammation. No evidence of 3-NT, NF- κ B and iNOS in main bronchus of rats exposed to PED e 1,2-NQ was found. The alveolar macrophages from rats exposed to PED and 1,2-NQ exhibited an increased phagocytic activity of zymosan particles, an effect significantly increased in macrophages from capsaicin pretreated rats. The pollutants also induced a marked increase in the production of pro-inflammatory cytokines in the main bronchi and macrophage suspension. Opposite to healthy rats, the cytokines production in response to pollutants in rats deprived of neuropeptides was higher. Our data are consistent with the hypothesis that DEP-induced airways oedema is highly influenced by increased ambient levels of 1,2-NQ, and takes place by neurogenic-mediated mechanisms involving up-regulation of cytokines and TRPV1 and tachykinin receptors.

Key words: neurogenic inflammation; 1,2-naphthoquinone; diesel exhaust particles; TRPV1 receptor; rat airways; capsaicin

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Nome
¹²⁵ I	¹²⁵ Iodo
1,2-NQ	1,2-Naftoquinona
5-HT	5-Hidroxitriptamina
aC	Antes De Cristo
ANOVA	Análise De Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
BCG	Bacilo De Calmette-Guérin
BSA	Albumina Bovina
C5a	5° Fator Do Sistema Complemento
CGRP	Peptídeo Relacionado Ao Gene Da Calcitonina
CINC	Proteína Quimiotática De Neutrófilos Induzida Por Citocinas
Ct	Cycle Threshold (Limiar De Rotação)
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiltreitol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão Da Média
ERNs	Espécies Reativas Do Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas Do Oxigênio
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GM-CSF	Fator Estimulante De Colônia De Macrófago/Granulócito
H ₂ O ₂	Peróxido De Hidrogênio
HTAB	Hexadtrimetil Amônio Bromida
i.p.	Intraperitoneal
IPEN	Instituto De Pesquisas Energéticas E Nucleares
i.tr.	Intratraqueal
i.v.	Intravenosa
IFN- γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
KDa	Kilodalton
LBA	Lavado Broncoalveolar
MBq	Megabequerel
MCP-1	Proteína Quimioatrante De Monócito-1
M-CSF	Fator Estimulante De Colônia De Macrófago
MN	Mononuclear
MIP-1 α	Proteína Inflamatória Do Macrófago-1 α
MP	Material Particulado
MPO	Mieloperoxidase
NANC	Fibras Não-Adrenérgica Não-Colinérgica
NaNO ₂	Nitrito De Sódio
NK ₁	Receptor De Neurocinina Tipo 1
NK ₂	Receptor De Neurocinina Tipo 2
NK ₃	Receptor De Neurocinina Tipo 3
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NO	Óxido Nítrico
Nox	Óxido De Nitrogênio
PAF	fator ativador de plaquetas

PBS	Tampão fosfato salina
PBST	Tampão fosfato salina com tween
PED	Partícula de exaustão do diesel
PMN	Polimorfonuclear
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonila
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase-transcrição reversa
s.c.	Via subcutânea
SP	Substância P
SDS	Sulfapoliacrilamida de sódio
TAE	Tris dioxinucleosídio trifosfato
Tag	DNA polimerase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TNFR-I	Receptor tipo 1 do fator de necrose tumoral
TNFR-II	Receptor tipo 2 do fator de necrose tumoral
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1
UFC-GM	Célula precursora para granulócito e macrófago
U.I	Unidade internacional
UV	Ultra violeta
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo

Lista de Reagentes

Nome	Procedência
Ácido acético glacial	Mallinckrodt Baker, México D.F., México
Ácido acético glacial	Nova Analítica, São Paulo, Brasil
Acrilamida PAGE	Pharmacia Biotech., Uppsala, Suíça
Albumina bovina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Albumina bovina marcada com I ¹²⁵	IPEN, São Paulo, Brasil
Álcool isopropílico	Synth (São Paulo, Brasil)
Anticorpo anti-IgG de camundongo	Bio-Rad, California, EUA
Anticorpo anti-nitrotirosina monoclonal	Upstate Lab. (Nova York, EUA)
Azul de bromofenol	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Azul de metileno (1%)	Merck, Darmstadt, Germany
Beta-mercapto etanol	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Bisacrilamida	Pharmacia Biotech., Uppsala, Suíça
Brazol	LGC Biotec., São Paulo, Brasil
Brometo de etídio	Gibco BRL, Califórnia, EUA
C ₆ H ₁₂ O ₆	Labsynth, São Paulo, Brasil
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Labsynth, São Paulo, Brasil
Capsaicina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Caseína	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Cloridrato de lidocaína 2%	Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil
Ditiotreitol	Sigma, St. Louis, MO, EUA
DMSO	Labsynth, São Paulo, Brasil
Dodecil sulfato de sódio	USB, Ohio, EUA
Fluoreto de fenil metil sulfonila	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Giemsa em pó	Merck, Darmstadt, Germany
Glicerol 87% w/w	Pharmacia Biotech., Uppsala, Suíça
Glicina	Pharmacia Biotech., Uppsala, Suíça
Heparina	Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil
KCl	Labsynth, São Paulo, Brasil
KH ₂ PO ₄	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Kit de Quimioluminescência	Bio-Rad, California, EUA
Kit para dosagem da TNF- α	BD Biosciences, Califórnia, EUA
Kits ELISA para dosagem de citocinas	R&D systems, Minneapolis, EUA
L-732,138	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Marcadores protéicos (Standard)	Invitrogen, Califórnia, EUA
Reagentes utilizados na técnica de RT-PCR: DEPC, TAE, DTT, dNTP, M-MLV, Taq DNA polimerase	Invitrogen, Califórnia, EUA
May-Grünwald	Merck, Darmstadt, Germany
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Labsynth, São Paulo, Brasil

N-(1-Naphthyl) ethylenediamine	Sigma, St. Louis, MO, EUA
NaCl	Labsynth, São Paulo, Brasil
Naftoquinona (1,2 NQ)	Universidade de Tsukuba (Japão)
NaHCO ₃	Labsynth, São Paulo, Brasil
o-dianisidina	Sigma, St. Louis, MO, EUA
PED	Universidade de Tsukuba (Japão)
Persulfato de sódio	Life Technologies, Califórnia, EUA
Primers	Invitrogen Brasil, São Paulo, Brasil
Quetamina	König S.A., Avellaneda, Argentina
Reagente Comassie Brilliant Blue	Bio-Rad, California, EUA
RPMI-1640	Gibcol BRL, Califórnia, EUA
SR48968	Sanofi-synthelabo, Paris, França
Sulfanilamida	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Temed	Pharmacia Biotech., Uppsala, Suíça
Tris Base	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Tween 20	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Tween 80	Labsynth (São Paulo-Brasil)
Vermelho de Ponceau	Sigma, St. Louis, MO, EUA
Xilazina	König S.A. (Avellaneda-Argentina)
Zimosan A	Sigma, St. Louis, MO, EUA

Lista de Figuras

Fig.	Página	Título
1	38	Aparelho respiratório. Fonte Http://www.corpohumano
2	40	Representação esquemática da inervação sensorial das vias aéreas pelas taquicininas
3	43	Estrutura química do composto químico orgânico 1,2-naftoquinona
4	68	Extravasamento plasmático evocado pela administração i.tr. de doses crescentes de PED ou 1,2-NQ
5	70	Efeito aditivo da injeção i.tr. da mistura de PED + 1,2-NQ na traquéia (Painel A) e brônquio principal (Painel B) de ratos
6	71	Efeito da injeção i.tr. de capsaicina nas vias aéreas de ratos tratados ou não com capsaicina, quando neonatos
7	72	Avaliação do tratamento neonatal com capsaicina sobre o extravasamento plasmático induzido pela mistura de poluentes nas vias aéreas de ratos
8	73	Efeito dos antagonistas de receptores de taquicininas sobre o extravasamento plasmático evocado pela mistura de poluentes nas vias aéreas de rato
9	76	Atividade da MPO frente aos poluentes na traquéia e brônquio principal de ratos tratados ou não com capsaicina
10	77	Efeito dos antagonistas NK ₁ (L-732,138) e NK ₂ (SR48968) na atividade da MPO em vias aéreas de ratos
11	79	Efeito do tratamento i.tr. com os poluentes (após 3 h) sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores TRPV1
12	80	Efeito do tratamento i.tr. dos poluentes sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores de taquicininas NK ₁ (painel 12A) e NK ₂ (painel 12B) em brônquio principal de ratos
13	82	Análise da expressão do gene da citocina TNF- α e seus receptores

14	83	Análise da expressão do gene do fator de transcrição NF- κ B em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com poluentes e seus veículos
15	84	Análise da expressão do gene da NOSi em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com os poluentes e seus veículos
16	87	Concentração das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e MCP-1 em homogenatos de brônquio principal de ratos tratados com poluentes (PED + 1,2-NQ), que receberam capsaicina ou não, quando neonatos
17	89	Efeito da mistura dos poluentes em animais tratados ou não com capsaicina sobre a taxa de fagocitose por macrófagos broncoalveolares: ensaio in vivo
18	90	Macrófagos obtidos do LBA de ratos, tratados com o veículo ou com poluentes, de animais submetidos ao tratamento com capsaicina
19	93	Concentração das citocinas na ausência e presença de zimosan na suspensão de macrófagos de ratos (controle ou capsaicina) tratados com os poluentes (PED + 1,2-NQ)
20	94	Western blot representativo da expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) em brônquio principal de ratos (controle ou tratados com capsaicina) que receberam injeção i.tr. da mistura de poluentes ou respectivos veículos
21	96	Concentração de nitrito (NO $_2^-$) em suspensão de macrófagos broncoalveolares de animais que receberam a mistura dos poluentes, tratados ou não com capsaicina, quando neonatos.

Lista de Tabelas

Tabela	Página	Título
1	32	Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio relevantes para a inflamação.
2	51	Exposição dos animais aos agentes testes.
3	55	Sequências dos primers utilizados e respectivos pares de bases no ensaio de RT-PCR.
4	58	Sequências dos primers utilizados e respectivos pares de base no ensaio de PCR em tempo real.
5	74	Efeito da administração i.tr. dos poluentes (após 3 h) sobre a atividade da MPO no trato respiratório de ratos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
Lista de Abreviaturas	10
Lista de Reagentes.....	12
Lista de Figuras.....	14
Lista de Tabelas.....	16
1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Considerações gerais: Inflamação	19
1.2 Componentes da resposta inflamatória e mediadores químicos	21
Sistema imunológico	21
Fagócitos	22
Citocinas e quimiocinas.....	26
Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na inflamação.....	30
Fator nuclear κ B (NF- κ B).....	32
Fibras Sensoriais e Neuropeptídeos.....	34
1.3 Anátomofisiologia das vias aéreas e processo inflamatório local	37
1.4 Características dos poluentes atmosféricos e o impacto sobre a saúde e economia.....	39
1.5 Objetivos e hipótese inicial.....	48
2 MATERIAL E MÉTODOS	49
2.1 Animais	49
2.2 Exposição dos animais aos poluentes e grupos experimentais	49
2.3 Avaliação da permeabilidade vascular nas vias aéreas.....	50
2.4 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)	51
2.5 Análise de expressão gênica pela reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR)	52
2.6 Quantificação da expressão gênica (TNF- α , TNFR1, TNFR2, NF- κ B, NOSi) por PCR em tempo real (real-time RT-PCR).....	55
2.7 Determinação da capacidade de espraçamento e fagocitose dos macrófagos	58
2.8 Determinação da concentração de citocinas e quimiocina por enzima-imunoensaio (ELISA)	59
2.9 Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (3-NT) via Western blot em homogenatos de brônquio principal de ratos.....	61
2.10 Quantificação da concentração de nitrito (NO_2^-) em suspensão de macrófagos broncoalveolares	63
2.11 Tratamentos farmacológicos	63
2.12 Obtenção e preparação dos poluentes	64
2.13 Análise estatística	65
3 RESULTADOS.....	66
3.1 Avaliação da permeabilidade vascular nas vias aéreas de ratos após administração dos poluentes.....	66
3.2 Efeito da injeção simultânea dos poluentes na permeabilidade vascular nas vias aéreas de ratos.	68
3.3 Determinação da eficácia do tratamento com capsaicina em ratos neonatos	68
3.4 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre o extravasamento plasmático induzido pelos poluentes em vias aéreas de rato	71
3.5 Papel dos antagonistas de receptores NK_1 e NK_2 na permeabilidade vascular induzida pelos poluentes em vias aéreas de rato	72

3.6	<i>Avaliação da atividade da enzima MPO nas vias aéreas de animais tratados com os poluentes</i>	73
3.7	<i>Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a atividade da MPO em vias aéreas de ratos após exposição aos poluentes</i>	74
3.8	<i>Envolvimento dos receptores de taquicinas na atividade da MPO induzida pelos poluentes em vias aéreas de rato</i>	76
3.9	<i>Efeito dos poluentes sobre a expressão gênica dos receptores TRPV1 e de taquicinas NK₁ e NK₂ em brônquio principal de rato</i>	77
3.10	<i>Quantificação da expressão gênica do TNF-α, TNFR1, TNFR2, NF-κB e NOSi por real-time RT-PCR em brônquio principal de rato exposto aos poluentes</i>	80
3.11	<i>Determinação das concentrações de citocinas e quimiocina em brônquio principal de ratos expostos aos poluentes.</i>	84
3.12	<i>Efeito da mistura dos poluentes sobre a fagocitose mediada pelo receptor C3b do complemento em animais tratados com capsaicina ou veículo</i>	86
3.13	<i>Efeito dos poluentes sobre a produção de citocinas e quimiocina na suspensão de macrófagos do LBA</i>	89
3.14	<i>Análise da expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) por Western blot em brônquio principal de ratos após exposição aos poluentes</i>	92
3.15	<i>Concentração de nitrito (NO₂⁻) em suspensão de macrófagos de ratos expostos aos poluentes, antes e após o desafio com zimosan (in vitro)</i>	93
4	DISCUSSÃO	95
5	CONCLUSÕES	112
6	REFERÊNCIAS	113
7	ANEXOS	146

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais: Inflamação

A inflamação pode ser definida como a resposta do tecido conjuntivo vascularizado a uma agressão, seja ela química, física ou biológica que, apesar da complexidade dos processos que a desencadeiam, se manifesta de maneira estereotipada. Essa tem como objetivo principal remover o agente etiológico/lesivo e reparar o tecido lesado (COTRAN *et al.*, 1999). Caracteriza-se pela resposta imediata (aguda) e generalizada (inata), a qual frequentemente segue um padrão de resposta mais específica (adaptativa).

A resposta inata compreende a estimulação de células residentes tais como as células vasculares (células do músculo liso e endotélio), mastócitos e macrófagos, levando à geração e/ou liberação subsequente de mediadores inflamatórios (ex.: aminas como a histamina, eicosanóides como a prostaglandina E_2 [PGE_2] ou leucotrienos [LTB_4], citocinas, quimiocinas e óxido nítrico [NO]). Ainda inclui a estimulação de proteínas plasmáticas, culminando na formação de mediadores inflamatórios solúveis tais como a bradicinina e fatores do sistema complemento.

Independentemente da natureza do estímulo lesivo, esses eventos celulares e plasmáticos iniciais causam fenômenos vasculares característicos: breve vasoconstrição arteriolar seguida de vasodilatação arteriolar e venular, abertura da rede capilar e aumento do fluxo sanguíneo local acompanhado de aumento da permeabilidade vascular em vênulas pós-capilares e conseqüente extravasamento do fluido e material protéico do plasma para o interstício (GARCIA-LEME *et al.*, 1973; GALLIN *et al.*, 1992) bem como a quimiotaxia de

células fagocíticas (neutrófilos e monócitos) dos vasos sangüíneos para o local da lesão (GARCIA-LEME, 1989). O componente celular da reação inflamatória aguda é representado, primordialmente, pelo influxo inicial de leucócitos polimorfonucleares (PMN): neutrófilos, eosinófilos e basófilos e, posteriormente, das células mononucleares (MN): monócitos e linfócitos em direção ao foco da lesão (tecido adjacente).

A mobilização dos leucócitos da corrente sangüínea para a área que circunda a lesão obedece a um padrão específico que compreende: marginação para superfície dos vasos, rolamento (deslizam sobre o endotélio), adesão forte à parede do vaso, e transmigração (diapedese) desses para o meio extravascular, através de junções interendoteliais. Este fenômeno ocorre de modo orientado para o tecido extravascular frente a um estímulo quimiotático (gradiente de concentração de mediadores inflamatórios) e, finalmente, observa-se o acúmulo dos neutrófilos no foco da lesão (GARCIA-LEME, 1989). Contudo, evidências recentes sugerem que em determinadas condições inflamatórias, as células MN chegam juntamente com os PMN no local da lesão (HENDERSON *et al.*, 2003).

A ocorrência de fenômenos estruturais e funcionais na microcirculação e no tecido intersticial adjacente à lesão compreende, em vários casos, a participação da inervação sensitiva local e de seus respectivos neuropeptídeos, incluindo a substância P (SP), a neurocinina A (NKA) e o peptídeo vasodilatador CGRP (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina), resultando no fenômeno conhecido como inflamação neurogênica (COTRAN *et al.*, 1999; veja revisão: BRAIN, 1997; RAWLINGSON *et al.*, 2005). A natureza sensivelmente padronizada dessas reações culmina na geração dos sinais e sintomas clássicos

da inflamação (rubor, edema, calor e dor) descritos por Cornelius Celsus na Antiga Roma (30 aC).

Por outro lado, a resposta adaptativa (imune) fornece um padrão de resposta mais eficiente e específica ao agente infeccioso (antígeno), onde a participação de linfócitos B, que produzem anticorpos ou linfócitos T, que regulam a resposta imune específica, é primordial. Os linfócitos T - auxiliares, mediante o contato com um antígeno previamente fagocitado pelas células da resposta imune inata (monócitos e macrófagos), induzem a produção de citocinas por vários tipos celulares. As citocinas, por sua vez, estimulam os linfócitos B. Subsequentemente, estes se encarregam de produzir anticorpos específicos para tal antígeno e, ao longo do processo, formam-se as células de memória, que irão responder de forma mais rápida e eficiente a um novo contato com o antígeno ou processo infeccioso (SAGARA *et al.*, 1993; veja revisão, ABBAS *et al.*, 2000; ROMAGNANI, 2004; AKDIS *et al.*, 2005).

1.2 Componentes da resposta inflamatória e mediadores químicos

Sistema imunológico

O sistema imunológico engloba processos complexos de interações célula-célula e célula-mediadora, que envolve mecanismos diferenciados que resultam na eliminação dos agentes invasores: imunidade inata ou adaptativa. Os principais componentes da imunidade inata são: 1) barreiras físicas e químicas, como o epitélio e substâncias antimicrobianas produzidas em superfícies epiteliais; 2) células fagocíticas (mononucleares: macrófagos, monócitos e polimorfonucleares: neutrófilos, basófilos, eosinófilos) e células “natural killer” (NK); 3) proteínas sangüíneas, incluindo membros do sistema do complemento e

outros mediadores inflamatórios (ex.: citocinas) (veja revisão, ABBAS *et al.*, 2000). Na imunidade adaptativa, ocorre a identificação de patógenos (ou substâncias estranhas) como substâncias não-comuns ao organismo. Essa resposta pode ser ainda dividida em dois tipos: adaptativa celular e humoral. Essas são reguladas por diferentes componentes e funções do sistema imune para eliminação de patógenos. A imunidade celular é mediada por células chamadas linfócitos T, essas têm a capacidade para conhecer antígenos que se ligam a marcadores da superfície de células imunitárias, como os macrófagos. A imunidade humoral é mediada por anticorpos, produzidas por linfócitos B, que depois se diferenciam em plasmócitos ou em células de memória (responderão mais rapidamente a um próximo contato com o antígeno). Os anticorpos secretados são específicos para cada antígeno e diferentes tipos de anticorpos ativam mecanismos efetores distintos. Suas funções são: reconhecimento de antígenos de patógenos, neutralização e marcação dos antígenos para eliminação por mecanismos efetores como a opsonização. A imunidade humoral é o principal mecanismo de defesa contra microorganismos extracelulares e suas toxinas (veja revisão, ABBAS *et al.*, 2000).

Fagócitos

Todas as células do sistema imunológico originam-se na medula óssea a partir de uma célula primordial com capacidade de auto-renovação. Nesse ambiente, essa célula se diferencia subsequentemente em precursores para as diferentes linhagens. Assim, por exemplo, pela diferenciação da célula precursora para granulócito e macrófago (UFC-GM) tem-se a primeira célula da linhagem macrofágica: o monoblasto. Esse dá origem ao pró-monócito que, por sua vez, se

diferencia em monócito, o qual segue da medula óssea para a circulação sangüínea, onde permanece por um período compreendido entre um a três dias. Através de 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). Essas células caracterizam-se pelo seu tamanho relativamente grande (25-50 μm de diâmetro) com um núcleo irregular e cromatina frouxa. Apresentam um grande número de mitocôndrias, complexo de Golgi bem desenvolvido e um número variável de vesículas endocíticas. A superfície da membrana do macrófago apresenta-se irregular com microvilos e citoesqueleto bem desenvolvido (ZHANG *et al.*, 1989).

Várias células são capazes de fagocitar nos mamíferos, embora com eficiência variável. “Por isto, criou-se a terminologia para fagócitos ‘não-profissionais’ e ‘profissionais’, os quais caracterizam as células com baixa e alta competência fagocítica, respectivamente (RABINOVITH, 1995). Os fagócitos profissionais abrangem principalmente os neutrófilos e macrófagos, que irão atuar como sentinelas do sistema imune na captura e destruição de células senescentes, apoptóticas, defeituosas, partículas poluentes e, principalmente, sobre os organismos potencialmente patogênicos e inflamatórios (GORDON, 1998). Mediante um estímulo adequado, essas células, que podem se encontrar em diferentes estados, desencadeiam alterações morfológicas, metabólicas e funcionais (COSTA ROSA *et al.*, 1994). Segundo a literatura, existem três tipos de macrófagos: 1) *macrófagos residentes* (células teciduais que apresentam baixa atividade metabólica, ou seja, secretam baixos conteúdos de hidrolases neutras

ou de espécies reativas do oxigênio (EROs) e/ou do nitrogênio (ERNs); 2) *macrófagos estimulados* ou inflamatórios (alta capacidade secretora de proteases neutras, muito embora apresentem baixa atividade citotóxica e microbicida); 3) *macrófago ativados* (apresentam, em geral, baixa capacidade secretória e alta produção de EROs e/ou ERNs; portanto, atividade microbicida e tumoricida).

As principais funções dos macrófagos ativados no foco inflamatório incluem a fagocitose e destruição de restos celulares de eventuais parasitas presentes na lesão, liberação de mediadores que agem sobre o próprio macrófago ou outras células proporcionando ativação dessas e, servindo como célula apresentadora de antígeno para linfócitos T, dando início à resposta específica do processo inflamatório (RAPPOLEE & WERB, 1989). Nos macrófagos existem receptores de membrana para a porção Fc dos anticorpos da classe IgG (UNKELESS *et al.*, 1988) e para o componente C3 do sistema complemento. Ainda, 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. Faz-se necessário à ocorrência de um segundo sinal que é fornecido pela ativação do receptor para Fc de IgG ligado ao antígeno, que induz 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 de Fc de IgG, o receptor para C3b pode ativar a fagocitose com a ajuda de linfocinas que agem sobre o macrófago (veja revisão GRINFFIN, 1984).

A fagocitose mediada via receptores para C3b, a qual regula a fagocitose de partículas de membrana de *Saccharomyces* (Zimosan - substância bastante

utilizada como ferramenta científica para investigar a ação de um determinado agente sobre a atividade fagocítica), não depende da enzima tirosina quinase, mas sim de microtúbulos intactos (ALLEN & ADEREM, 1996). Tais características distinguem este mecanismo de fagocitose daquele mediado pelos receptores para Fc, comumente bloqueado por inibidores da proteína tirosina quinase, e não afetado por agentes desestabilizadores de microtúbulos (GREENBERG *et al.*, 1993; ALLEN & ADEREM, 1996).

Mediante o contato com vidro ou substrato plástico, os macrófagos ativados podem emitir rapidamente prolongamentos citoplasmáticos, que chegam a abranger uma área de até 8 vezes seu tamanho original. A esse fenômeno deu-se o nome de espraiamento (aumento do corpo celular para facilitar a fagocitose). Nesse processo é possível detectar a geração de fatores do sistema complemento e coagulação por essas células (veja revisão COHN, 1978). Durante o processo de fagocitose, os macrófagos movimentam-se em direção ao gradiente de concentração de moléculas quimiotáticas, ou seja, na direção da própria partícula ou de sistemas bioquímicos ativados localmente. O engolfamento das partículas ocorre devido à emissão de prolongamentos citoplasmáticos do macrófago, denominados pseudópodos, que se estendem ao longo das partículas, formando os fagossomos (GREENBERG, 1995). Ao mesmo tempo, os macrófagos, quando estimulados, liberam no foco da lesão substâncias como eicosanóides, citocinas, NO, EROs, bem como o fator estimulante de colônia de macrófago/granulócito (GM-CSF) e o fator de ativação plaquetária (PAF) (ADAMS, 1989; KOBAYASHI *et al.*, 2006). Em vista da ampla atividade secretora dos macrófagos, outras substâncias biologicamente ativas podem ser liberadas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que

regulam a função e crescimento de outras células como: collagenases, ativador do plasminogênio, PGE_1 e PGE_2 , fibronectina, componentes do sistema complemento, eritropoetina, interferons, entre outras (veja revisão, RAPPOLEE & WERB, 1988). A secreção destas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e sua participação em processos fisiológicos e fisiopatológicos, como a inflamação (TAPPER, 1996).

No pulmão, os macrófagos alveolares ativados liberam grande quantidade de citocina IL-8 e a proteína inflamatória do macrófago-1 α (MIP-1 α), envolvidas no recrutamento de neutrófilos e eosinófilos nas vias aéreas (veja revisão KELLY, 1990). No lavado broncoalveolar de indivíduos normais, os macrófagos representam a maioria das células recuperadas. Evidências mostram que os macrófagos de pacientes alérgicos respondem rapidamente aos estímulos modulados por IgE, levando à liberação de radicais oxidantes livres (ânion superóxido - O_2^-), enzimas lisossomais e vários mediadores inflamatórios, que conjuntamente ativam endotélio e promovem o recrutamento de células inflamatórias (veja revisão, HAMID *et al.*, 2003).

Citocinas e quimiocinas

Todas as etapas envolvidas na resposta de fase aguda e resposta imune inespecífica são resultados de um complexo processo envolvendo vários mediadores químicos, dentre eles as citocinas. A maioria das citocinas é composta por polipeptídeos simples ou glicoproteínas com peso molecular (PM) igual ou inferior a 30 kDa. A produção constitutiva das citocinas é normalmente baixa ou ausente. Assim, a produção dessas é regulada por vários estímulos indutores em nível de transcrição ou tradução. As ações reguladas pelas citocinas

são de curta duração via receptores específicos localizados na superfície celular. Em geral, estas ações levam ao aumento (ou redução) na taxa da proliferação celular ou mudança no estado de diferenciação celular.

As citocinas e quimiocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-11, GM-CSF e o fator estimulante de colônia de granulócito (G-CSF) desempenham um papel importante na inflamação aguda.

