UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeitos da exposição a baixas doses de hidroquinona e fenol sobre
a mobilização e função leucocitária**

Alexandre Ferreira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

SÃO PAULO

2006

Alexandre Ferreira

**Efeitos da exposição a baixas doses de hidroquinona e fenol sobre
a mobilização e função leucocitária**

Comissão julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientadora / presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, 10 de outubro de 2006

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012311

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Ferreira, Alexandre

F383e Efeitos da exposição a baixas doses de hidroquinona e fenol
sobre a mobilização e função leucocitária / Alexandre
Ferreira. -- São Paulo, 2006.
90p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli

1. Imunotoxicologia 2. Toxicologia experimental I. T.
II. Farsky, Sandra Helena Poliselli, orientador.

615.9 CDD

Dedico este trabalho

à Deus pelo presente da Vida,

*aos meus pais Benedicto e Raquel
por mostrarem que a dedicação,
a honestidade e o trabalho
resultam em uma vida
digna e honrada.*

*à minha esposa Elisangela e minha filha Ingrid
pela força e compreensão nos momentos
difíceis que lhes foram impostos
durante o desenvolvimento
deste trabalho.*

À Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

*Toda minha admiração e agradecimento
pela orientação, contribuindo
de maneira significativa
para meu crescimento
pessoal e profissional.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Dâmares e Otávio e aos demais familiares, Helder, Júlia, Gustavo, Josimara, Palmira e José Ernesto Maroco (*in memorian*) pelo apoio moral, emocional e financeiro nos momentos difíceis.

A FAPESP pelo apoio financeiro (Bolsa de Mestrado, Processo nº 04/11412-9; Auxílio à Pesquisa, Processo nº 03/04013-8).

Aos Professores Wothan, Primavera, Ernani, Maurício, Ana Paula e Regina Lúcia, por colaborarem para execução deste trabalho.

Aos meus amigos pós-graduandos e estagiários, Emerson, Cristina, Sandra, Suéllen, Juan, Danielle, Kaline, Gabriela, Ana Paula, Mário, Fernando, Leilane e Julyana, por estarem sempre presentes em todos os momentos e pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos pós-graduandos em Toxicologia, Daniela, Fabyana, Vania, Rafael, Sidnei, Igo, Tiago, Fabriciano, Paula, Virginia, Melissa, Ana Verônica e Vanessa, pela amizade conquistada nesta fase de minha vida.

Aos colegas do Laboratório de Análises Toxicológicas, funcionários e estagiários, Maurício (Laboratório de Bioquímica), Mônica, Ângelo, Helena, Roseli, Karla, Dalva e Luzia, pela colaboração e amizade.

Aos colegas de República, Katia, Tatiana, Leila, Marcelo e Cássia, por me acolherem no decurso desta jornada.

LISTA DE ABREVIações

1,2-BQ	<i>orto</i> -benzoquinona
1,4-BQ	<i>para</i> -benzoquinona
APC	Célula apresentadora de antígeno
BSA	Albumina sérica bovina
CAM	Molécula de adesão celular
CAT	Catecol
CYP	Citocromo
EDTA	Etilenodiaminotetraacético
ELAM	<i>Endothelial leukocyte adhesion molecule</i>
EPM	Erro padrão da média
FE	Fenol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	<i>N</i> -formil metionil-leucil-fenilalanina
GMP-140	<i>Granule membrane protein</i>
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HBSS	Solução salina fosfato de Hanks
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HQ	Hidroquinona
HQ+FE	Hidroquinona associada ao fenol
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
LECAM	L-selectina
LeuCAM	<i>Leukocyte cell adhesion molecule</i>
LFA	<i>Lymphocyte function – associated antigen</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄

MAC	<i>Macrophage antigen</i>
MHC	<i>Main or major histocompatibility complex</i>
MN	Mononuclear
MPO	Mieloperoxidase
NK	<i>Natural killer</i>
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i>
NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductase – 1
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [*]	Radicais hidroxil
OVA	Ovalbumina
PADGEM	<i>Platelet-activation dependent granule external membrane protein</i>
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCA	Anafilaxia passiva cutânea
R-PE	Ficoeritrina
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PG	Prostaglandina
PMA	Acetato de forbol miristato
PMN	Polimorfonuclear
RI	Resposta inflamatória
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Th	Linfócitos T auxiliar
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
VCAM	<i>Vascular adhesion molecule</i>
VLA	<i>Very late activation antigen</i>

LISTA DE DROGAS E REAGENTES

- *BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA*: anticorpos anti moléculas de adesão: monoclonal anti-CD62L marcado com FITC (L-selectina, LECAM-1); monoclonal anti-CD18 marcado com FITC (β 2 integrina); e monoclonal anti-CD31 marcado com R-PE (PECAM-1); monoclonal anti-CD106 marcado com R-PE (VCAM-1).
- *Cristália, São Paulo, Brasil*: pentobarbital sódico.
- *EMS, São Paulo, Brasil*: Hidróxido de Alumínio.
- *LabSynth, São Paulo, Brasil*: cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, nitrito de sódio, cloreto de cálcio diidratado, cloreto de potássio, ácido acético glacial, formaldeído, hexano, sulfato de magnésio heptaidratado e bicarbonato de sódio.
- *Merck & Co, NJ, EUA*: azul de Evans, etanol, cristal de violeta, EDTA, hidrato de cloral, May-Grünwald, Giemsa, água oxigenada (30 volumes) e glicose.
- *Pierce CO., Rockford, Illinois*: solução de bloqueio.
- *Raymond A Lamb, London, UK*: meio de suporte para congelamento de tecido (O.C.T. Tissue Tek TM).
- *Roche Químicos e Farmacêuticos S.A.*: Heparina e Metacolina.
- *Sigma Chemical CO. St. Louis, EUA*: hidroquinona, fenol, brometo de hexadecil-trimetil-amônio, albumina sérica bovina (fração V), ovalbumina (grau II), lipopolissacarídeo de *Salmonella abortus*, azida sódica, orto-dianisidina, composto 48/80, N-formil metionil-leucil-fenilalanina e acetato de forbol miristato.
- *Southern Biotechnology Associates, San Diego, CA, EUA*: anticorpos anti moléculas de adesão monoclonal anti-CD54 marcado com FITC (ICAM-1).

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vii
LISTA DE ABREVIACÕES.....	ix
LISTA DE DROGAS E REAGENTES	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
ÍNDICE DE QUADROS	xvi
ÍNDICE DE TABELAS	xvi
RESUMO	xvii
SUMMARY	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Benzeno	1
1.2 Efeitos dos Produtos de Biotransformação do Benzeno sobre o Sistema Imune.....	5
1.3 Resposta Inflamatória	7
1.3.1 Inflamação Pulmonar.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Animais	16
3.2 Protocolos de Intoxicação	16
3.3 Resposta Inflamatória Inespecífica Pulmonar Induzida pelo LPS	17
3.3.1 Instilação intranasal de LPS de <i>Salmonella abortus</i>	17
3.3.2 Coleta do Lavado Broncoalveolar e Quantificação Celular.....	17
3.4 Resposta Inflamatória Específica Pulmonar Induzida pela OVA.....	18
3.4.1 Sensibilização dos Animais à OVA.....	18
3.4.2 Desafio pela OVA	18
3.4.3 Determinação da Atividade de MPO.....	18
3.5 Determinação do Leucograma	19
3.6 Coleta de Tecido Pulmonar para Ensaio de Imunohistoquímica.....	20
3.7 Ensaio de Citometria de Fluxo	20
3.8 Reação Anafilática <i>in vitro</i>	21
3.9 Anafilaxia Passiva Cutânea.....	22
3.10 Análise Estatística.....	22
4. RESULTADOS	25
4.1 Efeitos das Exposições Químicas sobre a Capacidade de Migração Leucocitária na Inflamação Pulmonar Induzida pelo LPS.....	25
4.1.1 Migração Leucocitária para o Foco Inflamatório.....	25

4.1.2 Mobilização de Leucócitos para o Sangue Periférico.....	32
4.1.3 Moléculas de Adesão Leucocitária e Endotelial.....	38
4.1.3.1 Moléculas de Adesão Leucocitária.....	38
4.1.3.2 Moléculas de Adesão Endotelial Pulmonar.....	41
4.2 Efeitos das exposições químicas sobre a capacidade de migração de leucocitária na inflamação pulmonar alérgica induzida pela ovalbumina	43
4.2.1 Mobilização de Leucócitos para o Foco Inflamatório	43
4.2.2 Mobilização de Leucócitos para o Sangue Periférico.....	50
4.2.3 Moléculas de Adesão Leucocitária e Endotelial.....	54
4.2.3.1 Moléculas de Adesão Leucocitária.....	54
4.2.3.2 Moléculas de Adesão Endotelial Pulmonar.....	57
4.2.4 Reação Anafilática <i>in vitro</i>	59
4.2.5 Anafilaxia Passiva Cutânea.....	63
5. DISCUSSÃO.....	67
6. CONCLUSÃO.....	77
7. REFERÊNCIAS	78
Anexo 1 Informações para os Membros de Banca Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	91
Anexo 2 Comissão de Ética em Experimentação Animal.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias de biotransformação do benzeno.....	4
Figura 2. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.....	27
Figura 3. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.....	29
Figura 4. Efeito da exposição simultânea de HQ e FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.....	31
Figura 5. Efeito da exposição à HQ sobre o número de leucócitos total (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.....	33
Figura 6. Efeito da exposição ao FE sobre o número de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.....	35
Figura 7. Efeito da exposição simultânea de HQ e FE sobre o número de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.	37
Figura 8. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN (A) e MN (B).....	39

Figura 9. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de $\beta 2$ integrina em leucócitos PMN (A) e MN (B).....	40
Figura 10. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar.	42
Figura 11. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.	45
Figura 12. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.	47
Figura 13. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.	49
Figura 14. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.....	51
Figura 15. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.....	52
Figura 16. Efeito da exposição à HQ e FE associados sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.	53
Figura 17. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN (A) e MN (B).	55
Figura 18. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de $\beta 2$ integrina em leucócitos PMN (A) e MN (B).....	56
Figura 19. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar.	58
Figura 20. Efeito da exposição à HQ sobre a capacidade de contração da traquéia <i>in vitro</i> desafiada pela OVA.	60
Figura 21. Efeito da exposição ao FE sobre a capacidade de contração da traquéia <i>in vitro</i> desafiada pela OVA.	61
Figura 22. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a capacidade de contração da traquéia <i>in vitro</i> desafiada pela OVA.....	62
Figura 23. Efeito da exposição à HQ, ao FE ou associação de ambos sobre a contração da traquéia <i>in vitro</i> induzida pelo composto 48/80.....	63
Figura 24. Efeito da exposição à HQ sobre a anafilaxia passiva cutânea.....	64
Figura 25. Efeito da exposição ao FE sobre a anafilaxia passiva cutânea.....	65
Figura 26. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a anafilaxia passiva cutânea.....	66

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1. Esquema do delineamento experimental empregado para avaliação dos efeitos dos agentes químicos sobre a resposta inflamatória induzida pelo LPS.....	23
Quadro 2. Esquema do delineamento experimental empregado para avaliação dos efeitos dos agentes químicos sobre a resposta inflamatória alérgica induzida pela sensibilização e desafio à OVA.	24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Redução no número de leucócitos no pulmão e na atividade de MPO em animais expostos à HQ em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.	26
Tabela 2. Redução no número de leucócitos no pulmão e na atividade de MPO em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.	30
Tabela 3. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos à HQ.	32
Tabela 4. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos ao FE.	34
Tabela 5. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE.....	36
Tabela 6. Redução no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos à HQ em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.....	44
Tabela 7. Modificações no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos ao FE em relação aos respectivos valores obtidos em animais controles.....	46
Tabela 8. Redução no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.....	48
Tabela 9. Redução na contração da traquéia de animais expostos à HQ, FE ou HQ+FE em relação a traquéias obtidas de animais controles.....	62

RESUMO

Os efeitos tóxicos decorrentes da exposição ambiental e ocupacional ao benzeno são amplamente descritos na literatura. Seus produtos de biotransformação fenólicos, entre os quais os compostos hidroxilados como FE e hidroquinona HQ, são indutores importantes de efeitos citotóxicos e genotóxicos responsáveis pela toxicidade ao sistema imune. No entanto, a contribuição de cada metabólito e os mecanismos envolvidos não estão completamente esclarecidos. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo estudar a capacidade da resposta inflamatória em ratos expostos à HQ, ao FE, ou a ambos simultaneamente (HQ+FE). Para tanto, ratos Wistar machos foram expostos aos agentes químicos por período de tempo prolongado (doses diárias de 5 ou 10mg/kg; i.p.; com 5 doses/semana no período de 17 ou 23 dias). Animais controles receberam o veículo pela mesma via. As respostas inflamatórias foram induzidas 24 horas após a última dose administrada. Foram avaliadas a resposta inflamatória inespecífica, decorrente da instilação intranasal de LPS de *Salmonella abortus* e a resposta inflamatória específica em animais previamente sensibilizados e desafiados pela OVA. Na resposta inflamatória inespecífica, as exposições à HQ e à HQ+FE provocaram redução acentuada no influxo de leucócitos para o pulmão inflamado, pelo menor número de leucócitos no LBA e pela atividade enzimática da MPO reduzida no tecido pulmonar. O efeito não é dependente de modificações no número de leucócitos circulantes nem de alterações nas expressões de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes (L-selectina e $\beta 2$ integrina) e no endotélio pulmonar (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) envolvidas na interação leucócito-endotélio. Na vigência de resposta inflamatória específica, as exposições à HQ, FE ou HQ+FE reduziram significativamente a migração de leucócitos para o LBA e para o tecido pulmonar. Da mesma forma que a RI induzida pelo LPS, não foram detectados alterações nos número de leucócitos circulantes e na expressão de moléculas de adesão. No entanto, os resultados obtidos em ensaios de anafilaxia passiva cutânea e reação anafilática *in vitro* mostraram que o efeito é dependente, pelo menos em parte, da menor concentração de imunoglobulinas anafiláticas circulantes e, conseqüentemente, da menor habilidade de desgranulação mastocitária. Em conjunto, os dados obtidos demonstram que as exposições à HQ, ao FE ou à HQ+FE prejudicam a migração de leucócitos para o foco de lesão na vigência de respostas inflamatórias de origem inata ou adquirida.

SUMMARY

The toxic effects of the ambient and occupational exposures to benzene is widely described in the literature. Phenolic hydroxylated compounds obtained from its biotransformation, such as phenol (PHE) and hydroquinone (HQ), induce important of cytotoxic and genotoxic effects responsible for the immunotoxicity. However, the role of each metabolite and mechanisms of toxicity are unknown. Then, the present work aimed to study the inflammatory response in rats exposed to HQ, PHE, or both simultaneously (HQ+PHE). Male Wistar rats were exposed to they chemical agents for extended period of time (5 or 10mg/kg/day; ip.; during 17 or 23 days; 2 days intervals each 5 doses). Control animals received the vehicle. Inflammatory reactions were induced 24 hours after the last dose by they intranasal instillation of lipopolysaccharide of *Salmonella abortus* (non-specific response) or by inhalation of ovalbumin in animals previously sensitized to the same antigen (specific response, produced by anaphylactic immunoglobulins). Animals exposed to HQ or HQ/PHE presented reduced numbers of PMN and MN cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lesser myeloperoxidase (MPO) activity in the pulmonary tissue. The reduced influx of leukocytes is not dependent on alterations on the numbers of circulating leukocytes either adhesion molecules expressions on leukocytes (L-selectin or $\beta 2$ integrin) and on lung microvascular endothelium (ICAM-1, V CAM-1 or PECAM-1) responsible for leukocyte-endothelial interactions. On the other hand, rats exposed to all schedules of exposures presented reduced numbers of leukocytes in the BALF and lesser MPO activity in the pulmonary tissue after an antigenic stimulus. As shown to inflammation induced by LPS, no alterations on circulating leukocyte numbers and adhesion molecules expressions were detected. However, the impaired leukocyte migration to the inflamed lung may be dependent, at last in part, on reduced levels of circulating anaphylactic antibodies, as detected by passive cutaneous anaphylaxis test, and by consequent reduced ability of mast cell desgranulation, evidenced by in *in vitro* trachea contraction. Together, our data show that HQ and PHE exposure differently affect the specific and non-specific inflammatory reactions.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Benzeno

O benzeno, um composto reconhecidamente carcinogênico, é uma substância presente na atmosfera devido às contribuições de emissões biogênicas e principalmente antropogênicas. O benzeno é um hidrocarboneto aromático naturalmente encontrado no petróleo cru e produtos derivados, sendo que a produção mundial em escala industrial é de aproximadamente 13,6 a 14,8 milhões de toneladas/ano (Fishbein, 1992). Em razão do processo de combustão e evaporação da gasolina, além de estar presente na fumaça de cigarros, é um importante poluente ambiental (Robinson *et al.*, 1997). Adicionalmente, o benzeno é um dos solventes orgânicos mais empregados, especialmente na produção de tintas, colas, vernizes, materiais de limpeza e na indústria do couro (IARC, 1982; 1987; WHO, 1993; Robinson *et al.*, 1997; Qu *et al.*, 2000; Wan *et al.*, 2005).

Na década de 1990, em razão das preocupações crescentes sobre os problemas da poluição ao meio ambiente e dos prejuízos à saúde humana, geradas a partir de estudos epidemiológicos de trabalhadores expostos ao benzeno, levaram à criação da emenda constitucional denominada *Clean Air Act Amendmets* nos Estados Unidos, que preconiza a redução da emissão de poluente proveniente de fontes móveis no ambiente. Desta forma, teve início o controle de poluentes, em particular do benzeno, com o intuito de amenizar o impacto prejudicial à saúde pública (IARC, 1987; Gralewics, 1999; FUNDACENTRO, 2005). Mais tarde, a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* classificou o benzeno como agente sensibilizante classe A1, reconhecidamente cancerígeno (ACGIH, 2003).

No Brasil, a portaria interministerial n.º 775, de 28 de abril de 2004, classificou o benzeno como produto cancerígeno, para o qual não existe limite seguro de exposição e ficou proibida sua comercialização, mesmo como componente de produtos industrializados. A partir de dezembro de 2005, a portaria determinou que a concentração do benzeno como contaminante de outros produtos não deveria ser superior a 0,4%, em volume (FUNDACENTRO, 2005).

No entanto, apesar de controlado, a exposição ocupacional e ambiental, mesmo que em baixas doses, ainda ocorre. Estima-se anualmente que cerca de dois milhões de trabalhadores estejam expostos ocupacionalmente ao benzeno no mundo. Contudo, estratégias para reduzir o nível de exposição têm sido realizadas para assegurar a qualidade de vida desses trabalhadores, como a melhora tecnológica dos meios de produção, uso de material de proteção adequado, a pressão das políticas de vigilância à saúde ocupacional, a tendência mundial de substituição do benzeno como solvente nos processos industriais e o avanço analítico para sua determinação de baixa concentração no ambiente a baixas concentrações (Coutrim *et al.*, 2000).

Vale ressaltar que o controle e exposição em países em desenvolvimento nem sempre é satisfatório uma vez que ainda são encontrados inúmeros relatos clínicos na literatura de intoxicação por benzeno (para revisão ver Nietert & Silver, 2000; Hayes *et al.*, 1997; Javelaud *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999; Bogadi-Sare *et al.*, 2000; Qu *et al.*, 2000; Yeowell-O'Connell *et al.*, 2001; Waidyanatha *et al.*, 2001; Melikian *et al.*, 2002; Rappaport *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2004; Swaen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005a; Fahy *et al.*, 2005).

É importante salientar que o aumento gradativo da concentração de benzeno em atmosferas urbanas tem indicado que a exposição pela respiração em ambientes não ocupacionais não pode ser desprezada, uma vez que a emissão de benzeno por veículos automotores tem aumentado consideravelmente após a substituição parcial ou completa dos compostos antidetonantes contendo chumbo por benzeno ou por outros hidrocarbonetos aromáticos (Scherer *et al.*, 1995; Coutrim *et al.*, 2000). Desta forma, pode-se inferir que a exposição não monitorada de pessoas por período prolongado de tempo ao solvente proveniente de emissões antropogênicas em ambientes não ocupacionais tem relevância na saúde pública (Gilli *et al.*, 1996).

O controle deste poluente em ambientes de ar externo e interno, entretanto, não tem sido comumente realizado. Além disso, a carência de estudos relativos à exposição populacional ao benzeno e seus metabólitos na atmosfera de grandes centros urbanos limita o entendimento do quanto estes poluentes podem estar afetando a saúde da população (Coutrim *et al.*, 2000).

O benzeno possui atividade neurotóxica, hematotóxica e carcinogênica após exposição a doses elevadas (> 100 ppm) ou após exposição por períodos prolongados de tempo. Estudos epidemiológicos (Rothman *et al.*, 1996a,b; Linet *et*

al., 1996; Yaneva *et al.*, 1998; Javeiaud *et al.*, 1998; Budinsky *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 2001; Swaen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005b) e experimentais *in vivo* e *in vitro* (Sun *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1998; Bergsagel *et al.*, 1999; Rithidech *et al.*, 1999; Kalf, 2000; Velasco-Lezama *et al.*, 2001; Marrubini *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2005; para revisão ver Snyder, 2002, 2004) têm demonstrado a capacidade do benzeno induzir desordens hematológicas como pancitopenia, anemia aplástica e leucemia mielóide aguda, além da capacidade do desenvolvimento de tumores em humanos, ratos e camundongos (Yin *et al.*, 1996; Huffman *et al.*, 2002; Gaskell *et al.*, 2005). Estudo realizado no Brasil por Miranda *et al.* (1997) a partir de índices hematimétricos obtidos em 7.356 trabalhadores integrantes nove empresas do Complexo Petroquímico de Camaçari, Bahia, revelou leucopenia, principalmente neutropenia, associada à exposição ao benzeno. A relação entre a intensidade da intoxicação e a dose exposta não é um parâmetro fácil de ser obtido. A literatura é permeada de estudos epidemiológicos e experimentais que mostram variabilidade de condições de exposição e efeitos tóxicos (IARC, 1982; Cox, 1991; Savitz & Andrews, 1997; Lan *et al.*, 2004).

No entanto, os dados são convincentes quanto ao papel dos produtos de biotransformação do benzeno nos efeitos tóxicos. Em mamíferos o benzeno é oxidado por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP), principalmente pela atividade enzimática da CYP 2E1 hepática ou pela CYP 2F2 presente nos pulmões. O óxido de benzeno formado mantém equilíbrio tautomérico com oxepina (Lindstrom *et al.*, 1999; Rappaport *et al.*, 2002; Sheets *et al.*, 2004; Sheets & Carlson, 2004). Estes compostos serão fontes dos demais metabólitos como FE, HQ e CAT (Medinsky *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2004). Os produtos oxidados serão substratos para enzimas hepáticas de fase II (sulfotransferases e glicuroniltransferases) responsáveis pela geração de conjugados fenólicos que são excretados na urina (Medinsky *et al.*, 1995), ou são transportados para a medula óssea onde são oxidados a 1,4-benzoquinona (1,4-BQ) e 1,2-benzoquinona (1,2-BQ), respectivamente, pela ação de mieloperoxidases e prostaglandina H sintetase. Por meio de reação hidrolítica via epóxido hidrolase, o óxido de benzeno produz dihidrodiol de benzeno que, sob atividade da dihidrodiol desidrogenase e CYP, pode ser convertido em CAT ou a óxidodiol de benzeno, respectivamente. Uma segunda oxidação via CYP ocorre com a molécula oxepina, seguida de abertura de anel, com conseqüente produção de muconaldeídos, e num

último passo, são convertidas a ácido *trans,trans*-mucônico (Snyder & Hedli, 1996), que funciona como indicador biológico de exposição ao solvente. Vias alternativas do metabolismo do benzeno incluem a formação de ácido *S*-fenilmercaptúrico, a partir da reação do óxido de benzeno com a glutatona (Henderson *et al.*, 2005). A representação esquemática das vias de biotransformação do benzeno está apresentada na Figura 1.

Figura 1. Representação esquemática das vias de biotransformação do benzeno (adaptada de Bois *et al.*, 1991; Lourenço, 2005; Kim *et al.*, 2005b).

1.2 Efeitos dos Produtos de Biotransformação do Benzeno sobre o Sistema Imune

Um grande número de estudos tem sugerido que o metabolismo do benzeno é o passo fundamental para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos (Medinsky *et al.*, 1995; para revisão ver Snyder 2002; 2004). Os metabólitos responsáveis por tais efeitos e os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão completamente elucidados (Snyder, 2000a;b; Sheets & Carlson, 2004), entretanto estudos têm mostrado que metabólitos com anéis aromáticos hidroxilados fechados, como HQ e FE, e com anéis abertos, como *trans,trans*-muconaldeído (Amin & Witz, 2001; Rivedal & Witz, 2005) são importantes para a gênese da toxicidade ao sistema imune.

Os metabólitos do benzeno, especialmente as quinonas, são estimuladores *in vitro* e *in vivo* da diferenciação de granulócitos e promovem supressão da hematopoese *in vivo* (para revisão ver DeCaprio, 1999; Snyder, 2004). Tais observações provêm de estudos que mostram que a exposição de animais de experimentação ao benzeno ou a seus metabólitos promove neutrofilia (para revisão ver Snyder 2002, 2004), e reduz o número de células mononucleares no sangue periférico (Gill *et al.*, 1980; Snyder *et al.*, 1980; Green *et al.*, 1981; Cronkite *et al.*, 1989; Farris *et al.*, 1997), na medula e em órgãos linfóides secundários (Robinson *et al.*, 1997; Farris *et al.*, 1997; Kalf, 2000; Velasco-Lezama *et al.*, 2001). É importante salientar que estes efeitos também são encontrados em intoxicações humanas (Zhang *et al.*, 1999; Bogadi-Sare *et al.*, 2000; Swaen *et al.*, 2004).

Além dos efeitos sob a produção e/ou maturação leucocitária, há evidências do papel da HQ e FE sobre a atividade celular. Tem sido observada redução da atividade citotóxica natural de linfócitos, na produção de anticorpos (Hsieh *et al.*, 1992; Taysse *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2002; Dimitrova *et al.*, 2005), bem como prejuízo da ativação e proliferação de linfócitos. Os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente estabelecidos, mas dependem de efeitos genotóxicos e citotóxicos (Li *et al.*, 1996, 1997; Pyatt *et al.*, 1998, 2000; McCue *et al.*, 2003).

Os efeitos sobre produção, maturação e função leucocitária podem ser decorrentes da ação de semiquinonas e benzoquinonas, pela habilidade de se

ligarem com alta afinidade iônica a ácidos nucleicos e proteínas, além de induzirem a geração de ROS, como H_2O_2 , O_2^- e $\text{OH}^\bullet$, responsáveis pelo estresse oxidativo e pela peroxidação lipídica (Eastmond *et al.*, 1987; Thomas *et al.*, 1990; Kolachana *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 1996; Ibuki & Goto, 2004; Rana & Verma, 2005) muito embora o eficiente mecanismo de detoxificação, que envolve a conjugação com sulfatos, glutathiona ou glicuronídeos impede a toxicidade local. Todavia, em condições de saturação enzimática ou na presença de características individuais, como polimorfismos para as enzimas de conjugação, favorecem a intoxicação (Nedelcheva *et al.*, 1999; Shen *et al.*, 2005). Ainda, o organismo lança mão de mais uma via de inativação das semiquinonas e benzoquinonas. Pela ação enzimática da NAD(P)H: quinona oxidoreductase (NQO1) constitutiva, a 1,4-BQ é reduzida à HQ e funciona como *scavenger* de O_2^- gerados durante a conversão tautomérica de 1,4-BQ a HQ (Ross *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 2004). Estudos têm proposto uma relação entre a concentração de MPO e NQO1 celular com o intuito de estabelecer um balanço entre bioativação e detoxificação, influenciando, desta forma, a susceptibilidade à toxicidade por compostos fenólicos (Ganousis *et al.*, 1992). Todavia, esta relação ainda permanece obscura, pois a capacidade da HQ induzir apoptose em cultura de células mielóide humana e em células linfoblástica leucêmica humana deficientes de MPOs é mantida, indicando que a atividade da MPO não é um fator condicionante para o desenvolvimento de toxicidade pela HQ (Inayat-Hussain *et al.*, 2001; Inayat-Hussain & Ross, 2005).

A ação dos metabólitos do benzeno sobre o sistema imune é complexa e como já salientada, envolve ações citotóxicas e genotóxicas. Neste sentido, tem sido mostrado a capacidade dos metabólitos do benzeno alterarem o microambiente medular, com prejuízo na secreção e atividade de fatores de crescimento entre os quais interleucina (IL)-1, IL-4, IL-12, Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos (Niculescu *et al.*, 1995; 1996; Lee *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005a), induzirem a apoptose em mieloblastos e linfoblastos na medula óssea e linfócitos circulantes (Hazel *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Kerzic *et al.*, 2003), além de exercerem efeitos genotóxicos representados por danos oxidativos, inibição da síntese de DNA e aberrações cromossômicas (Li *et al.*, 1997).

É importante ressaltar que não existe uma dose estabelecida para a atividade tóxica do benzeno ou de seus produtos de metabolização. Estudos *in vivo* em ratos, onde a HQ ou FE foram administrados por via parenteral, permitiram estabelecer a

dose onde não foi observado qualquer efeito adverso (NOAEL), com doses diárias de 15 e 12 mg/kg, respectivamente (IPCS, 1994a,b; Taysse *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996, 1997; Ryan *et al.*, 2001; McCue *et al.*, 2003).

A monitorização ocupacional é baseada em modificações no número de células sanguíneas circulantes e por determinações clínicas de neurotoxicidade em função dos efeitos lesivos no tecido hematopoiético e nervoso provocados pela exposição prolongada ao benzeno. Dados obtidos em nosso laboratório mostraram que a quantificação das células brancas no compartimento periférico pode não ser um indicador de exposição mais adequado. A administração i.p. de HQ ou FE em ratos Wistar machos, na dose de 50 mg/kg/dia não provocou efeitos tóxicos em tecido hepático ou renal, nem mesmo na produção de células brancas, mas modificou a capacidade de resposta celular na vigência processo inflamatório de origem inespecífica (Macedo *et al.*, 2006) ou específica (Lourenço, 2005). Estes dados são muito relevantes uma vez que exposições *in vitro* ou *in vivo* oscilam entre 25 e 350 mg/kg (Laskin *et al.*, 1989; Hedli *et al.*, 1996; Kerzic *et al.*, 2003; Bironaite *et al.*, 2004; Ibuki & Goto, 2004; Gaskell *et al.*, 2004; English & Deisinger, 2005). Vale ressaltar que os trabalhos experimentais de animais expostos *in vivo* são em pequeno número e foram realizados com doses maiores que as por nós empregadas.

Em conjunto, os dados apresentados mostram que a exposição ao benzeno, mesmo em doses consideradas baixas, a que os indivíduos de centros urbanizados e trabalhadores estão expostos, pode causar prejuízos sérios à saúde e que os indicadores de exposição/efeito utilizados atualmente podem não ser representativos da intoxicação. Desta forma, estudos que elucidem os mecanismos envolvidos na toxicidade podem ser relevantes para o estabelecimento de biomarcadores precoces e mais efetivos.

1.3 Resposta Inflamatória

O sistema imune compreende um complexo conjunto de células e tecidos que têm por função proteger o organismo da invasão de agentes estranhos e manter condições apropriadas para detecção de estímulos antigênicos ou não. Em condições fisiológicas, o organismo está apto a se proteger por intermédio de uma

série de reações, denominadas, de uma maneira geral, de resposta inflamatória. No caso desta resposta ser deficiente, o organismo fica susceptível às agressões. No entanto se a resposta for exacerbada, as diferentes reações comprometem o tecido afetado, com prejuízo aos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (para revisão ver Tracey, 2002; Kumar *et al.*, 2005).

Funcionalmente, a resposta imune pode ser dividida segundo os mecanismos de defesa envolvidos. A imunidade natural, também chamada de inespecífica, é caracterizada pela presença dos componentes de defesa antes mesmo da exposição ao agente flogístico (microorganismos ou macromoléculas estranhas). Várias células estão envolvidas neste tipo de resposta imune, dentre elas os PMN, que são células fagocíticas onde os neutrófilos são componentes importantes. São capazes de fagocitar o agente invasor ou liberar enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente estranho. Em situação de inflamação persistente, ocorre também, na área lesada, uma infiltração de células de outros tipos celulares, como MN, incluindo monócitos e linfócitos (Suzuki *et al.*, 2003).

Dinamicamente, a resposta inflamatória específica é caracterizada pela apresentação dos antígenos aos linfócitos T e B pelas células APCs como macrófagos, células dendríticas entre outros. Os linfócitos T e B, dotados de receptores específicos para antígenos são estimulados, proliferando e diferenciando-se em células efetoras como linfócitos T citotóxicos e plasmócitos produtores de imunoglobulinas (para revisão ver Muller, 2001).

O reconhecimento antigênico pelos linfócitos ocorre via compatibilidade dos antígenos ao MHC, subdividido em antígenos da Classe I para a ação linfocitária citotóxica e antígenos da Classe II, para o reconhecimento e indução da produção de imunoglobulinas, glicoproteínas composta por cadeias polipeptídicas cadeias leves cadeias pesadas e dotada de atividade bifuncional, sendo capaz de ligar-se a antígeno e de exercer atividade efetora quando associada a elementos do sistema complemento da resposta imune (para revisão ver Tracey, 2002). Na vigência de RI, células APCs fagocitam os patógenos em peptídeos antigênicos que se ligam à moléculas do complexo MHC e posteriormente são apresentados na superfície celular sob a forma de um complexo MHC-peptídeo para o devido reconhecimento por leucócitos B e T (Abbas *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2005).

Uma vez que se tenha o reconhecimento do complexo MHC-peptídeo por linfócitos T, ocorre a ativação da diferenciação, proliferação e secreção de mais

fatores de crescimento e quimiotáticos capazes de mobilizar outras células do sistema imune para o foco inflamatório (Ali *et al.*, 1999). Simultaneamente, tem-se primeira etapa da Ri específica, onde o contato com o antígeno promove a sensibilização de linfócitos B, gerando especificidade e memória antigênica. Nesta etapa, os linfócitos B expressam receptores capazes de reconhecer antígenos solúveis não complexados às moléculas do MHC (Abbas *et al.*, 1998). No decorrer do processo, uma pequena parcela de linfócitos B se diferenciam em plasmócitos, células produtoras de imunoglobulinas antígeno-específicas, entre as quais imunoglobulinas da classe E (IgE) que sensibilizam mastócitos presentes no tecido adjacente ao foco inflamatório por meio da fixação na membrana dos mesmos. Outra parcela de linfócitos B e T se diferenciam em células de memória as quais permanecem na circulação garantindo uma resposta rápida e eficaz contra uma futura exposição ao antígeno sensibilizante (para revisão ver Abbas *et al.*, 1998; Calich & Vaz, 2001; Kumar *et al.*, 2005).

Na situação de re-exposição ao mesmo antígeno, novamente linfócitos B são ativados, proliferam e se diferenciam em plasmócitos, passando a secretar quantidades elevadas de imunoglobulinas capazes de levar a destruição do agente agressor quando associado a enzimas do sistema complemento. Ainda, a formação de complexos entre o antígeno e imunoglobulinas fixadas em receptores da parede celular de mastócitos leva a ativação dos mesmos, resultando na liberação de mediadores quimiotáticos para MN. Entre os mediadores considerados quimiotáticos, citam-se os prostanóides como prostaglandinas (PG) I₂, PGD₂, PGE₂ e PGF₂α, derivados da via da lipoxigenase como leucotrieno B₄ (LTB₄), cininas, substâncias liberadas dos neutrófilos entre outros. Desta forma, ocorre o que denominamos de amplificação da resposta inflamatória (Godard *et al.*, 1982; Tomioka *et al.*, 1984; Tavares de Lima & Silva, 1998; Tan *et al.*, 1999; para revisão ver Abbas *et al.*, 1998; Tracey, 2002; Kumar *et al.*, 2005).

Os leucócitos são células extremamente importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória. São provenientes de um precursor comum na medula óssea, no entanto se proliferam em linhagens distintas, onde as células mielóides maturam e originam granulócitos e monócitos e as células linfóides originam os linfócitos. As células linfóides, em diferentes fases de seu desenvolvimento, migram carregadas pelo sangue, para os órgãos linfóides, onde a maturação será completada, enquanto as células mielóides proliferam e maturam na medula. Após a etapa de maturação,

os leucócitos são mobilizados para a circulação, onde permanecem por período de tempo específico e variável e posteriormente serão removidas pelo baço (Thomas *et al.*, 2006; Roessler & Grosschedl, 2006).

Durante a circulação, uma pequena parcela destas células migra para os tecidos, dentre eles o pulmonar, permanecem por curto período de tempo, sofrem apoptose e são fagocitadas por macrófagos residentes. Vale ressaltar que os linfócitos são dotados de comportamento diferenciado de migração regido pelo seu estado de ativação e memória. São capazes de realizar percurso cíclico, onde são lançados pelo sistema linfático ao sangue circulante e deste para os tecidos e, posteriormente, retornam ao sangue e para tecidos linfóides secundários (Worthylake & Burridge, 2001; Wiedle *et al.*, 2001).

Em condições normais, a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio da microcirculação é pequena, uma vez que estes circulam no centro da corrente sanguínea envoltos pelos eritrócitos. Fazem parte das poucas exceções o *pool* periférico de leucócitos aderido à parede dos vasos da microcirculação e a recirculação de linfócitos, que interagem com células endoteliais especializadas de tecidos linfóides secundários (Wiedle *et al.*, 2001). Na vigência de RI, a interação dos leucócitos ao endotélio é exacerbada, e no interstício, os leucócitos migram direcionalmente para o foco de lesão. A migração das células brancas é decorrente da liberação de fatores quimiotáticos, como por exemplo, proteínas do sistema complemento e as cininas, que são gerados na corrente sanguínea e encontrados também no sítio da lesão, mediadores lipídicos e citocinas secretados por células competentes no foco de lesão (Ali *et al.*, 1999; Frangogiannis *et al.*, 2001).

Inicialmente os leucócitos marginam o endotélio de microvasos, predominantemente de vênulas pós-capilares próximas à área lesada e a aderência à parede vascular. A etapa subsequente a aderência é caracterizada pela migração celular por entre as junções interendoteliais numa dinâmica de mobilização desencadeada pela indução do *rolling* quando em contato direto com o endotélio. Esta etapa é fundamental para o recrutamento de células para o tecido lesado e é mediado por moléculas de adesão. Dentre as células que expressam moléculas de adesão estão os PMN, os MN, os fibroblastos, as plaquetas, as células endoteliais, entre outras (Jung *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 1999; para revisão ver Harlan, 1985; Rampart, 1994; Adams & Lloyd, 1997; Wiedle *et al.*, 2001; Kubes & Kerfoot, 2001; Kumar *et al.*, 2005).