As principais fontes celulares da IL-1 (α ou β) são as células mononucleares, fibroblastos, queratinócitos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos T (ambos Th₁ e Th₂) e B (FEGHALI & WRIGHT, 1997). A IL-1 β aumenta a expressão de moléculas de adesão e também pode aumentar a afinidade dessas moléculas com eosinófilos e células endoteliais (LAMPINEM *et al.*, 2004). Tanto a IL-1 α quanto a IL-1 β podem causar febre em decorrência do aumento na síntese da PGE₂ no hipotálamo (WARREN, 1990).

O TNF- α (PM 17 kDa), primeiramente caracterizado no plasma de camundongos pela sua capacidade de induzir necrose celular, daí o nome: tumor necrosis factor (CARSWELL *et al.*, 1975), é uma citocina produzida por mastócitos, neutrófilos, monócitos e células epiteliais em resposta a uma grande variedade de estímulos imunológicos e fisiológicos (FIERS, 1991). Contudo, macrófagos é sua principal fonte e também seu principal alvo (veja revisão, RUSSO & POLOSA, 2005). Considerada uma citocina pró-inflamatória, o TNF- α está associado a uma variedade de sinais e sintomas observados em condições patológicas, como a febre e a dor (FIERS, 1991). Os efeitos biológicos do TNF são mediados pela interação com seus receptores de superfície celular TNFR-I (PM 55 kDa) e TNFR-II (PM 75 kDa), os quais estão amplamente distribuídos em várias células do corpo (WALLACH *et al.*, 1999). O TNFR-I é responsável

principalmente pela sinalização de morte celular, enquanto o TNFR-II pelos efeitos pró-inflamatórios do TNF.

A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular variando entre 21 a 28 kDa (veja revisão VAN SNICK, 1990), produzida por uma variedade de células, incluindo as MN, células T e fibroblastos. Como as demais citocinas citadas anteriormente, a IL-6 induz a produção de proteínas da fase aguda no fígado, as quais são responsáveis pelo aumento na proteção contra microorganismos, além de modificarem a resposta inflamatória, pois interferem no tráfego celular e na liberação de mediadores inflamatórios (GADIENT & PATTERSON, 1999).

Interferons, divididos em tipos I e II, são citocinas que apresentam papel central na defesa do organismo contra patógenos. O interferon do tipo I (INF- α e INF- β) é secretado por células infectadas por vírus, enquanto o tipo II ou interferon- γ (INF- γ) é produzido por linfócitos T e células NK. Embora o INF- γ tenha sido originalmente definido como um agente com atividade direta sobre vírus, sabe-se atualmente que suas propriedades biológicas incluem a regulação de vários aspectos da resposta imune, estimulação das atividades de fagócitos, participação na proliferação e apoptose celular, bem como regulação da expressão da NO sintase (BOEHM *et al.*, 1997). O INF- γ age de modo sinérgico com as citocinas TNF- α e/ou IL-1, promovendo a formação local de exsudato inflamatório (ISSEKUTZ & ISSEKUTZ, 1993).

As citocinas antiinflamatórias são moléculas imunoreguladoras que controlam as respostas das citocinas inflamatórias. A IL-10 é a mais importante citocina antiinflamatória na resposta imune. Essa citocina inibe a produção do TNF- α , IL-1, IL-6 por monócitos e macrófagos (CLARKE *et al.*, 1998). Estudos têm mostrado que a função da IL-10 *in vivo* é a de regular a resposta inflamatória

pulmonar (GUDMUNDSSON *et al.*, 1998; SHANLEY *et al.*, 2000). Tais estudos mostraram que esta citocina está aumentada durante a inflamação e que o bloqueio da mesma, aumenta a produção de TNF- α e recrutamento de neutrófilos, exacerbando os danos pulmonares (SHANLEY *et al.*, 1996).

As quimiocinas, citocinas com baixo peso molecular, compreendem uma família de citocinas com propriedades quimiotáticas, que coordenam e regulam a infiltração de células para locais específicos. Em especial, destaca-se a subfamília das quimiocinas que incluem as RANTES (*regulated on activation, normal T-expressed and secreted*): proteína inflamatória de macrófago 1 α (MIP-1 α), proteínas quimioatraentes de monócitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4) e eotaxina (GALE & MCCOLL, 1999). São produzidas transitoriamente em sítios inflamados (RANDOLPH & FURIE, 1995; ROTH *et al.*, 1995; TESSIER *et al.*, 1997) e, além de promoverem a migração celular, as quimiocinas também funcionam como potentes ativadores celulares, podendo induzir desgranulação de neutrófilos, eosinófilos e basófilos, liberação de O₂⁻, NO e outros (veja revisão, OLIVEIRA *et al.*, 2003). Em particular, a MCP-1 está envolvida no início de processos inflamatórios no pulmão (CHENSUE *et al.*, 1996). Esta quimiocina está envolvida em infecções pulmonares, doenças fibróticas, doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC), inflamações alérgicas pulmonares, infiltração leucocitária, hiperreatividade brônquica e inflamação por LPS (KUNKEL *et al.*, 1991; CAR *et al.*, 1994; FREVERT *et al.*, 1995; KOPYDLOWSKI *et al.*, 1999; CONTI & DIGIOACCHINO, 2001; BARNES *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004). Nas vias aéreas, as maiores fontes de MCP-1 são os macrófagos e células tipo II (KUNKEL *et al.*, 1995).

Radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na inflamação

Espécies reativas são terminologias usadas para designar moléculas que geralmente contêm de um a quatro átomos juntamente com uma molécula de oxigênio ou nitrogênio em sua estrutura. Algumas são (ou formam) radicais livres, átomos individuais ou grupos de átomos com um ou mais pares de elétrons não pareados. Esses radicais possuem cargas (negativa ou positiva), embora alguns sejam isentos de cargas e apresentam reatividade variada. Por exemplo, o óxido nítrico (NO^*) é bem menos reativo do que o radical hidroxila (OH^* ; veja revisão, GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000).

O envolvimento dessas espécies na resposta inflamatória tem sido amplamente demonstrado na literatura. Tanto as espécies reativas quanto os radicais livres são gerados continuamente no organismo vivo. Algumas espécies possuem um papel fisiológico importante, enquanto outras são geradas por células ou produtos de metabolismo e estão mais envolvidas em processos patológicos (veja revisão, GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). Além da importância dessas substâncias no mecanismo de defesa do organismo e lesão tissular durante o processo inflamatório, evidências mais recentes sugerem que as espécies reativas podem estar também envolvidas em eventos mais refinados no início da resposta inflamatória, incluindo a regulação da resposta vascular (ex.: vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular) e influxo de leucócitos (veja revisão, RAMIREZ-PRIETO *et al.*, 2006).

É interessante ressaltar que além da fonte enzimática que origina o NO^* , esse produto é também encontrado na poluição atmosférica (RIPPERTON *et al.*, 1970) e na fumaça do cigarro (BORLAND & HIGENBOTTAM, 1987). Assim, essa espécie pode apresentar um impacto considerável, em particular, sobre a

fisiologia cardiopulmonar. Dentre o EROs e ERNs relevantes na inflamação, a tabela 1 abaixo demonstra alguns exemplos de como essas espécies podem ser sintetizadas e quais as principais enzimas envolvidas.

Dentre as mais estudadas, destaca-se o NO^* , o qual é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina, convertido em L-citrulina, pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual existe em três isoformas: NOS endotelial (NOSe), NOS neuronal (NOSn) e NOS induzível (NOSi) (veja revisão MONCADA, 1992). As isoformas NOSe e NOSn são importantes fisiologicamente por manterem a resposta homeostática, enquanto a NOSi é inativa, mas pode ser induzível frente à geração de citocinas durante uma patologia (WOOD *et al.*, 1993).

Por se tratar de um gás, o NO^* se difunde rapidamente através de membranas celulares (IGNARRO *et al.*, 1987), onde pode exercer vários papéis fisiológicos, incluindo a manutenção do tônus muscular, seqüestro de radicais superóxidos (O_2^- , RUBANY & VANHOUTTE, 1986), inibição da aderência e agregação plaquetária (RADOMSKI *et al.*, 1990), citoproteção e outras funções. Por outro lado, em concentrações elevadas, o NO^* é citotóxico, podendo contribuir para a lesão celular em ocorrências como o choque hipovolêmico e endotóxico (NAVA *et al.*, 1991). Esses efeitos são atribuídos, principalmente, à expressão da NOSi. O NO^* também reage rapidamente com o O_2^- , formando um potente agente oxidante: o ânion peroxinitrito (ONOO^-), que é mais reativo que os seus precursores, sendo mais tóxico para as células que o H_2O_2 , O_2^- e o NO^* (BRUNELLI *et al.*, 1995).

A ação citotóxica do ONOO^- estar relacionada à sua habilidade de iniciar peroxidação lipídica, oxidar grupamentos de sulfidril e nitrar resíduos de tirosina em várias proteínas (MONDORO *et al.*, 1997). No interior da célula, o ONOO^-

reage com tióis livres, preferencialmente a glutathione (AUGUSTO *et al.*, 1994). Outras evidências mostram que a nitração da tirosina pode levar à inativação de enzimas e/ou de receptores (veja revisão, BECKMAN & KOPPENOL, 1996). Em células inflamatórias demonstrou-se a formação de ONOO^- , reforçando assim o envolvimento desse oxidante na defesa do organismo contra agentes invasores bem como na patogênese da inflamação (KAPLAN *et al.*, 1996). Corroborando tais sugestões, ROHN e colaboradores (1999) demonstraram que o ONOO^- sensibiliza neutrófilos humanos, causando maior atividade da NADPH oxidase envolvida na formação de EROs.

1. Espécies Reativas de Nitrogênio e Oxigênio relevantes para a inflamação

ERN/EROs	Nome	Gerado (a partir de)	Enzimas envolvidas
$\text{NO}^\bullet$	Radical óxido nítrico	Oxidação da L-arginina	Óxido nítrico sintase (NOS)
ONOO^-	Ânion peroxinitrito	Reação com $\text{NO}^\bullet$ e O_2^-	NOS, Xantina oxidase (XO), NADPH oxidase
ONOOH	Ácido peroxinitroso	Protonação do ONOO^- em pH fisiológico	
ONOOOCO_2^-	Ânion nitroperoxicarbonato	Reação do ONOO^- com CO_2	
$\text{NO}_2^\bullet$	Radical dióxido de nitrogênio	Decomposição homolítica do ONOOH	
NO_2^-	Ânion nitrito	Oxidação do $\text{NO}^\bullet$ ou ONOO^-	
NO_3^-	Ânion nitrato	Oxidação do NO_2^- ou auto-isomerização do ONOO^-	
NO_2Cl	Cloreto de nitrila	Oxidação do NO_2^- pelo HOCl	Mieloperoxidase (MPO)
O_2^-	Radical ânion superóxido	Reação do H_2O_2 e Fe^{3+} Reação com $\text{OH}^\bullet$ e H_2O_2 Oxidação de xantina Redução parcial de O_2	XO e NADPH oxidase
$\text{OH}^\bullet$	Radical hidroxila	Reação do H_2O_2 e Fe^{2+} Reação do O_2^- e H_2O_2 Decomposição homolítica do ONOOH	
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio	Dismutação de O_2^-	SOD
HOCl	Ácido hipocloroso	Oxidação do Cl^- pelo H_2O_2	MPO

Fator nuclear κB (NF- κB)

A sinalização celular constitui um evento importante, onde o agonista (ligante) é capaz de promover uma resposta na célula via transdução de sinais. O mecanismo é complexo e inclui segundos mensageiros, enzimas e proteínas

específicas. O NF- κ B é conhecido como fator de transcrição, descoberta em 1986 no laboratório do prêmio Nobel David Baltimore. Sabe-se atualmente que esse fator pode ser encontrado em vários tipos celulares, onde regula inúmeras respostas celulares tais como estresse, produção de citocinas, radicais livres e anticorpos contra agentes infecciosos (bactérias e vírus). A importância do mesmo na modulação da resposta inflamatória bem como no choque séptico e em doenças auto-imune vem sendo descrita (ALBENSI & MATTSON, 2000).

O fator NF- κ B, mediante ativação por agentes como lipopolissacarídeos (LPS) e citocinas, liga-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve κ das moléculas de anticorpo produzidas pelos linfócitos B (SEM & BALTIMORE, 1986). Esse fator é um dímero, geralmente constituído pelas subunidades p65 e p50 bem como por outras subunidades descritas posteriormente, tais como a c-Rel, RelB, p52 (BEUERLE & BALTIMORE, 1996; SIEBENLIST, 1997; GHOSH *et al.*, 1998). Na ausência de estímulo, o NF- κ B encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória, o I κ B, cuja fosforilação e degradação pelo proteossoma 26S são necessárias para que ocorra a translocação do NF- κ B do citoplasma para o núcleo, onde ocorrerá a transcrição gênica (BAEUERLE & BALTIMORE, 1996; GHOSH & KARIN, 2002).

A fosforilação do NF- κ B é feita principalmente pelo complexo I κ B quinase (IKK), que possui duas subunidades com propriedades de quinase: IKK α e IKK β , bem como, uma subunidade essencial para compor o complexo IKK funcional, denominada IKK γ (GHOSH & KARIN, 2002). O desmembramento do complexo I κ B/NF- κ B permite o transporte do NF- κ B para o núcleo, com conseqüente ligação deste nos genes junto à região promotora, levando ao aumento na

expressão dos genes alvo (GHOSH *et al.*, 1998). Dentre eles, genes que codificam proteínas relacionadas à resposta inflamatória (citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema complemento, enzimas como a cicloxigenase 2 (COX-2), NOSi, moléculas de adesão, receptores da resposta imune). Adicionalmente, evidências mostram que alguns poluentes atmosféricos (ex.: material particulado [MP], partícula de exaustão do diesel [PED], dióxido de titânio [TiO₂], partículas de ferro) são capazes de ativar o fator de transcrição NF-κB em células epiteliais da traquéia de ratos e do pulmão de camundongos e humanos (SHUKLA *et al.*, 2000; CHURG & WRIGHT, 2002; JIMÉNEZ *et al.*, 2002; PEDEN, 2002; DAGHER *et al.*, 2007).

Fibras Sensoriais e Neuropeptídeos

As terminações nervosas sensoriais compreendem, principalmente, dois grandes grupos de fibras: tipo A (A α , A δ), formadas por corpos celulares grande-médios e axônios mielinizados, e fibras tipo C, que contêm corpos celulares pequenos e axônios não-mielinizadas (HOLZER, 1997). Na vigência de estímulos químicos, físicos ou térmicos adequados, estas fibras são estimuladas e uma variedade de neuropeptídeos pode ser liberada das terminações nervosas das fibras sensoriais, desencadeando o fenômeno conhecido como inflamação neurogênica (BRAIN, 1997).

A inflamação neurogênica nas vias aéreas é caracterizada pelo aumento de permeabilidade vascular (edema) e sintomas como broncoconstrição, aumento da secreção das glândulas seromucosas, adesão de leucócitos ao endotélio vascular e ativação de macrófagos alveolares (BARNES *et al.*, 1991; BERTRAND & GEPPETTI, 1996, TIBÉRIO *et al.*, 1997). Dentre os principais neuropeptídeos

envolvidos na inflamação neurogênica, destacam-se as taquicininas: substância P (SP) e a neurocinina A (NKA) e o peptídeo vasodilatador CGRP. As taquicininas são peptídeos formados por 10 a 11 resíduos de aminoácidos, cujas ações farmacológicas são mediadas via receptores específicos de taquicininas (NK), acoplados à proteína G. O subtipo NK₁ é principal ligante para SP, NK₂, reconhecido preferencialmente pela NKA, e NK₃, ligante específico para a neurocinina B (NKB) (veja revisão, BARNES *et al.*, 1991).

Os receptores NK₁ estão distribuídos nas células endoteliais em vênulas pós-capilares, músculo liso, epitélio e em células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e macrófagos). Nas vias aéreas esses receptores regulam a secreção de muco e permeabilidade vascular (veja revisão MAGGI, 1993; RAWLINGSON *et al.*, 2001). Os receptores NK₂ encontram-se em células nervosas, músculo liso e células epiteliais, enquanto os receptores NK₃ estão presentes, principalmente, no SNC (KNIGHT *et al.*, 1996). Tanto a SP como a NKA foram identificadas em fibras C em vias aéreas de animais experimentais (HUA *et al.*, 1985, BARNES *et al.*, 1991) e do homem (MARTLING *et al.*, 1987). De fato, Bertrand e colaboradores (1993) demonstraram que o extravasamento plasmático e a broncoconstrição induzidos por antígeno em vias aéreas de cobaias foram inibidos pelo antagonista de receptores de taquicininas.

Os neurônios aferentes possuem elementos de ordem excitatória ou inibitória como a adenosina trifosfato (ATP; BURNSTOCK *et al.*, 1970; 1972), NO (veja revisão, SANDER & WARD, 1992), peptídeo intestinal vasoativo (VIP; MAKHLOUF & GRIDEN, 1993) e peptídeo ativador da adenilato ciclase pituitária (JIN *et al.*, 1994). Em geral, ao contrário, as taquicininas (SP, NKA e NKB) e o CGRP exercem respostas excitatórias (ITOH *et al.*, 1995).

Desde a descoberta dos neuropeptídeos, muitos dos avanços no entendimento da importância fisiopatológica das taquicinas provêm do uso de antagonistas altamente seletivos de seus receptores bem como da síntese de substâncias agonistas não-peptídicas desses receptores. Alguns antagonistas não peptídicos (ex.: CP96345, CP99994 e SR 48968) apresentam alta afinidade para NK₁ ou NK₂ (REGOLI *et al.*, 1994). Assim, a especificidade dessas substâncias tem sido demonstrada em vários estudos experimentais onde, por exemplo, o extravasamento plasmático na traquéia de cobaias induzido por taquicinas é mediado via receptores NK₁, enquanto a broncoconstrição é mediada por ambos receptores NK₁ e NK₂ (BERTRAND & GEPPETTI, 1996). Um experimento mapeou, por técnica imunohistoquímica, a expressão desses receptores em fragmentos de pulmões obtidos em biópsias de pacientes com câncer, fumantes e não fumantes. A coloração imunohistoquímica foi positiva para os receptores NK₁ e NK₂ nas camadas musculares das vias aéreas, nas células mioepiteliais das glândulas, no endotélio e camada muscular dos vasos pulmonares. O receptor NK₂ foi expresso também em macrófagos, mastócitos e linfócitos T, sem diferenças entre os grupos estudados (MAPP *et al.*, 2000).

A estimulação das fibras sensoriais por mediadores químicos é modulada por receptores e canais iônicos específicos distribuídos ao longo do axônio e no corpo celular (veja revisão, BENHAM *et al.*, 2003). Dentre esses, destacam-se o receptor vanilóide-1 (TRPV1; CATERINA *et al.*, 1997; veja revisão, LEE *et al.*, 2003), receptores para bradicinina (BERGREN, 2006), histamina (LEE & WIDDICOMBE, 2001), serotonina (5-HT₄; COSTA *et al.*, 2003), receptor ativado por protease-2 (PAR-2; DING-PFENNIGDORFF *et al.*, 2004).

Pelo menos quatro membros da família de receptores TRPV já foram identificados e clonados (TRPV1/2, TRPV3, TRPV4 e TRPV5/6; GUNTHORPE *et al.*, 2002; CLAPHAM *et al.*, 2003).

Os receptores TRPV1 são sabidamente ativados pela capsaicina (8-metil-*N*-vanilil-6 nonamida), ingrediente pungente extraído de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum* (CATERINA *et al.*, 1997). Com relação à estrutura e função, pertence à família dos receptores com potencial transitório (*transient receptor potential vanilloid*). Por se tratar de canais catiônicos não seletivos e termosensíveis, os receptores TRPV1 podem ser também estimulados por prótons extracelulares, pH, temperatura (ex.: pH 5,4 a 37°C), mediadores endógenos (anandamida, eicosanóides, *hydroxy-eicosatetraenoic acid* S, 5-S [S-HETE, 5-S-HETE] e LTB₄; veja revisão, BENHAM *et al.*, 2003).

De longa data, é sabido que a administração da capsaicina a ratos recém-nascidos (2 a 10 dias de idade), na dose de 50 mg/kg, promove a máxima degeneração de fibras aferentes sensoriais não mielinizadas (JANCSÓ *et al.*, 1967; COSTA *et al.*, 1997), com conseqüente comprometimento neuroquímico, histoquímico e funcional, causando a diminuição permanente da resposta nociceptiva (JANCSÓ *et al.*, 1977, 1980; GAMSE *et al.*, 1980; NAGY *et al.*, 1980).

1.3 Anátomofisiologia das vias aéreas e processo inflamatório local

O sistema respiratório compreende as vias respiratórias (cavidades nasal, nasofaringe), traquéia, árvore bronquial e pulmões (bronquíolos, alvéolos e tecido elástico; Fig. 1). De uma forma bem simplista, pode se dizer que o sistema respiratório é formado por vários ductos, os quais são responsáveis pela passagem de ar do ambiente externo para os pulmões (respiração) e vice-versa.

A respiração é uma das funções vitais do organismo, mediante a qual as células vivas do corpo captam o oxigênio e eliminam o dióxido de carbono. É um intercâmbio gasoso entre o ar da atmosfera e o organismo. Contudo, antes da chegada do ar aos pulmões, as vias aéreas conduzem, aquecem, umedecem e filtram esse ar inalado que, em geral, contém partículas de pó e gases irritantes.

Figura 1. Aparelho respiratório. Fonte: <http://www.corpohumano.hpg.ig.com.br/respiracao>

O epitélio, que se estende das narinas até os bronquíolos terminais, é responsável pela produção do muco, cuja função principal é manter a umidade nesses tecidos, além de impedir a entrada de MP e substâncias estranhas. Há também as células ciliadas, cuja função é fazer com que o muco escoe lentamente até a laringe, onde as partículas presas ao mesmo são deglutidas ou expelidas pelo mecanismo da tosse (Fig.2).

Considerado uma barreira física e metabolicamente ativa, o epitélio contribui para a manutenção da homeostase das vias aéreas. Segundo DAVIES & HOLGATE (2002), a inflamação e o remodelamento característicos das vias aéreas como, por exemplo, na asma, seriam conseqüências de lesões anormais e de constantes reparos. Estas alterações parecem relacionar-se à susceptibilidade do epitélio brônquico do paciente a agentes inalados do meio ambiente. Abaixo do epitélio encontra-se a membrana basal, a qual compreende uma fina camada de

matriz extracelular, colágeno tipo IV, complexos de lâminina, fibronectina e proteoglicanos (SODERBERG *et al.*, 1990; veja revisão, BOUSQUET *et al.*, 1992; veja revisão, LAITINEN & LAITINEN, 1994).

Paralelamente, sabe-se que a função sintética das células musculares lisas das vias aéreas está muitas vezes relacionada à perpetuação e intensidade da inflamação local. Estudos têm demonstrado que o músculo liso constitui fonte importante de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, os quais regulam/modulam a inflamação (veja revisão, MCKAY & SHARMA, 2002). Além dos diversos tecidos (Fig. 2), as vias aéreas contêm inervação abundante de fibras do sistema nervoso autônomo (colinérgicas) bem como fibras aferentes primárias (sensoriais) (veja revisão BARNES, 1987; JOOS *et al.*, 2000).

Figura 2. Inervação sensorial das vias aéreas pelas taquicininas (JOOS *et al.*, 2000).

1.4 Características dos poluentes atmosféricos e o impacto sobre a saúde e economia

De acordo com estudos epidemiológicos, estima-se 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 conseqüências 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 a 165 bilhões de dólares serão economizadas desses países (BELL *et al.*, 2004). Segundo um outro 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). No conjunto, estas informações reforçam a necessidade do controle da poluição e o conhecimento de mecanismos envolvidos em doenças oriundas da exposição à mesma.

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). Por ser um país em desenvolvimento, o Brasil já enfrenta graves problemas com a poluição ambiental. São Paulo, o maior pólo industrial do país, é um dos estados onde a população mais sofre com as conseqüências dessa poluição (Ano 2005; www.fapesp.br.agencia). De acordo com as evidências recentes, a poluição ambiental constitui um dos maiores problemas de saúde pública mundial, não apenas pela sua influência na mudança climática do mundo, mas também pela sua ação nociva sobre a saúde humana. Mesmo em baixas concentrações, a associação entre os diferentes tipos de poluentes pode ser ainda mais prejudicial à saúde (BECKER *et al.*, 1996). Contudo, poucos estudos experimentais têm demonstrado isto e os mecanismos envolvidos. Os efeitos mais descritos são: aumento da mortalidade (TOULOUMI *et al.*, 1997; ZMIROU *et al.*, 1998), de hospitalizações (KONTOS *et al.*, 1999; ATKINSON *et al.*, 2001), de atendimentos emergenciais (PANTAZOPOULOU *et al.*, 1995; LIPSETT *et al.*, 1997),

agravamento de doenças respiratórias e cardíacas (MEDINA *et al.*, 1997; PETERS *et al.*, 1999), alterações da função pulmonar em indivíduos saudáveis ou com doença estabelecida (HOEK *et al.*, 1998; JALALUDIN *et al.*, 2000).

Os efeitos da poluição do ar dependem dos poluentes dispersos, das condições atmosféricas e do clima da região. Diferentes gases (ex.: ozônio e sulfatos), bem como as partículas dispersas como o MP apresentam diferentes efeitos biológicos. A extensão dos efeitos dessas partículas depende da natureza das substâncias que a formaram, como os compostos orgânicos, inorgânicos, metais e tamanho destas partículas (TATTERSFIELD, 1996). Os poluentes aéreos são derivados de uma variedade de fontes, sendo a queima de combustível a principal delas. Eles podem ser classificados como primários e secundários. Os poluentes primários são aqueles emitidos diretamente na atmosfera, tais como o dióxido de enxofre, alguns tipos de óxido de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono e MP. Os poluentes resultantes de reações químicas com outros poluentes ou gases atmosféricos são chamados de secundários, tais como ozônio e o óxido de nitrogênio (veja revisão, BERNSTEIN *et al.*, 2004).

Os poluentes no ar atmosférico podem ser também classificados conforme a ocorrência natural (provenientes de vulcões, incêndios em florestas, tempestades de areia, e outros) ou antropogênica (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). A concentração dessas substâncias depende da quantidade emitida para a atmosfera, de suas interações físico-químicas, de sua absorção e das condições meteorológicas para a sua dispersão.

Eles também sofrem 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).

O MP é primariamente formado durante a combustão de produtos de combustível fóssil, mas principalmente pelas fábricas e veículos de motor a diesel. Compreende não somente uma única substância, mas sim, um complexo de elementos que se agregam ao mesmo. Ao penetrar no sistema respiratório, leva junto às substâncias aderidas a ele, tais como material irritante, substâncias químicas tóxicas e cancerígenas (PEREIRA *et al.*, 1995). Estima-se que 80% do MP originam-se da fuligem (fumaça negra) dos escapamentos dos veículos automotores. De acordo com o diâmetro aerodinâmico do MP, este pode ser classificado em PM₁₀ grosso ou bruto (<10 µm), PM_{2,5} fino (<2,5 µm) e nano partículas ou ultrafinos (<1 µm).