As CAMs são glicoproteínas presentes na superfície das células que tem participação ativa no crescimento e diferenciação celular, bem como na formação de junções intracelulares e adesão celular a proteínas específicas. As CAMs quando influenciadas por citocinas e outros mediadores inflamatórios, desempenham funções importantes na adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e endotélio, recrutamento e migração seletiva de células brancas da microcirculação até o foco de lesão. Tais funções fazem delas importantes moléculas sinalizadoras e imprescindíveis na regulação da inflamação (Walzog *et al.*, 1999; Vestweber & Blanks, 1999; Kevil, 2003; Muller, 2003).

As CAMs estão divididas em famílias distintas, dependentes de características moleculares comuns. As principais famílias são: selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas (para revisões ver Rampart, 1994; Granger & Kubes, 1994; Adams & Lloyd, 1997; von Adrian & Mackay, 2000; Kumar *et al.*, 2005).

A família das selectinas é composta por proteínas como E-selectina (ELAM-1) presentes em células endoteliais; P-selectina, também denominada de GMP-140 ou PADGEM presentes nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais e grânulos-alfa das plaquetas; e a L-selectina (LECAM) presente na membrana de monócitos, linfócitos e neutrófilos. Suas expressões e ligações a carboidratos presentes constitutivamente nas membranas celulares são intermitentes, o que fazem com que o leucócito adira momentaneamente à parede vascular (Burns *et al.*, 2001; para revisão ver Ley & Kansas, 2004; Smalley & Ley, 2005).

As integrinas são receptores compostos pela ligação das subunidades α e β . A associação de várias subunidades α a uma subunidade β comum subdividiu esta família. Assim, a subfamília das β_2 integrinas compreende a LFA-1 (*CD11a*); MAC-1 (*CD11b*); e Gp150,95 (*CD11c*). Dentre as funções deste complexo estão a adesão leucocitária ao endotélio, a quimiotaxia e a fagocitose, regulados pelo aumento do número de receptores na superfície celular e por alterações morfofuncionais dos receptores já expressos (Meredith & Schwartz, 1997; Ridger *et al.*, 2001; Popper *et al.*, 2002).

A superfamília das imunoglobulinas abrange um grupo de CAMs caracterizadas pela presença de unidades semelhantes à classe das imunoglobulinas G. São compostas por ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1 e Mad-CAM-1 (Lebedeva *et al.*, 2005). A participação desta classe de CAM na RI é de suma

importância, uma vez que são expressas em membranas de células endoteliais e leucócitos migrados para o foco de lesão (Muller, 2003).

De modo geral, a descrição simplificada dos principais componente da RI e interação entre eles não reflete o processo na íntegra, já que este é altamente complexo e dependente de substâncias químicas produzidas por diferentes tipos celulares em cada microambiente, além da expressão de moléculas que facilitam a adesão celular e subsequente migração celular (Hussain *et al.*, 1998; Lau *et al.*, 2005; para revisão ver Abbas *et al.*, 1998; Lorenzi, 1999; Wiedle *et al.*, 2001; Kumar *et al.*, 2005).

1.3.1 Inflamação Pulmonar

Os pulmões representam órgãos essenciais da respiração, além de exercerem outras funções importantes como metabolização e defesa do organismo, por caracterizar uma barreira entre o meio externo e o interno ao organismo. São divididos em lobos onde os pulmões direito e o esquerdo possuem três e dois lobos, respectivamente. Situados na cavidade torácica, possuem forma piramidal, de consistência esponjosa medindo mais ou menos 25 cm de comprimento (Husain & Kumar, 2005).

Os pulmões são compostos de brônquios que se divide em bronquíolos e alvéolos pulmonares, estruturas de pequenas dimensões, localizadas no final dos bronquíolos. Os alvéolos são estruturas saculares formados no final de cada bronquíolo e circundados por densa rede de capilares pulmonares, consequentemente altamente vascularizados. É nos alvéolos que ocorre a hematose pulmonar entre o meio ambiente e o organismo, caracterizada pela troca gasosa entre os capilares da microcirculação e o alvéolo (Husain & Kumar, 2005).

Por constituir a porta principal de entrada de poluentes e microrganismos inalados, a interação entre o ar atmosférico e as células do trato respiratório credencia o pulmão como órgão-alvo no desenvolvimento de eventos inflamatórios. Na vigência de RI pulmonar de diferentes origens, a progressão da resposta à lesão é caracterizada por modificações na reatividade das vias aéreas, intensa migração leucocitária e ativação de células residentes (Widle *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003).

Neste contexto, fagócitos mononucleares residentes, mastócitos e células epiteliais são importantes para o recrutamento de leucócitos. Estas células em conjunto trabalham no sentido de recrutar células circulantes para o pulmão inflamado.

Os mastócitos são células que, por revestirem as vias aéreas e serem encontrados no epitélio brônquico, submucosa e proximidades fechadas dos vasos sanguíneos, podem ser considerados a primeira linha de defesa no combate de alérgenos inalados. São dotados de grânulos que armazenam grande quantidade de mediadores como leucotrienos, $\text{TNF-}\alpha$, proteases e proteoglicanas. Por apresentarem em sua superfície receptores para imunoglobulinas anafiláticas, como IgE, desgranulam e liberam mediadores potencializadores do processo inflamatório quando em contato com antígenos (Johansson *et al.*, 2004).

Os mononucleares residentes, representados predominantemente por macrófagos possuem uma função central na defesa contra patógenos, além de participar de vários tipos de inflamação. Podem atuar como células APCs, embora com menor capacidade que as células dendríticas (Hashimoto *et al.*, 2000; Rocca *et al.*, 2002). Os macrófagos são provenientes de monócitos circulantes, que no tecido se diferenciam em macrófagos. São células que podem variar em morfologia, função e propriedade em função do tipo de tecido em que se encontra (Hashimoto *et al.*, 1999).

Na resposta inflamatória pulmonar, a dinâmica das interações celulares são de suma importância para a instalação do processo inflamatório. A expressão e/ou ativação seqüencial de CAM é fundamental para a perfeita interação entre os leucócitos circulantes e a célula do endotélio da microvasculatura pulmonar (Wiedle *et al.*, 2001; Husain & Kumar, 2005).

Nesta etapa, quimiocinas presentes na superfície do endotélio vascular se ligam a receptores de leucócitos circulantes resultando em modificações conformacionais de CAM leucocitárias, entre as quais as integrinas, capazes de efetuar firme aderência à célula do endotélio microvascular do pulmão. Assim, estas moléculas são ativadas e ligam-se fortemente a contra-receptores moleculares ICAM-1 e VCAM-1 presentes em células endoteliais da microcirculação pulmonar (para revisão ver Vestweber, 2000; Wang & Doerschuk, 2002). Esta forte adesão celular simultaneamente ocasionará a redução no *rolling*, a adesão celular e modificações no citoesqueleto do leucócito de modo a permitir a migração

direcionada para o foco de lesão por entre os espaços intracelulares do endotélio pulmonar no processo denominado diapedese (Kubes & Kerfoot, 2001). Vale ressaltar que esta migração é caracterizada pela emissão de pseudópodes e é dependente perfeita interação com componentes da matriz extracelular e do gradiente de quimiocinas. Uma vez no foco lesado, o leucócito exercerá sua função efetora, resultando na atividade *killing* na apropriada. Tal evento leva liberação de grânulos com conteúdo enzimáticos, principalmente MPO, que contribuirão na resolução do processo inflamatório ou com destruição do tecido local em situações patológicas. (Adams & Lloyd, 1997; Kumar *et al.*, 2005).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visou avaliar experimentalmente os efeitos da exposição prolongada aos produtos provenientes da biotransformação do benzeno – HQ, ou FE ou associação de ambos - sobre a capacidade de mobilização leucocitária no sangue periférico e no recrutamento de leucócitos para o pulmão na vigência de resposta inflamatória inespecífica ou específica mediada por anticorpos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, pesando entre 150-200g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à ração e água durante todo o período experimental. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, com parecer emitido no Ofício CEEA n. 53/2005, intitulado Protocolo 65.

3.2 Protocolos de Intoxicação

O esquema de intoxicação compreendeu administrações intraperitoneais diárias dos produtos de biotransformação do benzeno (dose 5 e/ou 10 mg/kg em um volume final de 1 mL). As soluções administradas foram preparadas pela solubilização dos agentes químicos em etanol absoluto (5% da solução final) e o volume completado com solução salina estéril. O veículo consistiu do mesmo volume de salina estéril adicionado de etanol absoluto (5% da solução final). Os animais receberam 5 doses/semana dos agentes químicos ou volumes equivalentes dos veículos pela mesma via. O esquema de administrações referencia a jornada semanal de trabalho e o período de exposições levou em consideração a cinética de produção e maturação de leucócitos PMN, principais efetores durante uma resposta inflamatória aguda. Os animais foram avaliados segundo os esquemas de estímulo com LPS (Quadro 1) e OVA (Quadro 2) constantes no final do Material e Métodos.

3.3 Resposta Inflamatória Inespecífica Pulmonar Induzida pelo LPS

3.3.1 Instilação intranasal de LPS de *Salmonella abortus*

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/kg, i.p.), foi preparado solução contendo 100µg de LPS dissolvidos em 1 mL de salina estéril e 100µL instilado na cavidade nasal dos animais com auxílio de uma micropipeta. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais foram novamente anestesiados e o LBA coletado como descrito abaixo.

3.3.2 Coleta do Lavado Broncoalveolar e Quantificação Celular

A coleta do LBA foi realizada de acordo com Tavares de Lima *et al.* (1998) e Bozinovski *et al.* (2004). Para tanto, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65mg/kg). A cavidade peritoneal foi exposta e a exsanguinação realizada pela aorta abdominal. Foi realizada incisão longitudinal na região cervico-ventral, a traquéia exposta e canulada utilizando uma válvula reguladora com três entradas, onde foi acoplada a uma das entradas uma cânula de polietileno; à segunda, uma seringa de plástico contendo 20 mL de PBS e, à terceira, uma seringa vazia. A cânula foi inserida na traquéia e realizada a lavagem do espaço broncoalveolar. Esta lavagem foi efetuada em etapas, injetando-se lentamente no espaço alveolar um volume de 10 mL de PBS. A seguir, a válvula conectada à seringa contendo PBS foi fechada, abrindo-se aquela ligada à seringa vazia, sendo feita a aspiração do PBS injetado, acompanhada de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido até que todo o volume de PBS fosse injetado.

O LBA obtido foi centrifugado por 10 min a 1.000 rpm, o sobrenadante descartado e as células ressuspensas em 1 mL de PBS. A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica comum e contada no mínimo 400 células. Para tanto, alíquotas da amostra (90 µL) foram acrescidas de 10µL de cristal violeta a 0,2% dissolvido em ácido acético (30%); desta solução, uma alíquota (10µL) foi diluída com 90µL de PBS; totalizando uma

diluição de 1:100. Para a contagem diferencial das células, alíquotas da amostra (70µl) foram colocadas em Cytospin® (Fanem) e centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min. As lâminas obtidas foram coradas com solução de May-Grünwald e Giemsa e o número de leucócitos MN e PMN foram quantificados por microscopia óptica comum.

3.4 Resposta Inflamatória Específica Pulmonar Induzida pela OVA

3.4.1 Sensibilização dos Animais à OVA

Os animais receberam soluções contendo 10µg de OVA (Grau II), 10 mg hidróxido de alumínio solubilizados em PBS por via intraperitoneal. Após sete dias da sensibilização, os animais receberam 0,66 mL de solução de OVA a 0,1% em PBS (reforço) por via subcutânea. Decorridos seis dias do reforço, a reação anafilática foi desencadeada expondo os animais a broncoprovocação. O período total de 14 dias de sensibilização foi baseado no protocolo proposto por Coleman *et al.* (1983), que verificou que após a injeção intraperitoneal de OVA emulsionada em alúmen (hidróxido de alumínio), os níveis circulantes de imunoglobulinas anafiláticas aumentavam rapidamente entre sete e 14 dias. A coleta do LBA e a contagem do número de células no LBA foram realizadas conforme descrito no item 3.3.2.

3.4.2 Desafio pela OVA

A broncoprovocação foi realizada pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Para tanto, três animais por sessão foram acondicionados em caixa plástica (40 x 27 x 13,3 cm) acoplada em nebulizador ultrassônico (NS®) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 e 1,0 µm³.

3.4.3 Determinação da Atividade de MPO

A determinação da atividade de MPO foi empregada como indicativo de leucócitos para o pulmão (tecido e LBA) na vigência de resposta inflamatória

inespecífica pela instilação intranasal de LPS ou adquirida pela sensibilização à OVA. Para a coleta do tecido do pulmão, os animais foram anestesiados (pentobarbital sódico, 65 mg/kg, i.p.), submetidos a laparotomia mediana e exsanguinados pela aorta abdominal. Subseqüentemente, a cavidade torácica foi aberta e o leito vascular do pulmão imediatamente perfundido com PBS contendo heparina (5 UI/mL) com o auxílio de uma cânula introduzida na artéria pulmonar.

O tecido pulmonar livre de sangue foi pesado e a ele adicionados tampão fosfato (pH 6,2 contendo 0,5% de brometo de hexadecil-trimetilamônio e 5 mM EDTA) na concentração de 3mL/g de tecido de pulmonar. A seguir, as amostras foram homogeneizadas duas vezes consecutivas, por período de 30 segundos cada em Politron® (Brinckman). Os homogenatos resultantes foram centrifugados a 17.500 rpm durante 15 min à temperatura de 4°C e o sobrenadante utilizado para determinação da atividade de MPO. Assim, 680µl de PBS contendo 0,25% de BSA, 500µL de tampão fosfato pH 6.2, 100µL de água oxigenada (0,0005%), 40µL da amostra e 100µL de *orto*-dianisidina (1,25 mg/mL) foram adicionados em tubos de ensaio de vidro para a reação. Após 15 min, a reação foi paralisada pela adição de 100µL de azida sódica (1%). A quantificação da absorbância foi feita por espectrofotometria (450 nm) em leitor de placas (Spectra Max Plus® – Molecular Devices).

Vale ressaltar que eventual participação de catalases provenientes de MN no consumo do peróxido de hidrogênio está descartada em detrimento da baixa migração destas células para o tecido pulmonar no período de 24 horas após o estímulo com OVA ou LPS, conforme estudos realizados por Bozinovski *et al.* (2004) e Noulon *et al.* (2005).

3.5 Determinação do Leucograma

A contagem total e diferencial de leucócitos circulantes foi realizada a partir de amostras de sangue heparinizado, coletadas do plexo orbital dos animais, com auxílio de um tubo capilar de vidro. A contagem global de células foi feita em câmaras de Neubauer, após a diluição das amostras de sangue na proporção de 1:20 (v:v) com líquido de Türk. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços

de sangue fixados e corados, pancrômicamente pela solução de May-Grünwald e Giemsa.

3.6 Coleta de Tecido Pulmonar para Ensaio de Imunohistoquímica

Seis horas após instilação intranasal de LPS ou inalação de OVA, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg), a cavidade peritoneal exposta e realizado o sangramento através da aorta abdominal. Os pulmões foram rapidamente removidos e insuflados com meio de suporte para congelamento de tecidos (OCT, Tissue Tek™) diluído em PBS na proporção de 2 para 1. Regiões dos lobos direito e esquerdo dos pulmões foram seccionadas e congeladas em hexano à baixa temperatura, imerso em nitrogênio líquido para congelamento gradativo. Após o congelamento, os tecidos foram cortados em criostato a -25°C (Leika Microsystem). Os cortes foram feitos na espessura de 8 micra e depositados em lâminas silanizadas. Após 10 min, os tecidos foram colocados em acetona gelada para fixação por 10 min a -25°C. Em seguida, os cortes foram armazenados em freezer (-22°C) para ensaios de imunohistoquímica.

Nos ensaios de imunohistoquímica direta por fluorescência, as secções foram incubadas com solução de bloqueio para sítios inespecíficos por 24 horas em atmosfera umidificada a 4°C, seguido de período de incubação “*overnight*” (câmara umidificada, 4°C) com anticorpos monoclonal de ratos anti-molécula de adesão ICAM-1 (1:50) marcado com FITC, anticorpos monoclonal anti molécula de adesão PECAM-1 (1:500) e VCAM-1 (1:100), marcado com R-PE. As preparações foram analisadas através de Software analisador de imagens (KS 300, Kontron) em microscópio de fluorescência. Para avaliar a reação de fundo, os mesmos procedimentos foram realizados em secções de pulmões na ausência de anticorpos.

3.7 Ensaio de Citometria de Fluxo

Os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo experimental descrito por van Eeden *et al.* (1999) e Li *et al.* (2000). Neste ensaio, o sangue foi coletado pelo plexo orbital com EDTA (100mg/mL) antes e 6 horas após a instilação intranasal de LPS ou inalação de OVA. Foi realizada a lise dos eritrócitos com

solução de cloreto de amônia (0,13M, agitação 1 min) e os leucócitos recuperados após lavagem com HBSS e duas seqüências de centrifugação (1000 rpm, 10 min/cada). Após lavagem, os leucócitos foram incubados por 10 ou 30 min a 4°C com 10 µL de anticorpos monoclonal anti-L-selectina (Anti-LECAM) ou anti-β2 integrina (anti-CD18), respectivamente, na ausência de luz. Após o período de incubação, as células foram analisadas no citômetro de fluxo (Becton & Dickinson - San Jose, CA, USA, FACS Calibur). Aproximadamente 10.000 células foram obtidas e somente leucócitos morfolologicamente viáveis foram considerados aptos para a análise.

3.8 Reação Anafilática *in vitro*

Este ensaio mede a contração da traquéia após adição de estímulo *in vitro*. Em nossos experimentos investigamos a contração induzida pela adição de OVA ou de composto 48/80. No 23º dia de exposição aos agentes químicos (13º dia após sensibilização), os animais foram sacrificados por excesso de anestésico (hidrato de cloral; > 400 mg/kg, i.p.), dessangrados pela aorta abdominal e, a seguir, o tórax foi aberto. A traquéia foi removida e o tecido conjuntivo adjacente foi removido cuidadosamente. A porção distal da traquéia (região correspondente aos cinco últimos anéis cartilagosos próximos à narina) foi preparada para registro isométrico de força. Neste estudo foram utilizados transdutores F-60 (Narco®), acoplados a fisiógrafo da mesma marca. Os segmentos de traquéia foram montados em cubas para órgão isolado (8 mL), contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl, 115,0mM; KCl, 4,6mM; CaCl₂ 2.H₂O, 2,5mM; KH₂ PO₄, 1,2mM; MgSO₄.7 H₂O, 2,5mM; NaHCO₃, 25,0mM e glicose, 11,0mM) aerada com 95% de O₂ e 5% de CO₂.

Os segmentos da traquéia, uma vez montados, foram expostos a uma carga inicial de 500mg de tensão. Durante o período de equilíbrio (60 min), a solução de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 15 min. Decorrido este período, a tensão foi reajustada para 1g de tensão e a capacidade contrátil (viabilidade tecidual) dos segmentos de traquéia avaliada substituindo-se o tampão Krebs-Henseleit por tampão KCl despolarizante (60mM). Somente segmentos que apresentaram resposta contrátil, frente à despolarização com KCl, foram desafiados com 100µg/mL de OVA ou composto 48/80 (0,1 mL, 10µg/mL) 15 min mais tarde.

3.9 Anafilaxia Passiva Cutânea

A anafilaxia passiva cutânea é uma técnica descrita por Mota & Wong (1969) que mostra indiretamente o título de imunoglobulinas anafiláticas disponível no momento. Para tal fim, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral, o sangue da aorta abdominal coletado no 23º dia após início das exposições químicas (13º dia após a sensibilização). Após diluição seriada, o soro foi administrado por via intradérmica no dorso de ratos não manipulados e não sensibilizados ("naive"). Decorridas 24 horas, os animais receberam, por via intravenosa, 1,0 mL de solução contendo 500µg de OVA associada a 2,5mg do corante azul de Evans. Após 30 min, os animais foram sacrificados, a pele removida e o diâmetro dos halos azuis determinados. O título de PCA foi representado pela maior diluição na qual o soro determinou halo maior que 5mm de diâmetro.

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-testes estatísticos apropriados (Bonferroni e Tukey). O teste "t" de Student foi empregado para amostras não pareadas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Prism V.4.00 (GraphPad Software Inc., 1992-2003). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos das Exposições Químicas sobre a Capacidade de Migração Leucocitária na Inflamação Pulmonar Induzida pelo LPS

4.1.1 Migração Leucocitária para o Foco Inflamatório

Com o intuito de investigar os efeitos das exposições químicas sobre a capacidade de migração leucocitária frente a um estímulo inflamatório inespecífico, os animais foram broncoprovocados com LPS e as células quantificadas no LBA e no tecido pulmonar. Os resultados obtidos mostraram que a HQ, nas doses de 5 ou 10mg/kg, provocou inibição significativa no recrutamento de leucócitos para o espaço broncoalveolar (Figura 2A). A análise diferencial das células no LBA mostrou que o número de leucócitos mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN) foi significativamente menor em animais expostos à HQ, tanto com a dose de 5 mg/kg quanto com dose de 10 mg/kg, do que em animais controles (Figura 2B). Se expressas em porcentagem, as reduções em relação aos respectivos valores de animais controles estão apresentadas na Tabela 1. Vale ressaltar que o estímulo inflamatório foi eficiente porque os números de células encontradas no LBA de animais controles são marcadamente maiores que os obtidos do LBA de animais não manipulados, como a seguir: MN = $5,08 \times 10^5$ células; PMN = $0,17 \times 10^5$ células (n=4).

Com o objetivo de avaliar se as exposições químicas comprometiam a migração de leucócitos PMN para o tecido pulmonar, ensaio para determinação da atividade da enzima MPO foi realizado no tecido pulmonar 24 horas após a broncoprovocação com LPS. Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ reduziu significativamente a atividade enzimática em relação ao valor com animais controles (Figura 2C; Tabela 1). É importante salientar que o valor basal da atividade enzimática de MPO obtido de animais não manipulados é $0,04 \pm 0,001$ (n=4).

Tabela 1. Redução no número de leucócitos no pulmão e na atividade de MPO em animais expostos à HQ em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.

	HQ 5 mg/kg (%)	HQ 10 mg/kg (%)
Leucócitos totais	52,86	59,05
PMN	58,06	95,05
MN	49,08	34,68
MPO	36,84	80,30

A

B

C

Figura 2. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.

(A e B) Número de leucócitos presentes no LBA 24 horas após instilação intranasal de LPS (100µg/mL) em animais previamente expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar obtido 24 horas após instilação intranasal de LPS. Os resultados expressam a média ± EPM de células ou tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo. *p<0,001 em relação ao respectivo valor obtido no grupo de animal controle.

Diferentemente do obtido em animais expostos à HQ, a exposição ao FE não modificou a mobilização de leucócitos para o LBA 24 horas após a instilação intranasal de LPS. Os valores encontrados em animais controles e expostos às doses de 5 ou 10 mg/kg de FE foram equivalentes (Figura 3A e 3B).

A migração para o tecido pulmonar também não foi alterada pela exposição ao FE, em ambas as doses empregadas. Como mostrado na Figura 3C, os resultados não diferiram entre os grupos.

A

B

C

Figura 3. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.

(A e B) Número de leucócitos presentes no LBA 24 horas após instilação intranasal de LPS (100µg/mL) em animais previamente expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar obtido 24 horas após a instilação intranasal de LPS. Os resultados expressam a média ± EPM de células ou tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo.

Uma vez que com a dose de 5 mg/kg de HQ detectamos efeito inibitório sobre a migração leucocitária e as doses de 5 ou 10 mg/kg de FE não provocaram alterações neste parâmetro, os ensaios subseqüentes foram realizados em animais expostos a 5 mg/kg de cada agente químico com o objetivo de avaliar a possibilidade potencialização do FE à HQ. Os resultados obtidos mostraram que a exposição simultânea à HQ e ao FE inibiu a mobilização leucocitária para o LBA. A redução foi de 48,47% em relação ao valor controle (Figura 4A). A análise diferencial mostrou que a redução refletia inibição na migração de MN e PMN para o LBA (Figura 4B; Tabela 2).

A associação de ambos agentes químicos promoveu redução na atividade de MPO em relação à atividade encontrada no tecido pulmonar de animais expostos ao veículo (Figura 4C; Tabela 2).

Se estes resultados são comparados aos obtidos em animais expostos à dose de 5 mg/kg de HQ, apresentados na Figura 2A e 2B e na Tabela 2, observa-se que a associação ao FE acarretou redução maior que a provocada pela HQ no número de PMN e na atividade de MPO.

Tabela 2. Redução no número de leucócitos no pulmão e na atividade de MPO em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.

	HQ+FE (5 mg/kg) (%)
Leucócitos totais	48,47
PMN	85,08
MN	41,28
MPO	68,85

Figura 4. Efeito da exposição simultânea de HQ e FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório 24 horas após instilação intranasal de LPS.

(A e B) Número de leucócitos presentes no LBA 24 horas após instilação intranasal de LPS (100 μ g/mL) em animais previamente expostos à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, em volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar obtido 24 horas após instilação intranasal de LPS. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células ou tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo. * $p < 0,001$ em relação ao respectivo valor obtido em animal controle.

4.1.2 Mobilização de Leucócitos para o Sangue Periférico

Com o intuito de avaliar se as deficiências nas migrações de leucócitos para o foco inflamatório induzidas pela exposição à HQ eram decorrentes de modificações no número de leucócitos circulantes, o leucograma foi quantificado antes e após as exposições químicas e 24 horas após a instilação intranasal de LPS. Os resultados apresentados nas Figuras 5A, B e C mostram que as exposições às doses de 5 ou 10 mg/kg de HQ não alteraram o número de leucócitos e que após indução de RI os aumentos nos números de MN e PMN foram equivalentes nos três grupos de animais estudados.

As porcentagens de aumento em relação aos valores obtidos antes da indução da RI estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos à HQ.

	MN (%)	PMN (%)
Controle	31,3	24,7
HQ 5 mg/kg	30,6	23,6
HQ 10 mg/kg	31,3	22,7

A

B

C

Figura 5. Efeito da exposição à HQ sobre o número de leucócitos total (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.

Número de leucócitos circulantes em animais expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). O leucograma foi determinado no sangue coletado do plexo orbital dos animais antes e após as exposições químicas e 24 horas após instilação intranasal de LPS. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 5 animais/grupo. * $p < 0,001$ em relação ao respectivo valor obtido no grupo de animal controle.

Como mostrado em animais expostos à HQ, a exposição ao FE não modificou o número de leucócitos circulantes nem comprometeu o aumento na mobilização acarretada pela resposta inflamatória (Figura 6A, B e C). As porcentagens de aumento 24 horas após a RI em relação aos valores encontrados antes da instilação intranasal do LPS estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos ao FE.

	MN (%)	PMN (%)
Controle	31,3	19,6
FE 5 mg/kg	30,6	21,4
FE 10 mg/kg	31,3	20,9

Figura 6. Efeito da exposição ao FE sobre o número de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.

Número de leucócitos circulantes em animais expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). O leucograma foi determinado no sangue coletado do plexo orbital dos animais antes e após as exposições químicas e 24 horas após a instilação intranasal de LPS. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo valor obtido no grupo de animal controle.

Os dados apresentados na Figura 7A, B e C mostram que a exposição de HQ e FE simultaneamente não alterou o número de leucócitos circulantes, uma vez que os valores foram similares em animais expostos ao veículo ou aos agentes químicos e não diferiram do valor encontrado antes da exposição aos agentes químicos. Ainda, na vigência da RI, o incremento no número de células brancas na circulação foi equivalente nos dois grupos de animais estudados (Figura 3A, B e C; Tabela 5).

Tabela 5. Porcentagem de aumento no número de leucócitos circulantes em relação aos valores obtidos antes da indução da resposta inflamatória em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE.

	MN (%)	PMN (%)
Controle	26,0	30,9
HQ+FE (5 mg/kg)	27,7	36,2

Figura 7. Efeito da exposição simultânea de HQ e FE sobre o número de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) no sangue circulante.

Número de leucócitos circulantes em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, volume final de 1 mL, via i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). O leucograma foi determinado no sangue coletado do plexo orbital dos animais antes e após as exposições químicas e 24 horas após a instilação intranasal de LPS. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 5 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao respectivo valor obtido no grupo de animal controle.

4.1.3 Moléculas de Adesão Leucocitária e Endotelial

4.1.3.1 Moléculas de Adesão Leucocitária

Com o intuito de avaliar se as exposições aos agentes químicos modificaram a habilidade de leucócitos interagirem com o endotélio microvascular pulmonar, quantificamos a expressão de L-selectina e $\beta 2$ integrinas na membrana de leucócitos PMN e MN coletados antes e 6 horas após a instilação intranasal de LPS.

Os valores obtidos mostraram que as exposições aos agentes químicos isolados ou associados não foram capazes de modificar as expressões de L-selectina em PMN e MN (Figura 8A e B, respectivamente) em condições basais ou 6 horas após estímulo com LPS. Os valores encontrados em leucócitos PMN e MN de animais expostos aos agentes químicos foram similares aos obtidos no grupo de animais controles e os incrementos após RI foram equivalentes.

Da mesma forma que os dados encontrados nas expressões de L-selectina, as exposições aos agentes químicos também não alteraram as expressões de moléculas $\beta 2$ integrina em leucócitos PMN e MN (Figura 9A e B). Os valores encontrados foram equivalentes aos obtidos em células de animais que foram expostos somente ao veículo. No entanto, nesta etapa do processo inflamatório (6 horas) não observamos aumento de expressão desta molécula em células provenientes de todos os grupos de animais testados.

É importante salientar que o controle positivo deste ensaio compreendeu células estimuladas *in vitro* com LPS. Neste caso houve aumento de 80% na expressão de $\beta 2$ integrina (dados não mostrados) indicando que a ausência de aumento não reflete falha no protocolo experimental.

Figura 8. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN (A) e MN (B).

Expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg cada agente, em volume de 1 mL, i.p., ou a volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado do plexo orbital. A expressão de L-selectina foi quantificada antes e 6 horas após instilação intranasal do LPS por ensaio de citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 4 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. * $p < 0,001$ em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 9. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de $\beta 2$ integrina em leucócitos PMN (A) e MN (B).

Expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg cada agente, em volume de 1 mL, i.p., ou a volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado do plexo orbital. A expressão de $\beta 2$ integrina foi quantificada antes e 6 horas após instilação nasal do LPS por ensaio de citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 4 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.1.3.2 Moléculas de Adesão Endotelial Pulmonar

Já que as expressões de moléculas de adesão nos leucócitos não estavam modificadas, investigamos se as exposições poderiam comprometer as expressões de seus ligantes em células do endotélio microvascular pulmonar. Desta forma, quantificamos por ensaios imunohistoquímica as expressões das imunoglobulinas, ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 em microvasos do pulmão.

As Figuras 10A, B e C mostram que as expressões destas moléculas não foram alteradas em animais expostos à HQ, ao FE ou à associação HQ+FE quando comparados com valores obtidos de cortes histológicos de animais expostos ao veículo.

Figura 10. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar.

Expressão de moléculas de adesão no endotélio da microcirculação pulmonar de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg de cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p., ou com o volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 17 dias). A expressão de (A) ICAM-1, (B) PECAM-1 ou (C) VCAM-1 foi quantificada 6 horas após instilação intranasal do LPS por ensaios de imunohistoquímica. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de tecidos pulmonar obtidos de 3 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.2 Efeitos das exposições químicas sobre a capacidade de migração de leucocitária na inflamação pulmonar alérgica induzida pela ovalbumina

4.2.1 Mobilização de Leucócitos para o Foco Inflamatório

Com o objetivo de investigar os efeitos das exposições da HQ, FE ou de ambos agentes químicos associados sobre a capacidade de migração de leucócitos na vigência da resposta inflamatória específica mediada por anticorpos, os animais foram sensibilizados a OVA após 10 dias do início das exposições aos agentes químicos. Vinte e três dias após o início das exposições ou 13 dias após sensibilização à OVA, os animais foram broncoprovocados com OVA. O LBA e o tecido pulmonar foram coletados 24 horas mais tarde para quantificação do número total e diferencial dos leucócitos.

A exposição à HQ induziu redução a migração de leucócitos para o LBA e o efeito parece ser dependente de dose, uma vez que as reduções foram de 18,95% e 32,16% em relação ao valor encontrado em animais controles, respectivamente (Figura 11A; Tabela 6). A análise diferencial mostrou que as doses de 5 e 10 mg/kg promoveram redução de mesma magnitude na migração de PMN em relação aos valores obtidos em animais expostos ao veículo. Apesar do número de MN estar menor em animais expostos a dose de 5 mg/kg, significância estatística só foi encontrada com a dose de 10 mg/kg (Figura 11B). A porcentagem de redução em relação aos respectivos valores controles está apresentada na Tabela 6.

A indicação do infiltrado leucocitário no tecido pulmonar foi obtida pela quantificação da atividade de MPO. Os dados apresentados na Figura 11C mostram que a exposição à HQ reduziu significativamente a atividade de MPO no tecido pulmonar. As porcentagens de redução em relação aos valores obtidos em animais controles estão apresentadas na Tabela 6. Como já previamente descrito, o valor basal obtido em animais não manipulados é $0,04 \pm 0,001$ (n=4).

Tabela 6. Redução no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos à HQ em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.

	HQ 5 mg/kg (%)	HQ 10 mg/kg (%)
Leucócitos totais	18,95	32,16
PMN	57,75	56,60
MN	14,83	25,74
MPO	42,46	54,53

Figura 11. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.

Animais foram expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg, em volume de 1 mL, i.p., ou a volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. O LBA e o tecido pulmonar foram coletados 24 horas após broncoprovocação. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (A) número de leucócitos totais; (B) número diferencial de leucócitos. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar. Os valores expressam a média $\pm$ EPM de células e tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo. * $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ em relação aos valores obtidos em animais controles.

Os valores obtidos em animais expostos ao FE mostraram que somente a exposição à dose de 10 mg/kg induziu redução significativa no recrutamento leucocitário para o LBA (Figura 12A). No entanto, a análise diferencial do LBA mostrou que a migração de PMN estava reduzida, tanto em animais expostos a dose de 5 mg/kg como de 10 mg/kg em relação aos animais controles. A quantificação do número de MN mostrou que a dose de 5 mg/kg provocou elevação significativa destas células em relação aos valores em animais controles enquanto que a dose de 10 mg/kg não alterou o influxo de MN (Figura 12B). As reduções ou aumento no número de leucócitos no pulmão inflamado de animais expostos ao FE em relação aos controles estão apresentados na Tabela 7.

As exposições ao FE provocaram reduções significativas na atividade da enzima MPO em relação ao controle (Figura 12C). As reduções em relação ao controle estão apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Modificações no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos ao FE em relação aos respectivos valores obtidos em animais controles.

	FE 5 mg/kg (%)	FE 10 mg/kg (%)
Leucócitos totais	15,32	↓ 43,07
PMN	↓ 61,48	↓ 64,72
MN	↑ 32,05	17,28
MPO	↓ 23,51	↓ 53,86

(↓ = redução; ↑ = aumento).

Figura 12. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.

Animais foram expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg, em volume de 1 mL, i.p., ou a volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. O LBA e o tecido pulmonar foram coletados 24 horas após broncoprovocação. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (A) número de leucócitos totais; (B) número diferencial de leucócitos. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar. Os valores expressam a média $\pm$ EPM de células e tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo. *p<0,05 em relação aos valores obtidos em animais controles.

Interessantemente, os resultados apresentados na Figura 13 mostram que a exposição simultânea dos metabólitos HQ e FE, ambos na dose de 5 mg/kg cada, não foram capaz de diminuir o número total de leucócitos migrados para o pulmão, uma vez que o número de leucócitos total foi equivalente no grupo de animais expostos simultaneamente aos agentes químicos e no grupo de animais expostos ao veículo (Figura 13A). No entanto, a análise diferencial das células migradas para espaço broncoalveolar mostrou a exposição simultânea a ambos os agentes provocaram redução no número de PMN, mas não alterou o número de MN (Figura 13B). A porcentagem de redução em relação aos respectivos valores controles está apresentada na Tabela 8.

Os resultados apresentados na Figura 13C mostram que a associação de HQ e FE promoveu redução intensa na atividade de MPO no tecido pulmonar quando comparados ao tecido de animais expostos ao veículo. Se comparados aos valores obtidos após exposição à HQ ou ao FE (Tabelas 6 e 7), observamos que houve adição de efeito somente na atividade de MPO (Tabela 8).

Tabela 8. Modificações no infiltrado leucocitário e na atividade de MPO em animais expostos simultaneamente à HQ e ao FE em relação aos respectivos valores encontrados em animais controles.

	HQ+FE (5 mg/kg) (%)
Leucócitos totais	↓ 9,74
PMN	↓ 49,50
MN	↑ 11,98
MPO	↓ 77,76

(↓ = redução; ↑ = aumento).

Figura 13. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a mobilização de leucócitos para o foco inflamatório em resposta à OVA em animais previamente sensibilizados.

Animais foram expostos simultaneamente à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p., ou a volume equivalente de veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. O LBA e o tecido pulmonar foram coletados 24 horas após broncoprovocação. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. (A) número de leucócitos totais; (B) número diferencial de leucócitos. (C) A atividade de MPO foi determinada por espectrofotometria em macerado de tecido pulmonar. Os valores expressam a média ± EPM de células e tecido pulmonar obtidos de 6 animais/grupo. *p<0,001 em relação aos valores obtidos em animais controles.

4.2.2 Mobilização de Leucócitos para o Sangue Periférico

Em razão das alterações ocorridas na migração de leucócitos para o LBA, investigamos possíveis alterações no sangue de animais expostos aos agentes químicos e controles por meio da determinação do leucograma. Os dados apresentados na Figura 14A mostram que as exposições aos agentes químicos não alteraram o número de leucócitos circulantes e nem a mobilização leucocitária após a broncoprovocação. O incremento no número de leucócitos após indução de RI, predominantemente de PMN foi equivalente nos três grupos de animais estudados (Figura 14A, B). Não foram detectadas diferenças significativas no número de MN após a indução de RI em animais expostos ao veículo ou às duas doses de HQ (Figura 14C).

Da mesma forma que para a exposição à HQ, a exposição ao FE não provocou modificações no leucograma. Ainda, a mobilização de células para o compartimento periférico 24 horas após a broncoprovocação foi equivalente nos três grupos de animais (Figura 15A). A análise diferencial destas células mostrou que a inflamação ocasionou aumento de leucócitos MN e PMN nos animais controles (Figura 15B e C).

Uma vez detectado os efeitos individuais dos agentes químicos HQ e FE sobre o recrutamento leucocitário para o sangue periférico, investigamos os efeitos da associação de ambos os agentes na dose de 5 mg/kg sobre a mobilização de leucócitos no mesmo modelo.

A exposição simultânea de HQ e FE não acarretou modificações no leucograma, uma vez que os valores foram similares nos animais expostos aos agentes químicos e ao veículo. Da mesma forma que para as exposições isoladas à HQ ou ao FE, o incremento na mobilização de células brancas 24 horas broncoprovocação foi de mesma magnitude que a detectada em animais controles (Figura 16A). A análise diferencial mostrou que a elevação do número de PMN foi a responsável pela leucocitose após broncoprovocação. O número de MN não foi modificado em ambos os animais controles ou expostos ao agente químico (Figura 16 B e C).