A poluição emitida pela exaustão do diesel (PED) compreende uma mistura de gases, vapores, compostos orgânicos e partículas finas liberadas da engenharia do veículo. Considerada uma das principais vilãs no desencadeamento de reações inflamatórias e alérgicas, visto que suas partículas finas (PM<2,5 µm) penetram mais facilmente pelas vias aéreas e, conseqüentemente pulmões, podendo causar complicações pulmonares e vasculares (SEATON *et al.*, 1995; CLARKE *et al.*, 2000; DONALDSON, 2003). Evidências bioquímicas demonstram ainda que moléculas químicas tóxicas tais como quinonas incorporam-se à superfície da PED, tornando-as mais tóxicas (CHO *et al.*, 2004; DONALDSON *et al.*, 2003; ICHINOSE *et al.*, 2003). Recentemente, CHO e colaboradores isolaram e purificaram a 1,2-naftoquinona

(1,2-NQ - $C_{10}H_6O_2$, PM=158,16; veja Fig. 3) da PED, cuja concentração por grama de PED varia entre 14 a 16 μg (CHO *et al.*, 2004).

1,2-naftoquinona

Figura 3. Estrutura química do composto químico orgânico 1,2-naftoquinona. Fonte: Catálogo Sigma-Aldrich (2003-2004). Pág. 1320.

A poluição atmosférica parece causar danos à saúde menos evidentes em indivíduos saudáveis, os quais passam despercebidos ou causam sintomas leves. Contudo, a exposição prolongada parece levar à diminuição da função pulmonar, que tem resultado em ausências no trabalho ou escola (NASCIMENTO *et al.*, 2006). A susceptibilidade aumentada aos danos da poluição atmosférica é mais comum em indivíduos com histórico de doenças vasculares e respiratórias (ex.: diabetes, isquemia, doença pulmonar obstrutiva) (RUMEL *et al.*, 1993; SEATON *et al.*, 1995; BURNETT *et al.*, 1999). Até mesmo a exposição aguda aos poluentes, parece promover alterações inflamatórias sistêmicas, culminando na alteração dos batimentos cardíacos, aumentando o risco de doenças cardiovasculares ou agravamento de doenças vasculares pré-existentes (GOLDBERG *et al.*, 2001; HOEK *et al.*, 2001; SULLIVAN *et al.*, 2005). Em indivíduos idosos expostos cronicamente ao MP observou-se um risco aumentado de mortalidade (NASCIMENTO *et al.*, 2006).

Nos Estados Unidos, segundo uma análise comparativa de curva de sobrevivência, a expectativa de vida em pessoas idosas expostas aos poluentes passou de 76,4 anos para 73,5 anos de vida. Para os fumantes, a partir de 20

anos de idade, essa expectativa foi menor ainda, em torno de 67,9 anos. Apesar do menor risco associado à poluição atmosférica do que ao tabagismo, a importância da poluição em saúde pública está no fato de que esta é onipresente, ou seja, é involuntária tanto em ambientes externos como domésticos (POPE, 2000).

Devido às suas características anátomo-funcionais, o sistema respiratório é freqüentemente o maior alvo dos contaminantes presentes no ar atmosférico. A importância desse sistema vai além das trocas gasosas entre o ar e sangue, pois também tem funções não respiratórias, como a manutenção de um sistema imunológico ativo, o metabolismo de substâncias endógenas: PG, angiotensina e de barreira biológica entre o sangue e o meio ambiente. Todas as porções do trato respiratório, desde a região nasal até a superfície de trocas gasosas, têm papel no reconhecimento, no metabolismo, e na eliminação de substâncias contaminantes (RICHARDS & BROOKS, 1995). Os pulmões são protegidos por um conjunto de mecanismos de defesa interativos, onde estão incluídas as defesas mecânicas, químicas e imunológicas. O maior grau de proteção pulmonar é atingido quando a ação de todos os mecanismos disponíveis é coordenada. Entretanto, embora o risco de infecção aumente por ocasião de falha em qualquer um dos mecanismos isoladamente, os outros possuem a capacidade de, até certo grau, prover uma proteção redundante, evitando que o indivíduo fique doente. Vale ressaltar que a função de proteção exercida por esse conjunto dos mecanismos de defesa é tão eficiente que em condições normais existe um estado de esterilidade no trato respiratório inferior (RENNARD & ROMBERGER, 2000).

O primeiro mecanismo de defesa se baseia na filtração aerodinâmica das partículas inaladas. As partículas possuem capacidades diferentes para adentrar o trato respiratório dependente de diversos fatores como, tamanho, densidade e forma. Assim, as partículas (>10 a $15\ \mu\text{m}$) ficam retidas ao longo das cavidades nasais à medida que o ar inspirado entra em contato com a mucosa que reveste o septo e as conchas nasais. O ar sofre então uma curva ao nível da nasofaringe em direção aos pulmões e algumas das partículas maiores restantes ficam retidas na parede posterior da faringe, pois são incapazes de acompanhar o ar durante esse trajeto. Dessa forma, poucas partículas com o tamanho em questão chegam ao nível da traquéia e brônquios principais. Esses fenômenos descritos acima são dependentes de um mecanismo de filtração aerodinâmico particular conhecido por impactação, sendo primordialmente dependente da inércia das partículas. Com a ação desse mecanismo, pouquíssimas partículas ainda ($>10\ \mu\text{m}$) chegam então aos alvéolos (SCHLESINGER, 1995). Porém, por não haver mecanismo de transporte mucociliar nos alvéolos, as partículas aí depositadas são eliminadas de maneira muito mais lenta do que nas vias aéreas. Esse fluxo mais lento é decorrente do tempo de transporte dos macrófagos até porções mais proximais do sistema respiratório que contenha epitélio ciliado. Muitas das partículas insolúveis, que são depositadas nas regiões alveolares, podem ser fagocitadas por macrófagos, que migram para as junções broncoalveolares a fim de entrar no sistema mucociliar (SCHLESINGER, 1995).

As partículas cujos diâmetros são <10 e, principalmente, entre 5 e $0,2\ \mu\text{m}$ são retidas por um outro mecanismo de filtração aerodinâmica conhecido por sedimentação. Entende-se por sedimentação a deposição de partículas nas vias aéreas de menor calibre devido à ação exercida pela força da gravidade sobre as

mesmas. Finalmente, as partículas ($<0,1 \mu\text{m}$) são depositadas pelo mecanismo Browniano. Esse primeiro mecanismo de defesa (filtração aerodinâmica) é acrescido de dois reflexos importantes para a proteção pulmonar: o reflexo da tosse e a broncoconstrição (veja revisão, NEWHOUSE *et al.*, 1976 a, b).

O segundo mecanismo de defesa é o transporte mucociliar (cílios, líquido periciliar e muco), onde as partículas depositadas entre os dois terços posteriores da cavidade nasal e a nasofaringe e também aquelas depositadas desde a laringe até os bronquíolos terminais são constantemente transportadas em direção à orofaringe. Nesse local, elas podem ser eliminadas mediante deglutição ou expectoração. O muco é formado de duas camadas, a saber: uma superficial, mais viscosa e elástica, conhecida como gel, e outra mais profunda em contato direto com os cílios das células epiteliais que revestem a mucosa respiratória, mais fluída e conhecida como sol. O acoplamento do muco ao batimento sincrônico dos cílios representa o mecanismo de eliminação (*clearance*) mucociliar. Associado a isto, existe ainda um constante desprendimento das células ciliadas que se soltam do epitélio e levam consigo eventuais patógenos a elas aderidos (NEWHOUSE *et al.*, 1976a).

Muitos são os mecanismos imunológicos de defesa (humoral e celular) atuantes na proteção do sistema respiratório contra as substâncias inaladas. O primeiro deles é representado pelos macrófagos alveolares, que são responsáveis pela remoção física de partículas inaladas. Porém, o principal sistema de eliminação dessas substâncias é o transporte mucociliar (NEWHOUSE *et al.*, 1976b; MATUTE-BELLO *et al.*, 1997).

Nas vias aéreas, a inflamação, *per se*, manifestada pelo espessamento da mucosa e pelo infiltrado celular, altera as propriedades mecânicas do pulmão,

independente da função do músculo liso. Dessa forma, a resposta das vias aéreas a um determinado estímulo fica aumentada. O influxo de neutrófilos e eosinófilos para o pulmão depende, em grande parte, do aumento na produção de $\text{TNF-}\alpha$, citocina que age como um disparador do processo inflamatório das vias aéreas (LUKACS *et al.*, 1995; THOMAS *et al.*, 1995). A liberação de mediadores inflamatórios (proteases, por exemplo) pelos neutrófilos contribui para lesar o tecido pulmonar (veja revisão, KAY & CORRIGAN, 1992). Os linfócitos produzem grande quantidade de citocinas, as quais estão envolvidas no recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para as vias aéreas (veja revisão KELLY, 1990; POULTER *et al.*, 1994).

Curiosamente, estudos toxicológicos recentes apontam as fibras sensoriais, via ativação dos receptores TRPV1, como um dos principais alvos no desencadeamento de patologias inflamatórias relacionadas à poluição ambiental incluindo o MP (OORTGIESEN *et al.*, 2000; VERONESI *et al.*, 2000; KIKUNO *et al.*, 2006). Embora conexões existam entre o MP e as disfunções vasculares (ex.: inflamação) via mecanismos modulados por estresse oxidativo e NO^* (BECKER *et al.*, 1996; KUMAGAI *et al.*, 1997; DONALDSON *et al.*, 2003; HIRANO *et al.*, 2003), pouco se sabe sobre a associação de poluentes ambientais e a participação de componentes neuro-inflamatórios (ex.: neuropeptídeos). Reforçando tais sugestões, evidências adquiridas de experimentos conduzidos *in vivo* e *in vitro* mostram que as taquicininas, particularmente a SP, contribuem para a formação da resposta inflamatória via interação com linfócitos, mastócitos e eosinófilos (WIEDERMANN *et al.*, 1989). Segundo outros achados experimentais, a substância P age como quimiotático para linfócitos além de estimular a produção de citocinas (IL-2, IL-6, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$) por linfócitos (FOSTER *et al.*,

1991; NIO *et al.*, 1993; RAMESHWAR *et al.*, 1993). Corroborando com esses achados, evidências indicam que as neurocininas induzem aumento na quimiotaxia de leucócitos bem como ativação do sistema imunológico em virtude do aumento na liberação de histamina e produção de citocinas dos linfócitos T, macrófagos e mastócitos (MOORE *et al.*, 1990; SAGARA *et al.*, 1993).

1.5 *Objetivos e hipótese inicial*

Trabalhou-se neste projeto com a hipótese de que a possível resposta inflamatória em vias aéreas de ratos expostos, de forma aguda, ao MP da emissão do diesel pode ser exacerbada pela co-administração do composto químico reativo 1,2-NQ, via mecanismo modulado por fibras sensoriais e seus neuropeptídeos, em particular, as taquicininas. Considerado o exposto acima, os objetivos principais deste estudo foram:

- 1) Efetuar uma análise comparativa sobre o possível aumento na permeabilidade vascular, influxo de leucócitos e estresse oxidativo produzido pela administração intratraqueal (i.tr.) das PED, isoladas, ou em associação com a 1,2-NQ em estruturas (traquéia, brônquio principal e pulmão) das vias aéreas de ratos;
- 2) Avaliar farmacologicamente e bioquimicamente a participação de mecanismos neurogênicos nas possíveis respostas inflamatórias causadas pela mistura de PED e 1,2-NQ no brônquio e células residentes (macrófagos);
- 3) Investigar o impacto direto da mistura de poluentes sobre as características funcionais, morfológicas e metabólicas dos macrófagos broncoalveolares de animais normais e depletados de neuropeptídeos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

O projeto foi desenvolvido de acordo com as normas regidas pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº127, folha 21 do livro 2).

Ratos Wistar, de ambos os sexos (250 - 350g), foram obtidos do Biotério Central do ICB (USP). Em determinados protocolos, ratos Wistar tratados com capsaicina, quando neonatos, foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Edson Antunes (Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas).

Antes dos procedimentos experimentais, os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Farmacologia do ICB-I sob condições climáticas adequadas (ciclo 12/12, claro/escuro; 22°C) com ração e água filtrada *ad libitum*.

Os animais utilizados foram anestesiados, pela via intraperitoneal (i.p.), com a mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg).

2.2 Exposição dos animais aos poluentes e grupos experimentais

Animais, após indução da anestesia, receberam a injeção intratraqueal (i.tr.) dos agentes testes e, em seguida, sacrificados após 15 minutos ou 3 horas, conforme o protocolo experimental estabelecido (Tabela 2).

Tabela 2. Tratamentos e Grupos Experimentais

Grupos experimentais	Sugestões de Dose	Referências
Veículo dos poluentes	DMSO: 0,01% Tween 80: 0,05%	Cho <i>et al.</i> , 2004

PED	1 e 5 mg/kg;(i.tr.)	Yang <i>et al.</i> , 2003
1,2-NQ	35 e 100 nmol/kg;(i.tr.)	Cho <i>et al.</i> , 2004
Mistura Poluentes (PED + 1,2-NQ)	1mg/kg + 35 nmol/kg;(i.tr.)	Teles <i>et al.</i> , 2005
Mistura Poluentes + Capsaicina (tratamento neonatal)	50 mg/kg (s.c.)	Jancsó <i>et al.</i> , 1967
Mistura Poluentes + Veículo Capsaicina (tratamento neonatal)	1mg/kg + 35 nmol/kg;(i.tr.)	Teles <i>et al.</i> , 2005
Mistura Poluentes + Antagonista NK ₁ (L-732,138)	5 mg/kg;(i.p.)	Bang <i>et al.</i> , 2004
Mistura Poluentes + Antagonista NK ₂ (SR48968)	1,6 µmol/kg;(i.v.)	Trevisani <i>et al.</i> , 2005

2.3 Avaliação da permeabilidade vascular nas vias aéreas

Os animais foram anestesiados, conforme descrito no item 2.1, e depois receberam a injeção, pela veia caudal, de albumina bovina marcada com ¹²⁵I (BSA-¹²⁵I; 0,037 MBq/µg). A determinação do aumento de permeabilidade vascular foi avaliada nas vias aéreas de ratos (traquéia, brônquio principal e pulmão esquerdo) frente à injeção i.tr. de PED (1 e 5 mg/kg), 1,2-NQ (35 e 100 nmol/kg), mistura de poluentes (PED + 1,2-NQ, menores doses) e respectivos veículos. Quando necessário, os antagonistas foram administrados, pela via intraperitoneal (i.p.) ou endovenosa (e.v.), de acordo com a literatura (Tabela 2).

Após 15 minutos da administração dos poluentes, foi realizada a laparotomia mediana no animal e uma amostra de 1 ml de sangue foi coletada, via transecção da aorta abdominal, e depois submetida à centrifugação (RICCIARDOLO *et al.*, 1994). O animal foi sacrificado seccionando-se a artéria abdominal e o leito vascular do pulmão foi então exposto e imediatamente perfundido, via inserção de uma cânula de polietileno no ventrículo direito, com 40 ml do tampão fosfato (PBS) heparinizado (10 UI/ml). A seguir, a traquéia, o brônquio principal e pulmão foram cuidadosamente removidos, limpos de seus tecidos conjuntivos, pesados e levados com o plasma para o contador γ (Packard Bioscience, EUA). O extravasamento plasmático obtido em cada tecido foi

avaliado em função do acúmulo local da BSA-¹²⁵I na amostra de 1 ml de plasma (ITO *et al.*, 1996; TELES *et al.*, 2005). A resposta obtida foi expressa como volume de plasma extravasado por grama de tecido úmido em relação à contagem (100%) obtida em 1 ml plasma.

2.4 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Os animais anestesiados foram tratados com os poluentes, conforme descrito no item 2.2. Três horas após o tratamento com os agentes testes, os mesmos foram sacrificados mediante superdosagem anestésica. Após a exsangüinação dos animais, o leito pulmonar foi perfundido conforme descrito acima e, em seguida, os mesmos tecidos foram removidos, pesados e mantidos em freezer (-80°C). Quando necessário, as amostras congeladas foram imersas (1 ml/50 mg de tecido) em tampão de homogeneização contendo brometo de hexadeciltrimetilamônia (HTAB, 0,5%), em tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄, 50 mM, pH 6,0). Com o auxílio do homogenizador (Politron, Brinckman), cada amostra foi processada durante 45 s e os homogenatos obtidos foram subsequentemente incubados em estufa (60°C, durante 2 h) para inativação da catalase. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (12,000 rpm, 15 min) e os sobrenadantes (20 µl de cada amostra) foram coletados e incubados em microplaca juntamente com 200 µl da solução de tampão KH₂PO₄ contendo dihidrocloreto de *o*-dianisidina (0,164 mg/ml) em H₂O₂ (0,0005 %, pH 6).

A análise da densidade ótica (460 nm) foi realizada em leitor de ELISA a cada intervalo de 10 s, durante 5 min. A atividade da enzima MPO foi expressa em unidades e corrigida pela quantidade de tecido (g) utilizado no ensaio, segundo a fórmula: MPO (U/g) = Vmax/s x 60/0,0113/0,5. Considerou-se que

uma unidade de atividade de MPO corresponde àquela capaz de degradar um micromol de H_2O_2 por minuto (BRADLEY *et al.*, 1982).

2.5 *Análise de expressão gênica pela reação de polimerização em cadeia após transcrição reversa (RT-PCR)*

Os animais foram submetidos ao tratamento com os poluentes, conforme o item 2.2, pelo período de três horas. Após o período estipulado, os ratos foram sacrificados, o brônquio principal foi removido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e depois armazenado em freezer (-80°C) até o processamento das amostras. A expressão de RNAm para os receptores TRPV1, NK₁ e NK₂ em brônquio principal foi avaliada por RT-PCR.

a) Extração do RNA total

O RNA total foi extraído usando-se o reagente Brazol (fenol e tiocianato de guanidina; LGC Biotecnologia Ltda.). Os brônquios foram homogeneizados em Brazol (1 ml/100 mg de tecido), e após 5 min, adicionou-se 1 ml de solução de clorofórmico/álcool isoamílico (24:1). Após agitação vigorosa para extração dos lipídios, os tubos foram deixados em repouso (10 min) e levados à centrifugação (12,000 g; 15 min.; 4°C). A fase aquosa (sobrenadante) foi separada (600 μl) e o RNA precipitado pela adição de 500 μl de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12,000 g, 10 min, 4°C) e os sobrenadantes foram descartados. O precipitado (*pellet*) de RNA formado foi lavado com 500 μl de etanol 95% e após nova centrifugação (7,000 g, 6 min, 4°C), os sobrenadantes foram desprezados e lavados novamente com etanol 75%. Os tubos foram invertidos e apoiados sobre o papel de filtro para eliminar qualquer

resíduo de etanol. Os precipitados de RNA total foram então dissolvidos em 50 µl de água tratada com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato).

Para a quantificação de RNA total, as amostras foram diluídas 1:1000 em água Milli-Q autoclavada e suas absorbâncias medidas a 260 nm. As concentrações de RNA total foram calculadas considerando-se a relação: 1 AU = 40 µg/ml. A integridade do RNA total isolado foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (1% em TAE [tris acetato EDTA] contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, Gibco BRL, EUA) em uma voltagem de 70 v durante 30 min. As bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

b) Transcrição do cDNA

Para isto, amostras de 2 µg de RNA total dos diferentes grupos foram misturadas a 5 µl de oligo dT (Gibco BRL, EUA) e H₂O tratada com DEPC (q.s.p. 23 µl). Esta mistura foi aquecida (70°C, 10 min) e, em seguida, deixada à temperatura ambiente durante 10 min. Foram adicionados à reação: 10 µl de tampão de reação (*stand buffer*), 2,5 µl de dNTP 10 mM (2'-deoxinucleotídeo 5-trifosfato, Amersham, Inglaterra), 5 µl de DTT (ditiltreitol, 0,1 M) e 1 µl de inibidor de RNases (RNA guard, Amersham, Inglaterra). A mistura foi aquecida (37°C, 2 min) e posteriormente adicionou-se 1 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (200U, *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Invitrogen Life Technologies-EUA). As amostras foram novamente aquecidas (70°C, 15 min e a 37°C por 2 min) e reservadas em freezer (-20°C) até processamento do RT-PCR.

c) Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os primers utilizados (Invitrogen Life Technologies, Brasil) foram diluídos a uma concentração de 500 pmoles/ μ l em H₂O Milli-Q autoclavada (Tabela 3). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ l contendo 2,5 μ l de cDNA (amostra), 2,5 μ l de tampão para PCR (10X), 0,75 μ l de MgCl₂ (1,5 mM), 0,5 μ l de dNTP (0,2 mM), 1,5 μ l do primer 3', 1,5 μ l do primer 5', 0,5 μ l de Taq DNA polimerase (2 U, *Thermus aquaticus* DNA polymerase, Fermentas Life Science, EUA) e q.s.p. 25 μ l de H₂O para PCR. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi utilizado como controle interno.

Os ciclos de amplificação foram realizados por desnaturação inicial (94°C, 10 min), seguida de 40 ciclos que consistiram de desnaturação (94°C, 45 s), anelamento (56°C, 45 s) e extensão (72°C, 1 min). Uma extensão final foi feita a 72°C durante 10 min e 4°C por 15 min.

Tabela 3. Sequências de primers utilizados e respectivos pares de base no ensaio de RT-PCR

Primers	Sequência (5'→ 3')	Pares de Base	Refs.
TRPVR1	Sense- TCA TGG GTG AGA CCG TCA ACA AG Antisense- TGG CTT AAG GGA TCC CGT ATA AT	428	Xin <i>et al.</i> 2005
NK ₁	Sense- CAT CAA CCC AGA TCT CTA CC Antisense- GCT GGA GCT TTC TGT CTA GGA	380	King <i>et al.</i> 2001
NK ₂	Sense- CAT CAC TGT GGA CGA GGG GG Antisense- TGT CTT CCT CAG TTG GTG TC	491	King <i>et al.</i> 2001
GAPDH	Sense- GGT GCT GAG TAT GTC GTG GA Antisense- TTC AGC TCT GGG ATG ACC TT	400	Ferraz <i>et al.</i> , 1997

d) Separação dos produtos de PCR

Alíquotas dos produtos da reação de PCR (aproximadamente 10 µl preparadas com 2 µl de tampão de amostra), previamente normalizadas para darem quantidades equivalentes do controle de GAPDH em todas as amostras, foram submetidas ao gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Os géis foram visualizados sob luz UV e as imagens foram capturadas com o auxílio do *software Chemilmager* (Alpha Innotech, San Leandro-CA).

A intensidade das bandas, usada como medida do grau de expressão de RNAm foi determinada por análise densitométrica, e os valores obtidos foram expressos em unidades arbitrárias.

2.6 Quantificação da expressão gênica (*TNF-α*, *TNFR1*, *TNFR2*, *NF-κB*, *NOSi*) por PCR em tempo real (real-time RT-PCR)

Os animais foram tratados com a mistura de poluentes e os brônquios principais armazenados conforme descrito nos itens 2.2 e 2.5. A seguir, esse material foi submetido à análise da expressão gênica da citocina *TNF-α* e seus

receptores: R1 e R2, bem como do NF- κ B e NOSi pelo ensaio de PCR em tempo real (Tabela 4). Esta técnica foi utilizada alternativamente neste protocolo após a padronização da mesma em nosso laboratório.

a) Extração e quantificação de RNA total

A extração do RNA total foi realizada pelo método do Brazol, conforme descrito no item 2.5 a.

b) Purificação e transcrição reversa (RT) do cDNA

As amostras de RNA total obtidas foram tratadas com RNase e DNase, conforme descrito a seguir: uma quantidade de 3 μ g de RNA total foi diluída em q.s.p. 9 μ l de água DEPC e depois aquecidas (37°C, 10 min). Após novo aquecimento (75°C, 5 min) com a seguinte mistura: 1 μ l de inibidor de RNases (RNA guard, Amersham, Inglaterra), 1 μ l de DNase I (RQ1 DNase, Promega Madisom, EUA), 4 μ l de 5X *First-Strand Buffer*, 1 μ l de oligo dT, 2 μ l de DTT (0,1M) e 1 μ l de dNTP (10mM), as amostras foram reservadas (37°C, 10 min).

A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNase a 1 μ l da enzima transcriptase reversa (SuperCript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen) a 42°C, por 2 h, e 95°C, por 5 min. As amostras de cDNA foram mantidas a -20°C.

c) PCR quantitativo em tempo real (real-time RT-PCR)

O teste de PCR em tempo real foi realizado pelo sistema Sybr®Green com o auxílio do termociclador (Applied Biosystems-Gene Amp 5700, Foster City, CA, USA), no qual o fluoróforo se encontra no tampão do PCR: em cada fase de

anelamento, o fluoróforo se intercala na dupla fita, liberando a fluorescência que é proporcional ao número de cópias. Os *primers* utilizados para cada um dos genes escolhidos estão listados na tabela 4, sendo os mesmos programados para todos os experimentos da seguinte maneira: 1 ciclo de desnaturação inicial de 2 min a 50°C e 10 min a 95°C, e 40 ciclos de amplificação (10 s de desnaturação a 95°C e 10 s de anelamento e extensão a 60°C por 1 min). A validação do resultado passou por um processo chamado de curva de dissociação, na qual o produto do PCR foi aquecido de 60 até 95°C, levando à separação da dupla fita com conseqüente diminuição da fluorescência. Assim, foi possível determinar a especificidade da amplificação.

A reação foi realizada utilizando-se 3 ml de amostra, 3 ml dos pares de primers (200 nM) e 6 ml do reagente Sybr® Green. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando-se um coeficiente de variação para o ΔC_t ("cycle threshold") através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (SCHMITTGEN *et al.*, 2000). A enzima *Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase* (HPRT) foi utilizada como controle interno.