Figura 14. Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.

Animais foram expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital antes e após as exposições químicas e 24 horas após broncoprovocação com OVA. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os valores expressam a média ± EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. *p<0,05 e **p<0,01 em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 15. Efeito da exposição ao FE sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.

Animais foram expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital antes e após as exposições químicas e 24 horas após broncoprovocação com OVA. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 16. Efeito da exposição à HQ e FE associados sobre a mobilização de leucócitos totais (A) e diferencial (B, PMN; C, MN) para o sangue circulante na vigência de RI específica.

Animais foram expostos simultaneamente à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital antes e após as exposições químicas e 24 horas após broncoprovocação com OVA. A contagem total de leucócitos foi realizada em Câmara de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por May-Grünwald e Giemsa. Os valores expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação aos valores obtidos em animais controles.

4.2.3 Moléculas de Adesão Leucocitária e Endotelial

4.2.3.1 Moléculas de Adesão Leucocitária

Com o objetivo de verificar se as exposições aos agentes químicos eram capazes de modificar a habilidade de leucócitos PMN interagirem com o endotélio de microvasculatura pulmonar, quantificamos as expressões de L-selectina e $\beta 2$ integrinas na membrana de leucócitos PMN e MN.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição aos agentes químicos não modificou a expressão de L-selectina em PMN ou MN, uma vez que os valores antes e 6 após a inalação de OVA foram equivalentes aos encontrados em animais pertencentes ao grupo controle (Figura 17A e B). É importante salientar que o aumento de expressão em PMN após estímulo alérgico foi de mesma magnitude em todos os grupos de animais estudados (Figura 17 A).

Os dados mostrados nas Figuras 18A e B indicam que as exposições químicas não alteraram a expressão de $\beta 2$ integrina em PMN e MN antes e 6 horas após o desafio com OVA. Como descrito previamente, a ausência de incremento na expressão de $\beta 2$ integrina após RI não é decorrente de falha na metodologia, já que o controle positivo do ensaio para a expressão de $\beta 2$ integrina foi maior quando realizado em células estimuladas *in vitro* com OVA (dados não mostrados). Assim, a ausência de aumento no ensaio *in vivo* não reflete falha no protocolo experimental.

Figura 17. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN (A) e MN (B).

Expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg cada agente, em volume de 1 mL, i.p. ou a volume equivalente de veículo pela mesma via com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletadas do plexo orbital. A expressão de L-selectina foi quantificada antes e 6 horas após a broncoprovocação com OVA por ensaios de citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± EPM de células obtidas de 4 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,001$ em relação aos respectivos valores antes do estímulo inflamatório.

Figura 18. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de $\beta 2$ integrina em leucócitos PMN (A) e MN (B).

Expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg cada agente, em volume de 1 mL, i.p. ou a volume equivalente de veículo pela mesma via com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletadas do plexo orbital. A expressão de $\beta 2$ integrina foi quantificada antes e 6 horas após a broncoprovocação com OVA por ensaios de citometria de fluxo. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de células obtidas de 4 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.2.3.2 Moléculas de Adesão Endotelial Pulmonar

Com o objetivo de verificar os efeitos das exposições aos agentes químicos sobre a expressão de receptores em células endoteliais, quantificamos imunoglobulinas ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 em microvasos pulmonar por ensaio de imunohistoquímica.

Os dados obtidos mostram que as exposições não alteraram as expressões das moléculas de adesão no endotélio quantificadas 6 horas após a inalação de OVA (Figura 19A, B e C).

Figura 19. Efeito da exposição aos agentes químicos sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio pulmonar.

Expressão de moléculas de adesão no endotélio da microcirculação pulmonar de animais expostos à HQ, FE ou ambos associados (doses diárias de 5 mg/kg cada agente, em volume de 1 mL, i.p. ou a volume equivalente de veículo pela mesma via com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados com OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram broncoprovocados pela inalação de 10 mL de solução de OVA 1% diluída em PBS durante 15 min. Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletadas do plexo orbital. A expressão de (A) ICAM-1, (B) PECAM-1 ou (C) VCAM-1 foi quantificada 6 horas após a broncoprovocação com OVA por ensaios de imunohistoquímica. Os resultados expressam a média $\pm$ EPM de tecidos obtidos de 3 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas

4.2.4 Reação Anafilática *in vitro*

Para investigar os possíveis mecanismos envolvidos nas inibições de recrutamento de leucócitos para o pulmão inflamado determinado pelos agentes químicos, estudamos a capacidade de contração da traquéia pelo modelo de reação anafilática *in vitro*, que indica a capacidade de desgranulação de mastócitos. Para tanto, foram coletados segmentos distais da traquéia dos diferentes grupos de animais expostos aos metabólitos HQ, FE, associação de ambos, ou ao veículo e sensibilizados à OVA. Estes segmentos foram desafiados *in vitro* com OVA e a capacidade de contração muscular determinada.

Os resultados obtidos mostraram que a contração da traquéia isolada de animais expostos às doses de 5 mg/kg ou 10 mg/kg de HQ foi menor quando comparados a contração da traquéia obtidas de animais controles (Figura 20; Tabela 9).

Os resultados observados na Figura 21 demonstram que, semelhantemente aos resultados encontrados em animais expostos à HQ, as traquéias dos animais expostos às doses de 5 mg/kg ou 10 mg/kg de FE também apresentaram redução na atividade contrátil traqueal quando comparados com a contração da traquéia de animais controle. As porcentagens de redução em relação ao controle estão apresentadas na Tabela 9.

Quando associados, a exposição à HQ e ao FE também reduziu a habilidade de contração da traquéia em comparação à traquéia de animais controles (Figura 22; Tabela 9). No entanto, a inibição da contração detectada não foi superior à determinada pela exposição à HQ ou ao FE isolados.

Ainda, para investigar se as inibições de recrutamento de leucócitos para o pulmão inflamado em animais expostos aos agentes químicos seriam decorrentes de alterações na capacidade de mastócitos em desgranular por mecanismo não dependente imunoglobulinas anafiláticas, investigamos a habilidade de contração das traquéias pela ação do composto 48/80, agente que provoca a desgranulação de mastócitos por mecanismos dependentes da ativação direta de segundos mensageiros e independente da desgranulação mediada por imunoglobulinas.

Os resultados mostrados na Figura 23 demonstram que a capacidade de desgranulação de mastócitos não é afetada pelas exposições aos agentes químicos,

sejam eles isolados ou associados, uma vez que a atividade contrátil das traquéias provenientes de animais expostos aos agentes químicos foi equivalente quando comparados com a contração da traquéia de animais controle.

Figura 20. Efeito da exposição à HQ sobre a capacidade de contração da traquéia *in vitro* desafiada pela OVA.

Animais foram expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, segmentos distais da traquéia foram isolados e desafiados *in vitro* com OVA (100µg/mL). Os valores expressam a média $\pm$ EPM de traquéias obtidas de 3 animais/grupo.

* $p < 0,01$ em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 21. Efeito da exposição ao FE sobre a capacidade de contração da traquéia *in vitro* desafiada pela OVA.

Animais foram expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10 mg/kg em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, segmentos distais da traquéia foram isolados e desafiados *in vitro* com OVA (100 μ g/mL). Os valores expressam a média $\pm$ EPM de traquéias obtidas de 3 animais/grupo. *p<0,01 em relação aos valores obtidos em animais controles.

Figura 22. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a capacidade de contração da traquéia *in vitro* desafiada pela OVA.

Animais foram expostos simultaneamente à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, segmentos distais da traquéia foram isolados e desafiados *in vitro* com OVA (100µg/mL). Os valores expressam a média ± EPM de traquéias obtidas de 3 animais/grupo. *p<0,01 em relação aos valores obtidos em animais controles.

Tabela 9. Redução na contração da traquéia de animais expostos à HQ, FE ou HQ+FE em relação a traquéias obtidas de animais controles.

		Redução na contração (%)
HQ	5 mg/kg	31,13
	10 mg/kg	52,84
FE	5 mg/kg	25,05
	10 mg/kg	46,10
HQ+FE	5 mg/kg	26,40

Figura 23. Efeito da exposição à HQ, ao FE ou associação de ambos sobre a contração da traquéia *in vitro* induzida pelo composto 48/80.

Animais foram expostos à HQ, ao FE ou a ambos simultaneamente (doses diárias de 5 mg/kg cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, segmentos distais da traquéia foram isolados e desafiados *in vitro* com composto 48/80 (1 μ g/100 μ L). Os valores expressam a média $\pm$ EPM de traquéias obtidas de 3 animais/grupo.

4.2.5 Anafilaxia Passiva Cutânea

Com o objetivo de investigar os efeitos das exposições aos agentes químicos sobre a síntese de imunoglobulinas anafiláticas, soros de animais sensibilizados e expostos à HQ, ao FE, à associação de ambos ou ao veículo foram coletados e submetidos à diluição seriada, para subsequente injeção intradérmica em animais não manipulados. Vinte e quatro horas após a injeção das frações diluídas dos soros, os animais foram desafiados com OVA via endovenosa em concomitância com a injeção de solução de Azul de Evans, corante com grande afinidade química para proteínas plasmáticas. O extravasamento protéico no sítio de aplicação do soro foi determinado em função da dimensão do halo azulado formado no local da injeção.

Os dados demonstrados na Figura 24, 25 e 26 indicam que a concentração de soro de provenientes de animais expostos à HQ, FE ou associação de ambos necessária para induzir a resposta anafilática foi maior que a concentração de soro de animais controles.

É interessante salientar que as concentrações de soro dos animais expostos ao agente químico para provocar a reação anafilática cutânea foram equivalentes se as exposições foram isoladas (HQ ou FE) ou associadas (HQ+FE).

Figura 24. Efeito da exposição à HQ sobre a anafilaxia passiva cutânea.

Animais foram expostos à HQ (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado da aorta abdominal para obtenção de soro. Após diluição seriada, os soros foram injetados via intradérmica em ratos não manipulados previamente. Após 24 horas, os animais foram desafiados simultaneamente pela injeção intravenosa de OVA (500 µg/mL) e solução de azul de Evans (2,5 mg/mL). Os animais foram sacrificados 30 min após o desafio. O halo formado pelo extravasamento protéico no local da injeção foi determinado. Os resultados expressam a recíproca do maior título sorológico capaz de provocar lesão de pelo menos 5 mm. Os valores expressam a média ± EPM do título sorológico obtido de 4 animais/grupo. *p<0.05 em relação aos valores obtidos em animais expostos ao veículo.

Figura 25. Efeito da exposição ao FE sobre a anafilaxia passiva cutânea.

Animais foram expostos ao FE (doses diárias de 5 ou 10mg/kg, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10µg/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado da aorta abdominal para obtenção de soro. Após diluição seriada, os soros foram injetados via intradérmica em ratos não manipulados previamente. Após 24 horas, os animais foram desafiados simultaneamente pela injeção intravenosa de OVA (500 µg/mL) e solução de azul de Evans (2,5 mg/mL). Os animais foram sacrificados 30 min após o desafio. O halo formado pelo extravasamento protéico no local da injeção foi determinado. Os resultados expressam a recíproca do maior título sorológico capaz de provocar lesão de pelo menos 5 mm. Os valores expressam a média ± EPM do título sorológico obtido de 4 animais/grupo. *p<0.05 em relação aos valores obtidos em animais expostos ao veículo.

Figura 26. Efeito da exposição simultânea à HQ e ao FE sobre a anafilaxia passiva cutânea.

Animais foram expostos simultaneamente à HQ e ao FE (doses diárias de 5 mg/kg de cada agente químico, em volume de 1 mL, i.p. ou ao volume equivalente do veículo pela mesma via, com 5 doses/semana durante 23 dias) e sensibilizados pela OVA (10 dias após o início da exposição, 10 μ g/10mg de hidróxido de alumínio, i.p.). No 23º dia após o início das exposições químicas ou no 13º dia após a sensibilização, os animais foram sacrificados e o sangue foi coletado da aorta abdominal para obtenção de soro. Após diluição seriada, os soros foram injetados via intradérmica em ratos não manipulados previamente. Após 24 horas, os animais foram desafiados simultaneamente pela injeção intravenosa de OVA (500 μ g/mL) e solução de azul de Evans (2,5 mg/mL). Os animais foram sacrificados 30 min após o desafio. O halo formado pelo extravasamento protéico no local da injeção foi determinado. Os resultados expressam a recíproca do maior título sorológico capaz de provocar lesão de pelo menos 5 mm. Os valores expressam a média $\pm$ EPM do título sorológico obtido de 4 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação aos valores obtidos em animais expostos ao veículo.

5. DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente, os efeitos tóxicos do benzeno e de seus metabólitos desencadeiam uma série de manifestações sobre o sistema imune, que se apresentam como imunossupressão, leucemias, anemias e neoplasias (para revisões ver DeCaprio, 1999; Snyder, 2004; Hayes *et al.*, 1996; Qu *et al.*, 2000; Yeowell-O'Connell *et al.*, 2001; Fahy *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005b). A gravidade destes efeitos associados a neurotoxicidade observada após as exposições, levou à adoção de legislações específicas com recomendações de parâmetros de referência sobre a utilização ambiental e ocupacional do benzeno (FUNDACENTRO, 2005).

Entretanto, tais recomendações nem sempre têm sido cumpridas a contento e intoxicações humanas ainda têm sido descritas mesmo que em condições de exposição a baixas doses (Melikian *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2004; Swaen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005b; Fahy *et al.*, 2005). Assim, neste trabalho nos propusemos a investigar os efeitos da exposição *in vivo* a metabólitos do benzeno, que reconhecidamente afetam o sistema imunológico, sobre respostas inflamatórias pulmonares inespecífica e específicas. É importante salientar que a extrapolação de dose, via e tempo de exposição dos estudos de animais para humanos é complexa. Neste trabalho não tivemos o objetivo de alcançar doses diárias de exposição humana, mas empregamos doses de HQ e FE muito inferiores que as preconizadas na literatura para os estudos experimentais.

Para tal fim, utilizamos ratos da linhagem Wistar, uma vez que a literatura descreve que estes animais possuem sistemas enzimáticos necessários para biotransformações do benzeno e de seus metabólitos, além de ser o modelo experimental que mais se aproxima do humano na vigência de intoxicação pelo solvente (Hedli *et al.*, 1996; Lovern *et al.*, 1997; 2001; Rana & Verma, 2005). Embora as vias de exposição inalatória ou dérmica sejam as mais relevantes em uma simulação de intoxicação ocupacional, o uso experimental de vias oral, cutânea, subcutânea e intraperitoneal tem sido descrito na literatura para esclarecer os mecanismos de ação tóxicos (MacEachern *et al.*, 1992; Punjabi *et al.*, 1994; Velasco-Lezama *et al.*, 2001; English & Deisinger, 2005).

O período de exposição aos agentes químicos (17 ou 23 dias) foi decorrente da cinética de produção e maturação de leucócitos polimorfonucleares (PMN), os primeiros efetores durante uma resposta inflamatória aguda. É possível que o intervalo de 17 a 23 dias seja suficiente para que granulócitos, que possam ter sofrido alterações na hematopoese, alcancem a circulação na ocasião da indução das respostas inflamatórias agudas. Dados obtidos de ensaios epidemiológicos e experimentais *in vivo* ou *in vitro* mostram que os compostos fenólicos aqui empregados afetam as células precursoras da medula óssea ou as fases de maturação de leucócitos segmentados, com conseqüente alteração na mobilização destas células para o compartimento periférico (Moran *et al.*, 1996; Henschler *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2006). Os granulócitos são produzidos na medula óssea e passam por diferentes etapas de maturação que se prolongam por cerca de 14 dias. A partir de então, já maduros, são mobilizados para o sangue periférico. Nesta localização, circulam por 6 a 7 horas, são seqüestrados pelo baço ou migram, subseqüentemente, para os tecidos adjacentes onde permanecem por aproximadamente 2 dias antes de entrarem em apoptose e serem fagocitados por células competentes no interstício (para revisões ver Lorenzi, 1999; Ryan *et al.*, 2001).

O ganho de peso corpóreo na vigência das exposições aos agentes químicos foi adotado como medida de acompanhamento de possíveis danos aos animais. Os dados obtidos demonstraram que as exposições não provocaram alterações aparentes ou severas, uma vez que o ganho de peso apresentado pelos animais expostos durante as exposições (17 ou 23 dias) foi equivalente ou maior que o ganho de peso em animais controle (Variação de Peso: $\Delta P_{\text{Controle}} = 75,7 \pm 1,58$; $\Delta P_{\text{HQ } 10\text{mg/kg}} = 72,3 \pm 3,03$; $\Delta P_{\text{FE } 10\text{mg/kg}} = 83,6 \pm 0,26^*$; $\Delta P_{\text{HQ+FE } (5\text{mg/kg})} = 89,7 \pm 0,33^*$) ($n=6$) (dados não mostrados). É importante salientar que enzimas séricas, indicadoras de alteração da função hepática ou renal, bem como a morfologia destes tecidos, não foram alterados pela administração de 50 mg/kg de HQ ou FE, pelo mesmo período de tempo aqui empregado (Macedo, comunicação pessoal). Desta forma, podemos supor que a exposição a doses 10 vezes menores, empregadas no presente estudo, também não deva ter comprometido os tecidos acima descritos.

Dois modelos de inflamação foram estudados: a inespecífica, desencadeada pela instilação intranasal de LPS e a específica, induzida pela inalação de OVA em animais previamente sensibilizados. Muito embora estas respostas tenham etiologias

distintas, são caracterizadas por significativa infiltração de leucócitos PMN na sua fase aguda.

Os dados obtidos mostraram que a exposição de HQ provocou redução marcada na migração de leucócitos PMN e MN para o pulmão em resposta ao LPS. A análise da atividade de MPO, que reflete a concentração de leucócitos migrados para o pulmão, mostrou que os leucócitos nos animais expostos à HQ nem mesmo alcançaram o tecido pulmonar, uma vez que a atividade foi muito menor no tecido de animais expostos à HQ que em animais controles. Diferentemente, a exposição ao FE não comprometeu a migração destas células para o pulmão.

Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que a exposição de animais da mesma espécie à HQ usando o mesmo protocolo de intoxicação, no entanto, com doses diárias de 50 mg/kg, acarretou, diferentemente, maior migração de PMN para o tecido subcutâneo inflamado (modelo de bolsa de ar injetada com glicogênio de ostra). A investigação dos mecanismos envolvidos demonstrou que a exposição à HQ provocou neutrofilia, por conta de aceleração nas etapas de maturação destas células e modificações no seu estado de ativação na circulação, visualizada por decréscimo e acréscimo das expressões de L-selectinas e $\beta 2$ integrinas, respectivamente (Macedo *et al.*, 2006). Os mecanismos envolvidos nos resultados por nós obtidos não estão esclarecidos, mas podemos sugerir as doses da HQ e/ou características dos tecidos estudados podem ser os responsáveis pelas diferenças de respostas celulares. Interessantemente, a exposição ao FE, em ambos os modelos e doses, não provocou modificações no recrutamento leucocitário para os focos inflamatórios (Macedo *et al.*, 2006), indicando que o FE parece não ser o metabólito predominantemente para este efeito tóxico. Poder-se-ia esperar que o FE promovesse efeitos semelhantes à HQ, uma vez que é biotransformado à HQ por influência do CYP 2E1 e que esta via de metabolização tem sido considerada a principal no processo de biotransformação do benzeno (Hoffmann *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2002; Snyder, 2004).

A literatura tem mostrado que o FE exerce efeito potencializador sobre a HQ, pela habilidade de ativar as MPOs e prostaglandinas H sintetases na medula óssea e conseqüentemente aumentar a metabolização da HQ a seus compostos oxidados, como a 1,4-BQ (Parkinson, 2001). Assim, com o intuito de averiguar a possível interação entre HQ e FE nos efeitos aqui observados, os animais foram expostos simultaneamente às doses de 5 mg/kg de ambos os agentes químicos. Os

resultados obtidos mostraram que a associação dos agentes potencializou o recrutamento de PMN, e da atividade de MPO. Estes resultados concordam com dados da literatura que mostram que o FE age sinergicamente à HQ ou a outros compostos fenólicos na alteração da linhagem granulocítica. No entanto, estes dados, obtidos a partir de camundongos expostos diariamente à HQ e FE associados durante uma semana mostraram que a associação é capaz de promover reduções significativas no número de leucócitos circulantes (Eastmond *et al.*, 1987).

Ainda, a literatura tem referido que as interações tóxicas entre os metabólitos podem ser decorrentes da complicada relação entre modelos de biotransformação dos metabólitos, gerando reduções celulares na medula óssea (Eastmond *et al.*, 1987; Henschler *et al.*, 1996). Muito embora o mecanismo sinérgico do FE não esteja esclarecido, além da ação do FE sobre MPO citadas anteriormente, existem evidências que a oxidação do FE à radical fenoxi associado à ROS seja o responsável pelo efeito (Eastmond *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1990; Medinsky *et al.*, 1995), onde a auto-oxidação destes metabólitos gerariam ROS em quantidade suficiente para saturar a atividade *scavenger* do sistema NQO1. Assim, os radicais livres formados seriam os responsáveis pelas lesões em células granulocíticas medulares, levando a alteração na maturação e ativação destas, com conseqüente redução da população de PMN tanto na medula óssea quanto no sangue circulante (Eastmond *et al.*, 1987; Kolachana *et al.*, 1993; Moran *et al.*, 1996), favorecendo a metabolização da HQ à metabólitos altamente reativos (Ross *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 2004; Henderson *et al.*, 2005).

Nossos dados não concordam com Henschler *et al.* (1996), os quais mostram que a exposição de camundongos submetidos a doses diárias muito maiores (75 mg/kg de HQ ou à HQ e FE associados (50 mg/kg, cada agente químico) que as utilizadas por nós por período de 11 dias não alterou a capacidade de recrutamento de leucócitos da medula óssea para o sangue periférico ou mesmo alterações na relação diferencial entre MN e PMN.

Em conjunto, os dados mostraram que a exposição à HQ inibe a mobilização leucocitária para o pulmão inflamado. Interessantemente, a exposição ao FE não afeta este evento inflamatório e acarreta efeito potencializador sobre a inibição no recrutamento de PMN promovida pela HQ. A etapa inicial na investigação dos mecanismos envolvidos foi avaliar se as exposições interferiram com o número de leucócitos na circulação ou com a capacidade de mobilização destas células dos

compartimentos de reserva. Nossos dados mostraram que a exposição à HQ, FE ou associação de ambos os agentes químicos não modificou no número de células brancas circulantes durante as exposições químicas e que na vigência de resposta inflamatória aguda pulmonar, onde o aumento na mobilização de células brancas para o sangue periférico não foi prejudicado. Como já salientado previamente, o acúmulo de compostos fenólicos derivados do benzeno, associados ou não a processos enzimáticos locais, afetam à medula óssea e a conseqüente produção e maturação leucocitária. Os mecanismos genotóxicos e citotóxicos envolvidos na hematotoxicidade são amplos e ainda não estão completamente elucidados. Trabalhos têm sugerido que atividade enzimática de peroxidases como a MPO e compostos fenólicos seja o passo-chave na elucidação da toxicidade direta provocados por estes compostos sobre as células brancas (Irons *et al.*, 1980; Smith *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002) ou no estroma do microambiente medular (Garnett *et al.*, 1983; Thomas *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1994; Kalf *et al.*, 1996; Ross *et al.*, 1996). Há evidências que o equilíbrio entre MPO/NQO1, que representa o balanço-limitante entre a bioativação e a detoxificação dos compostos fenólicos, seja determinante para susceptibilidade celular às lesões provenientes da ação oxidativa de ROS e da 1,4-BQ (Ganousis *et al.*, 1992; Moran *et al.*, 1996).

A mobilização de leucócitos circulantes para o foco de lesão é dependente da expressão e da interação de receptores glicoprotéicos nas membranas celulares, denominados de moléculas de adesão. A expressão seqüencial de moléculas das famílias das selectinas, integrinas e imunoglobulinas que medeiam o “rolling” e a aderência de leucócitos nos vasos da microcirculação próxima à área lesada são fundamentais para o recrutamento de células brancas (Rampart, 1994; Vestweber & Blanks, 1999; Ebnet *et al.*, 2004). A análise da expressão de moléculas de adesão mostraram que as deficiências no recrutamento de células brancas aqui descritas não refletem modificações nas expressões de L-selectina e $\beta 2$ integrina em leucócitos circulantes, ou mesmo de ICAM-1, VCAM-1 ou PECAM-1 no endotélio de vênulas pós-capilares da microcirculação pulmonar.

Os efeitos de compostos fenólicos derivados do benzeno sobre as moléculas de adesão ainda são escassos, no entanto há evidências que o hábito de fumar modifica as expressões de moléculas de adesão VCAM-1, bem como promover o aumento da expressão de L-selectinas e ICAM-1, moléculas importantes na interação leucócito-endotélio. Tais evidências, associado a presença dos compostos

fenólicos HQ e FE no cigarro (Robinson *et al.*, 1997), sugerem o envolvimento destes compostos no acúmulo de células inflamatórias em fumantes portadores de doenças cardiovasculares (Patlar *et al.*, 2002; Palmer *et al.*, 2002; Cavusoglu *et al.*, 2004; Lain *et al.*, 2006). Outras evidências tem sido mostrado na literatura, onde o polimorfismo genético nas expressões de moléculas de adesão (VCAM-1) e de citocinas (IL-1, IL-4, IL-10 e IL-12) pode ser fator determinante para maior susceptibilidade aos efeitos tóxicos do benzeno (Lan *et al.*, 2005).

Em conjunto, os dados obtidos mostram que a exposição à HQ compromete a migração de leucócitos MN e PMN para o foco de lesão em uma resposta inflamatória inespecífica e que o efeito não é dependente de modificações no número de leucócitos circulantes ou de suas habilidades de expressar moléculas de adesão responsáveis pela interação leucócito-endotélio. Interessantemente, a exposição ao FE não modificou a capacidade de recrutamento de leucócitos na vigência de resposta inflamatória e a exposição associada de FE acarretou efeito potencializador à HQ somente no recrutamento de leucócitos PMN. Os resultados por nós obtidos não permitem inferir os mecanismos envolvidos no efeito da HQ. As investigações subseqüentes do nosso laboratório visam a elucidação das ações dos compostos fenólicos HQ e FE sobre a expressão de outras moléculas de adesão importantes para o recrutamento de leucócitos no pulmão como as E-selectinas e as moléculas pertencentes à família das integrinas (beta1, beta4, e beta7 integrinas). Estas últimas, além de estarem envolvidas na interação leucócito-endotélio na inflamação pulmonar, mediam a migração no interstício (Ebnet *et al.*, 2004). Ainda, será objetivo de estudo a atividade intracelular de leucócitos envolvidos na RI, como a ativação do NF-kappa B e as alterações morfológicas responsáveis pela locomoção; além da quantificação de mediadores inflamatórios no LBA relevantes para o recrutamento leucocitário. Considerado as características da RI pulmonar e os mediadores com a atividade quimiotática relevante, elencamos o LTB₄, TNF- α , IL-1 e a IL-8 como ponto de partida.

A literatura traz dados bastante convincentes da ação dos metabólitos do benzeno sobre a maturação e função de linfócitos B e T. No entanto, não existem trabalhos *in vivo* que mostrem os efeitos decorrentes destas alterações na vigência de uma resposta do hospedeiro ao trauma. Neste sentido, investigamos os efeitos das exposições químicas sobre a RI específica induzida pela OVA. Para tanto, os

animais foram sensibilizados pela OVA uma semana após o início das exposições aos agentes químicos. O modelo experimental utilizado foi de hipersensibilidade imediata descrito por Coleman *et al.* (1983), baseado na capacidade de desenvolvimento da RI mediada por imunoglobulinas anafiláticas da classe E a partir do 14º dia de sensibilização.

Os dados obtidos mostraram que a exposição à HQ induziu redução acentuada no recrutamento leucocitário de MN e PMN para o espaço broncoalveolar em resposta à OVA. Vale salientar que apenas os animais que foram expostos à maior dose (10 mg/kg) apresentaram recrutamento de MN reduzido. A atividade enzimática de MPO, indicativo da concentração de leucócitos no pulmão estava reduzida, refletindo que os leucócitos não alcançaram o tecido pulmonar inflamado. Da mesma forma, a exposição ao FE evocou redução significativa na migração destas células para o foco inflamatório.

Tal comportamento sugere ser dependente da dose uma vez que dados obtidos por Macedo *et al.* (2006; enviado para publicação) sob as mesmas condições do protocolo, mas com dose de 50mg/kg/dia de HQ, mostraram redução maior na migração de leucócitos para o tecido pulmonar inflamado. Diferentemente do efeito da exposição ao FE sobre a RI inespecífica (dados apresentados anteriormente), neste modelo de inflamação, a exposição ao FE acarretou redução na migração de leucócitos para o foco inflamatório.

Com o objetivo de investigar o possível efeito sinérgico ou aditivo da HQ e FE sobre os parâmetros investigados, os animais foram expostos simultaneamente às doses de 5mg/kg de ambos os agentes químicos. Os resultados mostraram efeito aditivo somente na atividade de MPO indicando que a associação de ambos os agentes químicos afeta marcadamente a capacidade dos leucócitos migrarem para o pulmão inflamado.

Como discutido anteriormente, o efeito sinérgico, aditivo ou potencializador do FE sobre as alterações de parâmetros imunológicos desencadeados pela HQ, bem como os mecanismos de ação envolvidos, não são bem conhecidos e até mesmo controversos (Eastmond *et al.*, 1987; Smith *et al.*, 1990; Medinsky *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 1999; Yoon *et al.*, 2001; 2002; Snyder, 2004; Ruiz-Ramos *et al.*, 2005).

A análise do leucograma mostrou que as exposições aos agentes químicos isolados ou associados não comprometeram a mobilização de leucócitos para o

sangue periférico quando comparado a animais controles, bem como a capacidade de mobilização na vigência de resposta inflamatória pulmonar. Tais dados são controversos aos apresentados na literatura, uma vez que estudos relatam eventos como supressão da hematopoese, redução do número de células brancas no sangue periférico, diminuição da habilidade de responder à quimiotaxia, alterações na produção de ROS em camundongos expostos à doses de 600 mg/kg de benzeno ou à associação de HQ e FE na dose 50 mg/kg/dia num período de 3 dias de exposição (Farris *et al.*, 1997; DeCaprio, 1999; Kalf, 2000; Snyder, 2004). Ainda, efeito proliferativo desencadeado pelo FE sobre a linhagem mononuclear tem sido relatado na literatura (Poirier *et al.*, 2002). Adicionalmente, a expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes mostraram que as exposições químicas não alteraram a concentração destas moléculas na membrana celular, sugerindo que as células circulantes estão aptas para os fenômenos de interação iniciais ao endotélio microvascular pulmonar.

Em conjunto, os dados sugerem que os agentes químicos parecem não alterar os leucócitos circulantes e, portanto, as ações da HQ ou FE podem ser no endotélio vascular ou nas etapas subseqüentes da migração no interstício extravascular. Neste sentido, os dados dos ensaios de imunohistoquímica, que mostraram que as exposições não alteram as expressões de ICAM-1, VCAM-1 ou PECAM-1 no endotélio de microvasos pulmonares, corroboram a possível ação de substâncias químicas na locomoção das células brancas na matriz intravascular. Muito embora a literatura sugira a participação de moléculas de adesão na gênese da intoxicação pelo benzeno, esta hipótese será investigada pela avaliação da capacidade de locomoção orientada de leucócitos e aderência *in vitro*.

Como afirmado anteriormente, os efeitos do benzeno ou de seus derivados sobre a resposta inflamatória ainda são escassos na literatura, no entanto, evidências apontam que estes agentes químicos possam interferir na regulação da hematopoese e que a ocorrência de polimorfismos gênicos para citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão também possa influenciar a susceptibilidade da toxicidade induzida pelo benzeno e seus derivados. Ainda, sugerem que a diminuição de moléculas de adesão endoteliais, principalmente VCAM-1 possam estar diretamente associadas à redução do número de linfócitos B e T, células NK, linfócitos T CD4⁺ e monócitos, alterações no microambiente medular caracterizadas por prejuízo em diferentes etapas da maturação e proliferação. *In vitro*, exposições à

baixas doses de HQ inibem a apoptose e induz diferenciação de granulócitos a partir de mieloblastos provenientes de murinos. Os metabólitos do benzeno provocam alterações na produção de imunoglobulinas anafiláticas, além de modificações na mediação química dependente de IL-3, IL-4, TNF- α , fatores estimuladores de crescimento como GM-CSF (Ewens *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002; Poirier *et al.*, 2002; McCue *et al.*, 2003; Lan *et al.*, 2005; Dimitrova *et al.*, 2005). Como consequência, tais alterações contribuem para o desenvolvimento de efeitos imunossupressivos.

No sentido de se aquilatar a possibilidade dos agentes químicos interferirem com a sensibilização e consequente geração de imunoglobulinas anafiláticas, o ensaio de PCA foi empregado. Os resultados obtidos indicaram que as exposições ao FE e à HQ prejudicam a síntese de imunoglobulinas anafiláticas em resposta à OVA, uma vez que suas concentrações circulantes foram menores em animais expostos aos agentes químicos. Ainda, a exposição simultânea a ambos os agentes químicos não exacerbou a resposta. Vale ressaltar que nas Figuras 24, 25 e 26, a ausência de erro padrão da média nos grupos controles e no grupo exposto ao FE na dose de 10 mg/kg se deve à determinação de valores idênticos de títulos de imunoglobulinas anafiláticas intra-grupos.

Uma vez que a sensibilização deve ser efetiva para o desenvolvimento adequado do processo alérgico e que esta é responsável pela ligação de Ig nos receptores de mastócitos para sua desgranulação na vigência de desafio, avaliamos se a redução na concentração de imunoglobulinas anafiláticas modificava a capacidade de contração da traquéia, resposta inicial do processo dependente da sensibilização prévia de mastócitos. Realmente, a concentração de imunoglobulinas reduzida comprometeu a habilidade de mastócitos desgranularem, visualizados pela menor contração tecidual de órgãos obtidos de animais expostos aos agentes químicos quando desafiados *in vitro* pela OVA. A exposição associada de HQ e FE não alterou a já reduzida capacidade de contração em traquéia de animais expostos à HQ ou ao FE isoladamente.

A especificidade da resposta anafilática foi confirmada pela contração equivalente de traquéias obtidas dos 4 grupos de animais estudados após administração *in vitro* do composto 48/80, um agente desgranulador de mastócitos por agir diretamente nos mecanismos intracelulares efetores do processo. Ainda que em tecido diferente da traquéia, dados por nós obtidos a partir de ensaios de microscopia intravital, mas não apresentados neste trabalho mostram que o número

de mastócitos perivasculares no mesentério não é alterado pelas exposições. Ainda, nestes ensaios, a menor habilidade de desgranulação alérgica específica em animais expostos à HQ, FE ou HQ+FE foi corroborada após aplicação tópica de OVA. Por outro lado, a desgranulação evocada pela aplicação tópica de composto 48/80 provocou desgranulação equivalente nos 4 grupos de animais estudados.

A menor habilidade de desgranulação mastocitária em animais expostos aos agentes químicos pode ser um mecanismo envolvido, pelo menos em parte, na menor migração de leucócitos para o pulmão inflamado. O recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório alérgico é dependente da secreção de mediadores inflamatórios como histamina, além de prostanoídes e leucotrienos derivados do metabolismo do ácido araquidônico, provenientes da desgranulação de mastócitos quando ativados por imunoglobulinas anafiláticas (Mota & Wong, 1969; Fahy *et al.*, 1995; Maestrelli *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 2000; Wardlaw *et al.*, 2004). Além de exercer efeito direto sobre os fenômenos de interação leucócito-endotélio e na migração tecidual, estes mediadores ativam células residentes que secretam mediadores que facilitam a evolução da RI (para revisão ver Ley & Kansas, 2004; Smalley & Ley, 2005).

Em conjunto, os nossos resultados mostram que a HQ e FE acarretam prejuízo na migração de leucócitos MN e PMN para o foco inflamatório alérgico, com certas particularidades quanto ao tipo leucocitário envolvido e que tal evento independe de alterações no número de células brancas circulantes no sangue periférico ou de sua capacidade de expressar as principais moléculas envolvidas na interação entre leucócitos circulantes e o endotélio de microvasos pulmonares. Neste modelo inflamatório, ambos os agentes químicos provocaram alterações no recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado, no entanto não se evidenciou efeito aditivo do FE à HQ exceto quando comparado os valores obtidos na determinação da atividade de MPO no pulmão inflamado. No entanto, é possível que o efeito seja dependente da menor secreção de mediadores inflamatórios derivados dos mastócitos, já que estes desgranulam menos em função da menor concentração de imunoglobulinas anafiláticas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

1. a exposição à HQ acarretou redução na migração de leucócitos MN e PMN para o LBA e para o tecido pulmonar 24 horas após a instilação intranasal de LPS de *Salmonella abortus*.
2. a exposição ao FE não alterou a migração leucocitária para o LBA e para o tecido pulmonar inflamado pelo LPS;
3. a exposição simultânea de HQ e FE potencializou somente as reduções de leucócitos PMN para o LBA, da atividade de MPO e de leucócitos para o tecido pulmonar; O efeito não foi dependente de modificações no número de leucócitos circulantes nem das expressões de moléculas de adesão em leucócitos circulantes ou no endotélio microvascular pulmonar;
4. a exposição à HQ em animais previamente sensibilizados e desafiados pela OVA provocou redução no número de leucócitos MN e PMN no pulmão inflamado, enquanto que a exposição ao FE comprometeu somente a infiltração de leucócitos PMN. A exposição simultânea a ambos os agentes químicos acarretou efeito inibitório semelhante às exposições isoladas, além de provocar efeito aditivo na atividade de MPO, indicativo da infiltração leucocitária para o tecido pulmonar;
5. os efeitos sobre a migração de leucócitos para o pulmão na vigência de RI alérgica não foi dependente de modificações na habilidade de mobilização periférica de leucócitos, nem de alterações na expressão de moléculas de adesão em leucócitos circulantes ou no endotélio dos microvasos pulmonares. No entanto, parecem ser dependentes da inibição da produção de imunoglobulinas anafiláticas e da conseqüente redução na desgranulação de mastócitos.

7. REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.
- ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. *TLVS and BEIS based on the documentation for threshold limit values for Chemical Substances and Physical Agents and biological exposure indices*. Cincinnati: ACGIH, 2003. 219p.
- Adams, D.H.; Lloyd, A.R. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *The Lancet*. 349: 490-494, 1997.
- Ali, H.; Richardson, R.M.; Haribabu, B.; Snyderman, R. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J Biol Chem*. 274(10):6027-30, 1999.
- Amin, R.P.; Witz, G. DNA-protein crosslink and DNA strand break formation in HL-60 cells treated with *trans,trans*-muconaldehyde, hydroquinone and their mixtures. *Int J Toxicol*, 20, 69-80, 2001.
- Bergsagel, D.E.; Wong, O.; Bergsagel, L.; Alexanian, R.; Anderson, K.; Kyle, R.A.; Raabe, G.K. Benzene and multiple myeloma: appraisal of the scientific evidence. *Blood*. 94 (4): 1174-1182, 1999.
- Bironaite, D.; Siegel, D.; Moran, J.L.; Weksler, B.B.; and Ross, D. Stimulation of endothelial IL-8 (eIL-8) production and apoptosis by phenolic metabolites of benzene in HL-60 cells and human bone marrow endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions*. 149: 37-49, 2004.
- Bogadi-Sare, A; Zavalic, M; Trosic, I; Turk, R; Kontosic, I; Jelcic, I. Study of some immunological parameters in workers occupation exposed to benzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 73(6): 397-400, 2000.
- Bois, F.Y.; Smith, M.T.; Spear, R.C. Mechanisms of benzene carcinogenesis: application of a physiological model of benzene pharmacokinetics and metabolism. *Toxicology Letters*. 56, 283-298, 1991.
- Bozinovski, S., Jones, J.; Beavitt, S.J.; Cook, A.D.; Hamilton, J.A.; Anderson, G.P. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286(4):L877-85, 2004.
- Budinsky, R.A.; DeMott, R.P.; Wernke, M.J.; Schell, J.D. An evaluation of modeled benzene exposure and dose estimates published in the Chinese-National Cancer Institute collaborative epidemiology studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 30: 244-258, 1999.
- Burns, J.A.; Issekutz, T.B; Yagita, H.; Issekutz, A.C. The alpha-4-beta-1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha-5-beta-1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta-2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. *J. Immunol*. 166: 4644-4649, 2001.
- Calich, V.; Vaz, C. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 260p.
- Cavusoglu, Y.; Timuralp, B.; Us, T.; Akgun, Y.; Kudaiberdieva, G.; Gorenek, B.; Unalir, A.; Goktekin, O.; Ata, N. Cigarette smoking increases plasma concentrations of vascular cell adhesion molecule-1 in patients with coronary artery disease. *Angiology*. 55(4): 397-402, 2004.

Coleman, J.W.; Layton, G.T.; Stanworth, D.R. The kinetics of *in vivo* sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur. J. Immunol.* 13(12):994-8, 1983.

Coutrim, M.X.; Carvalho, L.R.F.; Arcuri, A.S.A. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. *Química Nova.* 23(5): 653-63, 2000.

Cox, L.A. Biological basis of chemical carcinogenesis: insights from benzene. *Risk Anal.* 11:453-464, 1991.

Cronkite, E.P.; Drew, R.T.; Inoue, T.; Hirabayashi, Y.; Bullis, J.E. Hematotoxicity and carcinogenicity of inhaled benzene. *Environ Health Perspect.* 82: 97-108, 1989.

DeCaprio, A.P. The Toxicology of Hydroquinone- Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *Critical Reviews in Toxicology.* 29(3): 283-330, 1999.

Dimitrova, N.D.; Kostadinova, R.Y.; Marinova, S.N.; Popov, T.A.; Panev, T.I. Specific immune responses in workers exposed to benzene. *Int Immunopharmacol.* 5(10):1554-9, 2005.

Eastmond, D.A.; Smith, M.T.; Irons, R.D. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 91: 85-95, 1987.

Ebnet, K.; Suzuki, A.; Ohno, S.; Vestweber, D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* 1;117(Pt 1):19-29, 2004.

English, J.C.; Deisinger, P.J. Metabolism and disposition of hydroquinone in Fischer 344 rats after oral and dermal administration. *Food and Chemical Toxicology.* 43: 483-493, 2005.

Ewens, S.; Wulferink, M.; Goebel, C.; Gleichmann, E. T-cell dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Arch. Toxicol.* 73:159-67, 1999.

Fahy, A.; Lethbridge, G.; Earle, R.; Ball, A.S.; Timmis, K.N.; McGenity, T.J. Effects of long-term benzene pollution on bacterial diversity and community structure in groundwater. *Environmental Microbiology.* 7(8), 1192-1199, 2005.

Fahy, J.V.; Wong, H.; Liu, J. Comparisons of samples collect by sputum induction and bronchoscopy from asthmatic and healthy subjects. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 152: 53,1995.

Farris, G.M.; Robinson, S.N.; Wong, B.A.; Wong, V.A.; Hanh, W.P.; Shah, R. Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. *Toxicology.* 28 (118): 137-48, 1997.

Fishbein, L. Exposure from occupational versus other sources. *Scand. J. Work Environ. Health.* 8(1): 5-16, 1992.

Frangogiannis, N.G.; Mendoza, L.H.; Lewallen, M.; Michael, L.H.; Smith, C.W.; Entman, M.L. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J*, v. 15, p. 1428-1430, 2001.

FUNDACENTRO. *Acordo e legislação sobre o benzeno 10 anos.* São Paulo: Fundacentro, 2005.

- Ganousis, L.G.; Goon, D.; Zyglewska, T.; Wu, K.K.; Roos, D. Cell-specific metabolism in mouse bone marrow stroma: studies of activation and detoxification of benzene metabolites. *Mol. Pharmacol.* 42:1118-25, 1992.
- Garnett, H.M.; Cronkite, E.P.; Drew, R.T. Effect of in vivo exposure to benzene on the characteristics of bone marrow adherent cells. *Leuk Res.* 7(6):803-10, 1983.
- Gaskell, M.; McLuckie, K.I.E.; Farmer, P.B. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone in the *supF* forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity. *Mutation Research.* 554: 387-398, 2004.
- Gaskell, M.; McLuckie, K.I.E.; Farmer, P.B. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone. *Chemico-Biological Interactions.* 153-154: 267-270, 2005.
- Gill, D.P.; Jenkins, V.R.; Kempen, R.R.; Ellis, S. The importance of pluripotential stem cells in benzene toxicity. *Toxicology.* 16(2):163-71, 1980.
- Gilli, G.; Scursatone, E.; Bono, R.; *Environ. Health Perspect.* 104, 1137, 1996.
- Godard, P.; Chaintreuil, J.; Damon, M.; Coupe, M.; Flandre, O.; Crastes de Paulet, A.; Michel, F.B. Functional assessment of alveolar macrophages: comparison of cells from asthmatics and normal subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* 70: 88-95, 1982.
- Gralewics, S. Organic solvents and time-dependent sensitization. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 12(4):371-81, 1999.
- Granger, D.N.; Kubes, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 55 (5), 662-675, 1994.
- Green, J.D.; Snyder, C.A.; Lo Bue, J.; Goldstein, B.D.; Albert, R.E. Acute and chronic dose/response effects of inhaled benzene on multipotential hematopoietic stem (CFU-S) and granulocyte/macrophage progenitor (GM-CFU-C) cells in CD-1 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 58(3):492-503, 1981.
- Harlan, J.M. Leukocyte-endothelial interactions. *Blood.* 65(3):513-25, 1985.
- Hashimoto, I.; Kodama, J.; Seki, N.; Hongo, A.; Miyagi, Y.; Yoshinouchi, M.; Kudo, T. Macrophage infiltration and angiogenesis in endometrial cancer. *Anticancer Res.* v. 20, p. 4853-4856, 2000.
- Hashimoto, S.; Suzuki, T.; Dong, H.Y.; Nagai, S.; Yamazaki, N.; Matsushima, K. Serial analysis of gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, v. 94, p. 845-852, 1999.
- Hayes, R.B.; Songnian, Y.; Dosemeci, M.; Linet, M. Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Industrial Medicine.* 10: 117-126, 2001.
- Hayes, R.B.; Yin, S.N.; Dosemeci, M.; Li, G.L.; Wacholder, S.; Chow, W.H.; Roth, N.; Wang, Y.Z.; Dai, T.R.; Chao, X.J.; Jiang, Z.L.; Y, P.Z.; Zhao, H.B.; Kou, Q.R.; Zang, W.Y.; Meng, J.F.; Zho, J.S.; Ding, C.Y.; Zhang, Z.N.; Li Travis, L.B.; Blot, W.J.; Linet, M.S. Mortality among benzene-exposed workers in China. *Environ Health Perspect.* 104 (6): 1359-52, 1996.
- Hayes, R.B.; Yin, S.N.; Dosemeci, M.; Li, G.L.; Wacholder, S.; Travis, L.B.; Li, C.Y.; Rothman, N.; Hoover, R.N. Linet, M.S. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--

- National Cancer Institute Benzene Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1065-71, 1997.
- Hazel, B.A.; Baum, C.; Kalf, G.F. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts. *Stem Cells*. 14(6):730-42, 1996.
- Hedli, C.C.; Rao, N.R.; Reuhl, K.R.; Witmer, C.M.; Snyder, R. Effects of benzene metabolite treatment on granulocytic differentiation and DNA adduct formation in HL-60 cells. *Arch. Toxicol*. 70: 135-144, 1996.
- Henderson, A.P.; Barnes, M.L.; Bleasdale, C.; Cameron, R.; Clegg, W.; Heath, S.L.; Lindstrom, A.B.; Rappaport, S.M.; Waidyanatha, S.; Watson, W.P.; Golding, B.T. Reactions of benzene oxide with thiols including glutathione. *Chem Res Toxicol*, 18, 265-270, 2005.
- Henschler, R.; Glatt, H.R.; Heyworth, C.M. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro and in vivo. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1271-1274, 1996.
- Hoffmann, J.H.; Sungchul, J.; Hedli, C.C.; Snyder, R. Metabolism of [¹⁴C]phenol in the isolated perfused mouse liver. *Toxicological Sciences*. 49: 40-47, 1999.
- Hsieh, G.C.; Sharma, R.P.; Parker, R.D.; Coulombe, R.A. Jr. Immunological and neurobiochemical alterations induced by repeated oral exposure of phenol in mice. *Eur J Pharmacol*. 228(2-3):107-14, 1992.
- Huffman, L.J.; Prugh, D.J.; Brumbaugh, K.; Ding, M. Influence of hyperthyroidism on rat lung cytokine production and nuclear factor- κ B activation following ozone exposure. *Inhalation Toxicology*, 14:1161-1174, 2002.
- Husain, A.N.; Kumar, V. The lung. In: Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. (ed.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th. Elsevier. 47-86, 2005.
- Hussain, N.; Wu, F.; Zhu, L.; Thrall, R.S.; Kresch, M.J. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of acid-induced acute lung injury in the rat. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 19(6): 867-74, 1998.
- IARC, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 1987.
- IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Some Industrial Chemicals and Dyestuffs*. World Health Organization International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 1982.
- Ibuki, Y.; Goto, R. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1690: 11-21, 2004.
- Inayat-Hussain, S.H.; Ross, D. Intrinsic pathway of hydroquinone induced apoptosis occurs via both caspase-dependent and caspase-independent mechanism. *Chem. Res. Toxicol*. 18: 420-427, 2005.
- Inayat-Hussain, S.H.; Wink, S.L.; Ross, D. Differential involvement of caspases in hydroquinone-induced apoptosis in human leukemic HL-60 and Jurkat cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 175: 95-103, 2001.

- IPCS. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 157. *Hydroquinone*. 1994a. (URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm>. Acesso: 16 dez. 2005).
- IPCS. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 161. *Phenol*. 1994b. (URL: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc161.htm#PartNumber:7>. Acesso: 16 dez. 2005).
- Irons, R.D., Dent, J.G., Baker, T.S., Rickert, D.E. Benzene is metabolized and covalently bound in bone marrow in situ. *Chem Biol Interact*. 30(2):241-5, 1980.
- Javelaud, B.; Vian, L.; Molle, R.; Allain, P.; Allemand, B.; Andre, B.; Barbier Churet, A.M.; Dupuis, J.; Galand, M.; Millet, F.; Talmon, J.; Touron, C.; Vaiss, M.; Vechambre, D.; Vieules, M.; Viver, D. Benzene exposure in car mechanics and road tanker drivers. *Int. Arch. Occup. Environ Health* 71(4):277-88, 1998.
- Johansson, A-K.; Sergejeva, S.; Sjöstrand, M.; Lee, J.J.; Lötvall, J. Allergen-induced traffic of bone marrow eosinophils, neutrophils and lymphocytes to airways. *Eur. J. Immunol*. 34: 3135-3145, 2004.
- Jung, U.; Norman, K.E.; Scharffetter-Kochanek, K.; Beaudet, A.L.; Ley, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *J Clin Invest*, v. 102, p. 1526-1533, 1998.
- Kalf, G.F. Utility of a mouse model for studying the effects of benzene on the myeloid lineage: effects of hydroquinone on a model myeloid system. *J Toxicol Environ Health A*. 61(5-6): 399- 411, 2000.
- Kalf, G.F.; Renz, J.F.; Niculescu, R. *p*-Benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1 alpha and -1 beta to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, and interleukin-1 beta converting enzyme. *Environ Health Perspect*. 104 Suppl 6:1251-6, 1996.
- Kerzic, P.J.; Pyatt, D.W.; Zheng J.H.; Gross, A.S.; Le, A.; Irons, R.D. Inhibition of NF-kappa B by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Toxicology*, 187:127-37, 2003.
- Kevil, C.G. Endothelial cell activation in inflammation: lessons from mutant mouse models. *Pathophysiol*, v. 9, p. 63-74, 2003.
- Kim, E.; Kang, B.Y.; Kim, T.S. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor-kappaB binding activity. *Immunol Lett*. 99(1):24-9, 2005a.
- Kim, S.; Vermeulen, R.; Waidyanatha, S.; Johnson, B.A.; Lan, Q.; Rothman, N.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Li, G.; Shen, M.; Yin, S.; Rappaport, S.M. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis Advance*. 8: 2005b.
- Kolachana, P.; Subrahmanyam, V.V.; Meyer, K.B.; Zhang, L.; Smith, M.T. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo*. *Cancer Res*. 53: 1023-6, 1993.
- Kubes, P.; Kerfoot, S.M. Leukocyte recruitment in the microcirculation – the rolling paradigm revisited. *News Physiol. Sci*. 16: 76-80, 2001.

- Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. *Acute and chronic inflammation*. In: Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. (ed.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th. Elsevier. 47-86, 2005.
- Lain, K.Y.; Luppi, P.; McGonigal, S.; Roberts, J.M.; Deloia, J.A. Intracellular Adhesion Molecule Concentrations in Women Who Smoke During Pregnancy. *Obstet Gynecol*. 107(3):588-594, 2006.
- Lan, Q.; Zhang, L.; Li, G.; Vermeulen, R.; Weinberg, R.S.; Dosemeci, M.; Rappaport, S.M.; Shen, M.; Alter, B.P.; Wu, Y.; Kopp, W.; Waidyanatha, S.; Rabkin, C.; Guo, W.; Chanock, S.; Hayes, R.B.; Linet, M.; Kim, S.; Yin, S.; Rothman, N. Smith, M.T. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*, 306, 1774-6, 2004.
- Lan, Q.; Zhang, L.; Shen, M.; Smith, M.T.; Li, G.; Vermeulen, R.; Rappaport, S.M.; Forrest, M.S.; Hayes, R.B.; Linet, M.; Dosemeci, M.; Alter, B.P.; Weinberg, R.S.; Yin, S.; Yeager, M.; Welch, R.; Waidyanatha, S.; Kim, S.; Chanock, S.; Rothman, N. Polymorphisms in cytokine and cellular adhesion molecule genes and susceptibility to hematotoxicity among workers exposed to benzene. *Cancer Research*. 65, 9574-9581, 2005.
- Laskin, D.L.; MacEachern, L.; Snyder, R. Activation of bone marrow phagocytes following benzene treatment of mice. *Environ Health Perspect*. 82: 75-9, 1989.
- Lau, D.; Molinay, H.; Eiserich, J.P.; Freeman, B.A.; Daiber, A.; Gehling, U.M.; Brümer, J.; Rudolph, V.; Münzel, T.; Heitzer, T.; Baldus, S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *PNAS*. 102 (5), 431-436, 2005.
- Lebedeva, T.; Dustin, M.L.; Sykulev, Y. ICAM-1 co-stimulates target cell to facilitate antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 17: 251-258, 2005.
- Lee, M.H.; Chung, S.W.; Kang, B.Y.; Kim, K.M.; Kim, T.S. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4+ T cells and increases immunoglobulin E levels in antigen-primed mice. *Immunology*. 106(4):496-502, 2002.
- Ley, K.; Kansas, G.S. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Rev*. 4:1-11, 2004.
- Li, N.; Hallden, G.; Hjerdahl, P. A whole-blood flow cytometric assay for leukocyte Cd11b expression using fluorescence signal triggering. *Eur. J. Haem*. 65: 57-65, 2000.
- Li, Q.; Aubrey, M.T.; Christian, T.; Freed, B.M. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundam Appl Toxicol*. 38(2):158-65, 1997.
- Li, Q.; Geiseltart, L.; Mittler, J.N.; Mudzinski, S.P.; Lawrence, D.A.; Freed, B.M. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol Appl Pharmacol*. 139(2):317-23, 1996.
- Lindstrom, A.B.; Yeowell-O'Connell, K.; Waidyanatha, S.; McDonald, T.A.; Rappaport, S.M. Investigation of benzene oxide in bone marrow and other tissues of F344 rats following metabolism of benzene in vitro and in vivo. *Chem Biol Interact*, 122: 41-58, 1999.

- Linnet, M.S.; Yin, S.N.; Travis, L.B.; Li, C.Y.; Zang, Z.N.; Li, D.G.; Rothman, N.; Li, G.L.; Chow, W.H.; Donaldson, J.; Dosemeci, M.; Wacholder, S.; Blot, W.J.; Hayes, R.B. Clinical features of hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Environ. Health Perspect.* 114 (Suppl 6): 1353-64, 1996.
- Lorenzi, T. *Manual de hematologia – propedêutica e clínica*. 2.ed. São Paulo: MEDSI, 1999.
- Lourenço, E.L.B. *Efeitos dos tratamentos crônicos com produtos de biotransformação do benzeno sobre a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares na vigência de resposta inflamatória*, 2005 [Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo]. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 82pp.
- Lovern, M.R.; Cole, C.E.; Schlosser, P.M. A review of quantitative studies of benzene metabolism. *Critical Reviews in Toxicology.* 31(3):285-311, 2001.
- Lovern, M.R.; Turner, M.J.; Meyer, M.; Kedderis, G.L.; Bechtold, W.E.; Schlosser, P.M. Identification of benzene oxide as a product of benzene metabolism by mouse, rat, and human liver microsomes. *Carcinogenesis.* 18(9):1695-700, 1997.
- MacEachern, L.; Snyder, R.; Laskin, D.L. Alterations in the morphology and functional activity of bone marrow phagocytes following benzene treatment in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 117(2): 147-54, 1992.
- Macedo, S.M.D.; Lourenço, E.L.B.; Borelli, P.; Fock, R.A.; Ferreira Jr, J.M.; Farsky, S.H.P. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology.* 220: 126-135, 2006.
- Macedo, S.M.D.; Vaz, S.C.M.; Lourenço, E.L.B.; Glória de Souza, M. da; Cavriani, G.; Ligeiro-Oliveira, A.P.; Almeida, S.R.; Tavares de Lima, W.; Farsky, S.H.P. *In vivo* hydroquinone exposure inhibits leukocyte migration during an allergic lung inflammation in rats. *Toxicology Letters.* 2006. (Submitted)
- Maestrelli, P.; Seatta, M.; Di Stefano, A. Comparison of leukocyte counts in sputum, bronchial biopsies and bronchoalveolar lavage. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152: 1926, 1995.
- Marrubini, G.; Castoldi, A.F.; Coccini, T.; Manzo, L. Prolonged ethanol ingestion enhances benzene myelotoxicity and lowers urinary concentration of benzene metabolite levels in CD-1 male mice. *Toxicological Sciences.* 75: 16-24, 2003.
- McCue, J.M.; Lazis, S.; John Cohen, J.; Modiano, J.F.; Freed, B.M. Hydroquinone and catechol interfere with T-cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.* 39 (16), 995–1001, 2003.
- Medinsky, M.A.; Kenyon, E.M.; Schlosser, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. *Toxicology* 105(2-3): 225-233, 1995.
- Melikian, A.A.; Qu, Q.; Shore, R.; Li, G.; Li, H.; Jin, X.; Cohen, B.; Chen, L.; Li, Y.; Yin, S.; Mu, R.; Zhang, X. Wang, Y. Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 778, 211-21, 2002.
- Meredith, J.E.; Schwartz, M.A. Integrins, adhesion and apoptosis. *Cell Biology.* 7: 146-150, 1997.