Tabela 4. Sequências de primers utilizados e respectivos pares de bases no ensaio de PCR em tempo real

Primers	Sequência (5' → 3')	Conc (nM)	Refs.
HPRT	Sense- GAAGGTCTTGCTCGAGATGTG Antisense- TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	300	Peinnequin <i>et al.</i> , 2004
TNF-α	Sense- CACCACGCTCTTCTGTCTAC Antisense- TVAAAACTCGAGTGACAAGCC	300	Lung <i>et al.</i> , 2001
TNFR1	Sense- ACCAAGTGCCAAAGGAAC Antisense- TGGTTCTGCGAAGCTGTAAA	150	Lung <i>et al.</i> , 2001
TNFR2	Sense- AAAGAAGCCCTCCTGCCTAC Antisense- GGGTGCTGTGGTAATAGGT	150	Lung <i>et al.</i> , 2001
NF-κB	Sense- GCTTTGCAAACCTGGGAATA Antisense- AGCCCCTTATACACGCCTCT	150	Bozinovski <i>et al.</i> , 2002
NOSi	Sense- AAAATGGTTTCCCCCAGTTC Antisense - GTCGATGGAGTCACATGCAG	150	Peinnequin <i>et al.</i> , 2004

2.7 Determinação da capacidade de espraçamento e fagocitose dos macrófagos

a) Obtenção de células através de lavado broncoalveolar (LBA)

Os animais foram anestesiados e tratados com a mistura dos poluentes conforme os itens 2.1 e 2.2. Após 3 horas, sob anestesia, os animais foram exsangüinados via artéria abdominal. Seguida a canulação da traquéia, o LBA foi realizado injetando-se lentamente 20 ml do tampão PBS. Após cuidadosa massagem na região torácica, o volume de PBS injetado no pulmão foi cuidadosamente aspirado e armazenado sob refrigeração (4°C).

b) Determinação da capacidade de espraçamento

A determinação da capacidade de espraçamento foi estimada pelo método descrito por RABINOVITCH & DE STEFANO (1973). Para isto, amostras de 18 ml do LBA foram centrifugadas (1000 rpm, 10 min; 4°C) e o botão celular (*pellet*) obtido foi corado com a solução de Turk para contagem total de células. Após a contagem, uma quantidade de 2×10^5 células foi colocada em 100 µl de meio RPMI 1640 contendo soro bovino (10%) e, em seguida, essa mistura foi disposta sobre lamínulas de vidro em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, as lamínulas contendo as células aderidas foram lavadas com 1 ml de PBS e incubadas com 1 ml de meio de cultura (RPMI 1640; 37°C) por 2 h para visualização do espraçamento.

c) Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos broncoalveolares

As células do LBA aderidas às lamínulas de vidro e espraçadas foram incubadas, por 40 min a 37°C, em 1 ml de meio RPMI 1640 contendo as partículas a serem fagocitadas numa atmosfera contendo CO₂ (5%). Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas com 1 ml de PBS e coradas

com a solução de ROSENFELD (1947). A porcentagem de fagocitose foi determinada em cada amostra, pela contagem de 100 células em microscópio de contraste de fase (Standard 25, Carl Zeiss - Alemanha), pelo número de macrófagos que fagocitaram mais de três partículas.

d) Fagocitose mediada por receptor C3b do complemento

A suspensão de zimosan (50-57 mg/ml), obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, foi diluída em tampão PBS (1:10, pH 7,4) e aspirada (de três a quatro vezes) em seringa estéril contendo agulha fina. A seguir, essa suspensão foi incubada, sob agitação constante, com o soro obtido de ratos normais, na proporção de 1:1, em temperatura a 37°C (COSTA ROSA *et al.*, 1992). Após 30 minutos, esse material foi centrifugado (168 g, 10 min) e o precipitado foi suspenso em tampão PBS (pH 7,4). Esse procedimento foi repetido por três vezes e após a última centrifugação, o material obtido foi suspenso em meio RPMI 1640 (1 ml/amostra) para o ensaio de fagocitose. O número de partículas de zimosan/lamínula foi de 2×10^6 .

2.8 Determinação da concentração de citocinas e quimiocina por enzima-imunoensaio (ELISA)

As concentrações das citocinas interleucina 1 β (IL-1 β), Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 10 (IL-10), Fator de necrose tumoral α (TNF- α), Interferon γ (IFN- γ) e quimiocina: proteína quimioatraente de monócito-1 (MCP-1) foram quantificadas em homogenatos de brônquio principal e na suspensão de macrófagos recolhidos de LBA de ratos controle e submetidos aos poluentes, tratados ou não com capsaicina, quando neonatos, por enzima-imunoensaio (ELISA).

Seguido o tratamento i.tr. dos animais com a mistura de poluentes ou veículo correspondente após 3 h, esses foram sacrificados por superdosagem anestésica, conforme descrito no item 2.2. Os brônquios dos animais foram homogeneizados em PBS contendo EDTA (10 mM). O homogenato obtido dos brônquios foi coletado, congelado em nitrogênio líquido e imediatamente armazenado em freezer -80°C. Para a análise em suspensão de macrófagos provenientes do LBA foram utilizadas 2×10^5 células em 1ml de meio RPMI 1640 antes e após o desafio com 50-57 mg de zimosan diluído em 1ml de meio RPMI 1640. Essas suspensões foram congeladas em freezer -80°C.

Quando necessário, placas de ELISA (Costar) foram sensibilizadas com 100 μ l do anticorpo de captura diluído em tampão carbonato (pH 9,5) para IL-1 β , IL-6, IFN- γ ou tampão fosfato (pH 6,5) para TNF- α , MCP-1, IL-10. As placas foram submetidas à incubação por 18 h (4°C) e em seguida foram bloqueadas com PBS + gelatina 3% (200 μ l/poço), por 3 h. Após este processo, as placas foram lavadas quatro vezes com PBST (PBS + Tween 80 [0,05%]) e, em cada poço, das duas primeiras fileiras, foram adicionadas 100 μ l de PBST + BSA (0,1%). Nestes poços foram dispostos, na razão de 1:2, os padrões das citocinas e quimiocina recombinantes. Nos demais poços, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado diluído em PBST + BSA (0,1%). Após 1 h de incubação, a reação foi bloqueada com ácido cítrico (0,2 M) e então a leitura foi feita em leitor de ELISA (DO 450 nm).

A quantidade das citocinas e quimiocina nas amostras foi calculada a partir das curvas-padrão utilizando IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α , MCP-1, IL-10 recombinantes, nas concentrações de 15,625; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000 e 2000 pg/ml.

2.9 *Análise da expressão de resíduos protéicos de nitrotirosina (3-NT) via Western blot em homogenatos de brônquio principal de ratos*

Amostras de brônquio principal de ratos após 3 h da instilação dos poluentes, conforme descrito no item 2.2 foram pesadas e homogeneizadas em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4; contendo 1 mM de PMSF numa proporção de 5 ml de tampão/grama de tecido. Em seguida, as amostras foram centrifugadas, em centrífuga Eppendorf modelo 5412 (Eppendorf, Califórnia, EUA) a 10,000 *g* por 2 min e os sobrenadantes foram submetidos às análises de NT por Western blot.

A concentração de proteínas totais nos homogenatos de tecidos foi determinada através do método de Bradford (1976). A curva padrão foi realizada utilizando-se uma solução de albumina de soro bovino nas concentrações de 2, 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml em duplicata. As amostras foram devidamente diluídas em água destilada, adicionando-se posteriormente 50 µl do reagente Comassie Blue. Após 5 min, a leitura de absorbância a 595 nm foi realizada em leitor de placas de ELISA (Molecular Devices, EUA).

a) Eletroforese

As amostras foram diluídas em tampão TRIS-HCl 50 mM, pH 7,4 na concentração final de 50 µg de proteína para cada 20 µl de amostra (volume total: 130 µl). A esta solução, foram acrescentados 30 µl de tampão de amostra composto de TRIS 2M pH 6,8 (2,3 ml); SDS 10% (15 ml); azul de bromofenol (7,5 mg), glicerol (q.s.p. 25 ml); β-mercapto etanol (5 ml). As amostras foram centrifugadas (10,000 *g*, 15 s) e aplicadas no gel de SDS-PAGE a 10%. O controle positivo utilizado foi albumina de soro bovino nitrada com peroxinitrito *in vitro*. Para todas as corridas eletroforéticas, foram aplicadas 5 µl da solução de

marcadores de peso molecular, 10 µl de cada amostra (concentração final: 2,5 µg/µl) e 6 µl do controle positivo (na concentração de 0,38 µg/µl). As proteínas foram separadas por eletroforese aplicando uma corrente constante de 35 mA durante aproximadamente 2 h.

b) Transferência

A transferência das proteínas do gel foi feita para uma membrana de nitrocelulose utilizando tampão de transferência contendo: glicina 9,4 g; TRIS 1,97 g; SDS 0,65 g; etanol 120 ml e água dest. 530 ml. Para tanto, foi feito um “sanduíche” na seguinte ordem: uma placa com orifícios, duas esponjas, três papéis de filtro, o gel, a membrana, três papéis de filtro, três esponjas e outra placa com orifícios. Esse sistema foi ligado à fonte, fixando-se o valor da corrente em 150 mA (voltagem 50V), durante 2 h. Após este período, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (solução a 0,2% de corante Ponceau em solução aquosa contendo 3% de ácido tricloro acético e 3% de ácido sulfosalicílico), para verificar a eficiência da transferência. Posteriormente, as membranas foram lavadas com solução TBS-T (20 mM de TRIS-HCl, 8% de NaCl contendo 0,1% de Tween-20).

c) Bloqueio de sítios inespecíficos e incubação com anticorpo

O bloqueio de sítios inespecíficos presentes nas membranas de nitrocelulose foi realizado através da incubação das membranas com uma solução de caseína (0,2% em TBS-T) por 1 h, sob agitação contínua. Após este período, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-nitrotirosina (camundongo), na diluição de 500 ng/ml em TBS-T, durante 16 h sob agitação contínua a 18°C.

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (6 vezes) durante 10 min, sob agitação a temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina na diluição de 1:3000 em TBS-T por 2 h. As membranas foram posteriormente lavadas novamente com TBS-T (6 vezes durante 10 min) e finalmente submetidas à revelação das bandas imunorreativas.

d) Revelação

A revelação foi feita através da captação dos sinais de quimiluminescência pelo sistema *Chemilmager 5500* (Alpha Innotech Corporation, CA, EUA) e a intensidade das bandas foi analisada mediante densitometria.

2.10 Quantificação da concentração de nitrito (NO_2^-) em suspensão de macrófagos broncoalveolares

A concentração de NO_2^- em suspensão de macrófagos obtidos do LBA de ratos tratados, conforme item 2.2, antes e após o segundo desafio com zimosan foi determinado utilizando o método de GRIESS (1982).

Rapidamente, 100 μl da suspensão de macrófagos foi incubado com igual volume de reagente de Griess (sulfanilamida 1% e *N*-[1-naphthyl] ethylenediamine 0,1%) em temperatura ambiente por 10 min. A absorbância foi medida em leitor de Elisa (540 nm) e a concentração de NO_2^- foi determinada utilizando a curva padrão de NaNO_2 , na concentração de 1 a 200 μM .

2.11 Tratamentos farmacológicos

a) Degeneração das fibras sensoriais

A capsaicina, princípio ativo extraído de pimentas vermelhas do gênero *capsicum*, possui a propriedade de degenerar as fibras sensoriais quando administrada em ratos neonatos na dose de 50 mg/kg. Brevemente, o anestésico cloridrato de lidocaína em gel (50 mg/2%) foi distribuído numa porção do dorso dos animais com dois dias de vida. A seguir, foi realizado à injeção subcutânea (s.c.) da solução de capsaicina (50 mg/kg) na região dorsal, no volume de 0,1 ml conforme (JANCSÓ *et al.*, 1967; COSTA *et al.*, 1997). Animais controle receberam o mesmo volume do veículo correspondente (etanol: tween 80: H₂O destilada; 1:1: 8). Os animais foram usados após 8-9 semanas.

b) Antagonismo farmacológico

A participação das taquicininas foi investigada com o auxílio do bloqueio dos receptores de taquicininas, utilizando antagonistas seletivos de receptores NK₁ (L-732, 138; 5 mg/kg, i.p.; BANG *et al.*, 2004) e NK₂ (SR48968, 1,6 µmol/kg, i.v.; TREVISANI *et al.*, 2005) administrados 30 e 5 minutos, respectivamente, antes da instilação i.tr. dos agentes testes.

2.12 Obtenção e preparação dos poluentes

Os poluentes foram cedidos pelo Prof. Dr. Yoshito Kumagai (Departamento de Medicina do Meio Ambiente, Universidade de Tsukuba, Japão).

As PED foram obtidas da engenharia do motor Mod 4JBI (4 cilindros 2,74 l, 10 HP, 1.500 rpm; Isuzu Automobile Co, Japão) via sistema de filtragem (PM_{<2,5}), conforme descrito previamente (SAGAI *et al.*, 1996; CHO *et al.*, 2004). A obtenção e purificação do composto 1,2-NQ foi realizada via cromatografia de camada delgada eluída em diclorometano (CHO *et al.*, 2004).

A suspensão de PED (ex.: estoque 1 mg/ml, m/v; pH 7,4) foi preparada em tampão PBS e Tween 80 (0,05%). A solução estoque da 1,2-NQ (3 μ mol/ml, m/v) foi preparada em DMSO (0,01%), Tween 80 (0,05%) e PBS (99,94%). Quando a mistura de poluentes foi utilizada, optou-se por usar o veículo do 1,2-NQ. Após o preparo da solução, ambos os compostos foram levados ao sonificador por 5 min e imediatamente antes da administração dos mesmos, estes foram colocados sob agitação (vortex) durante 3 min.

Os demais reagentes e substâncias químicas com suas respectivas procedências estão listados nas páginas 12 e 13.

2.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias $\pm$ EPM de valores absolutos ou porcentagem. Os mesmos foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), seguida pelo teste modificado de Bonferroni ou, quando apropriado, realizou-se teste *t* Student não-pareado. As diferenças entre as médias foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (software Prism 4.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

3 RESULTADOS

3.1 *Avaliação da permeabilidade vascular nas vias aéreas de ratos após administração dos poluentes*

A figura 4A ilustra o extravasamento plasmático induzido pela instilação i.tr. da suspensão das PED (1 e 5 mg/kg) após 15 min sobre a traquéia, brônquio principal e pulmão esquerdo de ratos. A figura 4B mostra o efeito causado pelo tratamento i.tr. com o composto 1,2-NQ (35 e 100 nmol/kg), no mesmo intervalo de tempo.

Doses crescentes de PED ou 1,2-NQ causaram extravasamento plasmático, de maneira dependente da dose, na traquéia e brônquio principal, mas não no pulmão dos animais (Figuras 4A e 4B). Na traquéia, a dose maior das PED (5 mg/kg) causou extravasamento plasmático estatisticamente diferente ($P < 0,01$) quando comparado ao grupo que recebeu o veículo dos poluentes ou a menor dose das PED (1 mg/kg; Figura 4A). Em contraste, ambas as doses de 1,2-NQ produziram extravasamento plasmático significativo na traquéia ($P < 0,05$ e $P < 0,001$, respectivamente) e brônquio principal ($P < 0,01$ e $P < 0,001$, respectivamente), mas não no pulmão de ratos, quando comparado ao grupo veículo. Quando comparado com a menor dose (35 nmol/kg), observamos um aumento significativo do extravasamento plasmático após a administração da maior dose ($P < 0,01$; 100 nmol/kg; Figura 4B) na traquéia dos animais.

A **B.**

Figura 4. Extravasamento plasmático evocado pela administração i.tr. de doses crescentes de PED ou 1,2-NQ nas vias aéreas de ratos. Painei A mostra o efeito, após 15 min, da injeção i.tr. das PED na traquéia, brônquio principal ou pulmão esquerdo de ratos. O Painei B ilustra o efeito induzido pelas diferentes doses da 1,2-NQ nas mesmas estruturas. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n=7-9$ animais. ^{*} $P<0,05$, ^{**} $P<0,01$ e ^{***} $P<0,001$ em comparação aos respectivos grupos controles (veículo). ^{##} $P<0,01$ versus a menor dose.

3.2 *Efeito da injeção simultânea dos poluentes na permeabilidade vascular nas vias aéreas de ratos.*

O extravasamento plasmático causado pela administração i.tr. da baixa dose da suspensão das PED (1 mg/kg) foi significativamente aumentado (resposta aditiva) pela co-administração com a menor dose da 1,2-NQ (35 nmol/kg), quando comparado ao efeito produzido por cada composto isoladamente ou pelo veículo, tanto na traquéia ($P<0,01$; Figura 5A) como no brônquio principal ($P<0,001$; Figura 5B).

3.3 *Determinação da eficácia do tratamento com capsaicina em ratos neonatos*

A eficácia do método utilizado na degeneração das fibras C foi avaliada pela injeção i.tr. de capsaicina (160 nmol/kg, $n=4$) em ratos anestesiados, a qual produziu aumento significativo do extravasamento plasmático na traquéia ($P<0,01$), brônquio principal ($P<0,001$) e pulmão esquerdo ($P<0,05$) de ratos quando comparado aos valores obtidos nas mesmas estruturas de animais que receberam injeção i.tr. do veículo da capsaicina (Etanol: Tween 80: H_2O 1:1:8; s.c; Figura 6A).

Porém, nos animais tratados com capsaicina (50 mg/kg, s.c.; $n=4$), quando neonatos, o extravasamento plasmático foi marcadamente reduzido na traquéia ($P<0,001$), brônquio principal ($P<0,01$) e pulmão esquerdo ($P<0,05$) desses animais em resposta à injeção i.tr. de capsaicina (160 nmol/kg) em comparação ao grupo controle, ou seja, os animais que não foram depletados de fibras C, quando neonatos (Figura 6B). Tais resultados indicam que o tratamento de animais neonatos com capsaicina foi efetivo.

A. Traquéia

B. Brônquio principal

Figura 5. Efeito aditivo da injeção i.tr. da mistura de PED + 1,2-NQ na traquéia (Painel A) e brônquio principal (Painel B) de ratos. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo controle (veículo). # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$ e ### $P < 0,001$ quando comparado ao grupo que recebeu cada poluente isoladamente.

A.

B.

Figura 6. Efeito da injeção i.tr. de capsaicina nas vias aéreas de ratos tratados ou não com capsaicina, quando neonatos. Painei A indica a resposta da capsaicina e do seu veículo administrados i.tr. na traquéia, brônquio principal e pulmão esquerdo de ratos normais. Painei B mostra a resposta da capsaicina administrada i.tr. em animais depletados de fibra C ou ratos normais. Dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n = 4$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparado ao grupo de animais que receberam o veículo da capsaicina (etanol:Tween 80:H₂O dest.1:1:8).

3.4 feito do tratamento neonatal com capsaicina sobre o extravasamento plasmático induzido pelos poluentes em vias aéreas de rato

A figura 7 ilustra que em animais submetidos ao tratamento com capsaicina, quando neonatos, o extravasamento plasmático induzido pela mistura dos poluentes (PED 1 mg/kg + 1,2 NQ 35 nmol/kg) foi significativamente reduzido na traquéia ($P<0,05$), brônquio principal ($P<0,01$) e pulmão esquerdo ($P<0,05$) quando comparado ao extravasamento plasmático observado no grupo de animais que receberam apenas o veículo da capsaicina.

Figura 7. Avaliação do tratamento neonatal com capsaicina sobre o extravasamento plasmático induzido pela mistura de poluentes nas vias aéreas de ratos. As barras vazias representam os animais que receberam o veículo da capsaicina, enquanto as barras cheias representam o efeito obtido nos animais tratados com capsaicina, quando neonatos. Ambos os grupos foram expostos aos poluentes ou veículo dos poluentes. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M. para $n= 4-10$ animais. ** $P<0,01$ e *** $P<0,001$ comparado ao grupo que recebeu veículo dos poluentes. # $P<0,05$ e ## $P<0,01$ versus grupo de ratos normais que receberam os poluentes.

3.5 Papel dos antagonistas de receptores NK_1 e NK_2 na permeabilidade vascular induzida pelos poluentes em vias aéreas de rato

A figura 8 ilustra as médias e EPM do extravasamento plasmático induzido pela injeção i.tr. da mistura dos poluentes nas vias aéreas de ratos controles e pré-tratados com antagonistas de receptores NK_1 (L-732,138; 5 mg/kg; i.p. -30 min) e NK_2 (SR48968; 1,6 μ mol/kg; i.v. -5 min), respectivamente. Nota-se que o composto L-732, 138 promoveu inibição significativa do extravasamento plasmático induzido por esses poluentes na traquéia ($P<0,05$) e brônquio principal ($P<0,01$). Da mesma forma, o antagonista de receptores NK_2 promoveu inibição parcial, mas significativa, da resposta produzida pelos poluentes nas mesmas estruturas ($P<0,05$).

Figura 8. Efeito de antagonistas de receptores de taquicinas sobre o extravasamento plasmático evocado pela mistura de poluentes nas vias aéreas de rato. As barras vazias mostram o efeito dos poluentes em animais controles que receberam o veículo dos antagonistas. As barras cheias ilustram o efeito dos poluentes em ratos tratados com o antagonista de receptores NK_1 (5 mg/kg; -30 min, i.p.). As barras listradas o efeito dos poluentes em ratos tratados com o antagonista de receptores NK_2 (1,6 μ mol/kg; -5 min, e.v.). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n= 3-4$ animais. * $P<0,05$ e ** $P<0,01$ comparado ao grupo controle, que recebeu o veículo dos antagonistas.

3.6 Avaliação da atividade da enzima MPO nas vias aéreas de animais tratados com os poluentes

A tabela 5 demonstra que a injeção i.tr. de PED (1 mg/kg) ou 1,2-NQ (35 nmol/kg) após 3 horas, não promoveu aumento significativo na atividade da MPO comparado com o grupo que recebeu o veículo dos poluentes. Porém, a injeção simultânea desses compostos promoveu aumento significativo da atividade da MPO na traquéia ($P < 0,05$) e brônquio principal ($P < 0,01$), mas não no pulmão, em relação ao grupo que recebeu o veículo.

Tabela 5. Efeito da administração i.tr. dos poluentes (após 3 h) sobre a atividade da MPO no trato respiratório de ratos. Os valores representam os efeitos dos compostos administrados isoladamente ou associados em traquéia, brônquio principal e pulmão esquerdo de ratos. Dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=4$ animais. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ comparado com o grupo veículo.

TRATAMENTOS	Atividade da MPO (U/g tecido)			
	TRAQUÉIA	BRÔNQUIO	PULMÃO	n
Veículo	$0,15 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,01$	4
PED (1 mg/kg)	$0,16 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,01$	4
1,2-NQ (35 nmol/kg)	$0,20 \pm 0,04$	$0,12 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,02$	4
PED + 1,2 NQ (1 mg/kg + 35 nmol/kg)	$0,23 \pm 0,01^*$	$0,23 \pm 0,03^{**}$	$0,20 \pm 0,01$	4

3.7 Efeito do tratamento neonatal com capsaicina sobre a atividade da MPO em vias aéreas de ratos após exposição aos poluentes

A injeção i.tr. da mistura de poluentes produziu aumento significativo na atividade da MPO em relação ao grupo que recebeu o veículo da capsaicina (Figuras 9A e 9B). Nos animais tratados com capsaicina, quando neonatos, a administração i.tr. da mistura de poluentes na traquéia ($P < 0,05$; Fig 9A) e no brônquio principal ($P < 0,05$; Fig 9B) causou potencialização da atividade da MPO quando comparado aos animais não tratados com capsaicina que receberam igual mistura de poluentes. Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na atividade da MPO nos pulmões dos animais (dados não mostrados; $n = 4-8$).

A. Traquéia

B. Brônquio principal

Figura 9. Atividade da MPO frente aos poluentes na traquéia e brônquio principal de ratos tratados ou não com capsaicina. O painel A mostra o efeito da mistura dos poluentes na traquéia, enquanto o painel B ilustra o efeito da mistura de poluentes no brônquio principal de animais pré-tratados com capsaicina (barras listradas), ou veículo da capsaicina (barras vazias). Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n = 4-8$ animais. * $P < 0,05$ comparado com o grupo veículo.

3.8 Envolvimento dos receptores de taquicininas na atividade da MPO induzida pelos poluentes em vias aéreas de rato

A figura 10 demonstra que a atividade da MPO nas vias aéreas (traquéia e brônquio principal) de ratos expostos aos poluentes, após 3 horas, foi incrementada ($P < 0,05$) mediante pré-tratamento dos ratos com os antagonistas de receptores NK_1 (L-732,138; 5 mg/kg, i.p., -30 min) e NK_2 (SR48968, 1,6 $\mu\text{mol/kg}$; i.v. -5 min). Nota-se que o aumento dessa atividade está discretamente maior no grupo tratado com o antagonista NK_1 quando comparado com antagonista NK_2 . Não foram observadas alterações estatisticamente significativas na atividade da MPO nos pulmões dos animais (dados não demonstrados; $n = 4-8$).

Figura 10. Efeito dos antagonistas NK_1 (L-732,138) e NK_2 (SR48968) na atividade da MPO em vias aéreas de ratos. Os animais foram pré-tratados com os antagonistas NK_1 (5 mg/kg, i.p. -30 min) e NK_2 (1,6 $\mu\text{mol/kg}$; i.v. -5 min) e posteriormente expostos à mistura de poluentes por 3 h. As barras vazias representam os grupos tratados com salina e poluentes, enquanto as barras listradas representam grupos tratados com os poluentes e antagonistas NK_1 e NK_2 , respectivamente. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n = 5-8$ animais. * $P < 0,05$ comparado aos respectivos grupos veículos.

3.9 Efeito dos poluentes sobre a expressão gênica dos receptores TRPV1 e de taquicininas NK₁ e NK₂ em brônquio principal de rato

Com o auxílio da metodologia de RT-PCR, verificou-se que após três horas do tratamento i.tr. com as PED (1 mg/kg) ou 1,2-NQ (35 nmol/kg), administrados isoladamente, não houve alterações significativas na expressão (RNAm) dos receptores TRPV1 (Figura 11) ou do receptor de taquicininina NK₂ (Figura 12B) no brônquio desses animais em comparação aos animais tratados com o veículo dos poluentes.

Em contraste, níveis significativos da expressão (RNAm) dos receptores NK₁ foram detectados no brônquio principal de ratos tratados com 1,2-NQ (35 nmol/kg) ($P < 0,05$; Figura 12A), mas não foi capaz de alterar a expressão do RNAm dos receptores TRPV1 (Figura 11) e NK₂ (Figura 12B).

A injeção i.tr. da mistura de poluentes causou aumento significativo (RNAm) dos receptores TRPV1 ($P < 0,05$; Figura 11) e de taquicinininas NK₁ ($P < 0,05$; Figura 12A) e NK₂ ($P < 0,01$; Figura 12B). Em animais tratados com capsaicina, nota-se que o tratamento com a mistura dos poluentes reduziu significativamente a expressão (RNAm) dos receptores TRPV1 ($P < 0,05$; Figura 11) e de taquicinininas NK₁ ($P < 0,05$; Figura 12A) e NK₂ ($P < 0,01$; Figura 12B) em relação ao grupo que recebeu somente a mistura dos poluentes.

Figura 11. Efeito do tratamento i.tr. com os poluentes (após 3 h) sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores TRPV1. A barra vazia representa os animais tratados com o veículo dos poluentes enquanto as barras listradas representam as expressões do receptor TRPV1 nos animais tratados com poluentes. A barra cheia representa os animais tratados com capsaicina, quando neonatos, expostos a mistura dos poluentes. As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 2 μ g do RNA total. GAPDH atua como controle interno das células. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=3-5$ animais. * $P < 0,05$ versus veículo. # $P < 0,05$ versus grupo tratado com a mistura dos poluentes que receberam capsaicina, quando neonatos.

A.

B.

Figura 12. Efeito do tratamento i.tr. com os poluentes (após 3 h) sobre a expressão gênica (RNAm) de receptores de taquicinas NK₁ (painel 12A) e NK₂ (painel 12B) em brônquio principal de ratos. A barra vazia representa os animais tratados com o veículo dos poluentes enquanto as barras listradas representam as expressões dos receptores NK₁ e NK₂ nos animais tratados com poluentes. A barra cheia representa os animais tratados com capsaicina, quando neonatos, expostos a mistura dos poluentes. As fotos são representativas dos produtos de RT-PCR obtidos a partir de 2 µg do RNA total. O GAPDH atua como controle interno das células. Os dados estão expressos como a média ± E.P.M. para n=3-5 animais. *P<0,05, **P<0,05 *versus* veículo. #P<0,05 e ##P<0,01 *versus* grupo tratado com a mistura dos poluentes que receberam capsaicina, quando neonatos.

3.10 Quantificação da expressão gênica do $TNF-\alpha$, $TNFR1$, $TNFR2$, $NF-\kappa B$ e $NOSi$ por real-time RT-PCR em brônquio principal de rato exposto aos poluentes

A expressão gênica da citocina $TNF-\alpha$ e dos seus receptores $TNFR1$ e $TNFR2$ foi aumentada no brônquio de ratos tratados isoladamente com 1,2-NQ comparado com o respectivo veículo (Figura 13A-C). No brônquio de ratos tratados com as PED, a expressão do receptor $TNFR1$, mas não do $TNF-\alpha$ e receptor $TNFR2$, foi alterada ($P<0,05$) quando comparada com animais que receberam o veículo (Figura 13A-C). No grupo de animais que recebeu a mistura dos poluentes (DEP+1,2-NQ), observou-se um aumento significativo apenas na expressão do receptor $TNFR1$ ($P<0,001$) comparado com o grupo veículo.

No grupo de animais pré-tratado com capsaicina que recebeu a mistura dos poluentes foi observado um aumento significativo das expressões gênicas do $TNF-\alpha$ ($P<0,01$) e seus receptores $TNFR1$ ($P<0,05$) e $TNFR2$ ($P<0,001$) comparado com o grupo de animais que receberam apenas a mistura dos poluentes (Figura 13A-C).

A expressão gênica do $NF-\kappa B$ não foi diferente entre os diferentes grupos controle e injetados com os poluentes (Figura 14).

A mistura de poluentes não causou alteração significativa na expressão da $NOSi$, exceto as PEDs isoladas ($P<0,05$), em relação ao grupo veículo. Já nos animais tratados com capsaicina, a administração da mistura de poluentes causou um aumento marcante na expressão de $NOSi$ comparado aos animais expostos aos mesmos poluentes, não tratados com capsaicina ($P<0,01$; Figura15).

A.

B.

C.

Figura 13. Análise da expressão do gene da citocina TNF- α (painel 13A) e seus receptores TNFR1 (painel 13B), TNFR2 (painel 13C) em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com os poluentes e seus veículos (após 3 h), pelo ensaio de RT-PCR com quantificação em tempo real. A barra vazia representa os animais tratados com o veículo dos poluentes enquanto as barras listradas representam as expressões da citocina TNF- α e dos seus receptores TNFR1 e TNFR2 nos animais tratados com poluentes. A barra cheia representa os animais tratados com capsicina, quando neonatos, expostos a mistura dos poluentes. Os resultados são apresentados como diferença entre os valores de cycle threshold (Δ Ct). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=3-5 animais. *P<0,05, **P<0,01 e ***P<0,001 *versus* veículo. #P<0,05, ##P<0,01 e ###P<0,001 *versus* grupo tratado com a mistura dos poluentes que receberam capsicina, quando neonatos.

Figura 14. Análise da expressão do gene do fator de transcrição NF- κ B em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com os poluentes e seus veículos (após 3 h), pelo ensaio de RT-PCR com quantificação em tempo real. A barra vazia representa os animais tratados com o veículo dos poluentes enquanto as barras listradas representam a expressão do NF- κ B nos animais tratados com poluentes. A barra cheia representa os animais tratados com capsaicina, quando neonatos, expostos a mistura dos poluentes. Os resultados são apresentados como diferença entre os valores de cycle threshold (ΔCt). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=3-5$ animais.

Figura 15. Análise da expressão do gene da NOSi em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com os poluentes e seus veículos (após 3 h), pelo ensaio de RT-PCR com quantificação em tempo real. A barra vazia representa os animais tratados com o veículo dos poluentes enquanto as barras listradas representam a expressão de NOSi nos animais tratados com poluentes. A barra cheia representa os animais tratados com capsaicina, quando neonatos, expostos a mistura dos poluentes. Os resultados são apresentados como diferença entre os valores de cycle threshold (ΔCt). Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=3-5$ animais. * $P<0,05$ versus veículo. ## $P<0,01$ versus grupo tratado com a mistura dos poluentes que receberam capsaicina, quando neonatos.

3.11 Determinação das concentrações de citocinas e quimiocina em brônquio principal de ratos expostos aos poluentes.

As concentrações de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ e da quimiocina MCP-1 foram quantificadas em homogenatos de brônquio principal de ratos 3 h após a injeção i.tr. dos poluentes em animais tratados, ou não, com capsaicina, quando neonatos. Os dados revelaram aumento significativo nos níveis das citocinas IL-1 β ($P < 0,05$; Figura 16A), IL-6 ($P < 0,05$; Figura 16B), TNF- α ($P < 0,05$; Figura 16C) no homogenato de brônquio de animais tratados com a mistura dos poluentes, quando comparado com o grupo veículo dos poluentes. De modo semelhante, nos animais tratados com a mistura dos poluentes que receberam capsaicina, quando neonatos, foi observado um aumento significativo nas concentrações destas citocinas quando comparado com animais tratados capsaicina que receberam apenas o veículo dos poluentes: IL-1 β ($P < 0,05$; Figura 16A), IL-6 ($P < 0,05$; Figura 16B), TNF- α ($P < 0,05$; Figura 16C).

Os níveis de IL-10 não foram alterados nos animais saudáveis expostos à mistura de poluentes em relação ao grupo veículo (Figura 16E). Nos animais previamente tratados com capsaicina e a mistura dos poluentes, níveis significativos de IL-10 foram encontrados quando comparado com animais saudáveis expostos aos poluentes ou animais tratados com capsaicina que receberam apenas o veículo dos poluentes ($P < 0,01$; Figura 16E). Houve ainda um aumento significativo da IL-1 β ($P < 0,05$; Figura 16A), IFN- γ ($P < 0,05$; Figura 16 d), nos animais pré-tratados com capsaicina que receberam os poluentes em relação ao grupo tratado apenas com os poluentes e veículo da capsaicina. Os níveis de MCP-1 não foram diferentes entre os grupos (Figura 16F).

Figura 16. Concentração das citocinas IL-1 β (Painel A), IL-6 (Painel B), TNF- α (Painel C), IFN- γ (Painel D), IL-10 (Painel E) e da quimiocina MCP-1 (Painel F) em homogenatos de brônquio principal de ratos tratados (3 h) com injeção i.tr. dos poluentes (PED + 1,2-NQ), que receberam capsaicina ou não, quando neonatos. As barras vazias representam os animais tratados com o veículo da capsaicina. As barras cheias os animais tratados com capsaicina, quando neonatos. * $P < 0,05$ comparado ao grupo veículo dos poluentes que receberam ou não capsaicina, quando neonatos. # $P < 0,05$ e ## $P < 0,01$ comparado ao grupo tratado com os poluentes que não receberam capsaicina, quando neonatos ou com o grupo que recebeu o veículo dos poluentes, tratados apenas com o veículo da capsaicina, quando neonatos.

3.12 Efeito da mistura dos poluentes sobre a fagocitose mediada pelo receptor C3b do complemento em animais tratados com capsaicina ou veículo

A figura 16 ilustra que, após 3 horas, mistura dos poluentes em animais saudáveis aumentou a taxa de fagocitose de partículas de zimosan opsonizado (37,76%, de aumento; $P < 0,05$) quando comparado com animais saudáveis tratados com o veículo dos poluentes (Tween 80 + DMSO).

De modo semelhante, porém em maior intensidade, quando a mistura dos poluentes foi administrada nos animais tratados com capsaicina, quando neonatos, a atividade fagocítica foi estatisticamente diferente em comparação com os animais sadios tratados com os poluentes (55,3% de aumento $P < 0,05$) ou em comparação com animais tratados com capsaicina, quando neonatos, que receberam somente o veículo dos poluentes (Figura 16). Este experimento mostrou ainda que em animais pré-tratados com capsaicina e veículo dos poluentes, houve um aumento significativo da atividade fagocítica quando comparado com animais não tratados com capsaicina ($P < 0,05$; Figura 16).

Fotomicrografias das lâminas de macrófagos alveolares de animais saudáveis ou depletados de neuropeptídeos (com ou sem poluentes) estão representados na Figura 17. Após o estímulo *in vivo* (poluentes), os macrófagos alveolares obtidos destes animais *in vitro* foram incubados com o zimosan opsonizado. Nos animais depletados de neuropeptídeos e exposto aos poluentes, a formação de fagossomos devido ao engolfamento de partículas de zimosan, bem como o aumento dos corpos celulares dos macrófagos pela emissão de prolongamentos citoplasmáticos (alterações morfológicas citoplasmáticas) foi mais acentuada em comparação ao grupo que recebeu o veículo ou mesmo os animais saudáveis que receberam os poluentes.

Figura 16. Efeito da mistura dos poluentes PED (1 mg/kg) + 1,2-NQ (35 nmol/kg) em animais tratados ou não com capsaicina (50 mg/kg), quando neonatos, sobre a taxa de fagocitose por macrófagos brônquicos alveolares: ensaio *in vivo*. A barra vazia representa a taxa de fagocitose do zimosan apenas no meio de cultura RPMI 140. As barras listradas representam a taxa de fagocitose em animais saudáveis que receberam o veículo e mistura dos poluentes, respectivamente. As barras cheias ilustram os animais tratados com capsaicina, quando neonatos, que receberam o veículo e a mistura dos poluentes. A porcentagem de fagocitose foi determinada em microscópio de contraste de fase. Os macrófagos foram coletados do LBA, 3 h após o tratamento, por via i.tr, da mistura dos poluentes ou veículo dos poluentes, no volume de 100 μ l. Os dados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n= 3-6 animais. *P<0,05 comparado com o respectivo grupo veículo, tratados ou não com capsaicina, quando neonatos. #P<0,05 *versus* grupo de ratos não tratados com capsaicina, quando neonatos, que recebeu os poluentes. Ψ P<0,05 *versus* grupo de ratos não tratado com capsaicina que recebeu o veículo dos poluentes.

Figura 18. Macrófagos obtidos do LBA de ratos, tratados com o veículo ou com poluentes, de animais submetidos ou não ao tratamento com capsaicina, quando neonatos, espreiados e submetidos ao ensaio de fagocitose com partículas de zimosan opsonizado. As Figuras A e B representam a fagocitose de partículas de zimosan dos grupos veículos. As Figuras C e D representam a fagocitose de partículas de zimosan dos grupos que receberam a mistura dos poluentes tratados ou não com capsaicina, quando neonatos. As fotos foram realizadas em câmara fotográfica Kodak acoplada ao microscópio de contraste de fase com um aumento 60x. (→ Partícula de zimosan).

3.13 Efeito dos poluentes sobre a produção de citocinas e quimiocina na suspensão de macrófagos do LBA

As concentrações de citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ ou da quimiocina MCP-1, na ausência e presença de zimosan, foram quantificadas na suspensão de macrófagos do LBA de ratos saudáveis ou tratados com capsaicina, 3 h após a injeção i.tr. da mistura dos poluentes.

A injeção i.tr. da mistura de poluentes em ratos saudáveis não causou aumento significativo nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (Figura 19A) e IL-6 (Figura 19C) ou antiinflamatória (IL-10) (Figura 19E) em comparação com animais que receberam o veículo dos poluentes, tratados apenas com o veículo da capsaicina, quando neonatos.

Contudo, em animais privados de fibras C pelo tratamento neonatal com a capsaicina, a injeção i.tr. com a mistura dos poluentes causou um aumento significativo nas concentrações de IL-1 β (Figuras 19A; $P < 0,05$), sem interferir nas concentrações de IL-6 (Figuras 19C) e IL-10 (Figuras 19E) quando comparado com valores presentes na suspensão de macrófagos do grupo saudável ou tratado com capsaicina, que recebeu o veículo dos poluentes.

A figura 19B ilustra que após o segundo desafio dos fagócitos com o zimosan, ocorreu um aumento significativo na concentração de IL-1 β na suspensão dos macrófagos dos animais pré-tratados com capsaicina que receberam a mistura dos poluentes quando comparado aos respectivos grupos controles, que receberam o veículo dos poluentes ($P < 0,05$).

Já a concentração da IL-6 não foi alterada na suspensão das células dos animais saudáveis expostos aos dois desafios, poluentes e zimosan, em relação ao grupo controle que recebeu o veículo dos poluentes. Contudo, observou-se

aumento significativo dessa citocina nos animais pré-tratados com capsaicina, quando neonatos, e que receberam os poluentes em relação ao grupo de animais saudáveis expostos aos poluentes ou em comparação aos animais tratados com capsaicina que receberam o veículo dos poluentes, após o desafio com zimosan ($P < 0,05$; Figura 19D).

Assim como antes do desafio com zimosan, após o segundo desafio *in vitro*, não foram observadas alterações significativas nas concentrações da IL-10 na suspensão de células dos animais (saudáveis ou pré-tratados com capsaicina) tratados com os poluentes em comparação com animais controle, que receberam o veículo dos poluentes (Figura 19F).

Durante este ensaio, não foram detectadas concentrações mensuráveis, dentro da sensibilidade da técnica utilizada, da citocina TNF- α e IFN- γ ou da quimiocina MCP-1 nas suspensões de macrófagos dos diferentes grupos experimentais.

Figura 19. Concentração das citocinas IL-1 β na ausência e presença de zimosan (Painel A e B, respectivamente), IL-6 na ausência e presença de zimosan (Painel C e D, respectivamente), IL-10 na ausência e presença de zimosan (Painel E e F, respectivamente), na suspensão de macrófagos do LBA de ratos, tratados (3 h) com injeção i.tr. dos poluentes (PED + 1,2-NQ), que receberam capsaicina ou não, quando neonatos. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para n=3-6 animais. *P<0,05 comparado ao grupo veículo dos poluentes, tratados ou não com capsaicina. #P<0,05 e ##P<0,01 comparado com grupo que recebeu à mistura dos poluentes não tratados com capsaicina, quando neonato para n=3-6 animais.

3.14 Análise da expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) por Western blot em brônquio principal de ratos após exposição aos poluentes

A análise de Western blot não revelou alterações significativas na expressão basal da 3-NT em homogenato de células bronquiais dos diferentes grupos experimentais (Figura 20).

Figura 20. Western blot representativo da expressão de proteínas nitradas em resíduos de tirosina (3-NT) em homogenatos de brônquio principal de ratos (sadios ou pré-tratados com capsaicina) que receberam injeção i.tr. dos poluentes ou veículo. Banda 1. Veículo, banda 2. PED, banda 3. 1,2-NQ, banda 4. DEP+1,2-NQ, banda 5. DEP+1,2-NQ+capsaicina, (+) Albumina nitrada (NTBSA). As bandas são representativas da expressão de n=3-6 animais. NTBSA foi usado como controle positivo. kDa=Peso molecular.

3.15 Concentração de nitrito (NO_2^-) em suspensão de macrófagos de ratos expostos aos poluentes, antes e após o desafio com zimosan (in vitro)

A figura 21A ilustra que o tratamento i.tr. dos animais saudáveis com a mistura de poluentes, após 3 horas, não foi capaz de alterar significativamente a concentração basal de NO_2^- na suspensão de células desses animais quando comparado com o grupo controle, que recebeu o veículo dos poluentes.

Da mesma forma, concentrações estatisticamente não significativas de NO_2^- foram obtidas na suspensão de células de animais previamente tratados com capsaicina, e que receberam a mistura de poluentes, bem como o segundo estímulo com zimosan (Figura 21B).

A.

B.

Figura 21. Concentração de nitrito (NO_2^-) em suspensão de macrófagos broncoalveolares de animais que receberam a mistura dos poluentes, tratados ou não com capsaicina, quando neonatos. O painel A ilustra a produção de NO_2^- na suspensão de células de animais saudáveis ou pré-tratados com capsaicina que receberam a mistura dos poluentes ou seu veículo. O painel B mostra os mesmos tratamentos e grupos mediante um segundo estímulo, zimosan. Barras vazias representam animais tratados com o veículo da capsaicina, expostos ao veículo ou poluentes, enquanto as barras cheias representam os grupos tratados com capsaicina, quando neonato, expostos ao veículo ou poluentes. Os dados estão expressos como a média $\pm$ E.P.M. para $n=3-6$ animais.

4 DISCUSSÃO

Devido à posição anatômica e ao papel funcional do trato respiratório, a qualidade do ar inspirado pode, muitas vezes, comprometer a função deste sistema e desencadear reações inflamatórias capazes de promover efeitos em outros compartimentos (NEMMAR *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2005; FRANCO *et al.*, 2006; veja revisão, WIDDICOMBE & LEE, 2001). Existem várias evidências epidemiológicas e poucas farmacológicas de que diferentes níveis de poluentes atmosféricos causam desconforto ou podem afetar, de forma severa, a saúde de adultos e neonatos (JALALUDIN *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2004; NAESS *et al.*, 2007). Os efeitos adversos do fumo sobre o trato respiratório e aparelho cardiovascular de fumantes são bem conhecidos, mas os indícios do efeito irritante da poluição atmosférica sobre tais sistemas são ainda pouco explorados. Apesar do conhecimento da toxicidade de alguns contaminantes ambientais (ex.: compostos reativos), pouco se sabe sobre os efeitos nocivos da interação entre o composto químico reativo 1,2-naftoquinona e o MP liberado da exaustão do diesel (PED) e mecanismos envolvidos na inflamação das vias aéreas.

Considerada um dos principais constituintes do MP ambiental nas aéreas urbanas, as PED têm sido implicadas no desencadeamento de doenças inflamatórias e cardiovasculares (HARROD *et al.*, 2003; NEMMAR *et al.*, 2007). Além disso, compostos químicos reativos tais como quinonas e seus produtos de redução (ex. hidroquinona, semiquinonas), encontrados na natureza ou em MP suspenso no ar (CHO *et al.*, 2004; XIA *et al.*, 2004), são de particular interesse farmacológico e toxicológico, pois produzem, via mecanismos bem complexos, uma variedade de efeitos nocivos sobre a saúde da população. Dentre estes efeitos, destacam-se: a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio,

promover ligações covalentes com macromoléculas dos tecidos (CADENAS *et al.*, 1992) que levam à citotoxicidade e morte celular (CHO *et al.*, 2004) e, ainda, interferem com reações enzimáticas, causando imunotoxicidade e carcinogênese (veja revisão, MONKS & JONES, 2002).

Um dos primeiros aspectos deste trabalho consistiu em caracterizar se a 1,2-NQ, quando administrada simultaneamente com as PED, intensificava a resposta induzida pela aplicação i.tr. deste MP em vias aéreas de ratos. Em segunda instância, averiguou-se o mecanismo da possível resposta inflamatória induzida por tais poluentes, com ênfase no mecanismo neurogênico. Isto foi realizado mediante ensaios *in vitro* (testes bioquímicos e moleculares) e *in vivo*, utilizando o bloqueio farmacológico de receptores de taquicininas (NK₁ e NK₂) e animais depletados de neuropeptídeos pelo tratamento de ratos neonatos com a capsaicina (JANCSÓ *et al.*, 1977; COSTA *et al.*, 1997).

Ao investigar o efeito da administração i.tr. de baixas doses de 1,2-NQ (35 nmol/kg) ou PED (1 mg/kg) em vias aéreas de ratos Wistar, ficou claro que a 1,2-NQ, mas não o MP, aumentou significativamente a permeabilidade vascular e o extravasamento plasmático (edema) na traquéia e brônquio principal, mas não no pulmão dos animais, após um período de 15 minutos. Estas evidências indicam que a 1,2-NQ, em baixa dose, apresentou relevância deletéria maior do que as PED sobre as vias aéreas de ratos em um curto período de tempo. Já na maior dose, a injeção i.tr. das PED (5 mg/kg) produziu extravasamento plasmático (edema) significativo na traquéia e brônquio, mas não no pulmão dos animais. Na dose mais elevada da 1,2-NQ (100 nmol/kg), o edema nestas mesmas estruturas foi maior do que aquele obtido com a menor dose, demonstrando assim um perfil inflamatório para os poluentes dependente da dose. Sabido que a menor dose

das PED não causou edema significativo nas vias aéreas de ratos, evidenciou-se a seguir que a injeção simultânea da 1,2-NQ, na menor dose, com as PED promoveu efeito aditivo ($P < 0,01$) no edema induzido por este MP (1 mg/kg) na traquéia e brônquio principal dos animais. Isto demonstrou que a 1,2-NQ, quando associada ao MP, intensifica o efeito deletério deste sobre as vias aéreas de ratos. Com base na literatura disponível, esta é a primeira vez que se demonstrou experimentalmente o efeito sinérgico da 1,2-NQ sobre as ações das PED em vias aéreas de ratos *in vivo*.

O extravasamento plasmático representa um dos sinais clássicos da inflamação (ex.: asma) nas vias aéreas (BURNETT *et al.*, 1999). Estabelecido que este efeito é altamente influenciado pela exposição simultânea dos poluentes PED e 1,2-NQ, avaliou-se a seguir o efeito destes poluentes (isolados ou mistura) sobre a celularidade (e fagocitose). O neutrófilo, considerado fagócito profissional, realiza o processo de fagocitose similar ao macrófago, porém não apresenta antígenos. Devido à sua participação ativa na inflamação aguda, seu principal mecanismo de morte celular é o sistema mieloperoxidase-hialida, que forma radicais HOCl - responsáveis pela oxidação das moléculas ou microorganismos fagocitados. A avaliação da atividade enzimática da MPO (presente em grânulos de neutrófilos e também monócitos) nas células da traquéia e brônquio principal de ratos que receberam a instilação i.tr. das PED ou 1,2-NQ não mostrou diferença estatística na atividade desta enzima em comparação com a atividade da MPO no grupo controle, excluindo, portanto, a capacidade destes compostos promoverem isoladamente o influxo de neutrófilos. Entretanto, a injeção i.tr. da mistura destes poluentes resultou em aumento significativo do influxo de leucócitos (atividade da MPO) nas células da traquéia e brônquio principal, sem,

contudo, afetar a atividade basal desta enzima no parênquima pulmonar dos animais. Assim como os dados de permeabilidade vascular obtidos com a mistura de poluentes, estes resultados apontam que a 1,2-NQ, quando associada ao MP do diesel, potencializou a atividade da MPO na traquéia e brônquio principal dos animais.

A ausência de efeitos destes poluentes isolados sobre a permeabilidade vascular e o influxo de neutrófilos no parênquima pulmonar ainda não estar bem estabelecida. Porém, é provável que a dose administrada dos mesmos não fosse suficiente para causar extravasamento plasmático dos vasos sanguíneos da circulação pulmonar, visto que em outro estudo em andamento em nosso laboratório, doses maiores destes compostos foram capazes de causar efeitos significativos no pulmão e em outros compartimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2007). As PED utilizadas neste estudo possuem diâmetro em torno de $<2,5 \mu\text{m}$. Todavia, a inflamação evocada pelo MP não depende somente do tamanho das partículas, mas também da concentração das mesmas e cargas positivas associadas a elas (HAMOIR *et al.*, 2003), pois VERONESI e colaboradores (2000) mostraram que o MP da queima de óleo industrial (ROFA - residual oil fly ash) causou neutrofilia no lavado broncoalveolar de camundongos. Neste sentido, NEMMAR e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção i.tr. das PED, numa dose inferior a deste estudo, causou influxo de neutrófilos no pulmão de cobaias. A discrepância entre estes e o presente estudo está, provavelmente, relacionada aos diversos fatores, incluindo características físico-químicas dos compostos, volume e dose administrada, tempo de exposição, tamanho das partículas e espécie animal, visto que o efeito deste e de outros MP sobre a migração celular

foi demonstrado por outros MP em outros estudos (VERONESI *et al.*, 2000; NEMMAR *et al.*, 2003; YANAGISAWA *et al.*, 2004).

Os aspectos celular, bioquímico e molecular responsáveis pelo acúmulo de leucócitos no foco inflamatório é um fenômeno complexo, que depende da interação leucócito-endotélio, moléculas de adesão (*caderinas, selectinas, imunoglobulinas e integrinas*) e geração local de mediadores químicos como as citocinas. O processo inflamatório de vias aéreas está associado à maior produção de citocinas pró-inflamatórias por células epiteliais (ACKERMAN *et al.*, 1994), macrófagos (GOSSET *et al.*, 1992), mastócitos (GORDON *et al.*, 1990) e eosinófilos (FINOTTO *et al.*, 1994; SHAH *et al.*, 1995). As citocinas também apresentam papel relevante na ativação celular, proliferação, diferenciação celular, adesão, migração e síntese de proteínas da fase aguda. Além disso, estudos clínicos e experimentais apontam as citocinas como alvo em doenças pulmonares obstrutivas crônicas (veja revisão, BARNES, 2005; CHUNG, 2006). Dentre as citocinas envolvidas nas reações inflamatórias das vias aéreas, o TNF- α possui um papel de destaque, pois, além de recrutar leucócitos nas vias aéreas, aumenta a aderência de neutrófilos e monócitos à matriz celular, estimula a proliferação de fibroblastos e a produção de outras citocinas inflamatórias (THOMMESEN *et al.*, 1998). Ainda, causa hiperreatividade brônquica (KIPS *et al.*, 1992; YATES *et al.*, 1993), edema pulmonar, redução da complacência pulmonar e hipóxia arterial (veja revisão, BRIGHAM & MEYRICK, 1986). Juntamente com o TNF- α , outras citocinas (IL-1, IL-6 e IL-8) foram mensuradas no escarro de pacientes com doença inflamatória pulmonar (veja revisão, CHUNG, 2005; XU *et al.*, 2007). A quantificação de citocinas e quimiocinas em células do brônquio principal de ratos saudáveis expostos à mistura dos poluentes PED e 1,2-NQ

revelou aumento da geração de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , sem, entretanto, interferir na concentração basal da citocina antiinflamatória IL-10, da quimiocina MCP-1 e da citocina INF- γ que, dentre várias funções, possui a capacidade de estimular a fagocitose.

É interessante ressaltar que as citocinas pró-inflamatórias tais como, a IL-1 e TNF- α possuem ações estimulantes sobre fatores nucleares, incluindo o fator NF- κ B (SOLT *et al.*, 2007). Apesar dos níveis elevados destas citocinas nos homogenatos de brônquios de ratos expostos aos poluentes, a análise de PCR em tempo real não detectou aumento significativo na concentração desta proteína no brônquio dos animais, indicando que no tempo investigado, as concentrações formadas das citocinas não interferiram na geração do fator NF- κ B.

Além das citocinas, o envolvimento de espécies reativas (de oxigênio e nitrogênio) na resposta inflamatória tem sido amplamente demonstrado na literatura. Tanto as espécies reativas quanto os radicais livres são gerados continuamente no organismo vivo. Algumas espécies possuem um papel fisiológico importante, enquanto outras são geradas por células ou produtos de metabolismo e estão mais envolvidas em processos patológicos (veja revisão, GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). A importância destas substâncias no mecanismo de defesa do organismo e lesão tissular durante o processo inflamatório vem sendo bem discutida em vários estudos, os quais sugerem que as espécies reativas participam precocemente de eventos mais refinados da resposta inflamatória, como por exemplo, nas alterações vasculares (ex. vasodilatação, aumento de permeabilidade vascular) e no influxo de leucócitos (veja revisão, RAMIREZ-PRIETO *et al.*, 2006). Curiosamente, além da fonte enzimática que origina o NO * , este produto foi também encontrado na poluição

atmosférica (RIPPERTON *et al.*, 1970) e na fumaça do cigarro (BORLAND & HIGENBOTTAM, 1987). Portanto, essas moléculas apresentam um impacto considerável sobre a fisiologia cardiopulmonar. O NO^{*} resultante da ativação da NOS_i possui ação citotóxica. Assim, promove também a destruição de microrganismos e células tumorais. Em geral, a citotoxicidade do NO^{*} estar relacionada à ação desta molécula com outros compostos liberados durante a inflamação. Interessante, os ensaios de PCR deste estudo mostraram aumento significativo na expressão do gene da NOS_i em brônquio principal de ratos tratados i.tr. com as PED, mas não nos animais tratados com a 1,2-NQ ou a mistura destes. Isto é curioso, visto que somente a mistura da 1,2-NQ e PED foi capaz de promover uma resposta inflamatória (edema e influxo celular) significativa.

Uma outra determinação indireta do NO^{*} no processo inflamatório consiste na detecção de resíduos de 3-NT, os quais são formados pela ação do ONOO⁻ sobre os resíduos tirosina das proteínas. Segundo KAPLAN *et al.* (1996), a formação de ONOO⁻ foi evidente em células inflamatórias, reforçando assim o envolvimento desse oxidante na defesa do organismo contra agentes invasores bem como na patogênese da inflamação. Corroborando tais achados, ROHN e colaboradores (1999) demonstraram que o ONOO⁻ sensibiliza neutrófilos humanos, causando maior atividade da NADPH oxidase envolvida na formação de EROs. Em nosso estudo, entretanto, a análise da expressão de resíduos protéicos de 3-NT via Western blot no brônquio principal de ratos expostos aos poluentes, por 3 horas, não foi estatisticamente diferente do grupo controle, que recebeu o veículo. Além disso, a determinação da concentração de NO₂⁻, medida pelo método de Griess e utilizada como uma medida indireta da atividade da

NOS, não revelou alteração significativa na concentração basal desta molécula na suspensão de macrófagos de ratos expostos aos poluentes quando comparado ao grupo controle. Tais resultados reforçam que o NO[•] não apresenta um papel relevante na inflamação das vias aéreas de ratos induzida pela mistura dos poluentes PED e 1,2-NQ durante o período investigado. No conjunto, estes resultados demonstram a ausência da geração de espécies reativas na ação inflamatória das vias aéreas de ratos frente à mistura da 1,2-NQ e PED.

As vias aéreas são densamente innervadas por fibras nervosas sensoriais (veja revisão, RICHARDSON & WEBBER, 1987; SPINA & PAGE, 2002) que, mediante estímulos endógenos (ex.: mediadores químicos inflamatórios) ou exógenos (ex.: capsaicina, microorganismos) adequados, culminam na liberação de neuropeptídeos, capazes de iniciar respostas/mecanismos de defesa tais como, tosse, vasodilatação local, broncoconstrição e secreção de muco. Estes podem ser definidos classicamente como inflamação neurogênica. Subpopulações de fibras nervosas sensoriais expressam diferentes receptores, incluindo os receptores TRPV1, conhecidos como receptores vanilóides (JANCSÓ *et al.*, 1967), os receptores TRPV1 são também considerados canais catiônicos não-seletivos, sendo primordialmente ativados por vanilóides (ex. capsaicina) e, mais recentemente, sabe-se que por outros estímulos, incluindo o calor e substâncias com baixo pH (SZOLCSANYI *et al.*, 2004). Segundo algumas evidências experimentais, a estimulação dos receptores TRPV1 modula mecanismos de tosse e broncoconstrição (GRONEBERG *et al.*, 2004; TREVISANI *et al.*, 2005; JIA & LEE, 2007). É interessante ressaltar que tais receptores, além de expressos em fibras nervosas sensoriais (CATERINA *et al.*, 1997; WIDDCOMBE *et al.*, 2003), foram identificados em mastócitos, células epiteliais e

macrófagos (GRONEBERG *et al.*, 2004; STANDER *et al.*, 2004). Assim, podem ser ativados e/ou sensibilizados por mediadores químicos endógenos liberados durante uma lesão tissular (ex. isquemia) ou infecção.

A ativação dos receptores TRPV1 pela capsaicina é um mecanismo clássico e tem sido bem demonstrada (COSTA *et al.*, 1997; 2000; CATERINA *et al.*, 1997; veja revisão, NAGY *et al.*, 2004). O emprego da capsaicina (uma neurotoxina extraída de pimentas do gênero *capsicum*) na culinária é bem antigo. Da mesma forma, a capsaicina tem exibido um papel de destaque na pesquisa de neurociência e, mais recentemente, vem sendo empregada como fármaco na terapia da dor inflamatória. Quando administrada em ratos neonatos, a capsaicina promove degeneração de neurônios aferentes não-mielinizados (fibras C) com conseqüente comprometimento neuroquímico, histoquímico e funcional destes (JANCSÓ *et al.*, 1967). As ações farmacológicas da capsaicina são atualmente divididas em três fenômenos consecutivos: primeiro, a capsaicina excita os neurônios sensoriais, via ativação de receptores TRPV1. Em seguida, os neurônios tornam-se dessensibilizados e impossibilitados de conduzir novos estímulos nervosos. Dependendo da concentração e duração da ação da capsaicina, ocorrem as ações neurotóxicas, as quais estão relacionadas com a via de administração, espécie e idade dos animais (SZOLCSÁNYI *et al.*, 1975; veja revisão, HOLZER, 1991).

Utilizando ratos depletados de fibras C, pelo tratamento neonatal com capsaicina, este estudo revelou que o extravasamento plasmático evocado pela mistura dos poluentes (PED e 1,2-NQ) nas vias aéreas destes animais foi substancialmente reduzido, quando comparado com animais saudáveis que receberam os poluentes. Este achado sugere que a mistura de poluentes foi

capaz de ativar, direta ou indiretamente, terminais nervosos sensoriais, causando subsequente liberação de neuropeptídeos. A inflamação neurogênica nas vias aéreas está fortemente associada à liberação das taquicininas substância P e NKA (BRAIN, 1997). A participação destas no extravasamento plasmático evocado por PED e 1,2-NQ foi confirmada pelo emprego dos antagonistas não-peptídicos de receptores NK₁ (L-732, 138) e NK₂ (SR48968), que demonstraram redução substancial do edema evocado pelos poluentes nas vias aéreas dos animais, sustentando assim o envolvimento da substância P e NKA no extravasamento evocado pelas PED e 1,2-NQ. Corroborando estes achados, a sugestão de mecanismos neurogênicos em reações tóxicas induzidas por outros MP foi previamente demonstrada por outros autores (VERONESI *et al.*, 2000; AGOPYAN *et al.*, 2003). Todavia, esta é a primeira vez que a caracterização do mecanismo neurogênico foi descrita para o edema induzido por uma mistura de poluentes em vias aéreas de ratos *in vivo*.

As fibras C, encontradas no parênquima pulmonar e ao redor dos brônquios, contêm, especialmente, taquicininas e CGRP (HUNTER, 1999). A inflamação neurogênica pode estar associada (ou não) com o aumento da secreção de muco, estimulação de terminais nervosos colinérgicos, degranulação de mastócitos, estimulação de macrófagos e linfócitos, geração de fatores quimiotáticos para células polimorfonucleares, aumento na adesão leucocitária e ativação de células sanguíneas para o foco da inflamação (JOOS, 1994; 2003; veja revisão, MAGGI, 1997). Surpreendentemente, ao contrário dos resultados obtidos com o edema, o influxo de leucócitos induzido pela mistura de poluentes nas vias aéreas de ratos tratados com capsaicina foi potencializado quando comparado com animais saudáveis. De forma semelhante, o bloqueio dos

receptores NK₁ e NK₂ contribuiu para o aumento significativo da atividade da MPO frente aos poluentes. Embora intrigante, o presente achado vem ao encontro de outros dados de literatura, os quais sugerem que a degeneração das fibras sensoriais (tipo C), pela capsaicina, exacerbou a resposta inflamatória em vários modelos experimentais.

Dentre os estudos, MEDEIROS e colaboradores (2001) demonstraram que o tratamento neonatal de ratos com capsaicina aumentou a neutrofilia evocada por OVA no lavado broncoalveolar e na cavidade pleural destes. Este mesmo tratamento promoveu hiperreatividade nas vias aéreas de ratos (LONG *et al.*, 1996; STERNER-KOCK *et al.*, 1996; MEDEIROS *et al.*, 2003). Em cobaias, o tratamento com capsaicina contribuiu para um maior aumento na reatividade brônquica em resposta à fumaça do cigarro (DUSSER *et al.*, 1989; MUTOH *et al.*, 2000). O influxo de neutrófilos e hiperreatividade nas vias aéreas dos animais frente à exposição ao ozônio foi potencializado pela depleção dos neuropeptídeos (JIMBA *et al.*, 1995; STERNERKOCK *et al.*, 1996; TAKEBAYASHI *et al.*, 1998). Em parte, tais efeitos podem ser explicados pelas sugestões de outros autores, os quais revelaram que a estimulação de receptores NK₁ e NK₂, presentes no epitélio da traquéia e brônquio de ratos, leva à produção de prostaglandinas. Estas, por conseguinte, causam relaxamento no tônus da musculatura lisa da traquéia e brônquio principal de ratos (MHANNA *et al.*, 1999; AMANN *et al.*, 2001). Assim, na ausência destas o balanço relaxamento/contração nestas estruturas fica comprometida. Por outro lado, poucas evidências mostram efeitos opostos aos demonstrados acima. Segundo SCHUILLING e colaboradores (1999), o antagonista de receptores NK₁ (SR140333) causou redução significativa de eosinófilos, neutrófilos e linfócitos no lavado broncoalveolar no modelo de asma

alérgica em cobaias. Independentemente da presença da substância P nas fibras sensoriais, é importante ressaltar que esta substância pode ser produzida em outros locais, incluindo células inflamatórias como macrófagos alveolares (KILLINGSWORTH *et al.*, 1997; HO *et al.*, 1997), monócitos (HO *et al.*, 1997) e células dendríticas (LAMBRECHT *et al.*, 1999). Além disso, receptores para taquicininas foram descritos para linfócitos T, macrófagos e mastócitos (MAPP *et al.*, 2000).

No conjunto, os dados obtidos neste estudo juntamente com os descritos na literatura, indicam que o comprometimento na biossíntese de neuropeptídeos, principalmente as taquicininas, constitui um aspecto bastante relevante para a regulação positiva da neutropoiese ou, ao contrário, regulação negativa do aumento de permeabilidade vascular (extravasamento plasmático) evocado por poluentes (PED e 1,2-NQ) em vias aéreas de ratos. É provável que a maior neutrofilia induzida pelas PED e 1,2-NQ no brônquio de animais tratados com capsaicina seja, em parte, decorrente do aumento na gênese de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, visto que nestes animais os níveis basais destas substâncias estavam aumentados e, em alguns casos (IL-1 β , IFN- γ e IL-10) de forma bastante significativa quando comparado com os animais saudáveis. O aumento significativo das expressões gênicas do TNF- α e de seus receptores (TNFR1 e TNFR2) frente aos poluentes no brônquio de ratos pré-tratados com capsaicina em relação aos animais saudáveis reforça esta hipótese.

Adicionalmente, duas outras hipóteses podem ser discutidas para explicar melhor o maior influxo de neutrófilos frente aos poluentes em animais depletados de neuropeptídeos: a primeira, baseada em recente evidência de FRANCO-PENTEADO e colaboradores (2005), os quais sugerem que a perda permanente

das fibras C e a conseqüente supressão da produção de neuropeptídeos pelo tratamento de ratos neonatos com a capsaicina, leva ao aumento da expressão/regulação de mastócitos pulmonares residentes. Desta forma, podemos postular que, se os mastócitos estão em maior quantidade no parênquima pulmonar de ratos tratados com capsaicina; estes, quando estimulados pela mistura de poluentes, resultarão numa maior produção de citocinas e conseqüentemente em maior influxo de leucócitos local. Diante disto, é plausível sugerir que o aumento exacerbado da atividade da MPO e, portanto, do influxo de neutrófilos induzido pelos poluentes em brônquios de ratos depletados de neuropeptídeos se deu em conseqüência do aumento da regulação gênica de algumas quimiocinas e citocinas por mastócitos. Em segunda instância, é conhecido que a ausência de neuropeptídeos inibitórios (ex.: somatostatina) compromete um mecanismo regulatório (feedback negativo) importante sobre a função dos mastócitos. Assim, sem este controle inibitório sobre os mastócitos, estas células, já em grande quantidade, tornam-se alvos da ação de agentes endógenos e exógenos, como os poluentes. Por outro lado, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a exposição de animais e humanos ao MP do diesel aumentou *per se* a produção de quimiocinas (IL-8 e MIP) e citocinas (IL-1, IL-4, IL-5, GM-CSF e MIP-1 α) em células inflamatórias e epiteliais (YANG *et al.*, 1997; BOUTHLLIER *et al.*, 1998; BAYRAM *et al.*, 1998; STEERENBERG *et al.*, 1998; SHI *et al.*, 1996; TAKANO *et al.*, 1997, 1998; ICHINOSE *et al.*, 1998; OHTOSHI *et al.*, 1998).

Conforme observado anteriormente, a utilização da capsaicina como ferramenta farmacológica para avaliar o papel dos neuropeptídeos gera dados conflitantes, visto que tanto a redução quanto amplificação da inflamação foi

demonstrada em diferentes modelos experimentais. Em continuidade ao presente estudo, a elucidação do mecanismo da resposta inflamatória neurogênica induzida pelos poluentes via receptores de taquicininas (NK₁ e NK₂) e/ou ainda vanilóides (TRPV1) foi posteriormente avaliada pela análise da expressão (via RNA) destes receptores nas células do brônquio principal de ratos expostos aos poluentes. Os animais saudáveis expostos aos poluentes exibiram um aumento significativo da expressão (RNAm) dos receptores TRPV1 e de taquicininas (NK₁ e NK₂), quando comparado com o grupo controle. É possível que tal aumento seja resultante da maior produção e/ou liberação das taquicininas (substância P e NKA) de fibras sensoriais estimuladas pelos poluentes via ativação (direta ou indireta) dos receptores TRPV1. Reforçando esta sugestão, JOOS e colaboradores (2001) observaram que nas vias aéreas de pacientes com asma, os níveis de taquicininas estavam elevados e, estes, estavam sempre associados ao aumento na expressão dos receptores NK₁ e NK₂ de taquicininas.

Neste estudo, a redução da expressão gênica dos receptores TRPV1 e NK₁ e NK₂ de taquicininas foi evidente no brônquio dos animais tratados com os poluentes e destituídos de fibras C pelo tratamento neonatal com capsaicina. Segundo Watanabe *et al.* (2006), uma grande heterogeneidade de fibras nervosas (axônios) reativas aos receptores TRPV1 foi encontrada em regiões das vias aéreas de cobaias, incluindo a traquéia e o brônquio principal. O fato de que nos animais previamente tratados com capsaicina, a reatividade positiva aos receptores TRPV1 e atividade constritora em resposta à capsaicina foram abolidas na traquéia e brônquio principal destes animais, reforça nossos achados, indicando, portanto, que os poluentes em estudo estimulam diretamente os receptores TRPV1 *in vivo*. De fato, recente estudo *in vitro* revelou que a 1,2-NQ

causou *per se* contração da traquéia de cobaia, sendo este efeito inibido por bloqueadores de canais de Ca^{2+} ou *capsazepine*, um bloqueador inespecífico do receptor TRPV1 (KIKUNO *et al.*, 2006). Segundo estes autores, o mecanismo de contração traqueal induzido pela 1,2-NQ é primariamente dependente da fosforilação da proteína tirosina quinase, a qual estimula o receptor TRPV1, resultando em maior influxo do Ca^{2+} na célula muscular e, por fim, a contração.

Partindo do pressuposto que a substância P é uma forte candidata na regulação de algumas doenças pulmonares (ex.: asma) (CHANCELLOR-FREELAND *et al.*, 1995; DE SWERT *et al.*, 2004), decidiu-se por fim investigar a atividade fagocítica dos macrófagos obtidos de animais saudáveis e depletados de neuropeptídeos expostos aos poluentes. O macrófago é uma célula abundante do tecido broncoalveolar e também a principal célula diferenciada do sistema fagocítico mononuclear envolvida na defesa do organismo contra partículas inaladas e microorganismos.

O presente resultado mostrou que a mistura de poluentes estimulou, de maneira significativa, a fagocitose do polissacarídeo zimosan opsonizado com soro de ratos (via receptores C3b do sistema complemento). Estes dados sugerem que em pulmões de ratos saudáveis, os efeitos destes poluentes foram evidentes e se instalaram rapidamente. Curiosamente, em macrófagos de ratos depletados de neuropeptídeos, a produção de citocinas bem como a formação de fagossomos devido ao engolfamento de partículas de zimosan e o aumento de corpos celulares destas células pela emissão de prolongamentos citoplasmáticos (alterações morfológicas) foram mais acentuados, quando comparado aos efeitos nos ratos saudáveis tratados com os poluentes. Independentemente da exposição aos poluentes, foi possível observar que em ratos depletados de neuropeptídeos

a atividade fagocítica dos macrófagos alveolares destes animais foi estatisticamente diferente (maior) do que nos animais saudáveis que receberam o veículo dos poluentes.

Concomitantemente, a análise das concentrações de várias citocinas na suspensão de macrófagos pelo teste de Elisa revelou que em ratos saudáveis, os poluentes (na ausência do zimosan) não causaram aumento significativo nos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Ao contrário, em animais privados de fibras C, a mistura dos poluentes causou um aumento significativo nas concentrações de IL-1 β . Por outro lado, após o segundo desafio dos fagócitos com o zimosan, um aumento significativo na concentração de IL-1 β foi observado na suspensão dos macrófagos dos animais saudáveis ou pré-tratados com capsaicina que receberam a mistura dos poluentes. Estes dados são indicativos de que a degeneração de fibras sensoriais e a conseqüente depleção de neuropeptídeos endógenos, principalmente as taquicinininas, nas vias aéreas de ratos influenciaram a responsividade dos macrófagos alveolares e produção de citocinas *per se* bem como frente aos poluentes em estudo.

Por outro lado, apesar de indícios experimentais sugerirem que outros agentes químicos, tais como espécies reativas de oxigênio, etanol e sulfeto de hidrogênio ativam receptores TRPV1 (veja revisão, GEPPETTI *et al.*, 2006), a geração de radicais livres e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, não parece exercer um papel importante na resposta inflamatória aguda induzida pelas PED e 1,2-NQ em vias aéreas de ratos, uma vez que níveis significantes destas moléculas não foram encontrados na suspensão de macrófagos ou nos homogenatos dos brônquios dos animais.

Em suma, os resultados apresentados neste estudo nos permitem concluir que o aumento na produção e/ou liberação endógena de mediadores inflamatórios como as citocinas e taquicinininas, modula grandemente a resposta inflamatória induzida pelos poluentes ambientais PED e 1,2-NQ, cujo processo autofarmacológico é intensificado nos animais destituídos de fibras nervosas sensoriais. Isto se deve, em parte, ao fato de que nestes animais, a ausência de neuropeptídeos (possivelmente as taquicinininas) resultou em aumento da atividade funcional dos macrófagos juntamente com a produção de citocinas pró-inflamatórias por estas células e, possivelmente, por mastócitos pulmonares residentes. Estas evidências contribuem com um crescente argumento de que a perda da sinalização aferente taquicininérgica e, provavelmente, da somatostina leva à piora do quadro inflamatório induzido por substâncias irritantes, incluindo os poluentes PED e 1,2-NQ.

5 CONCLUSÕES

- 1 A injeção i.tr. de diferentes doses das PED ou 1,2-NQ evocou extravasamento plasmático (edema), de maneira dose-dependente, mas não promoveu influxo de leucócitos (atividade da MPO) na traquéia e brônquio principal de ratos;
- 2 Na menor dose, as PED não causaram edema significativo nas vias aéreas, mas associadas ao composto 1,2-NQ, causou efeito aditivo, sugerindo que a inflamação (edema e influxo de neutrófilos) induzida pelo MP do diesel é altamente influenciada pela presença da 1,2-NQ;
- 3 A exposição aguda de ratos à mistura de poluentes estimulou a fagocitose por macrófagos via receptor de complemento (C3b) bem como aumentou a produção de IL-1 β por tais células.
- 4 A inflamação induzida pelos poluentes nas vias aéreas de ratos não envolveu, no período avaliado, a participação do NF- κ B ou espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, mas foi modulada por neuropeptídeos, maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e expressão de receptores TRPV1 e taquicininas (NK₁ e NK₂);
- 5 O edema induzido pelos poluentes foi reduzido nas vias aéreas de animais pré-tratados com capsaicina ou por bloqueadores de receptores NK₁ e NK₂, sugerindo que estes poluentes estimularam diretamente as fibras C presentes nas vias aéreas, levando à liberação de substância P e NKA, responsáveis pelo edema. Já a fagocitose por macrófagos e a atividade da MPO no brônquio frente aos poluentes foi exacerbada em ratos pré-tratados com capsaicina;
- 6 No conjunto, os resultados deste estudo levam à conclusão de que na ausência da sinalização aferente taquicininérgica, embora tenha ocorrido redução do edema, houve uma piora do quadro inflamatório (fagocitose e influxo de neutrófilos) nas vias aéreas dos animais frente aos poluentes PED e 1,2-NQ. Esta piora pode ser atribuída à maior na gênese de citocinas pró-inflamatórias, levando ao influxo de neutrófilos nas vias aéreas bem como exacerbção da atividade funcional dos macrófagos alveolares.

6 REFERÊNCIAS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Cellular and Molecular Immunology. 4. Ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. Review.
- ACKERMAN V, MARINI M, VITTORI E, BELLINI A, VASSALI G, MATTOLI S. Detection of cytokines and their cell sources in bronchial biopsy specimens from asthmatic patients. Relationship to atopic status, symptoms, and level of airway hyperresponsiveness. *Chest*. 1994; 105(3):687-696.
- ADAMS DO, HAMILTON TA. The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol*. 1984; 2:283-318. Review.
- ADAMS DO. Molecular interactions in macrophage activation. *Immunol Today*. 1989; 10(2): 33-35. Review.
- AGOPYAN N, LI L, YU S, SIMON SA. Negatively charged 2- and 10- μ m particles activate vanilloid receptors, increase cAMP, and induce cytokine release. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 186:63-76.
- ALBENSI BC, MATTSON MP. Evidence for the involvement of TNF and NF κ B in hippocampal synaptic plasticity. *Synapse*. 2000; 35(2): 151-159.
- ALLEN LA, ADEREM A. Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med*. 1996; 184(2): 627-637.
- AMANN R, SCHULIGOI R, PESKAR BA. Effects of COX-1 and COX-2 inhibitors on eicosanoid biosynthesis and the release of substance P from the guinea-pig isolated perfused lung. *Inflamm Res*. 2001; 50(1):50-53.
- ATKINSON RW, ANDERSON HR, ASUNYER J, AYRES J, BASSINI M, VONK JM, BOUMGHAR A, FORASTIERE F, FORSBERG B, TOULOUMI G, SCHWARTZ J, KATSOUYANH K. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001; 164(10 Pt 1):1860-1866.

AUGUSTO O, GATTI RM, RADT R. Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinocarbonylhydrazine N-ethylcarbamide autoxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch Biochem Biophys*. 1994; 310(1):118-125.

AZZOLINA A, BONGIOVANNI A, LAMPIASI N. Substance P induces TNF- α and IL-6 production through NF κ B in peritoneal mast cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1643(1-3):75-83.

BAEUEERLE PA, BALTIMORE D. NF- κ B: ten years after. *Cell*. 1996; 87(1):13-20.

BALDWIN AS JR. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:649-83. Review.

BANG R, BIBURGER M, NEUHUBER WL, TIEGS G. Neurokinin-1 receptor antagonists protect mice from CD95- and tumor necrosis factor- α -mediated apoptotic liver damage. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004; 308, 1174-1180.

BARNES PJ, BARANIUK JN, BELVISI MG. Neuropeptides in the respiratory tract. *Am Rev Respir Dis*. 1991; 144(6): 1391-1399. Review.

BARNES PJ. Cytokine modulators as novel therapies for airway disease. *Eur Respir J Suppl*. 2001; 34:67s-77s. Review.

BARNES PJ. Neuropeptides in human airways: function and clinical implications. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 136(6 Pt 2): S77-S83. Review.

BARNES PJ. Achieving asthma control. *Curr Med Res Opin*. 2005; 21 Suppl 4:S5-S9. Review.

BAYRAM H, DEVALIA JL, SAPSFORD RJ, OHTOSHI T, MIYABARA Y, SAGAI M, DAVIES RJ. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 18(3):441-448.

BECKER S, SOUKUP JM, GILMOUR MI, DEVLIN RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: Effects on oxidant radical

generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996; 141(2):637-648.

BECKMAN JS, KOPPENOL WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 1):C1424-1437. Review.

BELL ML, SAMET JM, DOMINICI F. Time-series studies of particulate matter. *Annu Rev Public Health.* 2004; 25: 247-280.

BENHAM CD, GUN THORPE MJ, DAVIS JB. TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium.* 2003; 33(5-6): 479-487. Review.

BERGREN DR. Prostaglandin involvement in lung C-fiber activation by substance P in guinea pigs. *J Appl Physiol.* 2006; 100(6):1918-1927.

BERNSTEIN JA, ALEXIS N, BARNES C, BERNSTEIN IL, NEL A, PEDEN D, DIAZ-SANCHEZ D, TARLO SM, WILLIAMS PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 114(5):1116-1123. Review.

BERTRAND C, AND GEPPETTI P. Tachykinin and Kinin receptor antagonists: Therapeutic perspectives in allergic airways disease. *Tips.* 1996; 17: 255-259.

BERTRAND C, NADEL JA, GRAF PD, GEPPETTI P. Capsaicin increases airflow resistance in guinea pigs in vivo by activating both NK2 and NK1 tachykinin receptors. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 148(4 Pt 1): 909-914.

BORLAND C, HIGENBOTTAM T. Nitric oxide yields of contemporary UK, US and French cigarettes. *Int J Epidemiol.* 1987; 16(11): 31-34.

BOUBEL RW, FOX DL, TUMER DB, STERN AC. *Fundamentals of Air Pollution.* 3rd ed. San Diego: Academic Press Inc.; 1994.

BOUSQUET J, CHANEZ P, LACOSTE JY, WHITE R, VIE P, GODORD P, MICHEL FB. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy.* 1992; 47(1):3-11. Review.

BOUTHILLIER L, VINCENT R, GOEGAN P, ADAMSON IY, BJARNASON S, STEWART M, GUENETTE J, POTVIN M, KUMARATHASAN P. Acute effects of

inhaled urban particles and ozone: lung morphology, macrophage activity, and plasma endothelin-1. *Am J Pathol.* 1998; 153(6):1873-1884.

BOZINOVSKI S, JONES JE, VLAHOS R, HAMILTON JA, ANDERSON GP. Granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor (GM-CSF) regulates lung innate immunity to lipopolysaccharide through Akt/Erk activation of NFkappa B and AP-1 in vivo. *J Biol Chem.* 2002; 277(45):42808-42814.

BRADFORD LW. Problems of ethics and behavior in the forensic sciences. *J Forensic Sci.* 1976; 21(4): 763-768.

BRADLEY PP, PRIEBAT DA, CHRISTENSEN RD, ROTHSTEIN G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982; 78(3): 206-209.

BRAIN SD. Sensory neuropeptides: their role in inflammation and wound healing. *Immunopharmacology.* 1997; 37:133-152.

BREDT DS, SNYDER SH. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron.* 1994 13(2):301-313.

BRIGHAM KL, MEYRICK B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis.* 1986; 133:913-917.

BRUNELLI L, CROW JP, BECKMAN JS. The comparative toxicity of nitric oxide and peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 316(1):327-334.

BUCKLEY TL, NIJKAMP FP. Airways hyperreactivity and cellular accumulation in a delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Modulation by capsaicin-sensitive nerves. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994b; 149 (2 Pt 1): 400-407.

BUCKLEY TL, NIJKAMP FP. Mucosal exudation associated with a pulmonary delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse. Role for the tachykinins. *J Immunol.* 1994a; 153(9): 4169-4178.

BURNETT RT, SMITH-DOIRON M, STIEB D, CAKMAK S, BROOK JR. Effects of particulate and gaseous air pollution on cardiorespiratory hospitalizations. *Arch Environ Health*. 1999; 54(2):130-139.

BURNSTOCK G, CAMPBELL G, SATCHELL D, SMYTHE A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. 1970. *Br J Pharmacol*. 1997; 120 (4 suppl): 337-357.

BURNSTOCK G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972; 24(3):509-581.
BUSTIN SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*. 2000; 25(2): 169-193. Review.

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.

CARSWELL EA, OLD LJ, KASSEL RL, GREEN S, FIOE N, WILLIAMSON B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72(9): 3666-3670.

CATARINA M, SCHUMACKER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389: 816-824.

Chancellor-Freeland C, Zhu GF, Kage R, Beller DI, Leeman SE, Black PH. SUBSTANCE P AND STRESS-INDUCED CHANGES IN MACROPHAGES. *ANN N Y ACAD SCI*. 1995; 771:472-484.

CHO AK, SCHMITZ DA, YOU Y, RODRIQUEZ CE, DISTEFANO E, KUMAGAI Y, MIGUEL AH, EIGUREN 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 KF. Cytokines as targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets*. 2006; 7(6):675-681. Review.

CHUNG KF. Inflammatory mediators in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2005; 4(6):619-625. Review.

CHURG A, WRIGHT JL. Airway wall remodeling induced by occupational mineral dusts and air pollutant particles. *Chest*. 2002; 122(6 Suppl):306S-309S.

CLAPHAM DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003; 426(69):517-524.

CLARKE CJ, HALES A, HUNT A, FOXWELL BM. Il-10-mediated suppression of tnfr-alpha production is independent of its ability to inhibit nf kappa b activity. *Eur J Immunol*. 1998; 28(5):1719-1726.

CLARKE RW, COULL B, REINISCH U, CATALANO P, KILLINGSWORTH CR, KOUTRAKIS P, KAVOURAS I, MURTHY GG, LAWRENCE J, LOVETT E, WOLFSON JM, VERRIER RL, GODLESKI JJ. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect*. 2000; 108(12):1179-1187.

COHN, Z.A. The structure and function of monocytes and macrophages. *Adv Immunol*. 1968; 9: 163-214. Review.

COHN, ZA. Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J Immunol*. 1978; 121(3): 813-816. Review.

COOKE JP, SINGER AH, TSAO P, ZERA P, ROWAN RA, BILLINGHAM ME. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J Clin Invest*. 1992; 90(3):1168-1172.

COSTA ROSA LF, SAFI DA, CURI R. Effect of thiglycollate and BCG stimuli on glucose and glutamine metabolism in rat macrophages. *J Leukoc Biol*. 1994; 56(1): 10-14.

COSTA ROSA LF, SAFI DA, CURY Y, CURI R. Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. *Biochem Pharmacol*. 1992; 44(11): 2235-2241.

COSTA SK, DE NUCCI G, ANTUNES E, BRAIN SD. Phoneutria nigriventer spider venom induces oedema in rat skin by activation of capsaicin sensitive sensory nerves. *Eur J Pharmacol*. 1997; 339(2-3):223-226.

COSTA SK, YSHII LM, POSTONRN, MUSCARA MN, BRAIN SD. Pivotal role of endogenous tachykinins and the nk1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF alpha in the cutaneous microvasculature. *J Neuroimmunol*. 2006; 171(1-2): 99-109.

COSTA SKP, HYSLOP S, MALCANGIO M, DOCHERTY RJ, BRAIN SD. Activation of 5-HT4 receptors causes neurogenic inflammation in the cutaneous microvasculature. *Inflammation Research*. 2003; 52:S183-S186.

COSTA SK, DE NUCCI G, ANTUNES E, BRAIN SD. Involvement of vanilloid receptors and purinoceptors in the Phoneutria nigriventer spider venom-induced plasma extravasation in rat skin. *Eur J Pharmacol*. 2000; 391(3):305-15.

COTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T, ROBBINS SL. Pathologic basis of disease. Philadelphia: Saunders, 6th ed., 1999.

DAGHER Z, GARÇON G, BILLET S, VERDIN A, LEDOUX F, COURCOT D, ABOUKAIS A, SHIRALI P. Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM2.5) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol*. 2007; 27(3):284-290.

DAI J, XIE C, CHURG A. Iron loading makes a nonfibrogenic model air pollutant particle fibrogenic in rat tracheal explants. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 26(6):685-693.

DAVENPECK KL, GAUTHIER TW, LEFER AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology*. 1994; 107(4):1050-1058.

DAVIES DE, HOLGATE ST. Asthma: the importance of epithelial mesenchymal communication in pathogenesis. *Inflammation and the airway epithelium in asthma*. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002; 34(12):1520-1526.

DE SWERT KO, TOURNOY KG, JOOS GF, PAUWELS RA. The role of the tachykinin NK1 receptor in airway changes in a mouse model of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(6):1093-1099.

DE MEY JG, VANHOUTTE PM. Anoxia and endothelium-dependent reactivity of the canine femoral artery. *J Physiol*. 1983; 335:65-74.

DELFINO RJ, ZEIGER RS, SELTZER JM, STREET DH, MCLAREN CE. Association of asthma symptoms with peak particulate air pollution and effect modification by anti-inflammatory medication use. *Environ Health Perspect.* 2002; 110:A607-A617.

DING-PFENNIGDORFF D, AVERBECK B, MICHAELIS M. Stimulation of PAR-2 excites and sensitizes rat cutaneous C-nociceptors to heat. *Neuroreport.* 2004; 15(13):2071-2075.

DONALDSON K, STONE V, BORM PJ, JIMENEZ LA, GILMOUR PS, SCHINS RP, KNAAPEN AM, RAHMAN I, FAUX SP, BROWN DM, MACNEE W. Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀). *Free Radic Biol Med.* 2003; 34(11):1369-1382.

DONALDSON K. The biological effects of coarse and fine particulate matter. *Occup Environ Med.* 2003; 60(5):313-314.

DUSSER DJ, DJOKIC TD, BORSON DB, NADEL JA. Cigarette smoke induces bronchoconstrictor hyperresponsiveness to substance P and inactivates airway neutral endopeptidase in the guinea pig. Possible role of free radicals. *J Clin Invest.* 1989; 84(3):900-6.

FEGHALI CA, WRIGHT TM. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997; 2: d12-26.

FERRAZ JG, TIGLEY AW, APLLEYARD CB, WALLAGE JL. TNF-alpha contributes to the pathogenesis of ethanol-induced gastric damage in cirrhotic rats. *Am J Physiol.* 1997; 272: G809-G814.

FIERS W. Tumor necrosis factor: Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS Lett.* 1991; 285: 199-212.

FINOTTO S, OHNO I, MARSHALL JS, GAULDIE J, DENBURG JA, DOLOVICH J, CLARK DA, JORDANA M. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J Immunol.* 1994; 153(5):2278-2289.

FLOWER RJ, HARVEY EA, KINGSTON WP. Inflammatory effects of prostaglandin D₂ in rat and human skin. *Br J Pharmacol.* 1976; 56(2):229-33.

FOSTER OJ, BISWAS S, LIGHTMAN SL. Neuropeptide Y and tyrosine hydroxylase mRNA levels in the locus coeruleus show similar increases after reserpine treatment. *Neuropeptides*. 1991; 18(3): 137-141.

FRANCO LINO DOS SANTOS A, DAMAZO AS, BERALDO DE SOUZA HR, DOMINGOS HV, OLIVEIRA-FILHO RM, OLIANI SM, COSTA, S.K., 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: 35-42.

FRANCO-PENTEADO CF, DE SOUZA IA, CAMARGO EA, TEIXEIRA SA, MUSCARA MN, DE NUCCI G, ANTUNES E. Mechanisms involved in the enhancement of allergic airways neutrophil influx by permanent C-fiber degeneration in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005; 313(1):440-448.

GADIENT RA, PATTERSON PH. Leukemia inhibitory factor, Interleukin 6, and other cytokines using the GP130 transducing receptor: roles in inflammation and injury. *Stem Cells*. 1999; 17(3):127-137.

GALLIN EK, GREEN SW, PATCHEN ML. Comparative effects of particulate and soluble Glucan on macrophages of C3H/ HeN and C3H/HeJ mice. *Int J Immunopharmacol*. 1992; 14 (2): 173-183.

GAMSÉ R, HOLZER P, LEMBECK F. Decreased of substance P in primary sensory neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Brit. J. Pharmacol*. 1980; 68: 207-213.

GARCIA-LEME J, HAMAMURA L, MIGLIORINE RH, LEITE MP. Influence of diabetes mellitus upon the inflammatory response of the rat. A pharmacological analysis. *Eur J Pharmacol*. 1973; 23: 74-81.

GARCIA-LEME J. Hormones and inflammation. Boca Raton Florida, CRC Press; 1989.

GEPPETTI P, MATERAZZI S, NICOLETTI P. The transient receptor potential vanilloid 1: role in airway inflammation and disease. *Eur J Pharmacol*. 2006; 533(1-3):207-214. Review.

GHOSH S, KARIN M. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 2002; 109 Suppl:S81-96.

GHOSH S, MAY MJ, KOPP EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:225-260. Review.

GOLDBERG MS, BURNETT RT, BAILAR JC 3RD, TAMBLYN R, ERNST P, FLEGEL K, BROOK J, BONVALOT Y, SINGH R, VALOIS MF, VINCENT R. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109 Suppl 4:487-494.

GORDON JR, BURD PR, GALLI SJ. Mast cells as a source of multifunctional cytokines. *Immunol Today*. 1990; 11(12):458-464. Review.

GORDON S. The role of the macrophage in immune regulation. *Res Immunol*. 1998. 149(7-8): 685-688. Review.

GOSSET P, TSICOPOULOS A, WALLAERT B, JOSEPH M, CAPRON A, TONNEL AB. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 production by human mononuclear phagocytes from allergic asthmatics after IgE-dependent stimulation. *Am Rev Respir Dis*. 1992; 146(3):768-74.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-138.

GREENBERG S, CHANG P, SILVERSTEIN SC. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages. *J Exp Med*. 1993; 177(2): 529-534.

GREENBERG S. Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol*. 1995; 5: 93-99.

GREENBERG S, SILVERSTEIN. Phagocytosis. In *Fundamental Immunology*, third edition. W.E. Paul, editor. Raven Press. Ltd., New York. 1993; 941-964.

GRIESS GA, ZIGMAN S. Proteins associates with themembrane surface of lens fiber cells. *Exp Eye Res.* 1982; 34(1): 15-21.

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

GRONEBERG DA, NIIMI A, DINH QT, COSIO B, HEW M, FISCHER A, CHUNG KF. Increased expression of transient receptor potential vanilloid-1 in airway nerves of chronic cough. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 170: 1276-1280.

GROVES PH, LEWIS MJ, CHEADLE HA, PENNY WJ. SIN-1 reduces platelet adhesion and platelet thrombus formation in a porcine model of balloon angioplasty. *Circulation.* 1993; 87(2):590-597.

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):812-818.

GUNTHORPE MJ, BENHAM CD, RANDALL A, DAVIS JB. The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends Pharmacol Sci.* 2002; 23(4): 183-191.

GUO JP, PANDAY MM, CONSIGNY PM, LEFER AM. Mechanisms of vascular preservation by a novel NO donor following rat carotid artery intimal injury. *Am J Physiol.* 1995; 269(3 Pt 2):H1122-H1131.

GUTTERIDGE JM, HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 899:136-147. Review.

HAMID Q, TULIC'MK, LIU MC, MOQBEL R. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(1 Suppl): S5-S12. Review.

HAMILTON TA, BECTON DL, SOMERS SD, GRAY PW, ADAMS DO. Interferon-gamma modulates protein kinase C activity in murine peritoneal macrophages. *J Biol Chem.* 1985; 260(3): 1378-1381.

HAMOIR J, NEMMAR A, HALLOY D, WIRTH D, VINCKE G, VANDERPLASSCHEN A, NEMERY B, GUSTIN P. Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 190(3):278-285.

HARROD KS, JARAMILLO RJ, ROSENBERGER CL, WANG SZ, BERGER JA, MCDONALD JD, REED MD. Increased susceptibility to RSV infection by exposure to inhaled diesel engine emissions. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003; 28: 451-463.

HENDERSON RB, HOBBS JA, MATHIES M, HOGG N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. *Blood*. 2003; 102: 328-335.

HIRANO S, FURUYAMA A, KOIKE E, KOBAYASHI T. Oxidative-stress potency of organic extracts of diesel exhaust and urban fine particles in rat heart microvessel endothelial cells. *Toxicology*. 2003; 187: 161-170.

HIRANO T. The biology of interleukin-6. *Chem Immunol*. 1992; 51: 153-180. Review.

HO WZ, LAI JP, ZHU XH, UVAYDOVA M, DOUGLAS SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol*. 1997; 159:5654-5660.

HOEK G, BRUNEKREEF B, FISCHER P, VAN WIJNEN J. The association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study. *Epidemiology*. 2001 May;12(3):355-357.

HOEK G, DOCKERY DW, POPE A, NEAS L, ROEMER W, BRUNEKREEF B. Association between PM₁₀ and decrements in peak expiratory flow rates in children: reanalysis of data from five panel studies. *Eur Respir J*. 1998; 11(6):1307-1311.

HOLZER P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev*. 1991; 43(2):143-201. Review.

HOLZER P. Involvement of nitric oxide in the substance P-induced inhibition of intestinal peristalsis. *Neuroreport*. 1997; 8(13): 2857-2860.

HOLZER P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience*. 1988; 24: 739-768.

HUA XY, THEODORSSON-NORHEIM E, BRODIN E, LUNDBERG JM, HOKFELT T. Multiple tachykinins (neurokinin A, neuropeptide K and substance P) in capsaicin-sensitive sensory neurons in the guinea-pig. *Regul Pept*. 1985; 13(1):1-19.

HUNTER DD, UNDEN BJ. Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of guinea pig trachea. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159: 1943-1948.

ICHINOSE T, TAKANO H, MIYABARA Y, SAGAI M. Long-term exposure to diesel exhaust enhances antigen-induced eosinophilic inflammation and epithelial damage in the murine airway. *Toxicol Sci*. 1998; 44(1):70-79.

ICHINOSE T, TAKANO H, SADAKANE K, YANAGISAWA R, KAWAZATO H, SAGAI M, SHIBAMOTO T. Differences in airway-inflammation development by house dust mite and diesel exhaust inhalation among mouse strains. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003; 187(1):29-37.

IGNARRO LJ, BYRNS RE, BUGA GM, WOOD KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*. 1987; 61(6):866-79. *Immunol*. 1984; 2: 283-318.

ITO K, SAKAMOTO T, HAYASHI Y, MORISHITA M, SHIBATA E, SAKAI K, TAKEUCHI Y, TORII S. Role of tachykinin and bradykinin receptors and mast cells in gaseous formaldehyde-induced airway microvascular leakage in rats. *Eur J Pharmacol*. 1996; 307: 291-298.

ITOH H, SAKAI J, IMOTO A, CREED KE. The control of smooth muscle tissues by nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve fibres in the autonomic nervous system. *J Smooth Muscle Res*. 1995; 31(3): 67-78.

JALALUDIN BB, CHEY T, O'TOOLE BI, SMITH WT, CAPON AG, LEEDE SR. Acute effects of low levels of ambient ozone on peak expiratory flow rate in a cohort of Australian children. *Int J Epidemiol*. 2000; 29(3):549-557.

JALALUDIN BB, O'TOOLE BI, LEEDER SR. Acute effects of urban ambient air pollution on respiratory symptoms, asthma medication use, and doctor visits for asthma in a cohort of Australian children. *Environ Res*. 2004; 95: 32-42.

JANCSÓ G, KIRALY E, JANCSÓ-GABOR A. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 1977; 270: 741-743.

JANCSÓ G, KIRALY E, JANCSÓ-GABOR A. Chemosensitive pain fibres and inflammation. *Int J Tissue Reac*. 1980; 2: 57-66.

JANCSÓ N, JANCSÓ-GABOR A, SZOLCSANT J. Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by treatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemotr*. 1967; 31: 138-151.

JIA Y, LEE LY. Role of TRPV receptors in respiratory diseases. *Biochim. Biophys. Acta*. 1. 2007. Epub ahead of print.

JIMBA M, SKORNIK WA, KILLINGSWORTH CR, LONG NC, BRAIN JD, SHORE AS. Role of C fibers in physiological responses to ozone in rats. *J Appl Physiol*. 1995; 78: 1757-63.

JIMÉNEZ LA, DROST EM, GILMOUR PS, RAHMAN I, ANTONICELLI F, RITCHIE H, MACNEE W, DONALDSON K. PM(10)-exposed macrophages stimulate a proinflammatory response in lung epithelial cells via TNF-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282(2):L237-L248.

JIN JG, KATSOULIS S, SCHMIDT WE, GRIDER JR. Inhibitory transmission in tenia coli mediated by distinct vasoactive intestinal peptide and apamin-sensitive pituitary adenylate cyclase activating peptide receptors. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 270(2): 433-439.

JOOS GF, GERMONPRE PR, KIPS JC. Sensory neuropeptides and the human lower airways: present state and future directions. *Eur Respir. J.* 1994; 7: 1161-1171.

JOOS GF, GERMONPRE PR, PAUWELS RA. Role of tachykinins in asthma. *Allergy.* 2000; 55(4): 321-337.

JOOS GF, KATELIJNE O, DE SWERT, V ROMAIN A. The role of neural inflammation in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 992: 218-230.

JOOS GF, DE SWERT KO, PAUWELS RA. Airway inflammation and tachykinins: prospects for the development of tachykinin receptor antagonists. *Eur J Pharmacol.* 2001; 429(1-3):239-250. Review.

JOSENS PG, BOELAERT JR, HALLOY V, ZAMORA R, SCHNEIDER YJ, HERMAN AG. Human and rat macrophages mediate fungistatic activity against rhizopus species differently: in vitro and ex vivo studies. *Infect Immun.* 1995; 63(11):4489-4494.

KANEKO T, IKEDA H, FU L, NISHIYAMA H, MATSUOKA M, YAMAKAWA HO, OKUBO T. Capsaicin educates ozone-induced airway inflammation in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150: 724-728.

KAPLAN SS, LANCASTER JR JR, BASFORD RE, SIMMONS RL. Effect of nitric oxide on staphylococcal killing and interactive effect with superoxide. *Infect Immun.* 1996; 64(1):69-76.

KAY AB, CORRIGAN CJ. Asthma. Eosinophils and neutrophils. *Br Med Bull.* 1992; 48:51-64. Review.

KELLY J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141(3):765-788. Review.

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.

KILLINGSWORTH CR, SHORE SA, ALESSANDRINI F, DEY RD, PAULAUSKIS JD. Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. *Am J Physiol.* 1997; 273(5 Pt 1):L107310-L107381.

KIM JY, CHEN JC, BOYCE PD, CHRISTIANI DC. Exposure to welding fumes is associated with acute systemic inflammatory responses. *Occup Environ Med.* 2005; 62: 157-163.

KING KA, HU C, RODRIGUEZ MM, ROMAGUERA R, JIANG X, PIEDIMONTE G. Exaggerated neurogenic inflammation and substance P receptor upregulation in RSV-infected weanling rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24, 101-107.

KIPS JC, TAVERNIER J, PAUWELS RA. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. *Am Rev Respir Dis.* 1992; 145(2 Pt 1):332-336.

KNIGHT D, ZHOU D, BAI TWE. Determination of predominant cell types expressing tachykinin receptor in human lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 161 A.

KOBAYASHI M, NASUHARA Y, KAMACHI A, TANINO Y, BETSUYAKU T, YAMAGUCHI E, NISHIHARA J, NISHIMURA M. Role of macrophage migration inhibitory factor in ovalbumin-induced asthma in rats. *Eur Respir J.* 2006; 27(4): 726-734.

KONTOS AS, FASSOIS SD, DELI MF. Short-term effects of air pollution on childhood respiratory illness in Piraeus, Greece, 1987-1992: nonparametric stochastic dynamic analysis. *Environ Res.* 1999; 81(4):275-296.

KOTO H, AIZAWA H, TAKATA S, INOUE H, HARA N. An important role of tachykinins in ozone-induced airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995; 151: 1763-1769.

KRISHNA MT, CHAUHAN AJ, FREW AJ, HOLGATE ST. Toxicological mechanisms underlying oxidant pollutant-induced airway injury. *Rev Environ Health.* 1998;13(1-2):59-71.

KUBES P, GRANGER DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol.* 1992; 262(2 Pt 2):H611-615.

KUMAGAI Y, ARIMOTO T, SHINYASHIKI M, SHIMOJO N, NAKAI Y, YOSHIKAWA T, SAGAI M. Generation of reactive oxygen species during interaction of diesel exhaust particle components with NADPH-cytochrome P450 reductase and involvement of the bioactivation in the DNA damage. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22(3):479-487.

KUMAGAI Y, HAYASHI T, MIYAUCHI T, ENDO A, IGUCHI A, KIRIYA-SAKAI M, SAKAI S, YUKI K, KIKUSHIMA M, SHIMOJO N. Phenanthraquinone inhibits eNOS activity and suppresses vasorelaxation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281(1):R25-R30.

LAITINEN A, LAITINEN LA. Airway morphology: epithelium/basement membrane. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 150(5 Pt 2): 514-517. Review.

LAMBRECHT BN, GERMONPRE PR, EVERAERT EG, CARRO-MUINO I, DE VEERMAN M, DE FELIPE C, HUNT SP, THIELEMANS K, JOOS GF, PAUWELS RA. Endogenously produced substance P contributes to lymphocyte proliferation induced by dendritic cells and direct TCR ligation. *Eur J Immunol.* 1999; 29(12): 15-25.

LAMPINEN M, CARLSON M, HAKANSSON LD, VENGE P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. *Allergy.* 59(8): 793-805, 2004.

LEE LY, GU Q. Mechanisms of bronchopulmonary C-fiber hypersensitivity induced by cationic proteins. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16(1):15-22.

LEE LY, WIDDICOMBE JG. Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. *Environ Health Perspect.* 2001; 109 Suppl 4:585-589. Review

LIPSETT M, HURLEY S, OSTRO B. Air pollution and emergency room visits for asthma in Santa Clara County, California. *Environ Health Perspect.* 1997; 105(2): 216-222.

LONG NC, FREVERT CW, SHORE SA. Role of C-fibers in the inflammatory response to intratracheal lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1996; 271 (3 Pt 1):L-425-431.

LUKACAS NW, STRIETER RM, CHENSUE SW, WIDMER M, KUNKEL SL. TNF- α mediates recruitment of neutrophils and eosinophils during airway inflammation. *J Immunol.* 1995; 154(10): 5411-5417.

LUNG HL, LEUNG KN, STADLIN A, MACM TSANG D. Induction of tumor necrosis factor receptor type 2 gene expression by tumor necrosis factor- α in rat primary astrocytes. *Life Sci.* 2001; 68, 2081-2091.

LUSTER AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; 338(7): 436-445. Review.

MAGGI CA. Tachykinin receptor and airway pathophysiology. *Eur Respir J.* 1993; 6(5):735-742. Review.

MAGGI CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul. Pept.* 1997; 70: 75-90.

MAIER SF, WATKINS LR. Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood and cognition. *Psychol Rev.* 1998; 105(1): 83-107. Review.

MAKHLOUF GM, GRIDEN JR. Nonadrenergic noncholinergic inhibitory transmitter of the gut. *News Physiol Sci.* 1993; 8: 195-199.

MAPP CE, MIOTTO, BRACCIONI F. The distribution of neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors in human central airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161:207-215.

MARTLING CR, THEODORSSON-NORHEIM E, LUNDBERG JM. Occurrence and effects of multiple tachykinins; substance P, neurokinin A and neuropeptide K in human lower airways. *Life Sci.* 1987; 40(16): 1633-1643.

MATUTE-BELLO, G, LILES WC, RADELLA F, STEINBERG KP, RUZINSKI JT, JONAS M, CHI EY, HUDSON LD, MARTIN TR. Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156(6):1969-1977.

MCCLEANE G. The analgesic efficacy of topical capsaicin is enhanced by glyceryl trinitrate in painful osteoarthritis: a randomized, double blind, placebo controlled study. *Eur J Pain*. 2000; 4(4):355-360.

MCKAY S, SHARMA HS. Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respir Res*. 2002; 3(1):11. Review.

MEDEIROS MV, DE LUCA IM, BRICOLA AA, ZANESCO A, DE NUCCI G, ANTUNES E. Enhanced airways responsiveness in rats depleted of sensory neuropeptides by neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett*. 2003; 341:103-106.

MEDEIROS MV, MACEDO-SOARES MF, DE LUCA IM, HYSLOP S, DE NUCCI G, ANTUNES E. Contribution of c-fibers to leucocyte recruitment in bronchoalveolar lavage fluid and pleural cavity in the rat. *Eur J Pharmacol*. 2001; 421(2):133-140.

MEDINA S, LE TERTRE A, QUENEL P, LE MOULLEC Y, LAMELOISE P, GUZZO JC, FESTY B, FERRY R, DAB W. Air pollution and doctor's house calls: results from the ERPURS system for monitoring the effects of air pollution on public health in Greater Paris, France, 1991-1995. *Evaluation des Risques de la Pollution Urbaine pour la Sante. Environ Res*. 1997; 75(1):73-84.

MHANNA MJ, DRESHAJ IA, HAXHIU MA, MARTIN RJ. Mechanism for substance P-induced relaxation of precontracted airway smooth muscle during development. *Am J Physiol*. 1999; 276(1 Pt 1):L51-L56.

MIRAGLIA SG, SALDIVA PH, BOHM GM. An evolution of air pollution: on health impacts and costs in São Paulo, Brazil. *Environ Manage*. 2005; 25(5): 667-676.

MONCADA S. Nitric oxide gas: mediator, modulator, and pathophysiologic entity. *J Lab Clin Med*. 1992; 120(2):187-191. Review.

MONDORO TH, SHAFER BC, VOSTAL JG. Peroxynitrite-induced tyrosine nitration and phosphorylation in human platelets. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(6):1055-1063.

MONKS TJ, JONES DC. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. *Curr Drug Metab.* 2002; 3: 425-438. Review.

MOORE PK, AL-SWAYEH OA, EVANS R. Rabbit brain contains an endogenous inhibitor of endothelium-dependent relaxation. *Br J Pharmacol.* 1990; 101(4): 865-868.

MUTOH T, JOAD JP, BONHAM AC. Chronic passive cigarette smoke exposure augments bronchopulmonary C-fibre inputs to nucleus tractus solitarii neurones and reflex output in young guinea-pigs. *J Physiol.* 2000; 523 Pt 1:223-33.

NAESS O, NAFSTAD P, AAMODT G, CLAUSSEN B, ROSLAND P. Relation between concentration of air pollution and cause-specific mortality: four-year exposures to nitrogen dioxide and particulate matter pollutants in 470 neighborhoods in Oslo, Norway. *Am J Epidemiol.* 2007; 165; 435-443.

NAGY JI, IVERSEN LL, GOEDERT M, CHARPMAN D, HUNT SP. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J Neurosci.* 1983; 3:330-406.

NAGY JI, VINCENT SR, STAINES WMA, FIBIGER HC, RESINE TD, YAMAMURA HI. Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Res.* 1980; 186: 435-444.

NAGY I, SANTHA P, JANCOS G, URBAN L. The role of the vanilloid (capsaicin) receptor (TRPV1) in physiology and pathology. *Eur J Pharmacol.* 2004; 500(1-3):351-369. Review.

NASCIMENTO LF, PEREIRA LA, BRAGA AL, MODOLO MC, CARVALHO JA JR. Effects of air pollution on children's health in a city in Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica.* 2006; 40(1):77-82.

NATHAN CF. Secretory products of macrophages. *J Clin Invest.* 1987; 79(2):319-326. Review.

NAVA E, PALMER RM, MONCADA S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *Lancet.* 1991; 338(8782-8783):1555-1557.

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-L670.

NEMMAR A, HOYLAERTS MF, HOET PH, NEMERY B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Lett*. 2004; 149: 243-253.

NEMMAR A, NEMERY B, HOET PH, VERMYLEN J, HOYLAERTS MF. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168(11):1366-1372.

NEWHOUSE M, SANCHIS J, BIENENSTOCK J. Lung defense Mechanisms (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976a; 295 (18): 990-998. Review.

NEWHOUSE M, SANCHIS J, BIENENSTOCK J. Lung defense Mechanisms (Second of two parts). *N Engl J Med*. 1976b ; 295(19):1045-1052. Review.

NEWMAN SL, MIKUS LK, MA TUCCI. Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor - and Fc receptor - mediated phagocytosis. *J Immunol*. 1991; 146 (3): 967-974.

NIO DA, MOYLAN RN, ROCHE JK. Modulation of T lymphocyte function by neuropeptides. Evidence for their role as local immunoregulatory elements. *J Immunol*. 1993; 150(12): 5281-5288.

OHTOSHI T, TAKIZAWA H, OKAZAKI H, KAWASAKI S, TAKEUCHI N, OHTA K, ITO K. Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro. *J Allergy Clin Immunol*. 1998; 101(6 Pt 1):778-785.

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.

OORTGIESEN M, VERONESI B, EICHENBAUM C, KISER PF, SIMON SA. Residual oil fly ash and charged polymers activate epithelial cells and nociceptive

sensory neurons. *Am J Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2000; 278:L683-L695.

PABLA R, BUDA AJ, FLYNN DM, BLESSE SA, SHIN AM, CURTIS MJ, LEFER DJ. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1996; 78(1): 65-72.

PABLA R, BUDA AJ, FLYNN DM, BLESSÉ SA, SHIN AM, CURTIS MJ, LEFER DJ. Nitric oxide attenuatesneutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1996; 78(1):65-72.

PALFRAMAN RT, COSTA SK, WILSONCROFT P, ANTUNES E, DE NUCCI G,BRAINS D. The effect of a tachykinin NK1 receptor antagonist, SR140333, on oedema formation induced in rat skin by venom from the Phoneutria nigriventer spider. *Br J Pharmacol*. 1996; 118(2): 295-298.

PANTAZOPOULOU A, KATOYANNI K, KOUREA-KREMASTINO J, TRICHOPOULOS D. Short-term effects of air pollution on hospital emergency outpatient visits and admissions in the greater Athens, Greece area. *Environ Res*. 1995; 69(1):31-36.

PEDEN DB. Pollutants and asthma: role of air toxics. *Environ Health Perspect*. 2002; 110 Suppl 4:565-568.

PEREIRA FL, SILVA DA, SOPELETE MC, SUNG SS, TAKETOMI EA. Mite and cat allergen exposure in Brazilian public transport vehicles. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2004; 93: 179-184.

PEREIRA PM, SALDIVA PHN, SAKAE RS, BOHM GM, MARTINS MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res*. 1995; 69(2):96-101.

PEINNEQUIN A, MOURET C, BIROT O, ALONSO A, MATHIEU J, CLARENCON D, AGAY D, CHANCERELLE Y, MULTON E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*. 2004 Feb 5; 5:3.

PETERS A, PERZ S, DORING A, STIEBER J, KOENIG W, WICHMANN HE. Increases in heart rate during an air pollution episode. *Am J Epidemiol.* 1999; 150(10): 1094-1098.

PFAFFL MW, LANGE IG, DAXENBERGER A, MEYER HH. Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of ER α and ER β mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS.* 2001; 109: 345-355.

POPE CA. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect.* 2000; 108 (Suppl 4):713-723.

POULTER LW, JANOSSY G, POWER C, SREENAN S, BURKE C. Immunological/physiological relationships in asthma: potential regulation by lung macrophages. *Immunol Today.* 1994; 15(6):258-261.

PRYOR WA, SQUADRITO GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol.* 1995; 268(5 Pt 1):L699-L722. Review.

RABELLINO EM, ROSS GD, POLLEY MJ. Membrane receptors of mouse leukocytes. I. Two types of complement receptors for different regions of C3. *J Immunol.* 1978; 120(3): 879-885.

RABINOVITCH M, DE STEFANO MJ. Macrophage spreading in vitro. I. Inducers of spreading. *Exp Cell Res.* 1973; 77(1): 323-324.

RABINOVITCH M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* 1995; 5(3): 85-87.

RADI R, BECKMAN JS, BUSH KM, FREEMAN BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem.* 1991; 266(7):4244-4250.

RADOMSKI MW, PALMER RM, MONCADA S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(24):10043-10047.

RAJEEVAN MS, VERNON SD, TAYSAVANG N, UNGER ER, Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR. *J Molecular Diagnosis*. 2001; 3: 26-31.

RAMESHWAR P, GASCON P, GANEA D. Stimulation of IL-2 production in murine lymphocytes by substance P and related tachykinins. *J Immunol*. 1993; 151(5): 2484-2496.

RAMIREZ-PRIETO MT, GARCIA-RIO F, VILLAMOR J. Role of oxidative stress in respiratory diseases and its monitoring. *Med Clin (Barc)*. 2006; 127(10):386-396. Review.

RAPPOLEE DA, WEB Z. Macrophage secretions: a functional perspective. *Bull Inst Pasteur, Paris*. 1989; 87: 361-394.

RAPPOLEE DA, WEBB Z. Secretory products of phagocytes. *Curr Opin Immunol*. 1988; 1(1): 47-55. Review.

RAWLINGSON A, GERARD NP, BRAIN SD. Interactive contribution of NK(1) and kinin receptors to the acute inflammatory oedema observed in response to noxious heat stimulation: studies in NK(1) receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*. 2001; 134(8):1805-1813.

REGOLI D, BOUDON A, FAUCHERE JL. Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev*. 1994; 46, 551-599.

RENNARD SI, ROMBERGER DJ. Host defenses and pathogenesis. *Semin Respir Infect*. 2000; 15(1):7-13.

RICCIARDOLO FL, NADEL JA, BERTRAND C, YAMAWAKI I, CHAN B, GEPPETTI P. Tachykinins and kinins in antigen-evoked plasma extravasation in guinea-pig nasal mucosa. *Eur J Pharmacol*. 1994a; 261, 127-132.

RICCIARDOLO FL, NADEL JA, GRAF PD, BERTRAND C, YOSHIHARA S, GEPPETTI P. Role of kinins in anaphylactic-induced bronchoconstriction mediated by tachykinins in guinea-pigs. *Br J Pharmacol*. 1994b; 113(2): 508-512.

RICHARDS IS, BROOKS SM. Respiratory toxicology. In: Gochfeld M, Herzstein J, Schenker M. Jackson R. Environmental Medicine. 1995; St. Louis: Mosby-year Book, p.166-181.

RICHARDSON PS, WEBBER SE. The control of mucous secretion in the airways by peptidergic mechanisms. *Am Rev Respir Dis*. 1987; 136: S72-S76.

RIPPERTON LA, KORNREICH L, WORTH JJ, Nitrogen dioxide and nitric oxide in non-urban air. *J Air Pollut Control Assoc*. 1970; 20(9): 589-592.

ROHN TT, NELSON LK, SIPES KM, SWAIN SD, JUTILA KL, QUINN MT. Priming of human neutrophils by peroxynitrite: potential role in enhancement of the local inflammatory response. *J Leukoc Biol*. 1999; 65(1):59-70.

ROSENBERG HF, PHIPPS S, FOSTER PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 May 2; [Epub ahead of print]

ROSENFELD G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem Inst Butantan*. 1947; 20, 315-328.

ROSSAINT R, PISON U, GERLACH H, FALKE KJ. Inhaled nitric oxide: its effects on pulmonary circulation and airway smooth muscle cells. *Eur Heart J*. 1993; 14 Suppl I:133-140. Review.

RUBANYI GM, VANHOUTTE PM. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*. 1986; 250(5 Pt 2):H822-H827.

RUMEL D, RIEDEL LF, LATORRE MDO R, DUNCAN BB. Myocardial infarct and cerebral vascular disorders associated with high temperature and carbon monoxide in a metropolitan area of southeastern Brazil. *Rev Saude Publica*. 1993; 27(1):15-22.

RUSSO C, POLOSA R. TNF-alpha as a promising therapeutic target in chronic asthma: a lesson from rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)*. 2005; 109(2): 135-142, Review.

SAAVEDRA Y, VERGARA P. Somatostatin inhibits intestinal mucosal mast cell degranulation in normal conditions and during mast cell hyperplasia. *Regul Pept.* 2003; 111(1-3):67-75.

SAGAI M, FURUYAMA A, ICHINOSE T. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. *Free Radical Biology and Medicine.* 1996; 21:199-209.

SAGARA H, YUKAWA T, ARIMA M, MAKINO S. Effect of capsaicin on the migration of eosinophils into the bronchi of guinea pigs. *Arerugi.* 1993; 42 (3 Pt 1): 236-42.

SALVAGGIO JE. Inhaled Particles and Respiratory-Disease. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94 (2 Pt 2):304-309. Review.

SALVI S, SEMPER A, BLOMBERG A, HOLLOWAY J, JAFFAR Z, PAPI A, TERAN L, POLOSA R, KELLY F, SANDSTROM T, HOLGATE S, FREW A. Interleukin-5 production by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999; 20(5):984-991.

SAMBROOK J, RUSSEL DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3th ed., 2001.

SANDERS KM, WARD SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol.* 1992; 262(3 Pt 1): G379-G392. Review.

SCHLESINGER RB. Interaction of gaseous and particulate pollutants in the respiratory tract: mechanisms and modulators. *Toxicology.* 1995; 105(2-3): 315-25.

SCHMITTGEN TD, ZAKRAJSEK BA, MILLS AG, GORN V, SINGER MJ, REED MW. Quantitative Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction to study mRNA Decay: Comparison of Endpoint and Real-Time methods. *Analytical Biochemistry.* 2000; 285(2): 194-204.

SCHUILING M, ZUIDHOF AB, ZAAGSMA J, MEURS H. Role of tachykinin NK1 and NK2 receptors in allergen-induced early and late asthmatic reactions, airway

hyperresponsiveness, and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29 Suppl 2:48-52.

SCHUILING M, ZUIDHOF AB, ZAAGSMA J, MEURS H. Involvement of tachykinin nk1 receptor in the development of allergen-induced airway hyperreactivity and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):423-430.

SEATON A, MACNEE W, DONALDSON K, GODDEN D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet*. 1995; 345 (8943):176-178.

SEN R, BALTIMORE D. Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*. 1986; 47(6):921-928.

SHAH A, CHURCH MK, HOLGATE ST. Tumour necrosis factor alpha: a potential mediator of asthma. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25(11):1038-1044. Review.

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):963-970.

SHANLEY TP, VASI N, DENENBERG A. Regulation of chemokine expression by IL-10 in lung inflammation. *Cytokine*. 2000;12(7):1054-1056.

SHI H, ZHONG X, LONG X, CHEN Y. Effect of interferon-gamma on antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse airway. *Chin Med J (Engl)*. 1996; 109(3):215-218.

SHUKLA A, TIMBLIN C, BERUBE K, GORDON T, MCKINNEY W, DRISCOLL K, VACEK P, MOSSMAN BT. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)-kappaB-related genes and oxidant-dependent nf-kappaB activation in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23(2):182-187.

SIEBENLIST U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. *Biochim Biophys Acta*. 1997; 1332(1):R7-R13.

SODERBERG M, HELLSTROM S, SANDSTROM T, LUNDGREN R, BERGH A. Structural characterization of bronchial mucosal biopsies from healthy volunteers a light and electron microscopical study. *Eur Respir J*. 1990; 3(3): 261-266.

SOLWAY J, AND LEFF AR. Sensory neuropeptides and airway function. *J Appl Physiol*. 1991; 71: 2077-2087.

SOLT LA, MADGE LA, ORANGE JS, MAY MJ. Interleukin-1-induced NF-kappaB activation is NEMO-dependent but does not require IKKbeta. *J Biol Chem*. 2007; 282(12):8724-8733.

SPINA D, PAGE CP. Pharmacology of airway irritability. *Curr Opin Pharmacol*. 2002;2(3):264-272.Review.

STÄNDER S, MOORMANN C, SCHUMACHER M, BUDDENKOTTE J, ARTUC M, SHPACOVITCH V, BRZOSKA T, LIPPERT U, HENZ BM, LUGER TA, METZE D, STEINHOFF M. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*. 2004; 13(3):129-139.

STEERENBERG PA, ZONNENBERG JA, DORMANS JA, JOON PN, WOUTERS IM, VAN BREE L, SCHEEPERS PT, VAN LOVEREN H. Diesel exhaust particles induced release of interleukin 6 and 8 by (primed) human bronchial epithelial cells (BEAS 2B) in vitro. *Exp Lung Res*. 1998; 24(1):85-100.

STERNER-KOCK A, VESELY KR, STOVALL MY, SCHELEGLE ES, GREEN JF, HYDE DM. Neonatal capsaicin treatment increases the severity of ozone-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996; 153: 436-443.

SUFFREDINI AF, FANTUZZI G, BADOLATO R, OPPENHEIM JJ, O'GRADY NP. New insights into the biology of the acute phase response. *J Clin Immunol*. 1999; 19(4): 203-214. Review.

SULLIVAN J, SHEPPARD L, SCHREUDER A, ISHIKAWA N, SISCOVICK D, KAUFMAN J. Relation between short-term fine-particulate matter exposure and onset of myocardial infarction. *Epidemiology*. 2005;16(1):41-48.

SZALLASI A, BLUMBERG PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Am Soc Pharmacol Exper Therap.* 2000; (51):159-211.

SZAREK JL, STEWART NL, SPURLOCK B, SCHNEIDER C. Sensory nerve- and neuropeptide-mediated relaxation responses in airways of Sprague-Dawley rats. *J Appl Physiol.* 1995; 78(5):1679-1687.

SZOLCSANYI J, JANCZO-GABOR A, JOO F. Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1975; 287(2):157-169.

SZOLCSANYI J, SANDOR Z, PETHO G, VARGA A, BOLCSKEI K, ALMASI R, RIEDL Z, HAJOS G, CZECH G. Direct evidence for activation and desensitization of the capsaicin receptor by N-oleoyldopamine on TRPV1-transfected cell, line in gene deleted mice and in the rat. *Neurosci Lett.* 2004; 6:361(1-3):155-158.

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.

TAKANO H, ICHINOSE T, MIYABARA Y, SHIBUYA T, LIM HB, YOSHIKAWA T, SAGAI M. Inhalation of diesel exhaust enhances allergen-related eosinophil recruitment and airway hyperresponsiveness in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998;150(2):328-37.

TAKEBAYASHI T, ABRAHAM J, MURTHY GG, LILLY C, RODGER I, SHORE SA. Role of tachykinins in airway responses to ozone in rats. *J Appl Physiol.* 1998; 85(2): 442-450.

TAKEMURA R, WERB Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am J Physiol.* 1984; 246(1 Pt 1): C1-C9. Review.

TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982; 126(1):131-138.

TAPPER H. The secretion of peformed granules by macrophages and neutophils. *J Leukoc Biol.* 1996; 59(5): 613-620.

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

TELES AM, YSHII LM, KUMAGAI Y, TAVARES LIMA W, MUSCARA MN, COSTA SKP. Pharmacological study addressing the link between activation of sensory C-fibers and airways inflammation evoked by air pollutants. In: Proceedings of the Br Pharmacol Society at <http://www.pA2online.org/abstracts>, Londres, 2005.

THOMAS PS, YATES DH, BARNES PJ. Tumor necrosis factor-alpha increases airway responsiveness and sputum neutrophilia in normal human subjects. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 152(1): 76-80.

THOMMESEN L, SJURSEN W, GASVIK K, HANSSEN W, BREKKE OL, SKATTEBOL L, HOLMEIDE AK, ESPEVI T, JOHANSEN B, LAEGREID A. Selective inhibitors of cytosolic o secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of tanscription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J Immunol*. 1998; 161(7): 3421-3430.

TIBERIO IF, TURCO GM, LEICK-MALDONADO EA, SAKAE RS, PAIVA SO, DO PATROCINIO M, WARTH TN, LAPA E SILVA JR, SALDIVA PH, MARTINS MA. Effects of neurokinin depletion on airway inflammation induced by chronic antigen exposure. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997; 155(5):1739-1747.

TOULOUMI G, KATSAOUYANNI K, ZMIROU D, SCHWARTZ J, SPIX C, DE LEON A, TOBIAS A, QUENNEL P, RABCZENKO D, BACHAROVA L, BISANTI L, VONK JM, PONKA A. Short-term effects of ambient oxidant exposure on mortality: a combined analysis within the APHEA project. *Air Pollution and Health: a European Approach*. *Am J Epidemiol*. 1997; 146(2):177-185.

TOULOUMI G, SAMOLI E, KATSOUYANNI K. Daily mortality and "winter type" air pollution in Athens, Greece - a time series analysis within the APHEA project. *J Epidemiol Community Health*. 1996; 50 (Suppl 1):S47-S51.

TREVISANI M, PATACCHINI R, NICOLETTI P, GATTI R, GAZZIERI D, LISSI N, ZAGLI G, CREMINON C, GEPPEPPI P, HARRISON S. Hydrogen sulfide causes vanilloid receptor 1-mediated neurogenic inflammation in the airways. *Br J Pharmacol* . 2005; 145: 1123-1131.

UNKELESS JC, SCIGLIANO E, FREEDMAN VH. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol.* 1998; 6: 251-281. Review.

VAN EEDEN SF, HOGG JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: The importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A.* 2002; 65(20):1597-1613.

VAN FURTH R. Human monocytes and cytokines. *Res Immunol.* 1998; 149(7-8): 719-720. Review.

VAN SNICK J. Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 253-278. Review.

VENGE P. Eosinophil activity in bronchial asthma. *Allergy Proc.* 1994; 15(3):139-141.

VERONESI B, de HAAR C, LEE L, OORTGIESEN M. The surface charge of visible particulate matter predicts biological activation in human bronchial epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 178(3):144-154.

VERONESI B, OORTGIESEN M, ROY J, CARTER JD, SIMON SA, GAVETT SH. Vanilloid (capsaicin) receptors influence inflammatory sensitivity in response to particulate matter. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 169 (1):66-76.

VILCEK J. Forty years of interferon, forty years of cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8(4): 239.

WALLACH D, VARFOLOMEEV NL, MALININ NL, GOLTSEV YV, KOVALENKO AV, BOLDIN MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17:331-367.

WARREN JS. Interleukins and tumor necrosis factor in inflammation. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1990; 28(1): 37-59.

WATANABE N, HORIE S, MICHAEL GJ, KEIR S, SPINA D, PAGE CP, PRIESTLEY JV. Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system. *Neuroscience.* 2006; 141(3):1533-1543.

WIDDICOMBE J, LEE LY. Airway reflexes, autonomic function, and cardiovascular responses. *Environ Health Perspect.* 2001; 109 Suppl 4:579-584. Review.

WIDDICOMBE JG. Functional morphology and physiology of pulmonary rapidly adapting receptors (RARs). *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2003; 270(1):2-10.

WIDDICOMBE JG. Overview of neural pathway in allergy and asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 2003; 16:23-30.

WIEDERMANN CJ, WIEDERMANN FJ, APPERL A, KIESELBACH G, KONWALINKA G, BRAUNSTEINER H. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxyterminal substance P. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1989; 340(2): 185-190.

WOOD ER, BERGER H JR, SHERMAN PA, LAPETINA EG. Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;191(3):767-774.

XIA T, KORGE P, WEISS JN, LI N, VENKATESEN MI, SIOUTAS C, NEL A. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(14):1347-1358.

XIN H, TANAKA H, YAMAGUCHI M, TAKEMORI S, NAKAMURA A, KOHAMA K. Vanilloid receptor expressed in the sarcoplasmic reticulum of rat skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 332, 756-762.

XU J, JIANG F, NAYERI F, ZETTERSTROM O. Apoptotic eosinophils in sputum from asthmatic patients correlate negatively with levels of IL-5 and eotaxin. *Respir Med.* 2007 Mar 20; [Epub ahead of print].

YANAGISAWA R, TAKANO H, INOUE K, ICHINOSE T, SADAKANE K, YOSHINO S, YAMAKI K, KUMAGAI Y, UCHIYAMA K, YOSHIKAWA T. Complementary DNA microarray analysis in acute lung injury induced by lipopolysaccharide and diesel exhaust particles. *Exp Biol Med.* 2004; 229(10): 1081-1087.

YANG HM, BUTTERWORTH L, MUNSON AE, MEADE BJ. Respiratory exposure to diesel exhaust particles decreases the spleen IgM response to a T cell-dependent antigen in female B6C3F1 mice. *Toxicol Sci.* 2003; 71(2): 207-216.

YANG HM, MA JY, CASTRANOVA V, MA JK. Effects of diesel exhaust particles on the release of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α from rat alveolar macrophages. *Exp Lung Res.* 1997; 23(3):269-284.

YATES DH, BARNES PJ, THOMAS PS. Tumor necrosis factor α alerts human bronchial reactivity and induces inflammatory cell influx. *Am Rev Respir Dis.* 1993; 147:A1001.

ZHANG XN. Changes in interleukin-1 and interleukin-2 in scalded rats. *Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi.* 1989; 5(3):213-5, 240.

ZMIROU D, SCHWARTZ J, SAEZ M, ZANOBBETTI A, WOJTYNIAK B, TOULOUMI G, SPIX C, PONCE de LEON A, LE MOULLEC Y, BACHAROVA L, SCHOUTEN J, PONKA A, KATSOUYANNI K. Time-series analysis of air pollution and cause-specific mortality. *Epidemiology.* 1998; 9(5):495-503.

7 ANEXOS

7.1. Artigos científicos submetidos

- 1 **TELES, A.M**, KUMAGAI Y, BRAIN S.D., TEIXEIRA S.AP., VARRIANO A.A., BARRETO M.A.G., LIMA WT, ANTUNES E., MUSCARÁ M.N., COSTA S.K.P. 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). Submetido Abr/07 – Toxicol Appl Pharmacol (S-07-00248).

7.2. Resumos apresentados em anais de congressos (periódicos indexados)

- 1 **TELES, AM**, KUMAGAI Y; MUSCARA MA, BARRETO MAAG, COSTA SKP. Pharmacological study addressing the link between sensory C fibers and airways inflammation evoked by air pollutants. Proceedings of British Pharmacological Society, Reino Unido. *Br J Pharmacol*. 2005, 3 (4): 121P. <http://www.pa2online.org>.
- 2 OLIVEIRA JF, **TELES AM**, YSHII LM, TAVARES DE LIMA W, TEIXEIRA SA, LIMA C, BARRETO MAAG, MUSCARÁ MN, COSTA SKP. Does acute pulmonary exposure to both diesel exhaust particles and quinones cause systemic effects? *Inflamm Res*. 2007; 56(Suppl 3): S408, P01.05.

7.3. Resumos e Conferências Apresentados em Congressos e Simpósios (Nacionais e Internacionais)

- 1) XXXVI Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2004, Águas de Lindóia, Brasil. Autores COELHO FR, **TELES AM**, LIMA WT, BRAIN SD, MUSCARÁ MN, COSTA SKP. The role of sensory fibers on microvascular changes evoked by diesel exhaust particles.
- 2) XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005, Águas de Lindóia, Brasil. Autores: **TELES, AM**, YSHII LM, KUMAGAI Y, LIMA W T, MUSCARA MN, COSTA SKP. Resumo: Effect of the reactive

compound 1,2-Naphthoquinone in the rat airways.

- 3) IV Congresso do ICB, São Paulo, Brasil, 2005. Autores: VAL L, **TELES, AM**, KUMAGAI Y, MUSCARÁ MN, LIMA WT, COSTA SKP. Efeito do composto reativo 1,2-NAFTOQUINONA (1,2-NQ) e partículas liberadas na exaustão do diesel sobre as vias aéreas de ratos.
- 4) Congresso da Sociedade Britânica de Farmacologia (Inverno), Londres, Dez/2005. Autores: **TELES AM**, KUMAGAI Y; MUSCARA MA, BARRETO MAAG, COSTA SKP. Resumo: Pharmacological study addressing the link between sensory C fibers and airways inflammation evoked by air pollutants.
- 5) II Simpósio Internacional de Neurociência do IINN-ELS, 2007. Natal, Brasil. Autores: **TELES AM**, SAMPAIO SC, LIMA C, BOLETINI-SANTOS D, TEIXEIRA SA, LOPES-FERREIRA M, MUSCARÁ MN, COSTA SK. Resumo: Capsaicin-Sensitive Neurons Modulate Pollutants-Induced Phagocytic Activity In Rats.
- 6) 8º Congresso Mundial em Inflamação, Copenhague, Jun/2007. Autores: OLIVEIRA JF, **TELES AM**, YSHII LM, TAVARES DE LIMA W, TEIXEIRA SA, LIMA C, BARRETO MAAG, MUSCARÁ MN, COSTA SKP. Resumo: Does acute pulmonary exposure to both diesel exhaust particles and quinones cause systemic effects.

7.4. Artigos científicos em preparação a serem submetidos em periódicos indexados

- 1) Oliveira J.F., **Teles A.M.**, Yshii L.M., Lima W.T., Teixeira S.A., Kumagai Y., Muscará M.N., Costa S.K.P. Does acute pulmonary exposure to both diesel exhaust particles (DEP) and quinones cause systemic effects? A ser submetido: Toxicol Lett.
- 2) Oliveira J.F., Favaro R., Tam C., Zorn T.M., Rizzo-Vasques Y., Brain S.D.; Costa S.K.P. Protective effect of TRPV1 receptors on diesel exhaust particle (DEP) and 1,2-naphthoquinone-induced airway inflammation. A ser submetido: Toxicol. Sci.
- 4) **Teles, A.M**, Sampaio S., Kumagai Y, Lima C., Muscará M.N., Costa S.K.P. Evidence that 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) and particulate matter exacerbate the phagocytic capacity of rat pulmonary macrophages: are they influenced by

sensory-efferent nerve and immune pathways? A ser submetido: J Leukocyte Biol.

7.5.Prêmios e Títulos

- 2005 – (Menção Honrosa) Sessão de painéis, conferido à aluna de doutoramento Aila M Teles. XX FESBE, realizado em Águas de Lindóia, São Paulo.
- 2005 – (Menção Honrosa) Sessão de painéis, conferido à aluna de doutoramento Aila M Teles. Congresso Científico anual do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, realizado em São Paulo.
- 2005 – (1o lugar) Sessão de painéis, conferido à aluna de doutoramento Aila M Teles. III Prêmio Qualidade Científica João Garcia-Leme, realizado no Departamento de Farmacologia, USP, São Paulo.