- Miller, A.C.; Schattenberg, D.G.; Malkinson, A.M.; Ross, D. Decreased content of the IL-1 alpha processing calpain murine bone marrow-derived macrophages after treatment with benzene metabolite hidroquinone. *Toxicol. Lett* 74(2): 177-84, 1994.
- Miranda, C.R.; Dias, C.R.; Oliveira, L.C.C.; Pena, P.G.L. Exposição ocupacional ao benzeno em trabalhadores do complexo petroquímico de Camaçari, Bahia. *Rev. Bras. Saúde Ocupacional*. 24, 87-91, 1997.
- Moran, J.L.; Siegel, D.; Sun, X.M.; Ross, D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol. Pharmacol.* 50 (3), 610-615, 1996.
- Mota, I.; Wong, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic of mouse antiserum during the course of immunization. *Life Sci.* 8:813-20, 1969.
- Muller, M.; Sung, K.L.; Muller, W.A.; Cho, J.Y.; Roman, M.; Castaneda, D.; Nayar, J.; Condon, T.; Kim, J.; Sriramaraio, P.; Broide, D.H. Eosinophil tissue recruitment to sites of allergic inflammation in the lung is platelet endothelial cell adhesion molecule independent. *J Immunol.* 167(4):2292-7, 2001.
- Muller, W.A. Leukocyte-endothelial cell interaction in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24(6):326-333, 2003.
- Nedelcheva, V.; Gut, I.; Soucek, P.; Tichavska, B.; Tynkova, L.; Mraz, J.; Guengerich, F.P.; Ingelman-Sundberg, M. Metabolism of benzene in human liver microsomes: individual variations in relation to CYP2E1 expression. *Arch Toxicol.* 73(1):33-40, 1999.
- Niculescu, R.; Bradford, H.N.; Colman, R.W.; Kalf, G.F. Inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 alpha and 1 beta to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. *Chem Biol Interact.* 22;98(3):211-22, 1995.
- Niculescu, R.; Renz, J.F.; Kalf, G.F. Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1alpha and -1beta to active cytokines by hidroquinone, a biological reactive metabolite of benzene. *Adv Exp Med Biol.* 1996;387:329-37, 1996.
- Nietert, P.J.; Silver, R.M. Systemic sclerosis: environmental and occupational risk factor. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12(6):520-6, 2000.
- Noulin, N.; Quesniaux, V.F.; Schnyder-Candrian, S.; Schnyder, B.; Maillet, I.; Robert, T.; Vargaftig, B.B.; Ryffel, B.; Couillin, I. Both hemopoietic and resident cells are required for MyD88-dependent pulmonary inflammatory response to inhaled endotoxin. *J Immunol.* 15;175(10):6861-9, 2005.
- Ong, C.N.; Kok, P.W.; Ong, H.Y.; Shi, C.Y.; Lee, B.L.; Phoon, W.H.; Tan, K.T. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. *Occup. Environ. Med.* 53(5):328-333, 1996.
- Palmer, R.M.; Stapleton, J.A.; Sutherland, G.; Coward, P.Y.; Wilson, R.F.; Scott, D.A. Effect of nicotine replacement and quitting smoking on circulating adhesion molecule profiles (sICAM-1, sCD44v5, sCD44v6). *Eur J Clin Invest.* 32(11): 852-7, 2002.
- Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. In: Klassen, C.D. (ed). *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 6.ed. McGraw-Hill, 2001.
- Patlar, S.; Slade, D.; Kirkpatrick, U.; McCollum, C.N. Smoking causes a dose-dependent increase in granulocyte-bound L-selectin. *Thromb Res.* 106(1):1-6, 2002.

- Poirier, M.; Fournier, M.; Brousseau, P.; Morin, A. Effects of Volatile Aromatics, Aldehydes, and Phenols in Tobacco Smoke on Viability and Proliferation of Mouse Lymphocytes. *J Toxicol Environ Health A*. 65 (9): 1437 - 1451, 2002.
- Popper, H.H.; Pailer, S.; Wurzinger, G. Expression of adhesion molecules in allergic lung disease. *Virchows Arch*. 440: 172-180, 2000.
- Punjabi, C.J.; Laskin, J.D.; Hwang, S; MacEachern L; Laskin, D.L. Enhanced production of nitric oxide by bone marrow cells and increased sensitivity to macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF after benzene treatment of mice. *Blood*. 83:3255-63, 1994.
- Pyatt, D.W.; Stillman, W.S.; Irons, R.D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 149 (2), 178-184, 1998.
- Pyatt, D.W.; Yang, Y.; Stillman, W.S.; Cano, L.L.; Irons, R.D. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NFkappaB in primary human CD19+ B lymphocytes. *Cell Biol. Toxicol*. 16 (1), 41-51. 155-210, 2000.
- Qu, Q.; Melikian, A.A.; Li, G.; Shore, R.; Chen, L.; Cohen, B.; Yin, S.; Kagan, M.R.; Li, H.; Meng, M.; Jin, X.; Winnik, W.; Li, Y.; Mu, R. Li, K. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites. *Am J Ind Med*, 37, 522-31, 2000.
- Rampart, M. Neutrophil-endothelial cell interactions. In: Brain, S.D. (ed) *The Handbook of Immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation*. Ed., San Diego, Academic Press: 77-107, 1994.
- Rana, S.V.S.; Verma, Y. Biochemical toxicity of benzene. *Journal of Environmental Biology*. 26(2): 157-68, 2005.
- Rappaport, S.M.; Waidyanatha, S.; Qu, Q.; Shore, R.; Jin, X.; Cohen, B.; Chen, L.C.; Melikian, A.A.; Li, G.; Yin, S.; Yan, H.; Xu, B.; Mu, R.; Li, Y.; Zhang, X. Li, K. Albumin adducts of benzene oxide and 1,4-benzoquinone as measures of human benzene metabolism. *Cancer Res*, 62, 1330-7, 2002.
- Ridger, V.C.; Wagner, B.E.; Wallace, W.A.H.; Hellewell, P.G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J. Immunol*. 166: 3484-3490, 2001.
- Rithidech, K.; Dunn, J.J.; Bond, V. P.; Gordon, C. R.; Cronkite, E.P. Characterization of genetic instability in radiation- and benzene-induced murine acute leukemia. *Mutation Research*. 428: 33-39, 1999.
- Rivedal, E.; Witz, G.. Metabolites of benzene are potent inhibitors of gap-junction intercellular communication. *Archives of Toxicology*. 2005.
- Robinson, S.N.; Shah, R.; Wong, B.A.; Wong, V.A.; Farris, G.M. Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology*. 119:227-37, 1997.
- Rocca, B.; Secchiero, P.; Ciabattini, G.; Ranelletti, F.O.; Catani, L.; Guidotti, L.; Melloni, E.; Maggiano, N.; Zauli, G.; Patrono, C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7634-7639, 2002.
- Roessler, S.; Grosschedl, R. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin Immunol*. 18(1):12-9, 2006.

Ross, D.; Beall, H.; Traver, R.D.; Siegel, D.; Philips, R.M.; Gibson, N.W. Bioactivation of quinones by DT-diaphorases, molecular, biochemical, and chemical studies. *Oncol. Res.* 6:493-500, 1994.

Ross, D.; Siegel, D.; Schettenberg, D.G.; Xiaoming, M.S.; Moran, J.L. Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role of modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ. Health Perspect.* 104:1177-82, 1996.

Rothman, N.; Li, G.L.; Dosemeci, M.; Bechtold, W.E.; Marti, G.E.; Wang, Y.Z.; Linet, M.; Xi, L.Q.; Lu, W.; Smith, M.T.; Titenko-Holland, N.; Zhang, L.P.; Blot, W.; Yin, S.N.; Hayes, R.B. Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am. J. Ind. Med.* 23(3): 225-6, 1996b.

Rothman, N.; Smith, T.H.; Hayes, R.B.; Li, G.L.; Irons, R.D.; Dosemeci, M.; Haa Stillman, W.S.; Linet, M.; Xi, L.Q.; Bechtold, W.E.; Wiemels, J.; Campleman, S.; Zhang, L.; Quintana, P.J.; Titenko-Holland, N.; Wang, Y.Z.; Lu, W.; Kolachav Meyer, K.B.; Yin, S. An epidemiological study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ Health Perspect.* 104 (6): 1365-70, 1996a.

Ruiz-Ramos, R.; Cebrian, M.E.; Garrido, E. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology.* 209: 279-287, 2005.

Ryan, B.M.; Selby, R.; Gingell, R.; Waechter Jr, J.M.; Butala, J.H.; Dimond, S. S.; Dunn, B. J.; House, R.; Morrissey, R. Two-Generation Reproduction Study and Immunotoxicity Screen in Rats Dosed with Phenol via the Drinking Water. *International Journal of Toxicology.* 20 (3), 121 – 142, 2001.

Savitz, D.A.; Andrews, K.W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Ind Med*, 31, 287-95, 1997.

Scherer, G.; Ruppert, T.; Daube, H.; Kossien, I.; Riedel, K.; Tricker, A.R.; Adlkofer, F. *Environ. Int.*, 21, 779, 1995.

Sheets, P.L.; Carlson, G.P. Kinetic factors involved in the metabolism of benzene in mouse lung and liver. *Journal of Toxicology and Environmental Health A.* 67 (5): 421-430, 2004.

Sheets, P.L.; Yost, G.L.; Carlson, G.P. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *Biochem Mol Toxicol.* 18:92-99, 2004

Shen, J.; Wang, R.T.; Xu, Y.C.; Wang, L.W.; Wang, X.R. Interaction models of CYP1A1, GSTM1 polymorphisms and tobacco smoking in intestinal gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 14;11(38):6056-60, 2005.

Shen, Y.; Shen, H.M.; Shi, C.Y.; Ong, C.N. Benzene metabolites enhance reactive species generation in HL60 human leukemia cells. *Human Exp. Toxicol.* 15 (5): 422-7, 1996.

Siegel, D.; Gustafson, D.L.; Dehn, D.L.; Han, J.Y.; Boonchoong, P.; Berliner, L.J.; Ross, D. NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1: role as a superoxide scavenger. *Molecular Pharmacology.* 65 (5): 1238–1247, 2004.

Silva, M.C.; Gaspar, J.; Silva, I D.; Leão, D.; Rueff, J. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells. *Mutagenesis.* 18 (6): 491-496. 2003.

- Smalley, D.M.; Ley, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.* 9(2): 255-266, 2005.
- Smith, M.T.; Zhang, L.; Jeng, M.; Wang, Y.; Guo, W.; Duramad, P.; Hubbard, A.E.; Hofstadler, G.; Holland, N.T. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneuploidy of Chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis* 21 (8), 1485–1490, 2000.
- Smith, M.T.; Robertson, M.L.; Yager, J.W.; Eastmond, D.A. Role of metabolism in benzene-induced myelotoxicity and leukemogenesis. *Prog. Clin. Biol. Res.* 340B:125-136, 1990.
- Snyder, C.A.; Goldstein, B.D.; Sellakumar, A.R.; Bromberg, I.; Laskin, S.; Albert, R.E. The inhalation toxicology of benzene: incidence of hematopoietic neoplasms and hematotoxicity in AKR/J and C57BL/6J mice. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 54:323-31, 1980.
- Snyder, R. Benzene and leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.* 32: 155-210, 2002.
- Snyder, R. Recent developments in the understanding of benzene toxicity and leukemogenesis. *Drug Chem Toxicol*, 23, 13-25, 2000a.
- Snyder, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metabolism Reviews.* 36 (3,4): 531-547, 2004.
- Snyder, R.; Hedli, C.C. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 6, 1165-71, 1996.
- Sun, J.D.; Medinsky, M.A.; Birnbaum, L.S. Benzene hemoglobin adducts in mice and rats: characterization of formation and physiological modeling. *Fundam Appl Toxicol.* 15:468-75, 1990.
- Suzuki, Y.; Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Ruperez, M.; Esteban, V.; Egido, J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 881-900, 2003.
- Swaen, G.M.H.; Scheffers, T.; Cock, J.D.; Slangen, J.; Drooge, H. Leukemia risk in caprolactam workers exposed to benzene. *Ann Epidemiol.* 2004 (in press)
- Tan, P.; Lusinskas, F.W.; Homer-Vanniasinkam, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 17 p. 373-389, 1999.
- Tavares de Lima, W.; Silva, Z.L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. *Gen. Pharmac.* 30(5): 689-95, 1998.
- Tavares de Lima, W.; Steil, A.A.; Russo, M.; Starobinas, N.; Teixeira, C.F.; Jancar, S. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 358(1): 69-75, 1998.
- Taysse, L.; Troutaud, D.; Khan, N.A.; Deschaux, P. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology.* 12;98(1-3):207-14, 1995.
- Thomas, D.J.; Sadler, A.; Subrahmanyam, V.; Siegel, D.; Reasor, M.J.; Wierda, D.; Ross, D. Bone marrow stromal cell bioactivation and detoxification of the benzene metabolite hydroquinone: comparison of macrophages of fibroblasts cells. *Mol. Pharmacol.* 37:255-62, 1990.

- Thomas, M.D.; Srivastava, B.; Allman, D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 239(2):92-102, 2006.
- Tomioka, M.; Ida, S.; Shindoh, Y.; Ishihara, T.; Takishima, T. Mast cell in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 1000-1005, 1984.
- Tracey, K.J. The inflammatory reflex. *Nature.* 420: 853-59, 2002.
- van Eeden, S.F.; Klut, M.E.; Walker, B.A.M.; Hogg, J.C. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Meth.* 232:23-43, 1999.
- Velasco-Lezama, R.; Barrera Escorcía, E.; Muñoz Torres, A.; Tapia Aguila Gonzalez Ramires, C.; García Lorenzana, M.; Ortiz Monroy, V.; Brtancou Rule, M. A model for induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice. *Toxicology.* 162(3):179-91, 2001.
- Vestweber, D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol.* 190:281-91, 2000.
- Vestweber, D.; Blanks, J.E. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological Rev.* 79(1): 181-213, 1999.
- von Adrian, U.H.; Mackay, C.R. T-cell function and migration – two side of the same coin. *New England Journal of Medicine.* 343 (14): 1020-34, 2000.
- Waidyanatha, S.; Rothman, N.; Fustinoni, S.; Smith, M.T.; Hayes, R.B.; Bechtold, W.; Dosemeci, M.; Guilan, L.; Yin, S. Rappaport, S.M. Urinary benzene as a biomarkers of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis*, 22, 279-86, 2001.
- Walzog, B.; Scharffetter-Kochanek, K.; Gaehtgens, P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol*, v. 276, p. 1125-1130, 1999.
- Wan, J.; Badham, H.J.; Winn, L. The role of c-MYB in benzene-initiated toxicity. *Chemico-Biological Interactions.* 153–154: 171–78, 2005.
- Wang, Q.; Doerschuk, C.M. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxidants & Redox Signaling.* 4:39-47, 2002.
- Wardlaw, A.J.; Bradding, P.; Pavord, I.D.; Brightling, C.E. Mast cell localization within the airway smooth muscle: relationship to airway hyperresponsiveness and other asthma phenotypes. *Clin Exp All Rev.* 4:111–117, 2004.
- Webb, D.C.; McKenzie, A.N.J.; Koskinen, A.M.L.; Yang, M.; Mattes, J.; Foster, P.S. Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity. *Journal of Immunology.* 165: 108–113, 2000.
- WHO. Environmental Health Criteria 150. *Benzene*. IPCS. WHO, Geneva, 1993.
- Wiedle, G.; Dunon, D.; Imhof, B.A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38(1):1-31, 2001.
- Worthylake, R.A.; Burridge, K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(5): 569-77, 2001.
- Yaneva, S.; Zlatev, Z.; Totcheva, T. Hematological changes in sailors from chemical cargo tankers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71(Suppl): S50-4, 1998.

- Yeowell-O'Connell, K.; Rothman, N.; Waidyanatha, S.; Smith, M.T.; Hayes, R.B.; Li, G.; Bechtold, W.E.; Dosemeci, M.; Zhang, L.; Yin, S. Rappaport, S.M. Protein adducts of 1,4-benzoquinone and benzene oxide among smokers and nonsmokers exposed to benzene in China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 831-8, 2001.
- Yin, S.N.; Hayes, R.B.; Linet, M.S.; Li, G.L.; Dosemeci, M.; Travis, L.B.; Zhang, D.G.; Chow, W.H.; Wacholder, S.; Blot, W.J. An expanded cohort study of cancer among benzene- exposed workers in China. Benzene Study Group. *Environ Health Perspect.* 104 (6): 1339-4, 1996.
- Yoon, B.-II.; Hirabayashi, Y.; Kawasaki, Y.; Kodama, Y.; Kaneko, T.; Kanno, J.; Kim, D. Y.; Inoue, T. Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hematopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp. Hematol.* 29: 278-285, 2001.
- Yoon, B.-II.; Hirabayashi, Y.; Kawasaki, Y.; Kodama, Y.; Kaneko, T.; Kanno, J.; Kim, D.-Y.; Fuji-Kuriyama, Y.; Inoue, T. Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. *Toxicological Sciences.* 70: 150-156, 2002.
- Zhang, L.; Eastmond, D.A.; Smith, M.T. The nature of chromosomal aberrations detected in humans exposed to benzene.. *Crit Rev Toxicol.* 32(1):1-42, 2002.
- Zhang, L.; Rothman, N.; Wang, Y.; Hayes, R.B.; Yin, S.; Titenko-Holland, N.; Dosemeci, M.; Wang, Y.Z.; Kolachana, P.; Lu, W.; Xi, L.; Li, G.L.; Smith, M.T. Benzene increases aneuploidy in the lymphocytes of exposed workers: a comparison of data obtained by fluorescence *in situ* hybridization in interphase and metaphase cells. *Environ Mol Mutagen.* 34(4):260-8, 1999.
- Zhang, L.; Wang, Y.; Shang, N.; Smith, M.T. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leukemia Research.* 22(2): 105-113, 1998.
- Zheng, J.H.; Pyatt, D.W.; Gross, S.A.; Le, A.T.; Kerzic, P.J.; Irons, R.D. Hydroquinone modulates the GM-CSF signaling pathway in TF-1 cells. *Leukemia.* 18(7):1296-304, 2004.

Anexo 1

Informações para os Membros de Banca Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Anexo 2
Comissão de Ética em Experimentação Animal

**Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**

(Ofício CEEA n. 53/2005 – Protocolo 65)

OLIVEIRA nº 28, 2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Data:	09/10/2005	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Lilacs:	724	Comissão de Ética em Experimentação Animal
Dedalus:	1516329	
MFN:	27902	
Terminal:	OK	

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos da exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a mobilização e função leucocitária, estudos in vivo e ex vivo” (Protocolo CEEA nº65), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Alexandre Ferreira e do orientador(a) Sandra Helena Poliselli Farsky, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 16/05/2005.

São Paulo, 10 de outubro de 2005.

*Prof.ª Dr.ª Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA*