UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TOXICOLOGIA E ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

# EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* À HIDROQUINONA SOBRE FUNÇÕES DO TECIDO TRAQUEAL E DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAMUNDONGOS

Ana Lucia Borges Shimada

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

**Orientador:** 

Prof. Dr. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo 2011 Ana Lucia Borges Shimada

# EFEITOS DA EXPOSIÇÃO *IN VIVO* À HIDROQUINONA SOBRE FUNÇÕES DO TECIDO TRAQUEAL E DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAMUNDONGOS

**Comissão Julgadora** 

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dra. Sandra Farsky

Orientadora/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

#### Agradecimentos

À minha família, meus pais Jorge Shimada e Dagmar Borges Shimada e às minhas irmãs Ana Paula e Ana Flávia pelo apoio incondicional, carinho, incentivo e presença em todos os momentos, sou extremamente grata a vocês;

À minha orientadora, Profa. Dra. Sandra Farsky, pela oportunidade cedida ao me permitir desenvolver este trabalho em seu laboratório, pela confiança em mim depositada e pelo esforço, orientação e dedicação para que fosse possível a conclusão do mesmo, muito obrigada;

#### Aos amigos,

Rodrigo Dias, Lara Lombardi, Natália Guimarães e Tiago Oliveira pelo companheirismo e bons momentos vividos em São Paulo;

André Ribeiro, Cristina Hebeda, Simone Bolonheis e André Nakasato por estarem sempre dispostos a me auxiliar na parte experimental deste trabalho, pela compreensão e ensinamentos;

Camila Araújo, Arícia Horácio, Gabriela Muller, Gabriela Borracha, Marcela, Carine Drewes, Isabel Machado, José Roberto Santin, Camila Lima e André Shimoyama, do Laboratório de Toxicologia Experimental, pela convivência durante o desenvolvimento deste projeto;

Dra. Paula Nishiyama, Dr. Miguel Machinski Jr. e Dra. Simone Mossini, professores da UEM, por acolher-me no Lab. de Toxicologia durante os 5 anos de graduação e me incentivarem na vinda à SP;

Patrícia de Souza Bonfim, Letícia Dias de Melo, Maria Graciela Iecher Faria, Elisiane Coan Boian, Cássia Paixão, Luciana Vignatti, Sabrina Ferreira e Franciele Martins, farmacêuticas da UEM, e Luciana Asami, pela amizade ao longo destes anos; Aos colaboradores,

Professor Dr. Wothan Tavares de Lima e seus alunos, principalmente à Dra. Adriana Lino dos Santos Franco, pela ajuda nos ensaios de reatividade da traquéia, pela disponibilidade e atenção sempre oferecida;

Dra. Silvana Sandri pela ajuda sempre que necessária principalmente nos ensaios com macrófagos e de Western Blot;

Alunos do Laboratório de Micologia, pela ajuda com o cultivo do fungo;

Professores e colegas da Toxicologia, professores Dr. Ernani Pinto Jr., Dr. Mauricio Yonamine, Dra. Ana Paula de Melo Loureiro, Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, Dra. Tania Marcourakis e Dra. Regina Lúcia De Moraes Moreau, e aos funcionários Ângelo, Luzia, Dalva, Sueli, Nancy, Elaine e Jorge;

Fundacentro, em nome de Walter dos Reis Pereira Filho e Alcinéa Meigikos dos Anjos Santos, pelo auxílio na quantificação de HQ no protocolo experimental escolhido para este trabalho;

Ao Biotério de Criação e Experimentação Animal da FCF/IQ por fornecer os animais utilizados neste trabalho;

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Ciências Farmacêuticas por acolher-me como aluna de pós-graduação;

À FAPESP por conceder a bolsa de mestrado (03964-5/09) e financiar o projeto (55382-7/08);

A todos que diretamente ou indiretamente participaram e me auxiliaram na elaboração deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

#### Resumo

A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico de origem natural ou antropogênica, encontrada em grandes concentrações no cigarro, além de ser produto da biotransformação do benzeno. Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a exposição à HQ compromete a resposta inflamatória in vivo. Dando continuidade a estas investigações, este trabalho visou investigar os efeitos da exposição in vivo à HQ sobre funções do tecido traqueal e atividades de macrófagos alveolares. Para tanto, camundongos Swiss machos foram expostos à HQ 25ppm (1,5mg/60mL/1h; 5 dias) ou veículo (solução salina etanol 1:20) por via sistêmica (nebulização). Concentrações de mediadores inflamatórios (interleucina (IL)  $1\beta$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-12 fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1); ensaio imunoenzimático (ELISA) e óxido nítrico (NO; reação de Griess) foram quantificados no lavado bronco-alveolar (LBA) em condições basais ou 3 horas após estímulo inflamatório (LPS in vivo; 100µL/mL; 10min) e no sobrenadante de macrófagos  $(M\Phi s)$  alveolares ou de cultura da traquéia obtidos dos animais e posteriormente estimulados in vitro (M $\Phi$ s: 5µg/mL de LPS + 10ng/mL de IFN- $\gamma$ ; traquéia: 1µg/mL de LPS; 24h). Atividades fagocítica e fungicida (microscopia óptica) e a expressão de receptores envolvidos na fagocitose toll-like receptor (TLR, TLR-2, TLR4 e dectina-1; citometria de fluxo) foram determinadas após incubação in vitro de M $\Phi$ s alveolares com o fungo Candida albicans e a expressão protéica de MyD88 foi realizada em M $\Phi$ s alveolares (western blot). Quantificação do RNAm para MCP-1 (reação da transcriptase reversa em cadeia de polimerase, RT-PCR) foi realizada em tecido traqueal e células de linhagem monocítica humana THP-1 foram empregadas em ensaios de quimiotaxia in vitro (Câmara de Boyden) frente a diferentes concentrações de MCP-1. Reatividade do tecido traqueal foi quantificada frente à metacolina. Os resultados obtidos mostraram que a exposição in vivo à HQ reduziu a concentração de MCP-1 (54,98% vs. controle LPS) e IL-12 (51,45% vs. controle LPS) no LBA após inflamação; reduziu a secreção de MCP-1 por M $\Phi$ s (basal: 87,96%; LPS+INF- $\gamma$ : 61,20%) e tecido traqueal em cultura (79,77% vs. controle LPS). Neste último tecido, a diminuição foi dependente da menor expressão gênica. Concentrações de MCP-1 semelhantes à detectada no sobrenadante de cultura de traquéia de animais expostos à HQ induziram migração de células THP-1 menor (38,2%) que à provocada pela concentração de MCP-1 no sobrenadante da cultura traquéia de animais controles. Traquéias de animais expostos à HQ apresentaram hiperreatividade (193,48%), a qual foi revertida pela remoção do epitélio traqueal. Adicionalmente, cultura de MΦs obtidos de animais expostos à HQ apresentaram maior atividade fagocítica (porcentagem de fagocitose: 36,30%; índice de fagocitose: 83,97%) e fungicida (68,47%), que não foram dependentes de alterações nos receptores TLR2, TLR4 e dectina-1, mas podem ser decorrentes da menor expressão protéica de MyD88. Em conjunto, os dados obtidos apontam para alterações importantes resultantes da exposição *in vivo* à HQ sobre funções de MΦs alveolares e do tecido traqueal que, em conjunto, podem ser determinantes para a toxicidade observada nestes animais que culmina com prejuízo na defesa do organismo.

Palavras-chaves: MCP-1, intoxicação ambiental e ocupacional, fagocitose, *Candida albicans*, LPS, inflamação.

#### Abstract

Hydroquinone (HQ) is a phenolic compound of natural or anthropogenic source, also found in high concentrations in cigarette, as well as benzene's metabolite. Our research group has demonstrated that exposure to HQ impairs in vivo inflammatory response. Following these investigations, this work aimed to study the effects of *in vivo* exposure to HQ on tracheal tissue and alveolar macrophages (M $\Phi$ s) activities. For this purpose, male Swiss mice were systemically (aerolised) exposed to 25ppm HQ (1.5 mg/60mL/1h; 5 days) or vehicle (saline ethanol solution, 1:20). Concentrations of inflammatory mediators (interleukin (IL) IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-4, IL-12 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) or monocyte chemoattractant protein (MCP-1); (enzyme immune assay, ELISA)) and nitric oxide (NO; Griess reaction) were quantified in bronchoalveolar lavage (BAL) at baseline or 3 hours after inflammatory stimulus (*in vivo* LPS, 100μL/mL; 10min); in the supernatant of cultured alveolar macrophages (M $\Phi$ s) or trachea obtained from animals and subsequently *in vitro* stimulated (M $\Phi$ s: 5µg/mL of LPS plus 10ng/mL IFN- $\gamma$ ; trachea: 1µg/mL LPS; 24 hours). Phagocytic and fungicidal activities (light microscopy) and expression of receptors involved in phagocytosis (toll-like receptor (TLR, TLR2, TLR4 and dectin-1, flow cytometry) were determined after in vitro incubation of alveolar M $\Phi$ s with Candida albicans fungus and expression of MyD88 pathway was held in alveolar M $\Phi$ s (western blot). Quantification of mRNA for MCP-1 (reaction of reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) was performed in tracheal tissue and cells human monocytic THP-1 were used in *in vitro* chemotaxis assays (Boyden chamber) using different concentrations of MCP-1. Tracheal reactivity was measured in response to methacholine. The results showed that in vivo HQ exposure reduced the concentration of MCP-1 (54.98% vs. control) and IL-12 (51.45% vs. control) in the BAL after inflammation; decreased secretion of MCP-1 by M $\Phi$ s (basal: 87.96%, LPS+INF- $\gamma$ : 61.20%) and in tracheal culture after LPS stimulation (79.77% vs. control). In the latter tissue, the MCP-1 protein content was dependent on impaired gene expression. Concentrations of MCP-1 similar to those detected in the supernatant of tracheal from HQ exposed rats induced smaller migration of THP-1 cells (38.2%) than that evoked by the MCP-1 concentration obtained in trachea supernatants collected from control animals. Tracheas from HQ exposed rats showed hyper reactivity (193.48%), which was reversed by removal of the tracheal epithelium. Additionally, culture of M $\Phi$ s obtained from HQ exposed rats showed increased phagocytic (percentage of phagocytosis: 36.30%; phagocytosis index: 83.97%) and fungicide activity (68.47%), which were not dependent on changes in the receptors TLR2, TLR4 and dectin-1, but could be due to reduced MyD88 expression. Together, these data point out important alterations on M $\Phi$ s and trachea after *in vivo* HQ exposure, which may be crucial for the toxicity observed in these animals that culminates with impaired host defense.

Key words: MCP-1, occupational and environmental toxicity, phagocytosis, *Candida albicans*, LPS, inflammation.

# Lista de figuras

Figura 1: Estrutura química da hidroquinona	16
Figura 2: Biotransformação do benzeno	19
Figura 3: Figura ilustrativa da caixa de exposição acoplada ao nebulizador ultrassônico	33
Figura 4: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre a concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> no LBA de camundongos Swiss machos	20) .40
Figura 5: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre a concentração de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-12 no LBA de camundongos Swiss machos	20) .42
Figura 6: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre a concentração de IL-4 e IL-10 no LBA de camundongos Swiss machos	20) 43
Figura 7: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre a concentração de MCP-1 no LBA de camundongos Swiss machos	20) 44
Figura 8: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre o número de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos	20) 45
Figura 9: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:2 sobre a concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA camundongos Swiss machos.	20) de 46
Figura 10: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol sali 1:20) sobre a concentração de IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-12 em sobrenadante de cultura de Me obtidos do LBA de camundongos Swiss machos	ina Φs 48
Figura 11: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol sali 1:20) sobre a concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA camundongos Swiss machos.	ina de 49
Figura 12: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol sali 1:20) sobre a concentração de MCP-1 em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do L de camundongos Swiss machos.	ina .BA .50
Figura 13: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol sali 1:20) sobre a concentração de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> em sobrenadante de cultura de traquéia obtido camundongos Swiss machos.	ina de 51
Figura 14: Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol sali 1:20) sobre a concentração de TNF-α e IL-6 em sobrenadante de cultura de traquéia obti de camundongos Swiss machos.	ina ido 52

Figura 17: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão gênica de MCP-1 pela traquéia de camundongos Swiss machos. ....55

Figura 18: Efeito da MCP-1 associado ao LPS sobre a quimiotaxia de células THP-1......56

Figura 20: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a reatividade da traquéia obtida de camundongos Swiss machos.......58

Figura 21: Foto representativa da traquéia íntegra (A) e da traquéia sem epitélio (B)......58

Figura 22: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a atividade fagocítica de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. 59

Figura 23: Foto ilustrativa de M $\Phi$ s alveolares obtidos do LBA de camundongos Swiss machos, expostos ao veículo (A) ou à HQ 25ppm (B), para determinação da atividade fagocítica......60

Figura 24: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a atividade fungicida de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos..61

Figura 25: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão de receptores de superfície envolvidos com a fagocitose de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos.......63

Figura 26: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão de MyD88 em M $\Phi$ s alveolares de camundongos Swiss machos......64

### Lista de tabelas

Tabela 1: Resumo	das alterações	causadas na	secreção d	de citocinas	após e	exposição	<i>in vivo</i> à
HQ							55

# Lista de abreviações, símbolos e fórmulas

ACGIH	American Conference of Industrial Hygienists
AM	Macrófagos alveolares
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP-1	Fator de transcrição ativador de proteína-1
ATP	Adenosina 5´-trifosfato
BZ	Benzeno
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CLR	Receptor de Lectina tipo-C
CMP	Precursor de célula mielóide comum
COX	Ciclooxigenases
CRs	Receptores de complemento
CTH	Célula tronco hematopoiética comum
СҮР	Enzimas do complexo citocromo p450;
DCs	Células dendríticas
DC-SIGN	Molécula não-integrina captadora da molécula de adesão intercelular-3 específica de célula dendrítica
DMFM	Dulbecco's Modified Faale Medium
dNTP	Desorribonuleotídeo trifosfatado
FDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FLISA	Ensaio imunoenzimático
epm	Erro padrão da média
E-selectina	Endothelial leukocyte adeshion molecule – 1
FcγR	Receptores de imunoglobulinas
FITC	Isoticianato de fluoresceína
a	Forca centrífuga relativa
GM-CSF	
	Fator estimulador de colonia de granulócito-macrofago
GSH	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroguinona
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p.	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCI Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCI Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCI Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina Óxido nítrico sintase induzível
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina Óxido nítrico sintase induzível Inibidor de NF-κB
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB KCl	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal Interperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina Óxido nítrico sintase induzível Inibidor de NF-κB Cloreto de potássio
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina Óxido nítrico sintase induzível Inibidor de NF-κB Cloreto de potássio Fosfato de potássio monobásico
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> LBA	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofago Glutationa Peróxido de hidrogênio Ácido clorídrico Mercúrio Hidroquinona Intraperitoneal International Agency for Research on Cancer Molécula de adesão intracelular-1 Interferon Imunoglobulina Inibidor de NF-κB quinase Interleucina Óxido nítrico sintase induzível Inibidor de NF-κB Cloreto de potássio Fosfato de potássio monobásico Lavado broncoalveolar
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> LBA LBP	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofagoGlutationaPeróxido de hidrogênioÁcido clorídricoMercúrioHidroquinonaIntraperitonealInternational Agency for Research on CancerMolécula de adesão intracelular-1InterferonImunoglobulinaInibidor de NF-κB quinaseInterleucinaÓxido nítrico sintase induzívelInibidor de NF-κBCloreto de potássioFosfato de potássio monobásicoLavado broncoalveolarProteína ligante de LPS
GSH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HCl Hg HQ i.p. IARC ICAM-1 IFN Ig IKK IL iNOS IKB KCl KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> LBA LBP LOX-1	Fator estimulador de colonia de granulocito-macrofagoGlutationaPeróxido de hidrogênioÁcido clorídricoMercúrioHidroquinonaIntraperitonealInternational Agency for Research on CancerMolécula de adesão intracelular-1InterferonImunoglobulinaInibidor de NF-κB quinaseInterleucinaÓxido nítrico sintase induzívelInibidor de NF-κBCloreto de potássioFosfato de potássio monobásicoLavado broncoalveolarProteína ligante de LPSLectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1

$LTB_4$	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MΦ	Macrófago
mA	Miliampere
МАРК	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCP-1	Proteína quimiotáxica de monócitos-1
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MGL	Macrophage galactose-type C-type lectin
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
Mincle	Macrophage-inducible C-type lectin
MIP-1α	Proteína inibitória de macrófagos-1α
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MPO	Mieloperoxidase
MR	Receptores de manose
MvD88	Proteína de diferenciacão mielóide 88
NaCl	Cloreto de Sódio
NaHCO	Bicarbonato de sódio
NF-ĸB	Fator de transcrição nuclear NF-ĸB
NIOSH	National Institute of Occupational Safety & Health
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
NO	Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
NO01	Ouinona oxido-redutase 1
$\Omega_2 \bullet^-$	Ânion superóxido
	Radical hidroxila
	Peroxinitrito
Pa	Pascal
PAMPs	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PRS	Solução tampão Fosfato-Salino
PF	Ficoeritrina
PI3-kinase	Fosfatidilinositol-quinase 3
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolinase C
PRRs	Recentores de Reconhecimento de Patógenos
RANTES	Regulated and normal t cell expressed and secreted
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
ROS	Espécies reativas de ovigênio
RT-PCR	Reação em cadeja de polimerase via transcriptase reversa
SEB	Soro fetal hovino
	Superóxido dismutase
	Macrófagos associados ao tumor
	Fator de transformação do crescimento
TGI-p Th1	Cálulas Thelper 1
Th2	Células Theiper 1
	Linhagem celular de leucemia humana aguda monocítica
	Pacantaras tall lika
	Threshold Limit Value Coiling
TLV-C	Threshold Limit Value - Cenny Threshold Limit Value - Time Weight Average
	Estor de pecrose tumoral a
	Linidado formadora do colônia
V CAIVI-I	MUNECUIA WE AVESAU VASCUIAI - I

RESUMO	4
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIAÇÕES, SÍMBOLOS E FÓRMULAS	11
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Compostos fenólicos	15
1.2 HIDROQUINONA	16
1.3 Resposta inflamatória pulmonar	20
1.3.1 Macrófagos	25
1.3.1.1 Origem e classificação dos macrófagos (M $arPhi$ s)	25
1.3.1.2 Receptores de superfície dos macrófagos	27
1.4 Efeitos da hidroquinona sobre macrófagos e tecido traqueal	29
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Animais	32
3.2 Exposições	32
3.2.1 Exposição à HQ	32
3.2.2 Exposição ao LPS	33
$3.3~ extsf{C}$ oleta do lavado broncoalveolar e quantificação de $ extsf{M}\Phi$ s	33
3.4 Ativação dos M $\Phi$ s por LPS e IFN-г <i>in vitro</i>	34
3.5 Coleta da traquéia e ativação pelo LPS <i>in vitro</i>	34
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	35
3.7 Expressão gênica de MCP-1 por RT-PCR	35
3.8 QUIMIOTAXIA IN VITRO	36
3.9 Reatividade da traquéia	36
$3.10$ Atividade fagocítica e fungicida de M $\Phi$ s	37
$3.11~ extsf{Q}$ uantificação da expressão de receptores de superfície de $ extsf{M}\Phi$ s envolvidos na fago	OCITOSE
POR CITOMETRIA DE FLUXO	38
3.12 Expressão de proteínas participantes das vias de sinalização intracelulares de MO	₽s por
Western Blot	38
3.12.1 Western Blot para MyD88	39
3.12.2 Western Blot para $eta$ -actina	39
3.13 Análise estatística	39
4 RESULTADOS	40
4.1 Efeitos da exposição <i>in vivo</i> à $HQ$ sobre a concentração de mediadores inflamatórios n	NO LBA
	40
4.1.1 Concentração de nitrito (NO <sub>2</sub> )	40
4.1.2 Concentração de interleucina-1 $eta$ (IL-1 $eta$ )	41
4.1.3 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- $lpha$ )	41
4.1.4 Concentração de interleucina-6 (IL-6)	41
4.1.5 Concentração de interleucina-12p70 (IL-12p70)	41
4.1.6 Concentração de interleucina-4 (IL-4)	43
4.1./ Concentração de interleucina-10 (IL-10)	43
4.1.8 Concentração de proteina quimiotáxica de monócitos (MCP-1)	44

### Sumário

4.2 Efeitos da exposição <i>in vivo</i> à HQ sobre a atividade secretora de M $arPhi$ s	45
4.2.1 Efeito da exposição à HQ sobre o número de M $arPhi$ s no LBA	45
4.2.2 Concentração de nitrito (NO2)	46
4.2.3 Concentração de interleucina-1 $eta$ (IL-1 $eta$ )	46
4.2.4 Concentração do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )	47
4.2.5 Concentração de interleucina-6 (IL-6)	47
4.2.6 Concentração de interleucina-12p70 (IL-12p70)	47
4.2.7 Concentração de interleucina-10 (IL-10)	49
4.2.8 Concentração de proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1)	50
4.3 Efeitos da exposição in vivo à HQ sobre a capacidade secretora do tecido traqueal	51
4.3.1 Concentração de nitrito (NO2)	51
4.3.2 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- $lpha$ )	52
4.3.3 Concentração de interleucina-6 (IL-6)	52
4.3.4 Concentração de interleucina-10 (IL-10)	53
4.3.5 Concentração de proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1)	54
4.3.5.1 Efeito da exposição in vivo à HQ sobre a expressão gênica de MCP-1	L pela
traquéia	54
4.4 Efeito da MCP-1 na quimiotaxia de células mononucelares in vitro	56
4.5 Efeitos da exposição <i>in vivo</i> à HQ sobre a reatividade da traquéia	57
4.6 Efeito da exposição <i>in vivo</i> à HQ sobre a atividade fagocítica e fungicida de M $arPhi$ s	59
4.6.1 Efeito da exposição à HQ sobre a atividade fagocítica de M $arPhi$ s	59
4.6.2 Efeito da exposição à HQ sobre a atividade fungicida de M $arPhi$ s	61
4.6.3 Efeito da exposição in vivo à HQ sobre a expressão de receptores envolvid	los na
fagocitose por M $arPhi$ s alveolares	62
4.6.4 Efeito da exposição in vivo à HQ sobre a expressão de MyD88 por M $arPhi$ s alve	olares
	64
5 DISCUSSÃO	65
6 CONCLUSÃO	74
7 REFERÊNCIAS	75
8 ANEXOS	87
8.1 Ficha do aluno	87
8.2 Currículo lattes	89
8.3 Comitê de ética	96
8.4 Artigo submetido para publicação n.1	97
8.5 Draft do artigo para publicação n.2	126

#### 1 Introdução

#### **1.1 Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos ou polifenóis compreendem mais de 8000 estruturas químicas caracterizadas por pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila. Estes compostos podem ser classificados pelo número e arranjo de seus átomos de carbono, sendo divididos em pelo menos 10 grupos, a saber: fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, isocumarinas, naftoquinonas, xantonas, estilbenes, antraquinonas, flavonóides e ligninas (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORDC, 2009; JAGANATHAN; MANDAL, 2009).

São amplamente encontrados no reino vegetal conjugados a açúcares e ácidos orgânicos como resultado do metabolismo secundário de plantas, ou seja, são produzidos em resposta a danos externos, sendo essenciais para o crescimento e reprodução das mesmas (SVARCOVA; HEINRICH; VALENTOVA, 2007; EPSTEIN, 2009).

Os compostos fenólicos possuem múltiplos efeitos biológicos incluindo ação antioxidante, antiplaquetária, antitrombótica, antialérgica, antitumoral, antiviral e antiinflamatória (MIEAN; MOHAMED, 2001; HSU; YEN 2008; FARHAT *et al.*, 2009). Isso os torna alvo interessante na pesquisa por fitoquímicos naturais que beneficiem a saúde, uma vez que há a necessidade do uso destes compostos na indústria alimentícia e farmacêutica (EPSTEIN, 2009; FARHAT *et al.*, 2009).

Os efeitos benéficos destas moléculas relacionados à sua atividade antioxidante são particularmente devido à sua habilidade de eliminar radicais livres, de doar átomos de hidrogênio ou elétrons e de quelar cátions metálicos, responsáveis pelo estresse oxidativo (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; FERNANDEZ-PANCHON *et al.*, 2008; FARHAT *et al.*, 2009).

Ademais, alguns compostos fenólicos, em especial os flavonóides, são capazes de reduzir as atividades das óxido nítrico sintases (NOS) e ciclooxigenases (COX), a adesão leucocitária, a desgranulação de mastócitos, além de diminuírem os níveis das citocinas interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Desta forma, são, assim, considerados uma estratégia nova e segura para modulação da inflamação dependente da via do fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (SVARCOVA; HEINRICH; VALENTOVA, 2007).

Os produtos de transformação dos compostos fenólicos também estão presentes em alimentos processados e bebidas, como no chá preto e verde, vinho tinto e café, além de ser encontrado no cacau, alho, kiwi, ameixa, cereja, uva, maçã, pêra, frutas *berries*, frutas cítricas, brócolis, couve, cidra, chicória, espinafre, soja, entre outros (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORDC, 2009; NICHOLS; KATIYAR, 2010).

Um dos compostos fenólicos amplamente encontrado em plantas é a arbutina (4-Hidroxifenil-β-D-glicopiranosídeo), presente em frutas como as *berries*, pêra e maçã, além de seus derivados tais como sucos e geléias. Plantas da família *Ericaceae*, como a *Arctostaphylos uvae ursi*, contém arbutina (4-12%) como seu principal constituinte ativo e são utilizadas como fitoterápico no tratamento de desordens do trato urogenital (SCHINDLER *et al.*, 2002; JIN; SATO, 2003; THAVARAJAH; LOW, 2006, MCGREGOR, 2007).

Apesar da ampla descrição das ações consideradas benéficas dos compostos fenólicos, a toxicidade destes compostos não está bem estabelecida. Mais estudos sobre os efeitos causados por estes compostos são necessários, uma vez que, dependendo da dosagem e do tempo de utilização, seu uso pode resultar em comprometimento do sistema de defesa do organismo (ZHAO *et al.*, 2009; MICHALOWICZA; MAJSTEREK, 2010; PAREDES-LÓPEZ *et al.*, 2010).

#### 1.2 Hidroquinona

O produto de hidrólise da arbutina é a hidroquinona (HQ, Figura 1: 1,4dihidroxibenzeno), nosso objeto de estudo. Além da composição de arbutina em plantas, a HQ livre também está presente naturalmente em alguns alimentos e bebidas, tais como no brócolis (0,1ppm), no vinho tinto (0,5ppm) e no café (40mg/Kg no grão seco; 0,5µg/mL no produto pronto para o consumo) (IARC, 1987; DEISINGER; HILL; ENGLISH, 1996; DARRALL *et al.*, 1998; JIN; SATO, 2003; RYCHLIŃSKA; GUDEJ, 2003; DIMITROVA *et al.*, 2005; THAVARAJAH; LOW, 2006).



Figura 1: Estrutura química da hidroquinona.

A HQ é uma substância cristalina branca e peso molecular de 110,11. Solúvel em água (70g/L a 25°C) e etanol; apresenta ponto de fusão 172,3°C, ponto de ebulição 287°C; pressão de vapor 2,4 ×  $10^{-3}$ Pa (1,8 ×  $10^{-5}$ mm Hg) a 25°C, além de ser um agente redutor com potencial eletroquímico de +286 mV para o par redox benzoquinona/hidroquinona a 25°C e pH 7,0 (IARC, 1987; MCGREGOR, 2007).

A HQ é utilizada na indústria cosmética, sendo um dos tratamentos mais indicados por dermatologistas para o clareamento da pele com finalidades estéticas ou terapêuticas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a comercialização de cremes na concentração de até 2% de HQ, mas podemos encontrar de 4 a 10% de HQ em formulações manipuladas (ANVISA, 2000; DECAPRIO, 1999; WESTERHOF; KOOYERS, 2005).

As ocorrências antropogênicas da HQ provêm da atividade industrial, como por exemplo, das indústrias produtoras de borracha, visto que a HQ é utilizada como inibidor da polimerização da mesma, das indústrias petroquímicas, da formulação de soluções reveladoras de fotografias preto e branco, entre outras inúmeras linhas industriais (IARC, 1987; MCGREGOR, 2007). A literatura estima que a produção industrial de HQ seja em torno de 35.000 a 40.000 toneladas por ano (DECAPRIO, 1999; WESTERHOF; KOOYERS, 2005).

Há registros que a HQ dispersa no ar pode estar conjugada a poeira em concentrações de 0,1 a 6,0mg/m<sup>3</sup> em indústrias que manipulam a mesma ou seus precursores, um número muito elevado visto que o *National Institute of Occupational Safety & Health* (NIOSH) e a *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) alertam para um limite de 2,0mg/m<sup>3</sup> onde o trabalhador pode permanecer em contato com a HQ por um período limitado de 8 horas por dia (TLV-TWA). Já a ACGIH vai mais longe, permitindo que um indivíduo em seu ambiente de trabalho esteja em contato com a HQ nesta concentração por no máximo 15 minutos por dia (TLV-C) (NIOSH, 1994; PIFER *et al.*, 1995). No Brasil, não há legislação vigente que determine o tempo máximo de contato com a HQ no ambiente de trabalho. A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) segue os mesmos valores estabelecidos pela NIOSH (NIOSH, 1994; CETESB).

A HQ também é produto de metabolização do benzeno (BZ), utilizado na indústria petroquímica e na de produção de produtos que requer solventes aromáticos, como a fabricação de borracha e sapatos. Os motores a combustível de matéria orgânica são as principais fontes de emissão móvel de HQ, uma vez que o BZ é adulterante comum deste

tipo de combustível. Além disso, os riscos de vazamentos provenientes de tanques de estocagem destes combustíveis podem ocasionar contaminação de aquíferos e lençóis freáticos (TIBURTIUS; PERALTA-ZAMORA; LEAL, 2004; LIANG; HUANG; CHEN, 2008; WEISEL, 2010).

Entre 1972 e 1991 a média de concentração de BZ na gasolina americana foi de 0,8 a 3,18%, enquanto que atualmente a gasolina americana contém cerca de 1%. Já na comunidade européia, a concentração de BZ na gasolina geralmente está acima de 2% (KEENAN *et al.*, 2010). No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) preconiza a concentração máxima de 1% de BZ na gasolina comum, mas a literatura indica que já foram encontrados até 8% de BZ, decorrentes de adulteração (ANP, 2001; AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTICIAS, 2005).

Outra fonte de ocorrência importante de HQ e BZ é o cigarro, um dos maiores responsáveis por doenças do trato respiratório (DOMAGALA-KULAWIK, 2008; PATEL; RYU; VASSALLO, 2008). Monografias da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) descrevem que um cigarro pode conter até 100µg de HQ e 72,2µg de BZ em sua composição. Já as quantidades liberadas pela fumaça deste cigarro podem chegar até 72,2µg a 183,5µg de HQ e 46,3µg a 272µg de BZ pela corrente primária e secundária, respectivamente, levando a uma exposição significativa, tanto para fumantes ativos quanto passivos (IARC, 1987; ANVISA, 2001; KIM; KANG; KIM, 2005).

O BZ absorvido pela pele ou pelas vias aéreas sofre epoxidação no fígado ou nos pulmões, mediada pela CYP2E1. O óxido de BZ resultante estabelece equilíbrio entre sua forma oxepina ou pode rearranjar-se não enzimaticamente a fenol (Figura 2). Este último, pela ação da CYP2E1, é hidroxilado, via dihidrodiol desidrogenase, aos compostos reativos da HQ, o catecol ou o 1,2,4-benzenotriol, gerando assim substratos para enzimas de fase II de biotransformação, os conjugados fenólicos encontrados na urina, o ácido fenilmercaptúrico e o ácido trans, trans-mucônico, ou ainda, são transportados pelo sangue para a medula óssea, onde são biotransformados pela mieloperoxidase (MPO) e prostaglandina H sintetase gerando os compostos 1,4 e 1,2-benzoquinonas, compostos estes mais tóxicos, que contribuem para a mielotoxicidade (GANOUSIS *et al.*, 1992; para revisões ver DE CAPRIO, 1999; SNYDER, 2004; JOHNSON; LANGÅRD; LIN, 2007; HARTWIG, 2010).



Figura adaptada de JOHNSON; LANGÅRD; LIN, 2007. (GSH: glutationa; CYP: enzimas do complexo citocromo p450; MPO: mieloperoxidase; NQ01: quinona oxido-redutase 1).

A comprovação da importância da metabolização do BZ para sua toxicidade é bastante evidenciada em estudos com animais geneticamente modificados para as enzimas CYP2E1 e MPO, uma vez que a mielotoxicidade é bastante reduzida nestes animais (KETTLE; WINTERBOURN, 1992; MEDINSKY; KENYON; SCHLOSSER, 1995; SNYDER 2002; SNYDER 2004).

Ademais, os estudos, na maioria *in vitro*, mostram que a exposição à HQ compromete a função de células do sistema imune (TAYSSE *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; CHO, 2008; CHOI *et al.*, 2008).

Todas as fontes de ocorrência citadas acima se tornam fontes de exposição para o ser humano no seu dia-a-dia, deixando-o em contato direto ou indireto com este agente químico. Embora a IARC classifique a HQ como agente químico do grupo 3, ou seja, não carcinogênica para humanos, McGregor (2007) questiona esta classificação, propondo que talvez os modelos de avaliação aplicados aos animais sejam limitados e inadequados para a indicação da toxicidade à HQ. Desta forma, estudos experimentais que elucidem os mecanismos de ação tóxica da HQ e que identifiquem indicadores biológicos de efeitos mais precoces e sensíveis podem contribuir efetivamente para avaliação do risco.

#### 1.3 Resposta inflamatória pulmonar

O sistema respiratório compreende as fossas nasais, a boca, a faringe, a laringe, a traquéia, e os pulmões, onde se encontram os brônquios, os bronquíolos e os alvéolos. A traquéia é um tubo cartilaginoso com paredes reforçadas que faz a conexão da laringe com os brônquios. A luz deste tubo é revestida por epitélio respiratório pulmonar ciliado pseudoestratificado, logo após está a lâmina própria, constituída de tecido conjuntivo frouxo rico em fibras elásticas, glândulas e células calciformes, produtoras de muco; seguida da cartilagem do tipo hialino, onde se encontra os condrócitos. O intervalo entre as duas extremidades de cada anel é coberto por tecido conjuntivo e músculo liso. A função primordial da traquéia é a passagem de ar e a remoção de partículas inaladas através de barreiras mecânicas ou químicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TEN HALLERS *et al.*, 2004).

A contração do músculo liso causa redução do lúmen traqueal, participando do reflexo da tosse, uma barreira mecânica. O estreitamento do lúmen pela contração muscular aumenta a velocidade do ar expirado e isto torna mais fácil expulsar a secreção acumulada na traquéia e corpos estranhos que possam ter penetrado. Além disso, barreiras químicas, como a produção de muco e movimentos ciliares, permitem eliminar partículas intermediárias inaladas (5-10µm) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; TEN HALLERS *et al.*, 2004).

O pulmão é o órgão com a maior superfície epitelial do organismo (140m<sup>2</sup> em humanos), composto de brônquios que se dividem em bronquíolos e alvéolos pulmonares,

que tem como função primordial a troca gasosa. Ademais, está em contato direto com partículas presentes no meio ambiente, que acabam por ser depositadas nas vias aéreas e superfícies alveolares, caso não sejam combatidas eficientemente por um sistema de defesa altamente integrado que inclui o aparato mucociliar, o sistema fagocítico inflamatório agudo (macrófagos e neutrófilos) e os mecanismos imune celular e humoral (GEISER, 2002; DELCLAUX; AZOULAY, 2003; GWINN; VALLYATHAN, 2006; AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; MORRISEY; HOGAN, 2010).

A tarefa de reconhecer um patógeno e ativar uma resposta do hospedeiro é realizado pelos Receptores de Reconhecimento de Patógenos (PRRs) presentes nos diferentes tipos celulares encontrados no pulmão, entre os quais, nos macrófagos. Estes PRRs reconhecem estruturas químicas de bactérias, vírus e fungos, chamados Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs), determinando, assim, o tipo de resposta que será desencadeada, como a subseqüente produção de citocinas proinflamatórias e a maturação de células apresentadoras de antígenos (NETEA *et al.*, 2008; LU; YEH; OHASHI, 2008).

As famílias melhor caracterizadas de PRRs são os Toll-Like Receptors (TLRs) e Receptores de Lectina tipo-C (CLRs). Os TLRs são glicoproteínas de membrana caracterizados por um domínio extracelular N-terminal composto por repetições ricas em leucina e por um domínio intracelular C-terminal Toll/IL-1R (TIR) que possui homologia com o receptor de Interleucina-1 (IL-1). Os TLRs podem estar associados à membrana das células (TLR1, 2, 4, 5 e 6) ou serem encontrados intracelularmente (TLR3, 7, 8 e 9) e medeiam a sinalização celular (NETEA *et al.*, 2008; KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009; GALÈS *et al.*, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Já os CLRs são uma superfamília de proteínas que contém um ou mais domínios de lectina tipo-C e é dividida em 17 grupos baseado em sua estrutura e disposição dos seus domínios. Podemos citar a dectina-1, dectina-2, receptores de manose (MR), molécula nãointegrina captadora da molécula de adesão intercelular-3 específica de célula dendrítica (DC-SIGN), macrophage galactose-type C-type lectin (MGL), macrophage-inducible C-type lectin (Mincle), lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), entre outros (Para revisão ver GARCÍA-VALLEJO; VAN KOOYK, 2009 e HUYSAMEN; BROWN, 2009) e, surgem como os principais receptores envolvidos no reconhecimento, captação e morte de patógenos (NETEA et al., 2008; GALÈS et al., 2010). Tem sido demonstrado que muitos PAMPs interagem com um TLR específico, por exemplo, o lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa (LPS), a proteína de fusão do vírus respiratório sincicial e a proteína de envelope do vírus do tumor mamário de camundongo estimulam o TLR4 (LU; YEH; OHASHI, 2008).

O LPS é um componente estrutural importante da membrana de bactérias gramnegativas e consiste em três partes, o lipídio A, um núcleo oligossacarídeo e uma cadeia lateral O. É um dos componentes imunoestimulatórios mais bem estudados e induz inflamação sistêmica, podendo levar à sepse caso ocorra excesso destes sinais (LU; YEH; OHASHI, 2008; TAKEUCHI; AKIRA, 2010). O reconhecimento do LPS por TLR4 requer a presença de uma série de outras proteínas, incluindo a proteína ligante de LPS (LBP), CD14 e MD2. Após a interação TLR4-LPS, cinco proteínas adaptadoras contendo domínios TIR são necessárias para subseqüente sinalização, a proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), TIRAP, TRIF, TRAM e SARM. A sinalização dependente de MyD88 leva à ativação de outros domínios, como IRAK4, IRAK1, TRAF6, TAK1, IKK e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A MAPK induz o fator de transcrição ativador de proteína-1 (AP-1) e fosforila o inibidor de NF-κB quinase (IKK), que fosforila o inibidor de NF-κB (IκB), levando a translocação do fator de transcrição nuclear NF-κB para o núcleo. Ambos controlam a expressão de citocinas proinflamatórias (Para revisão ver LU; YEH; OHASHI, 2008; MCGETTRICK; O'NEILL, 2010 e TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular expressas por diversas células. Pela sinalização de seus receptores, as citocinas exercem respostas distintas em populações especificas de células, ou seja, estimulam a ativação, proliferação e diferenciação de algumas populações, enquanto exercem um efeito inibitório em outros tipos celulares. Desta forma, exercem um papel na regulação da intensidade e duração da resposta inflamatória (DELCLAUX; AZOULAY, 2003; SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008).

A IL-1 compreende duas citocinas, a IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , proinflamatórias. Produzidas principalmente por macrófagos e monócitos, também são secretadas por células epiteliais, endoteliais e fibroblastos (DINARELLO; DONATH; MANDRUP-POULSEN, 2010; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010). A IL-1 $\beta$  induz a expressão de moléculas de adesão como a P-selectina, a molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e estimula o recrutamento leucocitário (CHING *et al.*, 2005; CHING *et al.*, 2006).

O TNF- $\alpha$  é secretado por macrófagos, células natural *killer* (NK), mastócitos, eosinófilos e células epiteliais. Tem sido demonstrado que o TNF- $\alpha$  aumenta a expressão de moléculas de adesão celular, tais como E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, e facilita a passagem de leucócitos para o espaço alveolar em resposta a um alérgeno ou produtos bacterianos. Adicionalmente, parece estar envolvida com o aumento da contratilidade de células do músculo liso das vias aéreas. A produção de TNF- $\alpha$  é mediada principalmente pelas MAPKs e pelo NF- $\kappa$ B, juntamente com participação de outras moléculas como a proteína quinase C (PKC), a fosfolipase C (PLC) e a fosfatidilinositol-quinase 3 (PI3-kinase) (THOMAS, 2001; PARK *et al.*, 2002).

A interleucina-6 (IL-6) é produzida por vários tipos celulares, como células T, células B, monócitos, fibroblastos, osteoblastos, queratinócitos, células endoteliais e algumas células tumorais. A IL-6 estimula a proliferação de células T, ativa células NK, está relacionada ao aumento da temperatura corporal e com a produção de proteínas de fase aguda. Ainda, é capaz de modular a expressão de ICAM por células mesoteliais. A produção de IL-6 é dependente do fator de translocação nuclear NF-κB (DELCLAUX; AZOULAY, 2003; ZIPRIN *et al.*, 2003; NOVOTNY *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2009).

A interleucina 12 (IL-12p70) é uma citocina heterodímera de 70kDa formada por duas subunidades, a p35 e p40, secretada por macrófagos, monócitos e células dendríticas. As funções da IL-12 são importantes tanto para a resposta imune inata quanto adaptativa, pois induz a produção de interferon-γ (IFN-γ) e a diferenciação de células T CD4+ em T *helper* 1 (Th1), relevantes na proteção contra microorganismos bacterianos. Ademais, regula a atividade citotóxica, proliferação e produção de citocinas por células NK e células T. Induz a migração de linfócitos T CD3+ e polimorfonucleares, mas não de monócitos e outras células T. A produção de IL-12 é regulada por uma série de compostos, através de componentes de sinalização múltiplos, como o NF-κB, p38 MAPK, moléculas que modulam o AMP cíclico, canais de íons de membrana celular, óxido nítrico (NO), receptores nucleares ou de superfície (ALLAVENA *et al.*, 1994; PEARLMAN *et al.*, 1997; KANG; KIM; KIM, 2005; ZHANG; WANG, 2008; PISTOIA; COCCO; AIROLDI, 2009; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2010).

A interleucina 10 (IL-10) é uma importante citocina anti-inflamatória, produto de células T *helper* do tipo 2 (Th2), inibe as funções e a diferenciação das células Th1, além de suprimir a secreção de citocinas proinflamatórias por macrófagos e células dendríticas. É secretada por macrófagos, monócitos, células T e B e células dendríticas. A produção de IL-

10 é regulada pela inibição do NF-κB, das MAPKs e ou pela ativação da via inibitória PI3K/AKT. Tem como função a capacidade de regular os parâmetros hemodinâmicos, o recrutamento leucocitário, por reduzir o *rolling* e a aderência dos leucócitos na microcirculação, reduz também a acumulação de leucócitos no pulmão e a secreção de moléculas quimiotáticas (HICKEY *et al.,* 1998; MAYNARD; WEAVER, 2008; MOSSER; ZHANG, 2008).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina anti-inflamatória produzida por células Th2, basófilos, mastócitos e células NK. Tem como função a diferenciação de linfócitos Th2, indução e produção de receptores IgE, hipersecreção de muco, transmigração de eosinófilos e a inibição da apoptose por linfócito T. A produção de IL-4 é mediada por três vias principais: JAK-STAT-6, Raf-MAPK e PKB. Ademais, o aumento do cálcio intracelular, do AMPc e da PKC também participam na regulação dos efeitos da IL-4 tais como, induzir a expressão de VCAM-1, aumentar a adesão de células T, eosinófilos e basófilos, mas não de neutrófilos em células endoteliais, exercendo um papel seletivo no recrutamento de células para o foco de lesão (THORNHILL; KYAN-AUNG; HASKARD, 1990; SCHLEIMER *et al.,* 1992; SHOLL-FRANCO; DA SILVA; ADÃO-NOVAES, 2009).

As quimiocinas são glicoproteínas que estruturalmente se assemelham às citocinas, mas diferem-se em sua habilidade de se ligar aos receptores acoplados a proteína G. São quimioatraentes e agonistas que regulam a migração e ativação leucocitária durante a inflamação e resposta imune. Podem ser classificadas de acordo com localização de seu resíduo de cisteína em C, CC, CXC e CX3C. Alguns exemplos de quimiocinas são a proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1), proteína inibitória de macrófagos-1α (MIP-1α), *regulated and normal t cell expressed and secreted* (RANTES) e interleucina-8 (IL-8) (SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; DESHMANE *et al.*, 2009; RANSOHOFF, 2009; YADAV; SAINI; ARORA, 2010).

A MCP-1/CCL2, um potente fator quimioatraente de monócitos e macrófagos, é um membro da família de quimiocinas CC, ou seja, possui os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes próximos à porção N-terminal. A família da MCP é composta de pelo menos cinco membros (MCP-1, -2, -3, -4 e -5). A MCP-1 é secretada por uma variedade de tipos celulares, tanto constitutivamente quanto após indução por estresse oxidativo, citocinas ou fatores de crescimento. Embora a maior fonte de MCP-1 seja pela secreção por monócitos e macrófagos, outros tipos celulares como as células endoteliais, células epiteliais,

fibroblastos, células do músculo liso vascular, astrócitos e células da microglia também produzem esta quimiocina.

A MCP-1 liga-se ao seu receptor CCR2, caracterizado por sete domínios transmembrana acoplados à proteína G ou com menor afinidade ao CCR11, sendo, assim responsável pela firme adesão de monócitos no endotélio, por expressar E-selectina. Além disso, ativa monócitos *in vitro*, aumenta a mobilização de cálcio intracelular, consequentemente a quimiotaxia e regula a expressão de moléculas de adesão (MELGAREJO *et al.*, 2009; DESHMANE *et al.*, 2009; YADAV; SAINI; ARORA, 2010).

A interação MCP-1/CCR2 ativa proteínas da família Rho, que resulta na indução da mobilidade celular. Adicionalmente, a ativação da proteína G induz a via inositol trifosfato (IP3) dependente de fosfolipase C (PLC), liberando cálcio intracelular. Além disso, a produção de MCP-1 é regulada pelo NF-κB dependente de proteína quinase C (PKC) e das MAP quinases (ERK1/2, JAK2, JNK1 e p38) (MELGAREJO *et al.*, 2009; YADAV; SAINI; ARORA, 2010).

Do exposto, fica evidente que o pulmão possui uma diversidade de células que são relevantes para a defesa do organismo e que estas possuem sistemas de membrana e vias de sinalizações intracelulares complexos e específicos para tal fim. Neste contexto, estas células, entre outras ações, secretam uma variedade de proteínas pro ou anti-inflamatórias, que no balanço, atuam no sentido de recrutar leucócitos circulantes para o estabelecimento da defesa ou para restauração do ambiente fisiológico.

#### 1.3.1 Macrófagos

#### 1.3.1.1 Origem e classificação dos macrófagos (M $\Phi$ s)

Macrófagos (M $\Phi$ s) são células teciduais com tamanho variando de 15 a 80µm de diâmetro, forma irregular e mononucleada, proveniente de monócitos circulantes, que representam cerca de 5 a 10% de leucócitos circulantes em mamíferos (TACKE; RANDOLPH, 2006; GREER *et al.*, 2009; YONA; JUNG, 2010). Os monócitos são provenientes da medula óssea a partir de uma célula tronco hematopoiética comum (CTH), que também dá origem aos demais leucócitos sob influência de citocinas e fatores de crescimentos. Especificamente, a CTH dá origem ao precursor de célula mielóide comum (CMP), que sequencialmente diferencia-se em monoblastos, pró-monócitos e monócitos, sob a ação do

fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF) e fator estimulador de colônia de M $\Phi$  (M-CSF) (MOSSER; EDWARDS, 2008; YONA; JUNG, 2010).

Por apresentarem receptores de quimiocinas e de adesão celular os monócitos se locomovem do sangue para os tecidos durante a inflamação, onde se diferenciam em M $\Phi$ s e células dendríticas (DCs). Esta transmigração para o tecido leva os monócitos a apresentarem um fenótipo funcional característico de acordo com o microambiente tecidual e o estado de ativação e função das células (GORDON; READ, 2002; STOUT; WATKINS; SUTTLES, 2009; GEISSMANN *et al.*, 2010).

Recentemente, tem sido mostrado que dependendo do meio ambiente de transformação do monócito, os MΦs são polarizados e de acordo com o fenótipo que adquirem são classificados em M1, M2 ou *tumor associated macrophages* (TAM). MΦs M1, ou a chamada via de ativação clássica de MΦs, são responsivos a citocinas inflamatórias do tipo 1 e a produtos de microorganismos, como o LPS. A via de ativação alternativa de MΦs, leva a polarização dos MΦs M2, que são divididos em três subtipos, os M2a, ativados por IL-4 ou interleucina-13 (IL-13); M2b, induzidos por complexos imunes e agonistas de TLRs e receptores de IL-1; e o M2c, induzido por IL-10 e hormônios glicocorticóides. Os MΦs M1 exercem potente atividade fagocítica e microbicida e favorecem a resposta Th1, enquanto que MΦs M2 facilitam a resposta Th2. Já os MΦs TAM apresentam funções protumorais, regulando o crescimento e a progressão tumoral e a angiogênese (MANTOVANI *et al.,* 2002; MARTINEZ *et al.,* 2008; SOLINAS, *et al.,* 2009; BENOIT; DESNUES; MEGE, 2010).

Podemos encontrar M $\Phi$ s nos órgãos linfóides, fígado (células de Kupffer), pulmão, trato gastrointestinal, sistema nervoso central (células da microglia), cavidades serosas, ossos (osteoblastos), pele (células de Langerhans), baço, peritônio e tecido conjuntivo (histiócitos). Aproximadamente 8% dos monócitos sanguíneos migram para a cavidade peritoneal, 15% para o pulmão e 50% para o fígado (GWINN; VALLYATHAN, 2006; MOSSER; EDWARDS, 2008; GREER *et al.*, 2009).

A população total de M $\Phi$ s no pulmão de camundongos é de aproximadamente 2x10<sup>6</sup> células, sendo 93% destas encontradas nos alvéolos e 7% no interstício pulmonar (GREER *et al.,* 2009). Baseado em sua localização, os M $\Phi$ s pulmonares podem ser divididos em alveolares, intersticiais e intravasculares (LOHMANN-MATTHES; STEINMÜLLER; FRANKE-ULLMANN, 1994).

Os M $\Phi$ s alveolares são importantes fagócitos residentes do pulmão, que representam cerca de 90% das células presentes no LBA, sendo o restante formado por linfócitos (ILES; FORMAN, 2002; GORDON; READ, 2002). Por se localizar na superfície interna do epitélio dos pulmões e estar imerso na camada de revestimento do espaço alveolar, é o único tipo de M $\Phi$  pulmonar que entra em contato direto com o ar (LOHMANN-MATTHES; STEINMÜLLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; GEISER, 2002).

Enquanto os MΦs alveolares são facilmente obtidos pela coleta do LBA, a obtenção de outras populações de MΦs pulmonares é difícil e demorada. Por essa razão, a maioria dos dados até agora publicados na literatura foram realizados com este tipo celular (LOHMANN-MATTHES; STEINMÜLLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; GREER *et al.*, 2009).

#### **1.3.1.2** Receptores de superfície dos macrófagos

Os M $\Phi$ s apresentam uma ampla gama de PRRs. Durante a diferenciação para M $\Phi$ s, os monócitos retêm a expressão dos TLRs e *up*-regulam a expressão dos CLRs. Além de expressarem TLR2, TLR4, TLR6, dectina-1, dectina-2 e MR, os M $\Phi$ s também expressam receptores de imunoglobulinas (Fc $\gamma$ R) e receptores de complemento (CRs), como o CR3 (GORDON; READ, 2002; NETEA *et al.*, 2008).

O reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs é necessário para uma resposta efetiva dos M $\Phi$ s, que podem assim, exercer suas atividades fagocíticas, *killing* e secretora.

Além dos MΦs, neutrófilos e células dendríticas também são conhecidas como fagócitos profissionais, ou seja, estão qualificados a englobar partículas e microorganismos. A chave para uma fagocitose efetiva e, assim, o desenvolvimento da resposta imune inata ou adaptativa, é a internalização das partículas e a maturação do fagossomo, com subsequente destruição dos patógenos (NICOLA; CASADEVALL; GOLDMAN, 2008; FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Há dois modelos de interação da partícula com a célula fagocítica. Uma delas é o reconhecimento direto de moléculas associadas aos patógenos, por exemplo, carboidratos, lipoproteínas e peptideoglicanos presentes na superfície dos mesmos, e o reconhecimento indireto que se desenvolve através da opsonização, ou seja, quando fatores endógenos do patógeno adquirem uma conformação em sua superfície, sendo assim reconhecidos por

receptores específicos do fagócito, tais como o FcγR e CR3 (FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

Os TLRs parecem não participar da fagocitose, mas podem estar envolvidos no direcionamento da subseqüente maturação de fagossomos e da apresentação de antígenos, embora este fato seja, ainda, controverso (NETEA *et al.*, 2008).

Após o englobamento da partícula, há a formação de um fagolisossomo na célula fagocítica, ou seja, a fusão de endossomos, lisossomos e fagossomos. Esta remodelagem da membrana é acompanhada por mudanças na composição do lúmen, que adquire pH ácido e características oxidativas e degradativas. A acidificação do lúmen se dá devido a ação da V-ATPase, um complexo citoplasmático V<sub>1</sub> que hidrolisa ATP e transfere a energia para um complexo V<sub>0</sub> incorporado à membrana levando a translocação de H<sup>+</sup> para dentro da célula. Além disso, a V-ATPase facilita a geração de ânion superóxido ( $O_2 \bullet^-$ ) por ação da NADPH oxidase, que combina com o H<sup>+</sup> gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), criando um ambiente que provoca um prejuízo direto no metabolismo do microorganismo (Para revisão ver FLANNAGAN; COSÍO; GRINSTEIN, 2009).

A geração de ânion superóxido é decorrente do processo metabólico, conhecido como *burst* respiratório, um dos principais mecanismos de morte exercido por células fagocíticas. Pela ação da superóxido dismutase (SOD), o ânion superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que serve como precursor da geração do radical hidroxila (OH•) através da reação tipo Fenton. Adicionalmente, a reação do ânion superóxido com o óxido nítrico (NO•) leva a formação do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). Assim, o *burst* respiratório resulta na produção de oxidantes tóxicos e na ativação de grânulos contendo proteases que levam à morte do microorganismo fagocitado (ILES; FORMAN, 2002; GWINN; VALLYATHAN, 2006; NETEA *et al.*, 2008).

Além de apresentarem uma atividade fagocítica e *killing* eficiente, os M $\Phi$ s também são capazes de secretar uma variada quantidade de citocinas, tanto proinflamatórias quanto anti-inflamatórias e quimiocinas após o reconhecimento dos PAMPs específicos, a fim de eliminar o patógeno, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , interleucina-8 (IL-8), IL-10, IL-6, Fator de transformação do crescimento (TGF- $\beta$ ), interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), MIP-1, MIP-2, leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), entre outras (LOHMANN-MATTHES; STEINMÜLLER; FRANKE-ULLMANN, 1994; DELCLAUX; AZOULAY, 2003).

#### 1.4 Efeitos da hidroquinona sobre macrófagos e tecido traqueal

Embora a literatura evidencie os efeitos tóxicos da HQ sobre o sistema imune, os mecanismos envolvidos não estão totalmente elucidados. Os dados da literatura sobre o papel da HQ sobre os M $\Phi$ s compreendem demonstrações de estudos *in vitro*. Os dados obtidos indicam que a HQ inibe a resposta imune mediada por estas células, pela diminuição da produção de peroxinitrito, sequestro do mesmo ou pela diminuição da produção do NO pela inibição da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Adicionalmente, o tratamento de M $\Phi$ s com HQ acarretam prejuízos na secreção de mediadores inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12 e NO, por mecanismo mediado via fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ B (KIM *et al.,* 2005; LEE *et al.,* 2007; CHO, 2008). Adicionalmente, Cho e colaboradores (2008) demonstraram que a supressão da fagocitose por dextran em M $\Phi$ s tratados com HQ *in vitro*, sugerindo um bloqueio da resposta inicial da ativação desta célula.

Apenas alguns poucos estudos mostram o efeito da HQ *in vitro* sobre funções traqueais em modelos animais, tais como a contração-relaxamento (GÜC; ILHAN; KAYAALP, 1988; HOBBS; TUCKER; GIBSON, 1991). Foi demonstrado anteriormente que a exposição à HQ 100µM bloqueia o tônus de relaxamento induzido por NO, mas não por azida sódica, hidroxilamina e nitroprussiato de sódio, em traquéia de cobaias, no músculo anococcígeo e no fundo gástrico de ratos (HOBBS; TUCKER; GIBSON, 1991). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que as traquéias de animais sensibilizados à ovalbumina (OVA) e expostos à HQ (50mg/Kg. i.p.) apresentaram a capacidade de contração reduzida frente ao desafio *in vitro* ao alérgeno (OVA) (MACEDO, *et al.,* 2007). Por outro lado, não há dados da literatura sobre a ação da HQ sobre a função secretora da traquéia.

Se associados, os dados obtidos da exposição *in vivo* à HQ, em especial em concentrações consideradas seguras, são fragmentários para concluir sobre os possíveis efeitos da HQ sobre as funções destas células.

Finalizando, vale ressaltar que os seres vivos estão constantemente expostos a agentes fenólicos provenientes de diferentes fontes naturais ou antropogênicas. Visto que estes compostos podem causar efeitos tóxicos e que a exposição pode estar exacerbada em algumas condições, tais como ambientais e ocupacionais, limites de exposição seguros a estes agentes devam ser definidos. A HQ se encaixa dentro destes compostos fenólicos, justamente por sua concentração ser elevada na fumaça do cigarro, por ser um agente ocupacional e por ser um metabólito ativo do BZ, onde possui reconhecida ação tóxica.

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a exposição de animais de experimentação à HQ, em condições onde não há comprometimento medular, causa inibição da resposta do organismo a agentes lesivos, quantificado pelo menor influxo leucocitário (MACEDO *et al.*, 2006, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007) Neste contexto, trabalho simultâneo a este projeto, tem mostrado que a exposição à HQ, por via sistêmica, similar à empregada no presente trabalho, reduz marcantemente a migração de leucócitos para o pulmão inflamado pelo LPS. No entanto, os mecanismos envolvidos neste efeito inibitório da HQ não estão esclarecidos.

### 2 Objetivos

Este trabalho foi delineado para investigar os efeitos da exposição *in vivo* à HQ sobre funções específicas de macrófagos alveolares e do tecido traqueal de camundongos Swiss machos envolvidas no recrutamento leucocitário, com o intuito de identificar possíveis mecanismos de ação tóxica deste composto.

#### 3 Material e Métodos

#### 3.1 Animais

Camundongos Swiss, machos, com peso entre 20-25g, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; Protocolo CEEA nº 196). Antes dos ensaios, os animais foram anestesiados pela injeção de cetamina (80mg/kg; Syntec<sup>®</sup>, Hortolândia, SP) associada à xilazina (8mg/kg, i.p.; Syntec<sup>®</sup>, Hortolândia, SP).

#### 3.2 Exposições

#### 3.2.1 Exposição à HQ

O esquema de exposição compreendeu a nebulização de solução de HQ (99%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) na concentração de 25ppm (1,5mg/60mL), na freqüência de 1mL/minuto, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Animais controles receberam volumes equivalentes do veículo (solução salina etanol 1:20) pela mesma via. Para tanto, 5 animais de cada vez foram acondicionados em uma caixa de exposição (Figura 3; volume total de 29L) dotada de 3 orifícios, um deles em um dos lados da caixa e dois na extremidade oposta. Pelo primeiro orifício, as soluções de HQ ou veículo foram nebulizadas utilizando um inalador ultrassônico (NS®, São Paulo, BR) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 e 10,0μm<sup>3</sup>. Os outros dois orifícios permitiram a saída de gases da caixa de acondicionamento. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão.



Figura 3: Figura ilustrativa da caixa de exposição acoplada ao nebulizador ultrassônico.

#### 3.2.2 Exposição ao LPS

Uma hora após a última exposição à HQ ou veículo, os animais foram ou não acondicionados em outra caixa de exposição, semelhante à utilizada para a inalação da HQ ou veículo, e uma solução de 100µg/mL de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS, sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO) foi nebulizada durante 10 minutos, na freqüência de 1mL/minuto. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão.

#### 3.3 Coleta do lavado broncoalveolar e quantificação de M $\Phi$ s

Uma hora após as últimas exposições à HQ ou veículo, ou três horas após a inalação de LPS, os animais foram anestesiado para a coleta do lavado broncoalveolar (LBA) que foi realizada de acordo com Tavares de Lima *et al.* (1998) e Bozinovski *et al.* (2004). A cavidade peritoneal foi exposta e realizada a exsanguinação pela aorta abdominal. Em seguida, a traquéia foi exposta e canulada (cânula de polietileno), onde foi acoplada uma seringa de 1mL contendo 500µL de Tampão Fosfato-Salino (PBS). O volume de PBS foi injetado no pulmão, que recebeu uma suave massagem, e aspirado na mesma seringa. O procedimento foi repetido 4 vezes até que o volume final coletado atingisse 2mL.

O LBA obtido foi centrifugado (15min, 600*g*, 4°C) e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior dosagens de mediadores inflamatórios. As células foram ressuspensas

em 1mL de meio RPMI acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (Vitrocell<sup>®</sup>, Campinas, SP) e seguiu-se com a quantificação de M $\Phi$ s. Para tanto, alíquotas da amostra foram diluídas em líquido de Türk (1:20) e observadas em câmara de Neubauer, por microscopia óptica comum.

#### 3.4 Ativação dos MΦs por LPS e IFN-γ in vitro

Após a coleta do LBA e quantificação dos M $\Phi$ s, 1x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados em placas de 24 poços, em meio RPMI 1640 (Vitrocell<sup>®</sup>, Campinas, SP) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Vitrocell<sup>®</sup>, Campinas, SP) a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> por 3 horas. Findo este período, os poços foram lavados com PBS para retirada de células não aderidas. Os M $\Phi$ s aderidos foram ou não estimulados com 5µg/mL de LPS e 10ng/mL de IFN- $\gamma$  (Recombinant Rat IFN- $\gamma$ , Thermo Scientific<sup>®</sup>, Waltham, MA) em volume final de 500µL de RPMI. As culturas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -22°C para quantificação de mediadores inflamatórios.

#### 3.5 Coleta da traquéia e ativação pelo LPS in vitro

Uma hora após as últimas exposições à HQ ou veículo, os animais foram anestesiados para coleta de fragmentos da traquéia e mortos por dessangramento da aorta abdominal. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta e a traquéia cuidadosamente removida e transportada para solução de PBS. A seguir, os segmentos da traquéia foram lavados com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco<sup>®</sup>, Grand Island, NY) suplementado com gentamicina (45µg/mL, Gibco<sup>®</sup>, Grand Island, NY). Posteriormente, os segmentos da traquéia foram transferidos para placas de 24 poços. Os tecidos foram ou não estimulados com 1µg/mL de LPS em volume final de 2mL de DMEM. As culturas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37<sup>o</sup>C por 24 horas. Após os períodos de incubação, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -22<sup>o</sup>C para quantificação de mediadores inflamatórios (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO *et al.*, 2006).

#### 3.6 Quantificação de mediadores inflamatórios

O LBA ou os sobrenadantes de cultura de M $\Phi$ s e da traquéia foram empregados para quantificação de mediadores inflamatórios (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, MCP-1, TNF- $\alpha$  e NO.

A quantificação da concentração de citocinas foi realizada por ELISA, utilizando kits comerciais e de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante destes kits. Os kits foram adquiridos das marcas BD Pharmingen, R&D Systems e eBiosciensce.

A concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi determinada no sobrenadante das culturas celulares utilizando a reação de Griess. Em resumo, 100µL dos sobrenadantes foram adicionados a 100µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida com 0,1% de α-naftil etilenodiamina; Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St Louis, MO). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (Power Wave x340, Bio-Tek<sup>®</sup>, Winooski, USA) com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (0,2-200µM).

#### 3.7 Expressão gênica de MCP-1 por RT-PCR

A fim de investigar o efeito da exposição à HQ sobre a expressão do RNA mensageiro (RNAm) para MCP-1 na traquéia obtida de animais expostos à HQ *in vivo* e incubadas *in vitro* com LPS 1µg/mL, foi realizado a reação de polimerização em cadeia. O RNA total foi isolado com o reagente Trizol (Invitrogen<sup>®</sup>, USA), de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. Em resumo, a transcrição reversa foi realizada utilizando 2µg de RNA e uma mistura dos seguintes reagentes: 20µg/mL de oligo(dT)<sub>15</sub>, 200U de transcriptase reversa de M-MLV (20mM de Tris-HCl, pH7,5, 200mM de NaCl, 0,1mM EDTA, 1mMDTT, 0,01% Nonidet<sup>®</sup> P-40 e 50% de glicerol), tampão de reação 5X (50mM Tris-HCl, pH 8,3, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub> e 2mM de DDT), 2mM dNTP em um volume final de 25µL. A reação foi incubada por 5 minutos a 70°C seguido por aquecimento a 42°C por 60 minutos. O cDNA foi armazenado a - 20°C até a realização do PCR.

Para a realização do PCR, 2,5µL de cDNA foram incubados com 2,5U de Taq DNA Polimerase, 0,5µL de 3' e 5'-*primers* específicos e 200µM de mistura de dNTP em tampão termofílico 5x (pH8,5) para DNA polimerase contendo 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>. As seguintes
sequencias de *primers* foram utilizadas:  $\beta_2$  microglobulina: 5´-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3´ (sense) 5´-AATGTGAGGCGGGTGGAACTG-3´ (antisense) e MCP-1: 5´-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3´ (sense) e 5´-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3´ (antisense). A temperatura de anelamento utilizada para o *primer* de MCP-1 foi de 57,6°C e para o *primer* de  $\beta_2$  microglobulina 54,2°C. O número de ciclos de amplificação foi 40 para ambos.

Os reagentes empregados na síntese do cDNA e na reação de PCR foram obtidos da Promega Corporation<sup>®</sup>, Madison, WI, USA.

#### 3.8 Quimiotaxia in vitro

A quimiotaxia *in vitro* foi realizada utilizando o modelo de câmara de Boyden. Para tanto, 1 x 10<sup>5</sup> células THP-1 (linhagem celular de leucemia humana aguda monocítica) foram acondicionadas ao compartimento superior da câmara, separadas do compartimento inferior por membranas de policarbonato com poros de 8µm (Millipore<sup>®</sup>, Billerica, USA). A migração das células THP-1 foi induzida preenchendo o compartimento inferior com 0,1 ng/mL e 0,9 ng/mL de MCP-1 recombinante de humano (eBioscience<sup>®</sup>, San Diego, EUA) associado a 10 µg/mL de LPS. A seguir, a câmara foi incubada a 37<sup>o</sup>C por 24 horas. Após este período, os filtros foram removidos e corados. A distância percorrida pelas células THP-1 pelo filtro foi quantificada por microscopia óptica comum (GOUWY *et al.,* 2009; MATOBA *et al.,* 2010).

#### 3.9 Reatividade da traquéia

Uma hora após a última exposição a HQ ou veículo, os animais foram anestesiados, exsanguinados pela aorta abdominal e, a seguir, o tórax foi aberto. A traquéia foi removida e o tecido conjuntivo adjacente foi retirado cuidadosamente. Anéis de segmento de traquéia íntegra ou traquéia que teve seu epitélio cuidadosamente removido através de uma cânula de polietileno foram montados para registro isométrico de contrações frente à estimulação colinérgica (metacolina). Para tanto, foi utilizado um sistema multicanal de tecido isolado (Powerlab<sup>®</sup>), acoplado a um sistema de aquisição, análise e estocagem de dados (Lab chart 7.01). Os segmentos de traquéia foram montados em cubas para órgão isolado (15mL) contendo solução de Krebs-Henseileit (NaCl, 115mM; KCl, 4,6mM; CaCl<sub>2</sub> 2.H<sub>2</sub>O, 2,5mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2mM; MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O, 2,5mM; NaHCO<sub>3</sub>, 25mM e glicose, 11mM) aerada com 95%

de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e aquecida a 37°C. Os tecidos foram expostos a uma carga inicial de 0,5g de tensão. Após o período de equilíbrio (30min), o tampão de Krebs-Henseileit foi substituído por uma solução de KCl despolarizante (60mM) para avaliação da viabilidade tecidual. Em seguida, a solução de KCl foi substituída novamente por tampão Krebs-Henseileit e a aplicação de metacolina foi iniciada para construção da curva concentração-efeito (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO *et al.,* 2006, 2010).

#### 3.10 Atividade fagocítica e fungicida de MΦs

Após a coleta do LBA e quantificação dos M $\Phi$ s, 2x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados em meio RPMI 1640 acrescido de 10% de soro fetal bovino sobre lamínula de vidro para aderência por 3 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>. Após este período, 1x10<sup>3</sup> do fungo *Candida albicans* foi adicionado para incubação por 24 horas nas mesmas condições. Em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado a -22°C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios e o número de M $\Phi$ s contendo fungos e o número de fungos no interior destas células foram quantificados por microscopia óptica. Assim, foi calculada a porcentagem de fagocitose e o índice de fagocitose, demonstrado pelas fórmulas:

### Porcentagem de fagocitose = <u>número de MΦs que fagocitaram pelo menos 1 fungo</u> x 100 número total de células contadas

#### Índice de fagocitose = Porcentagem de M $\Phi$ s que fagocitaram pelo menos 1 fungo

Х

#### média dos fungos no interior dos M $\Phi$ s

O mesmo procedimento experimental descrito acima foi realizado para determinação da atividade fungicida, ou seja,  $2x10^5$  M $\Phi$ s foram incubados com  $1x10^3$  *C. albicans* por 24 horas a  $37^{\circ}$ C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período, o sobrenadante foi coletado e estocado a -  $22^{\circ}$ C para posterior quantificação de mediadores inflamatórios e os poços foram lavados com PBS, para remoção dos fungos livres. Os M $\Phi$ s foram lisados com 1mL de água destilada gelada e estéril e uma alíquota diluída (1:200) foi semeada em ágar sabouraud. Após 24

horas de incubação em estufa a 30<sup>°</sup>C, as unidades formadoras de colônica (UFC) foram quantificadas (GIOULEKAS *et al.,* 2001; HAYAKAWA *et al.,* 2006).

# 3.11 Quantificação da expressão de receptores de superfície de M $\Phi$ s envolvidos na fagocitose por citometria de fluxo

Após coleta do LBA e quantificação dos MΦs, 2x10<sup>5</sup> MΦs aderidos em placas de 06 poços foram incubados com 1x10<sup>3</sup> *C. albicans* por 24 horas, para a quantificação da expressão de receptores de superfície envolvidos na fagocitose. Após a incubação, os poços foram lavados para remoção dos fungos livres e os MΦs aderidos foram removidos com auxílio de *cell scraper* para incubação com os anticorpos monoclonais anti-dectina-1-PE (anti-CLEC7A), anti-TLR4-PE (anti-CD284/MD-2) na diluição 1:100 por 45 minutos a 4°C na ausência de luz e com o anticorpo monoclonal anti-TLR2 na diluição 1:100 por 20 minutos a 4°C e após centrifugação, incubados por 30 minutos com o anticorpo secundário anti-rat IgG-FITC nas mesmas condições. As células foram analisadas no citômetro de fluxo. Os anticorpos foram adquiridos da marca R&D Systems (Minneapolis, USA).

# 3.12 Expressão de proteínas participantes das vias de sinalização intracelulares de M $\Phi$ s por *Western Blot*

As reações de *Western Blot* foram realizadas a partir de géis de poliacrilamida utilizando diferentes concentrações de proteína por poço de acordo com a proteína a ser estudada (25µg de proteína para MyD88). O lisado de proteínas utilizado foi obtido a partir de MΦs alveolares coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais, expostos ao veículo ou à HQ, ou seja, aproximadamente 8x10<sup>5</sup>/mL MΦs por amostra. Assim, o lisado de proteínas foi submetido à eletroforese em tampão de corrida a 300V e 50mA por 2 horas e 30 minutos. A transferência foi realizada em membrana de nitrocelulose aplicando-se uma corrente de 180mA por 1 hora e 30 minutos, em cuba de transferência. A confirmação da transferência foi realizada incubando-se a membrana com *Ponceau S*. Em seguinda, a membrana foi lavada com TBS-Tween 0,1% e bloqueada. A revelação foi realizada usando-se metodologia de quimioluminescência utilizando-se o luminol como substrato e a enzima peroxidase.

#### 3.12.1 *Western Blot* para MyD88

As reações de *Western Blot* para MyD88 foi realizada a partir de géis de poliacrilamida a 15% e transferidos para membranas de nitrocelulose. O bloqueio foi realizado em TBS-Tween 0,1% com 5% de caseína, durante 1 hora e 30 minutos. Após este período, a membrana foi lavada e foi adicionado o anticorpo primário anti-MyD88 (1:500) diluído em TBS-Tween 0,1% com 1% de caseína e mantida sob agitação, a 4°C, durante a noite. Após o período de incubação a membrana foi novamente lavada 6 vezes de 10 minutos com TBS-Tween 0,1%. Em seguida, foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG de cabra (1:3000) diluído em TBS-Tween 0,1% à membrana e incubada durante 2 horas sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente 6 vezes de 10 minutos com TBS-Tween 0,1% e revelada. Os anticorpos foram adquiridos da marca R&D Systems (Minneapolis, USA).

#### **3.12.2** Western Blot para β-actina

O blot foi realizado em gel de poliacrilamida 15% e transferido para membrana de nitrocelulose. A membrana foi lavada 3 vezes de 10 minutos com TBS-Tween (0,1%) a temperatura ambiente sob agitação, e em seguida foi incubada com anticorpo anti-β-actina conjugada com peroxidase na diluição 1:20000, por 45 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes de 10 minutos, sob agitação, e revelada.

#### 3.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média ± e.p.m. e foram analisados estatisticamente pelo Teste "t" de Student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prisma 5.0. Os valores obtidos foram considerados significativos quando P<0,05.

#### **4** Resultados

# 4.1 Efeitos da exposição *in vivo* à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no LBA

Os resultados apresentados a seguir foram obtidos em animais expostos ou não à HQ (25ppm; 1mL/min; 1h por dia; 5 dias) em condições basais ou de inflamação (LPS *in vivo*; 100µl/mL; 10min). É importante salientar que a exposição à HQ não alterou o número de leucócitos no LBA (Controles:  $7,5x10^5/mL \pm 0,7$ ; n=4 e HQ:  $8,2x10^5/mL \pm 1,6$ ; n=4), mas na vigência de inflamação, a exposição à HQ reduziu marcantemente a migração de leucócitos para o LBA, que refletiu reduções na mobilização de leucócitos polimorfonucleares (Controles:  $28,9x10^5/mL \pm 4,3$ ; n=19 e HQ:  $12,6x10^5/mL \pm 1,1$ ; n=19) e de mononucleares (Controles:  $14,2x10^5/mL \pm 3,8$ ; n= 14 e HQ:  $4,3x10^5/mL \pm 0,75$ ; n=14). Estes resultados foram obtidos durante o trabalho de Mestrado de André Luiz Teroso Ribeiro (comunicação pessoal).

#### 4.1.1 Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

A quantificação da concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> no LBA mostrou que a exposição à HQ não alterou a concentração do ânion em condições basais e na vigência de resposta inflamatória. Em todos os grupos experimentais, as concentrações de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foram equivalentes e não diferiram antes e após a indução de inflamação pelo LPS (Figura 4).



Figura 4: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de  $NO_2^-$  no LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, os animais foram expostos ou não ao LPS (100µg/mL;10 min) pela mesma via. O LBA foi coletado 1 hora após a última exposição à HQ ou ao veículo (basal) ou 3 horas após a indução da inflamação (LPS). O  $NO_2^-$  foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de  $NO_2^-$  no LBA obtido de 5-7 animais em cada grupo.

#### 4.1.2 Concentração de interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

Os resultados apresentados na Figura 5A mostram que a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-1 $\beta$  no LBA, na ausência ou presença de estimulação *in vivo* pelo LPS, em comparação aos animais que receberam o veículo, nestas mesmas condições. As concentrações encontradas não diferiram em animais expostos ao veículo ou à HQ em condições basais ou na vigência de estimulação pelo LPS.

#### 4.1.3 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

A exposição à HQ não alterou as concentrações de TNF- $\alpha$  no LBA em condições basais, nem mesmo após a estimulação pelo LPS. Vale ressaltar que a elevação na concentração de TNF- $\alpha$  no LBA após estimulação pelo LPS foi equivalente em animais controles ou expostos à HQ (Figura 5B).

#### 4.1.4 Concentração de interleucina-6 (IL-6)

A concentração de IL-6 no LBA dos animais, em condições basais, quer em condição de inflamação provocada pelo LPS, não foi alterada pela exposição à HQ (Figura 5C). O incremento na concentração desta citocina no LBA após inalação de LPS foi similar em animais controles ou expostos à HQ.

#### 4.1.5 Concentração de interleucina-12p70 (IL-12p70)

A concentração de IL-12p70 no LBA dos animais em condições basais não foi alterada pela exposição à HQ. Adicionalmente, após indução da inflamação, animais controles também não apresentaram alteração na concentração desta citocina. No entanto, animais expostos à HQ apresentaram concentrações menores de IL-12p70 no LBA após estímulo inflamatório (Figura 5D).



Figura 5: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 no LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, os animais foram expostos ou não ao LPS (100µg/mL;10 min) pela mesma via. O LBA foi coletado 1 hora após a última exposição à HQ ou ao veículo (basal) ou 3 horas após a indução da inflamação (LPS). A IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração destes mediadores no LBA obtido de 5-13 animais em cada grupo (\**P*<0,05 e \*\**P*<0,01 vs. respectivo controle basal; <sup>#</sup>*P*<0,05 vs. controle LPS).

#### 4.1.6 Concentração de interleucina-4 (IL-4)

Os resultados apresentados na Figura 6A mostram que em condições basais, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-4 no LBA, em relação aos animais que foram expostos ao veículo. Diferentemente, a indução da inflamação *in vivo* pelo LPS aumentou a concentração de IL-4 no LBA somente em animais controles (173,71%).

#### 4.1.7 Concentração de interleucina-10 (IL-10)

Os resultados apresentados na figura abaixo mostram que em condições basais, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no LBA. Por outro lado, após estimulação com LPS *in vivo*, apenas animais controles apresentaram aumento significativo na concentração de IL-10 no LBA (74,36%) (Figura 6B).



Figura 6: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de IL-4 e IL-10 no LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, os animais foram expostos ou não ao LPS ( $100\mu g/mL$ ;10 min) pela mesma via. O LBA foi coletado 1 hora após a última exposição à HQ ou ao veículo (basal) ou 3 horas após a indução da inflamação (LPS). A IL-4 e a IL-10 foram quantificadas por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de IL-4 no LBA obtido de 5-6 animais em cada grupo (\*p<0,05 vs. controle basal).

#### 4.1.8 Concentração de proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1)

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que a exposição à HQ não afetou a concentração de MCP-1. Ainda, a indução de inflamação não alterou a concentração desta quimiocina, neste período de reação inflamatória, em animais controles. Por outro lado, a concentração de MCP-1 foi significantemente menor (54,98% vs. controle inflamado) no LBA de animais expostos à HQ e estimulados pelo LPS em relação à concentração detectada nos respectivos grupos controles (Controle + LPS e HQ Basal).



Figura 7: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de MCP-1 no LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, os animais foram expostos ou não ao LPS ( $100\mu$ g/mL;10 min) pela mesma via. O LBA foi coletado 1 hora após a última exposição à HQ ou ao veículo (basal) ou 3 horas após a indução da inflamação (LPS). A MCP-1 foi quantificada por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de MCP-1 no LBA obtido de 7-8 animais em cada grupo (\*p<0,05 vs. controle basal; <sup>#</sup>P<0,05 vs. controle LPS).

#### 4.2 Efeitos da exposição *in vivo* à HQ sobre a atividade secretora de MΦs

A capacidade secretora de M $\Phi$ s alveolares foi avaliada em culturas de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ ou veículo e estimuladas *in vitro* pelo LPS e IFN- $\gamma$ .

#### 4.2.1 Efeito da exposição à HQ sobre o número de M $\Phi$ s no LBA

Os dados apresentados na Figura 8 mostram que o número de M $\Phi$ s obtidos do LBA de animais expostos à HQ não estava alterado em comparação ao número de M $\Phi$ s obtidos de animais que receberam o veículo.



Figura 8: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre o número de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e o número total de M $\Phi$ s foi quantificado em câmara de Neubauer por microscopia óptica comum. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. do número de M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido em 12 experimentos independentes.

#### 4.2.2 Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub>)

A Figura 9 mostra que a exposição à HQ não alterou a concentração de  $NO_2^-$  no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s de animais em condições basais. Já em condições de inflamação, a concentração de nitrito estava aumentada em animais controles e expostos à HQ. No entanto, em condições de inflamação, animais expostos à HQ apresentaram menores concentrações de  $NO_2^-$  em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s em comparação aos animais que receberam o veículo (Figura 9).



Figura 9: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 1x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados e estimulados ou não com LPS (5µg/mL) e IFN- $\gamma$  recombinante de rato (10ng/mL) por 24h. O NO<sub>2</sub><sup>-</sup> foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> secretado por M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido 4 vezes (\*\*\**P*<0,001 vs. controle basal; <sup>#</sup>*P*<0,001 vs. controle LPS+*IFN-\gamma*).

#### 4.2.3 Concentração de interleucina-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )

A Figura 10A mostra que não houve alteração na concentração de IL-1 $\beta$  no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ, em condições basais. Após indução de inflamação, houve aumento na concentração desta citocina no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos ao veículo e à HQ. Ainda, o aumento na concentração de IL-1 $\beta$  encontrado em animais expostos à HQ após a estimulação *in vitro* pelo LPS e IFN- $\gamma$  foi superior ao encontrado em animais que receberam o veículo.

#### 4.2.4 Concentração do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

A Figura 10B mostra que em condições basais, a concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ estava reduzida em relação aos valores encontrados em M $\Phi$ s obtidos de animais controles. Após estímulo inflamatório, houve aumento na concentração desta citocina no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s, tanto dos animais que receberam o veículo quanto dos que foram expostos à HQ.

#### 4.2.5 Concentração de interleucina-6 (IL-6)

A concentração de IL-6 no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ estava diminuída em condições basais em relação aos valores encontrados em células de animais expostos ao veículo. Por outro lado, após estímulo inflamatório, houve aumento equivalente na concentração desta citocina no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s proveniente de animais que receberam o veículo e HQ (Figura 10C).

#### 4.2.6 Concentração de interleucina-12p70 (IL-12p70)

A concentração de IL-12p70 no sobrenadante de cultura de MΦs obtidos de animais expostos à HQ não estava alterada em condições basais. Os valores encontrados foram equivalentes em células provenientes de animais expostos à HQ e ao veículo (Figura 10D). Por outro lado, após estímulo com LPS+IFN-γ, somente os animais expostos à HQ apresentaram concentrações aumentadas de IL-12p70 no sobrenadante de cultura de MΦs. Ademais, em condições inflamatórias, cultura de MΦs obtidos de animais expostos à HQ apresentaram maiores concentrações de IL-12p70 em relação aos animais que receberam o veículo.



Figura 10: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 1x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados e estimulados ou não com LPS (5µg/mL) e IFN- $\gamma$  recombinante de rato (10ng/mL) por 24h. A IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 foram quantificadas por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destas citocinas secretadas por M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido 5 vezes (\*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 vs. controle basal; \*P<0,05 vs. controle LPS+IFN- $\gamma$ ).

#### 4.2.7 Concentração de interleucina-10 (IL-10)

Em condições basais, sobrenadantes de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ apresentaram concentrações aumentadas de IL-10. Após estímulo inflamatório, houve aumento na concentração desta citocina no sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s de animais expostos ao veículo e à HQ. No entanto, a elevação na concentração da citocina foi marcantemente maior em cultura de células obtidas de animais expostos à HQ (Figura 11).



Figura 11: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 1x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados e estimulados ou não com LPS (5µg/mL) e IFN- $\gamma$  recombinante de rato (10ng/mL) por 24h. A IL-10 foi quantificada por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de IL-10 secretada por M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido 5 vezes (\*P<0,05 vs. controle basal; \*\*P<0,01 vs. controle LPS+IFN- $\gamma$ ).

#### 4.2.8 Concentração de proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1)

Sobrenadantes de cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ apresentaram concentrações reduzidas de MCP-1 na ausência de estimulação *in vitro* em comparação as concentrações encontradas em sobrenadantes de células provenientes de animais controles. Após estímulo pelo LPS+INF- $\gamma$ , a concentração de MCP-1 estava marcantemente aumentada em sobrenadantes de M $\Phi$ s de animais controles e de animais expostos à HQ, no entanto o aumento na concentração em culturas de células provenientes de animais expostos à HQ foi significantemente menor que a detectada em células de animais controles (Figura 12).



Figura 12: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de MCP-1 em sobrenadante de cultura de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 1x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados e estimulados ou não com LPS (5µg/mL) e IFN- $\gamma$  recombinante de rato (10ng/mL) por 24h. A MCP-1 foi quantificada por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de MCP-1 secretada por M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido 5 vezes (\*\**P*<0,01 e \*\*\**P*<0,001vs. controle basal; <sup>#</sup>*P*<0,001 vs. controle LPS+*IFN*- $\gamma$ ).

# 4.3 Efeitos da exposição *in vivo* à HQ sobre a capacidade secretora do tecido traqueal

A traquéia foi coletada de animais expostos à HQ ou ao veículo e mantida em cultura para avaliar os efeitos das exposições sobre a capacidade de suas células secretarem mediadores inflamatórios.

#### 4.3.1 Concentração de nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)

A Figura 13 mostra que a concentração de nitrito em sobrenadante de cultura de traquéia de animais expostos à HQ não estava alterada em condições basais. Após estimulação *in vitro* pelo LPS, a concentração de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> estava aumentada no sobrenadante de cultura de traquéia tanto de animais que receberam o veículo ou expostos à HQ.



Figura 13: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de  $NO_2^-$  em sobrenadante de cultura de traquéia obtido de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, as traquéias foram removidas, mantidas em meio DMEM suplementado com gentamicina (45µg/mL) e estimuladas ou não com 1µg/mL de LPS em volume final de 2mL por 24h. O  $NO_2^-$  foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de  $NO_2^-$  secretado pela traquéia de 15 animais em cada grupo (\**P*<0,05 vs. controle basal).

#### 4.3.2 Concentração de fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )

A Figura 14A mostra que a concentração de TNF-α no sobrenadante de cultura de traquéia estava aumentada em condições basais nos animais que foram expostos à HQ. Após a estimulação *in vitro* pelo LPS, somente cultura de tecido traqueal de animais que receberam o veículo apresentaram aumento da concentração desta citocina no sobrenadante.

#### 4.3.3 Concentração de interleucina-6 (IL-6)

Em condições basais, a concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de traquéia de animais expostos à HQ não estava alterada. Já em condições inflamatórias, houve aumento na concentração da citocina em sobrenadante de cultura de traquéia de animais expostos ao veículo e à HQ (Figura 14B).



Figura 14: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de TNF- $\alpha$  e IL-6 em sobrenadante de cultura de traquéia obtido de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, as traquéias foram removidas, mantidas em meio DMEM suplementado com gentamicina (45µg/mL) e estimuladas ou não com 1µg/mL de LPS em volume final de 2mL por 24h. O TNF- $\alpha$  e de IL-6 foram quantificados por ELISA. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração de TNF- $\alpha$  e de IL-6 secretados pela traquéia obtida de 9 ou 5 animais em cada grupo, respectivamente (\**P*<0,05; \*\**P*<0,01 vs. controle basal).

#### 4.3.4 Concentração de interleucina-10 (IL-10)

A Figura 15 mostra que em condições basais, a concentração de IL-10 não estava alterada no sobrenadante de cultura de traquéia de animais expostos à HQ, já valores semelhantes de concentração desta citocina foram detectados em cultura do tecido proveniente de animais expostos ao veículo ou à HQ. Após estímulo *in vitro* pelo LPS, a concentração de IL-10 estava aumentada no sobrenadante de cultura de traquéia dos animais que receberam tanto o veículo quanto a HQ.



Figura 15: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de IL-10 em sobrenadante de cultura de traquéia obtido de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, as traquéias foram removidas, mantidas em meio DMEM suplementado com gentamicina ( $45\mu g/mL$ ) e estimuladas ou não com  $1\mu g/mL$  de LPS em volume final de 2mL por 24h. A IL-10 foi quantificada por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de IL-10 secretada pela traquéia obtida de 5 animais em cada grupo (\**P<0,05 vs. controle basal*).

#### 4.3.5 Concentração de proteína quimiotáxica de monócitos (MCP-1)

A concentração de MCP-1 no sobrenadante de cultura de traquéia de animais que foram expostos à HQ não estava alterada na ausência de estímulo inflamatório. Valores similares foram encontrados em culturas de tecidos obtidos de animais expostos ao veículo ou à HQ. Por outro lado, após estímulo inflamatório, a concentração desta citocina estava aumentada somente no sobrenadante de cultura de tecidos de animais que receberam o veículo (Figura 16).



Figura 16: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a concentração de MCP-1 em sobrenadante de cultura de traquéia obtido de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, as traquéias foram removidas, mantidas em meio DMEM suplementado com gentamicina ( $45\mu g/mL$ ) e estimuladas ou não com  $1\mu g/mL$  de LPS em volume final de 2mL por 24h. A MCP-1 foi quantificada por ELISA. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da concentração de MCP-1 secretada pela traquéia obtida de 5 animais em cada grupo (\*\**P*<0,01 vs. controle basal; \*\*\**P*<0,001 vs. controle LPS).

### 4.3.5.1 Efeito da exposição in vivo à HQ sobre a expressão gênica de MCP-1

#### pela traquéia

Do exposto na Tabela 1, é possível supor que a MCP-1 seja um mediador inflamatório envolvido na toxicidade da exposição *in vivo* à HQ e, desta forma, ensaios adicionais foram realizados para verificar o mecanismo de ação da HQ sobre a secreção da MCP-1 e o efeito das diferenças de concentrações desta quimiocina encontrada em animais expostos ao veículo e à HQ sobre a migração leucocitária.

	LBA		MACRÓFAGOS		TRAQUÉIA	
	Basal	LPS	Basal	LPS	Basal	LPS
ΙL-1β	=	=	=	1	Não determinado	Não determinado
TNF-α	=	=	•	=	1	=
IL-6	=	=	•	=	=	=
IL-12p70	=	↓	=	1	Não determinado	Não determinado
MCP-1	=	¥	►	►	=	►
IL-4	=	=	Não determinado	Não determinado	Não determinado	Não determinado
IL-10	=	=	1	1	=	=
NO	=	=	=	¥	=	=

Tabela 1: Resumo das alterações causadas na secreção de citocinas após exposição in vivo à HQ.

Para investigar se a diminuição da concentração de MCP-1 pela traquéia em animais expostos à HQ era decorrente de alterações na sua síntese, a expressão gênica de MCP-1 foi quantificada por reação de RT-PCR. Os dados obtidos mostram que a exposição à HQ diminuiu a concentração de RNAm para MCP-1 na traquéia (Figura 17A). A Figura 17B, mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm de MCP-1.





Figura 17: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão gênica de MCP-1 pela traquéia de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na frequência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, as traquéias foram removidas, e o RNAm foi extraído com reagente Trizol<sup>®</sup>. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para MCP-1. (A) Os resultados expressam a média ± e.p.m. de 3 traquéias de diferentes animais em cada grupo. A linha tracejada indica os valores basais do RNAm de MCP-1 em traquéia de animais não expostos à HQ ou LPS. (B) Figura representativa da eletroforese em gel de agarose. *(\*P<0.05 vs. controle LPS)*.

#### 4.4 Efeito da MCP-1 na quimiotaxia de células mononucelares in vitro

As células THP-1 foram incubadas em câmara de Boyden e a distância percorrida por estas células frente a diferentes estímulos foi mensurada através de um filtro de policarbonato com poros de 8µm. A estimulação com LPS 10µg/mL não induziu a migração de THP-1 (Figura 18). Por outro lado, a associação MCP-1 0,9ng/mL com LPS, aumentou a migração das células pelo filtro, o que não aconteceu quando a concentração de MCP-1 utilizada foi menor, 0,1ng/mL. É importante ressaltar que as concentrações escolhidas de MCP-1 foram equivalentes às encontradas no sobrenadante da cultura de traquéia de animais expostos ao veículo (0,9 ng/mL) e à HQ (0,1 ng/mL) (Figura 16).



LPS 10µg/mL

Figura 18: Efeito da MCP-1 associado ao LPS sobre a quimiotaxia de células THP-1. A migração foi quantificada após 24 horas de incubação em câmara de Boyden. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da distância percorrida pelas células THP-1 em membranas de policarbonato com poros de 8µm (n=3-4) (\*\*\*p<0,001 vs. RPMI; <sup>#</sup>p<0,05 vs. MCP-1 0,9ng/mL).

#### 4.5 Efeitos da exposição in vivo à HQ sobre a reatividade da traquéia

Animais expostos ao veículo ou à HQ tiveram a traquéia removida para determinação da resposta contrátil frente estimulação colinérgica. Os dados obtidos na Figura 19 mostram que a traquéia integra (+ epi) de animais expostos à HQ apresentaram hiperresponsividade em resposta a uma curva dose-resposta de metacolina (10<sup>-6</sup>M a 10<sup>-3</sup>M). Por outro lado, após remoção mecânica do epitélio da traquéia (- epi), este efeito foi revertido (Figura 20). A Figura 21 mostra uma foto representativa de uma traquéia íntegra e uma traquéia que teve o epitélio removido, obtidas após os ensaios de reatividade.



Figura 19: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a reatividade da traquéia íntegra obtida de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, a traquéia foi cuidadosamente removida e acoplada em um sistema para determinação de sua capacidade contrátil frente à metacolina. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da reatividade da traquéia obtida de 7 animais (\**p*<0,05 vs. controle).



Figura 20: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a reatividade da traquéia obtida de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, a traquéia foi removida e teve seu epitélio cuidadosamente extraído para posterior determinação de sua capacidade contrátil frente à metacolina. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da reatividade da traquéia obtida de 7 animais (\**p*<0,05 vs. HQ + epi).



Figura 21: Foto representativa da traquéia íntegra (A) e da traquéia sem epitélio (B). Coloração Hematoxilia-Eosina. Foto obtida em aumento de 20x em microscópio óptico comum.

### 4.6 Efeito da exposição *in vivo* à HQ sobre a atividade fagocítica e fungicida de MΦs

#### 4.6.1 Efeito da exposição à HQ sobre a atividade fagocítica de M $\Phi$ s

A atividade fagocítica de M $\Phi$ s foi avaliada pela quantificação da porcentagem de fagocitose (número de M $\Phi$ s que fagocitaram pelo menos um fungo) e do índice de fagocitose (número de fungos por M $\Phi$ ).

M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos expostos à HQ apresentaram aumento da porcentagem de fagocitose frente à *C. albicans* (36,30%) em relação aos M $\Phi$ s de animais expostos ao veículo (Figura 22A). Ainda, os dados obtidos na Figura 22B mostraram que os M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ possuíam maior índice de fagocitose (83,97%), uma vez que um número maior de fungos foi encontrado no interior destas células. A Figura 23 ilustra os M $\Phi$ s e *C. albicans* observados em microscopia óptica comum.



Figura 22: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a atividade fagocítica de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 2x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados com 1x10<sup>3</sup> *C. albicans* por 24h. O número de M $\Phi$ s que apresentavam pelo menos um fungo em seu interior e os de fungos no interior dos M $\Phi$ s foram quantificados por microscopia óptica comum e, assim, calculado a porcentagem de fagocitose e o índice de fagocitose. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de fagocitose e do índice de fagocitose de M $\Phi$ s coletados do LBA obtido do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido em 8 experimentos independentes (*\*P<0,05 e \*\*P<0,01 vs. controle*).



Figura 23: Foto ilustrativa de MΦs alveolares obtidos do LBA de camundongos Swiss machos, expostos ao veículo (A) ou à HQ 25ppm (B), para determinação da atividade fagocítica. 1. MΦs 2. Leveduras de *C. albicans* 3. Hifas de *C. albicans*. 4. MΦs contendo leveduras de *C. albicans* em seu interior. Foto obtida em aumento de 40x em microscópio óptico comum.

#### 4.6.2 Efeito da exposição à HQ sobre a atividade fungicida de MΦs

A atividade fungicida de M $\Phi$ s foi determinada pela quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) crescente em meio Ágar Sabouraud. Os dados apresentados na Figura 24A mostram que fungos provenientes da cultura de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos à HQ formaram menores quantidades de UFC (68,47%) que fungos provenientes de M $\Phi$ s obtidos de animais expostos ao veículo. Já a figura 24B, ilustra as UFC crescentes em meio Ágar Sabouraud após lise dos M $\Phi$ s de animais expostos ao veículo (1) e à HQ (2), incubados previamente com *C. albicans*.



Figura 24: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a atividade fungicida de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado, 2x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados com *C. albicans* por 24h e após a lise destas células, semeados em ágar Sabouraud por 24h, para quantificação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). (A) Os resultados expressam a média ± e.p.m. do número de UFC crescente em ágar Sabouraud de M $\Phi$ s provenientes de *pool* de 5 animais em cada grupo, repetido em 6 experimentos independentes (\**P*<0,05 vs. controle). B) Foto ilustrativa de UFC de *C. albicans* em cultura de ágar Sabouraud, obtidas através da lise de M $\Phi$ s alveolares de LBA de camundongos Swiss machos após incubação com *C. albicans* e, previamente expostos ao veículo (1) ou à HQ 25ppm (2), para determinação da atividade fungicida.

# 4.6.3 Efeito da exposição *in vivo* à HQ sobre a expressão de receptores envolvidos na fagocitose por M $\Phi$ s alveolares

A expressão dos receptores *toll like* 2 (TLR2) e 4 (TLR4) e da dectina-1 foram avaliadas em MΦs alveolares obtidos do LBA de animais expostos ao veículo e à HQ na presença ou ausência de *C. albicans*, por citometria de fluxo. Os dados apresentados na Figura 25A e 25B mostram que, em condições basais, a exposição à HQ não alterou a porcentagem de células marcadas para dectina-1 e TLR-4. Por outro lado, após estimulação com *C. albicans in vitro*, tanto animais expostos ao controle quanto animais expostos à HQ apresentavam maior porcentagem de células marcadas para estes receptores em relação aos MΦs sem estimulação. Por outro lado, a expressão do receptor TLR2 não estava alterada em MΦs obtidos de animais expostos à HQ ou veículo, antes ou após incubação com *C. albicans* (Figura 25C).



Figura 25: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão de receptores de superfície envolvidos com a fagocitose de M $\Phi$ s obtidos do LBA de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e 2x10<sup>5</sup> M $\Phi$ s foram incubados com 1x10<sup>3</sup> *C. albicans* por 24 horas. Após este período, os fungos não fagocitados foram descartados e os M $\Phi$ s aderidos foram removidos com auxílio de *cell scraper* para incubação com anticorpos anti-TLR4-FITC, anti-dectina-1-FITC na diluição de 1:100 a 4°C por 45 min, e com anti-TLR2-PE por 20 minutos. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da porcentagem de células marcadas após serem obtidas do *pool* de 5 animais em cada grupo repetido em 4 experimentos independentes.

### 4.6.4 Efeito da exposição *in vivo* à HQ sobre a expressão de MyD88 por MΦs alveolares

Com o intuito de investigar se a exposição à HQ poderia afetar as vias intracelulares de ativação dos MΦs, MΦs alveolares foram coletados do LBA de animais expostos ao veículo ou HQ e ensaios de Western blot foram realizados. A Figura 26A indica que a exposição *in vivo* à HQ diminuiu a expressão protéica da MyD88 em MΦs alveolares obtidos do LBA de animais expostos à HQ. A Figura 26B indica uma representação ilustrativa da membrana de nitrocelulose utilizada para realização da reação de Western Blot.



Figura 26: Efeito da exposição *in vivo* à HQ (25ppm) ou ao veículo (solução etanol salina 1:20) sobre a expressão de MyD88 em M $\Phi$ s alveolares de camundongos Swiss machos. As exposições foram realizadas na freqüência de 1mL/min, por 1 hora, uma vez ao dia, durante 5 dias. Uma hora após a última exposição, o LBA foi coletado e os M $\Phi$ s alveolares foram utilizados para determinação da expressão de MyD88 por Western Blot. (A) Os resultados expressam a média  $\pm$  e.p.m. da expressão de MyD88 por M $\Phi$ s alveolares obtidos do *pool* de 5 animais repetido 3 vezes. (B) imagem representativa da membrana de nitrocelulose utilizada para determinar a expressão de MyD88 por WB em M $\Phi$ s alveolares. (*\*P<0.05 vs. controle*).

#### 5 Discussão

Trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento intraperitoneal (i.p.) de ratos Wistar, machos, com HQ, nas concentrações de 5, 10 e 50mg/kg/dia por 24 dias, com intervalos de 2 dias, a cada 5 dias de tratamento, acarretou prejuízo na migração de leucócitos para o pulmão na vigência de uma inflamação alérgica ou não-específica. Esta exposição não causou efeitos tóxicos no tecido hepático ou renal, além de não alterar a produção de células brancas e vermelhas pela medula óssea (MACEDO et al., 2006, 2007 e FERREIRA et al., 2007). Este último dado é muito instigante, uma vez que a literatura demonstra claramente que a exposição tóxica ao BZ leva a prejuízos acentuados à mielopoiese e que este efeito é decorrente da ação de compostos gerados pela metabolização endógena deste solvente, entre os quais a HQ (KETTLE; WINTERBOURN, MEDINSKY; KENYON; SCHLOSSER, 1995; SNYDER 2002; SNYDER 1992; 2004). Adicionalmente, dados de estudos in vitro mostram a ação tóxica da HQ sobre diferentes células da medula óssea (STILLMAN; VARELLA-GARCIA; IRONS, 2000; KERZIC et al., 2003; CHEN et al., 2004; BIRONAITE et al., 2004; YANG et al., 2006; HIRABAYASHI; INOUE, 2010). Se associadas aos dados da literatura, nossas observações sugerem que os parâmetros biológicos para avaliação do risco à exposição ao BZ ou à HQ podem não estar devidamente adequados e vão ao encontro à revisão mais recente de McGregor (2007), que salienta que a toxicidade da HQ pode estar subestimada, justamente pela falta de estudos experimentais.

Neste contexto, temos investigado esta hipótese e os mecanismos de ação envolvidos nos efeitos tóxicos por nós detectados, a fim de estabelecer possíveis indicadores de efeito mais precisos e precoces nas intoxicações. No decorrer dos estudos, duas preocupações têm sido iminentes: a via de exposição que mais se assemelha à exposição humana e a menor dose e frequência de exposição tóxica.

Assim, nossas investigações atuais buscam avaliar se os efeitos tóxicos por nós observados na exposição i.p. de HQ também são induzidas após exposição à HQ encontrada no meio ambiente, o que pode levar à sua absorção pelas vias aéreas, dérmica e oral, mimetizando a exposição humana ambiental e ocupacional. Para determinar o tempo e a concentração desta exposição, usamos como base os limites estabelecidos por órgãos competentes e as encontradas na literatura.

Assim, para os projetos atuais foi estabelecido o período de exposição de 5 dias, 1 hora ao dia, e a concentração de 12,5ppm (0,75mg/60mL); 25ppm (1,5mg/60mL) ou 50ppm (3,0mg/60mL) de HQ dispersa no ar, em um volume de 29L. Este delineamento experimental compreende período de tempo considerado curto e intervalo de concentrações semelhantes ou até menores que as preconizadas e utilizadas na literatura.

Para se determinar a concentração de HQ presente no interior da caixa de exposição utilizada foi realizada a quantificação de HQ presente em filtro de éster de celulose, o qual foi posicionado no interior da caixa de exposição. Este procedimento, realizado em colaboração com a Fundacentro, seguiu o protocolo estabelecido pela NIOSH (Protocolo nº5004, 1994). Assim, inferimos que a solução inicial de HQ a 25ppm, escolhida para este trabalho, se dispersa no ambiente onde os animais são mantidos para exposição e, após 1 hora, atinge concentração no interior da caixa de exposição de 0,20mg/m<sup>3</sup> ± 0,09, equivalente a 0,04ppm. É possível, então, inferir, que os animais possam estar expostos diariamente a concentrações menores que as preconizadas (TWA =  $2mg/m^3$ , equivalente a 0,44ppm) (RIBEIRO *et al.*, submetido para publicação).

Assim, nestas condições de exposição à HQ observou-se inibição do influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) para o pulmão após indução da resposta inflamatória ao LPS, veiculado também no meio ambiente. É importante ressaltar que a exposição à HQ não alterou o número de leucócitos circulantes no sangue dos animais inflamados ou não, corroborando, assim, que nossos protocolos de exposição à HQ não afetam, numericamente, a produção e mobilização de leucócitos da medula óssea para a corrente sanguínea (RIBEIRO *et al.*, submetido para publicação). Desta forma, o presente trabalho visou elucidar os mecanismos envolvidos na ação da HQ sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão inflamado, focando na capacidade de células presentes no trato respiratório secretar mediadores inflamatórios envolvidos neste processo.

O ponto de partida foi mensurar a concentração de mediadores inflamatórios no LBA. Os dados iniciais mostraram que a exposição à HQ não afetou a concentração de NO e IL-1β no LBA. Estes resultados não corroboram a literatura, uma vez que tem sido mostrado que o tratamento com HQ inibe a conversão proteolítica da pré-IL1β a IL-1β e diminui a secreção desta citocina em sobrenadantes de diferentes tipos celulares (NICULESCU *et al.,* 1995; OUYANG *et al.,* 2000). Adicionalmente, está bem estabelecido que a HQ inibe a produção de NO por diferentes mecanismos, entre os quais, pela inibição da expressão protéica e da atividade da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (KIM et al., 2005; CHO, 2008; HEBEDA et al., submetido para publicação). No entanto, estes resultados foram obtidos em ensaios in vitro, inferindo somente a ação da HQ sobre um tipo celular, sem contar com ativação/inibição de demais componentes endógenos, que deve ocorrer após a exposição sistêmica à HQ. Outro ponto que deve ser ressaltado, é que a etapa do processo inflamatório escolhida para quantificação destes mediadores pode não ter sido a mais adequada, mesmo porque não houve modificação nas concentrações destas citocinas no LBA de animais controles antes e após a indução da inflamação. Os dados obtidos em animais controles não refletem ausência de inflamação, uma vez que o número de leucócitos no LBA foi aumentado cerca de quatro vezes. Ainda, reforçando que o protocolo de exposição ao LPS foi adequado para indução da inflamação, as concentrações de IL-6 e TNF- $\alpha$  estavam aumentadas no LBA 3 horas após a exposição ao LPS em todos os grupos de animais estudados. Em conjunto, os resultados obtidos mostram que a exposição à HQ, in vivo, não afeta a secreção das citocinas proinflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e do NO pelos diferentes tipos de células presentes no pulmão na vigência de resposta inflamatória aguda. Da mesma forma que para o NO e a IL-1 $\beta$ , a literatura mostra que a exposição *in vitro* à HQ inibe a produção de TNF-α por células MN humanas e PMN de ratos (OUYANG et al., 2000; HEBEDA et al., submetido para publicação).

Diferentemente, verificamos que a exposição *in vivo* à HQ inibiu a secreção das citocinas proinflamatórias MCP-1 e IL-12 no LBA após a exposição ao LPS. A inibição da secreção de MCP-1 e IL-12 podem auxiliar na elucidação do efeito inibitório sobre o recrutamento leucocitário, já que a MCP-1 é uma quimiocina ativadora de monócitos, reguladora da expressão de moléculas de adesão e da quimiotaxia (MELGAREJO *et al.*, 2009; DESHMANE *et al.*, 2009; YADAV; SAINI; ARORA, 2010) e a IL-12 induz a migração de linfócitos T CD3+ e polimorfonucleares, mas não de monócitos e outros tipos de células T. (ALLAVENA *et al.*, 1994; PEARLMAN *et al.*, 1997; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2010). Por outro lado, poder-se-ia esperar que a exposição à HQ pudesse provocar a secreção de citocinas anti-inflamatórias, reduzindo, assim, o recrutamento leucocitário. No entanto, os dados obtidos mostraram que a exposição à HQ não alterou as concentrações de IL-4 e IL-10 no LBA após ação do LPS.

Desta forma, os dados das concentrações de citocinas no LBA sugerem que a exposição à HQ *in vivo* comprometeu somente a secreção de MCP-1 e IL-12 e, desta forma, este composto fenólico pode atuar especificamente em células presentes no tecido

pulmonar, por vias intracelulares distintas. Com base na complexa rede de sinalização intracelular induzida pelo LPS, que culmina com a secreção de citocinas, e os dados obtidos neste trabalho, fica difícil sugerir possíveis vias de inibição/ativação da HQ. Desta forma, no delineamento seguinte do trabalho, a elucidação do tipo celular no tecido pulmonar alvo de ação da HQ passou a ser objeto de estudo.

Como já salientado na Introdução, o tecido pulmonar é composto por uma variedade de células que estão aptas a responder aos estímulos agressivos (GEISER, 2002; DELCLAUX; AZOULAY, 2003; GWINN; VALLYATHAN, 2006; AZAD; ROJANASAKUL; VALLYATHAN, 2008; SUZUKI; CHOW; DOWNEY, 2008; MORRISEY; HOGAN, 2010). Neste contexto, salientamos que os M $\Phi$ s são células importantes, pois, ao exercerem suas atividades secretoras e de reconhecimento de patógenos, conduzem a resposta do organismo, que tem como objetivo a eliminação do agente agressor.

A exposição *in vivo* à HQ não alterou o número de MΦs residentes no LBA. Esta observação é importante, uma vez que a exposição ao agente fenólico foi realizada durante 5 dias, tempo este suficiente para induzir a migração de monócitos do sangue circulante e sua diferenciação em MΦs residentes, ou mesmo para induzir os processos de morte celular, se este fosse o caso, mesmo porque a literatura descreve que a exposição à HQ *in vitro* induz apoptose em diferentes tipos celulares, entre os quais os MΦs (ROSS *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2009).

Apesar da exposição à HQ não alterar o número de M $\Phi$ s residentes, a análise do seu perfil secretor mostrou que a exposição à HQ diminuiu a secreção basal das citocinas proinflamatórias MCP-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e elevou a secreção da citocina anti-inflamatória IL-10. Em condição de inflamação, a inibição da secreção de MCP-1 e da indução da secreção de IL-10 foi ainda mais evidenciada, sugerindo que estas citocinas são alvos de ação da exposição à HQ *in vivo*. Adicionalmente, detectou-se redução na produção de NO e aumento marcado na secreção de IL-12 e IL-1 $\beta$ . Em conjunto, estes dados mostram claramente que a atividade secretora dos M $\Phi$ s residentes alveolares é afetada pela exposição *in vivo* à HQ. A despeito da HQ e do próprio BZ serem componentes importantes do cigarro, os estudos da ação destes sobre M $\Phi$ s alveolares ainda são escassos, em especial com M $\Phi$ s isolados após exposições *in vivo*, como foi realizado neste trabalho. A literatura mostra uma série de trabalhos realizados após exposições *in vitro* com HQ ou BZ em M $\Phi$ s isolados da medula óssea ou em linhagens celulares (MACEACHERN; SNYDER; LASKIN, 1992; KALF; O`CONNOR 1993; LÉVAY; ROSS; BODELL, 1993; MILLER *et al.*, 1994; ROSS et al., 1996; VAN DEN HEUVEL; SCHOETERS; LEPPENS, 1997; THOMAS *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; CHO, 2008). Somente Pryor e colaboradores (1998) mostraram que a exposição *in vitro* à HQ obtida de amostras de cigarros causou danos ao DNA em M $\Phi$ s alveolares de ratos, dependente de estresse oxidativo.

Os trabalhos da literatura citados acima, embora conduzidos em diferentes condições de exposição à HQ *in vitro*, corroboram o efeito inibitório deste agente fenólico sobre a secreção de citocinas proinflamatórias e sobre a produção de NO. No entanto, diferem quanto à secreção da IL-12, da IL-1 $\beta$  e da citocina anti-inflamatória IL-10 (KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007). Desta forma, é possível que os aumentos nas secreções destas citocinas em nosso delineamento experimental não sejam dependentes de ação *per se* da HQ, mas sim de outros componentes endógenos que sejam ativados/inibidos pela ação *in vivo* da HQ.

A literatura tem demonstrado a utilização da cultura da traquéia como modelo para quantificar mediadores inflamatórios, principalmente em caso de exposição a agentes químicos presentes no ambiente (FERNANDES; HUBBARD; UNDEM, 1994; TREZENA, *et al.*, 2003; MALAVIA *et al.*, 2009; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO *et al.*, 2010). Apenas alguns poucos estudos mostram o efeito da HQ sobre outras funções traqueais em modelos animais, como na contração-relaxamento (ILHAM; SAHIN, 1986; GÜC; ILHAN; KAYAALP, 1988; HOBBS; TUCKER; GIBSON, 1991). Estes ensaios foram realizados pela incubação *in vitro* do tecido com a HQ e o mecanismo sugerido para o relaxamento induzido pelo agente fenólico foi a ação *scavenger* de NO, com conseqüente formação de peronixitrito (HOBBS; TUCKER; GIBSON, 1991). No entanto, ainda não há dados mostrando os efeitos da exposição à HQ sobre a secreção de mediadores inflamatórios pelas células presentes na traquéia.

O tecido traqueal é composto por mastócitos, histiócitos, células epiteliais, fibroblastos, glândulas traqueais e músculo liso (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999; TEN HALLERS *et al.*, 2004). Em conjunto, estas células secretam importantes mediadores inflamatórios, o que nos levou a quantificar, após a exposição à HQ, a concentração de substâncias químicas endógenas no sobrenadante de cultura de traquéia frente à estimulação pelo LPS *in vitro*. Os dados encontrados neste trabalho mostram que a exposição à HQ *in vivo* não alterou as concentrações das citocinas IL-6, IL-10 e do NO em sobrenadantes de cultura da traquéia em

condições basais, nem afetou suas secreções após estimulação pelo LPS *in vitro*. Por outro lado, a concentração de MCP-1 após a incubação com LPS foi marcantemente inibida em tecido proveniente de animais expostos à HQ, que foi dependente da menor expressão gênica. Interessantemente, a exposição à HQ *in vivo* estimulou a concentração da citocina proinflamatória TNF- $\alpha$ , em condições basais, mas não após a estimulação pelos LPS. É importante salientar que as concentrações de IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-4 não foram detectáveis em nossas condições experimentais mesmo em animais controles.

Se analisados em conjunto, os dados obtidos no presente trabalho mostram que a exposição à HQ *in vivo* afeta a capacidade de células do trato respiratório secretarem mediadores inflamatórios. Entre todas as citocinas estudadas, a concentração de MCP-1 estava reduzida no LBA e nos sobrendantes de MΦs e de tecido traqueal provenientes de animais expostos à HQ. Adicionalmente, foi demonstrado que a HQ controla a expressão gênica da MCP-1 no tecido traqueal. A expressão gênica de MCP-1 não foi quantificada em MΦs alveolares residentes, uma vez que o número de células obtidos do LBA não foi suficiente para obter material genético necessário para o ensaio de biologia molecular. Ainda, dados não mostrados neste trabalho, mas obtidos em nosso laboratório, mostraram que a HQ exerce efeito direto sobre a produção de MCP-1, já que o mesmo efeito foi observado em MΦs ou tecido traqueal incubados *in vitro* com HQ e subsequentemente estimulados *in vitro* pelo LPS. Resultados recentes da literatura indicam que neutrófilos de humanos tratados com 50µM de HQ por 9 ou 12h secretaram menores concentrações de MCP-1, ao contrário de eosinófilos, que no mesmo delineamento experimental secretaram concentrações mais elevadas de MCP-1 (YANG *et al.,* 2010).

Como já salientado na Introdução, a MCP-1 é uma quimiocina secretada pelas células endoteliais, células epiteliais, fibroblastos, células do músculo liso vascular, monócitos e M $\Phi$ s. Dentre a grande diversidade de ações da MCP-1, é um agente ativador de monócitos *in vitro*, capaz de induzir o fluxo intracelular de cálcio, regular a expressão de moléculas de adesão e a quimiotaxia (MELGAREJO *et al.*, 2009; DESHMANE *et al.*, 2009; YADAV; SAINI; ARORA, 2010). Já foi descrito anteriormente que o protocolo de exposição *in vivo* à HQ aqui realizado, reduz a migração de leucócitos mononucleares para o pulmão inflamado pelo LPS. Desta forma, foi hipotetizado se a menor concentração de MCP-1 no LBA poderia contribuir para migração ineficiente de células mononucleares observada *in vivo*. De fato, o LPS por si só não foi capaz de induzir a quimiotaxia *in vitro* de células mononucleares THP-1, mas a

associação de MCP-1 induziu migração celular, relacionada à dose. A migração frente a concentrações de MCP-1 obtidas em culturas de traquéia de animais expostos à HQ foi menor que a provocada pela concentração de MCP-1 obtida em sobrenadante de tecido obtido de animais controles. Vale ressaltar que a literatura recente mostrou o sinergismo da MCP-1 e alguns estímulos inflamatórios, como citocinas, fMLP e LPS na motilidade de células THP-1 (GOUWY *et al.*, (2010).

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho relacionados à capacidade de secreção de células pulmonares após exposição *in vivo* à HQ mostram a ação efetiva deste agente fenólico sobre estas atividades celulares. Ainda, a secreção de MCP-1 é, efetivamente, reduzida pela ação da HQ e que esta pode ser um mecanismo envolvido na menor migração de células mononucleares para o pulmão inflamado observada na intoxicação *in vivo*.

Uma das características importantes da reação inflamatória no trato respiratório é a broncoconstrição causada por uma diversidade de mediadores inflamatórios, entre os quais TNF-α, IL-1 e LTB<sub>4</sub> (LINO-DOS-SANTOS-FRANCO *et al.*, 2006 e 2010; THOMAS, 2001; TREZENA et al., 2003). A metacolina, um agonista muscarínico que causa uma broncoconstrição direta, ou seja, atua diretamente em um receptor específico do músculo liso das vias aéreas, é amplamente utilizada na investigação clínica e experimental para provocar a broncoconstrição (HEWITT, 2008; COCKCROFT, 2010) e, assim, foi o agente escolhido neste trabalho para investigar a ação da exposição *in vivo* à HQ sobre a reatividade das vias aéreas. A exposição à HQ causou hiperreatividade da traquéia frente à metacolina, que foi revertida após a remoção do tecido epitelial. Uma vez que o epitélio traqueal, constituído de epitélio pseudoestratificado ciliar e M $\Phi$ s, secreta diversos mediadores inflamatórios, é possível que o papel secretor destas células seja responsável pela constricção da traquéia. Neste contexto, o TNF- $\alpha$  é um dos responsáveis pela hiperreatividade da traquéia (THOMAS, 2001; TREZENA et al., 2003) e esta citocina foi secretada em maiores concentração pela traquéia quando esta foi obtida de animais expostos à HQ. Desta forma, pode-se supor que o TNF-α possa mediar a hiperreatividade da traquéia após exposição à HQ. Esta hipótese será investigada em um futuro breve.

Além da atividade secretora, os M $\Phi$ s possuem papel central na resposta inflamatória inata e adquirida pelas suas capacidades fagocítica e fungicida. Surpreendentemente,
mostramos neste trabalho que M $\Phi$ s alveolares de animais expostos à HQ possuem maior atividade fagocítica e fungicida frente à *Candida albicans* que M $\Phi$ s de animais controles. A literatura também é fragmentária quanto à ação da HQ sobre estas funções de M $\Phi$ s. Manning e colaboradores (1994) mostraram que a incubação *in vitro* de M $\Phi$ s peritoneais de murinos com 100mM de HQ reduziu a atividade fagocítica mediada pelo sistema complemento, num mecanismo dependente da metabolização de HQ à benzoquinona, que em última instância seria a responsável pela diminuição do acoplamento dos filamentos de actina intracelulares. Mais recentemente, Cho (2008) mostrou que a incubação de M $\Phi$ s de linhagem U937 com HQ reduziu a fagocitose de partículas de dextran. Em nosso laboratório, também temos mostrado que a incubação in vitro com HQ reduz a atividade fungicida e fagocítica de neutrófilos de ratos (HEBEDA et al., submetido para publicação). Com base nestes dados e em nossos resultados prévios, que mostraram inibição da secreção de citocinas proinflamatórias após exposição *in vivo* à HQ, consideramos surpreendente, em um primeiro momento, o aumento das atividades fagocítica e fungicida em M $\Phi$ s expostos à HQ in vivo. No entanto, deve ser considerado, de fato, que a exposição in vivo, durante 5 dias, pode interferir com outras vias de ativação dos M $\Phi$ s pela HQ *per se* ou pela ação de outras substâncias endógenas secretadas neste processo. Resultados obtidos recentemente em nosso laboratório parecem descartar o efeito indireto da HQ sobre as atividades fagocíticas e fungicidas dos MΦs e indicar que a exposição prolongada ao agente fenólico seja o responsável pelos efeitos inibitórios destas funções dos M $\Phi$ s. A incubação aguda de M $\Phi$ s alveolares com HQ diminuiu a atividade fagocítica e microbicida frente à C. albicans, enquanto que a exposição in vitro por 5 dias, mimetizou os efeitos da exposição in vivo à HQ, ou seja, aumentou as atividades frente ao fungo (dados não mostrados).

A *C. albicans* é um fungo que geralmente coloniza a pele e as superfícies mucosas de indivíduos normais, sem causar doença. Entretanto, quando os mecanismos de defesa estão prejudicados, no caso de pacientes imunocomprometidos ou durante a quimioterapia e drogas imunossupressoras, a *C. albicans* passa a ser um patógeno causador de infecções fúngicas oportunistas severas (MURCIANO *et al.*, 2008; NETEA *et al.*, 2008). A estrutura da parede celular da *C. albicans*, composta basicamente de glicanas, como as mananas e β-glucanas, é importante para o reconhecimento pelas células do sistema imune inato do hospedeiro (NETEA *et al.*, 2008; GALE'S *et al.*, 2010). Neste contexto, o TLR2, TLR4 e a

dectina-1 parecem exercer efeitos importantes no reconhecimento de estruturas fúngicas. O TLR2 após interação com  $\beta$ -manosídeos de *C. albicans*, leva a secreção de citocinas através da via de sinalização MyD88 (MURCIANO *et al.*, 2008; YÁÑEZ *et al.*, 2010), o TLR4 por sua vez reconhece estruturas O-mananas, enquanto que a dectina-1, o principal receptor de  $\beta$ -glucanas, tem sido relacionado como o mais importante receptor não-opsônico envolvido na captação de fungos em sua forma leveduriforme, mas não na forma de hifas (NETEA *et al.*, 2008; GALÉS *et al.*, 2010).

No sentido de se investigar os mecanismos envolvidos na ação inibitória da HQ sobre as funções de MΦs alveolares ligadas à fagocitose e morte, as ativações dos receptores de membrana e a proteína adaptadora MyD88 foram estudadas. Embora após incubação com *C. albicans* os MΦs apresentaram aumento da porcentagem de células marcadas para TLR4 e dectina-1, a exposição à HQ não alterou a expressão destes receptores. Por outro lado, a expressão de TLR2 na superfície dos macrófagos alveolares não foi alterada com exposição à HQ nem com incubação com *C. albicans*. Por outro lado, a exposição à HQ reduziu a expressão protéica da MyD88, indicando uma possível ação direta da HQ sobre esta via. Não há dados na literatura que demonstrem o papel da HQ sobre a MyD88.

Em conjunto, os dados obtidos nesta dissertação de Mestrado mostram que a exposição *in vivo* à HQ acarreta modificações na capacidade secretora de MΦs alveolares e do tecido traqueal, que podem estar relacionadas à menor migração de leucócitos para o pulmão inflamado. No entanto, ensaios complementares são necessários para estabelecer estas conexões e correlacioná-las com o prejuízo da inflamação detectado *in vivo*. É importante salientar que a exposição *in vivo* à HQ por período prolongado de exposição não reflete a literatura atual que mostra as ações agudas da HQ em diferentes tipos de células isoladamente.

# 6 Conclusão

Em conjunto, os dados obtidos permitem concluir que a exposição *in vivo* à HQ acarreta alterações na capacidade de secreção de células do trato respiratório e afeta a capacidade de contração do tecido traqueal e a atividade fagocítica e fungicida de M $\Phi$ s alveolares.

Esta conclusão está baseada nos seguintes resultados que mostraram que a exposição à HQ *in vivo*:

- Diminuiu a concentração de IL-12p70 e de MCP-1 no LBA dos animais 3 horas após a estimulação pelo LPS;
- Reduziu a concentração de TNF-α, de IL-6 e de MCP-1 e aumentou a secreção de IL-10 por MΦs alveolares na ausência de estimulação pelo LPS+IFN-γ;
- Aumentou a secreção de IL-1β, IL-12p70 e IL-10 e reduziu a secreção de MCP-1 e NO por MΦs alveolares na vigência de estimulação pelo LPS+IFN-γ;
- Aumentou a secreção de TNF-α e reduziu a secreção de MCP-1 pelo tecido traqueal na vigência de estimulação pelo LPS;
- Reduziu a expressão gênica de MCP-1 no tecido traqueal na vigência de estimulação pelo LPS;
- Causou hiperreatividade da traquéia frente à metacolina *in vitro*, que foi revertida pela remoção do epitélio;
- Aumentou a atividade fagocítica e fungicida de MΦs alveolares frente à Candida albicans;
- 8) Reduziu a expressão protéica de MyD88 em M $\Phi$ s alveolares.

# 7 Referências<sup>1</sup>

AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS. Encontro vai debater saúde dos trabalhadores em postos de gasolina. Curitiba, Paraná, 06 de Dezembro de 2005. Disponível em <a href="http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=16903&tit=Encontro-vai-debater-saude-dos-trabalhadores-em-postos-de-gasolina">http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=16903&tit=Encontro-vai-debater-saude-dos-trabalhadores-em-postos-de-gasolina> Acesso em: 03 de agosto de 2010.

ALLAVENA, P.; PAGANIN, C.; ZHOU, D.; BIANCHI, G.; SOZZANI, S.; MANTOVANI, A. Interleukin-12 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their interaction with vascular endothelium. **Blood**, v.84, n.7, p.2261-2268, 1994.

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO E GÁS NATURAL. Portaria nº 309/2001. Regulamento Técnico ANP nº 05/2001.

AZAD, N.; ROJANASAKUL, Y.; VALLYATHAN, V. Inflammation and Lung Cancer: Roles of Reactive Oxygen/Nitrogen Species. Journal of Toxicology and Environmental Health, v.11, n.B, p.1–15, 2008.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.L. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. **The Journal of Immunology**, v.181, p.3733-3739, 2010.

BIRONAITE, D.; SIEGEL, D.; MORAN, J.L.; WEKSLER, B.B.; 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**, v.149, n.2-3, p.177-188, 2004.

BRASIL. Resolução nº105, 31 de maio de 2001. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Diário Oficial da União, Brasília, 13 dez. 2001.

BRASIL. Resolução nº79, 28 de agosto de 2000. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Diário Oficial da União, Brasília, n. 169-E, Seção 1, 31 out. 2000. p. 34.

CETESB. Ficha de Informação de Produto Químico: Hidroquinona. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha\_completa1.asp?consulta=HIDRO QUINONA&cod=2662>. Acesso em: 04 de agosto de 2010.

CHEN, Y.; YU, K.; WU, J.B.; SHEN, Z.J.; JIANG, S.F.; HU, X.D.; ZHANG, J.L.; BI, L.X. Apoptosis induced by hydroquinone in bone marrow mononuclear cells in vitro. **Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi**, v.22, n.3, p.161-164, 2004.

CHING, S.; HE, L.; LAI, W.; QUAN, N. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. **Brain, Behaviour and Immunity**, v.19, n.2, p.127-137, 2005.

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2002 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

CHING, S.; ZHANG, H.; LAI, W.; QUAN, N. Peripheral injection of lipopolysaccharide prevents brain recruitment of leukocytes induced by central injection of interleukin-1. **Neuroscience**, v.137, n.2, p.717-726, 2006.

CHO, J.Y. Suppressive Effect of Hydroquinone, a Benzene Metabolite, on In Vitro Inflammatory Responses Mediated by Macrophages, Monocytes, and Lymphocytes. **Mediators of Inflammation**, p.1-11, 2008.

CHOI, J.M.; CHO, Y.C.; CHO, W.J.; KIM, T.S.; KANG, B.Y. Hydroquinone, a Major Component in Cigarette Smoke, Reduces IFN-γ Production in Antigen-Primed Lymphocytes. **Archives of Pharmaceutical Research**, v.31, n.3, p.337-341, 2008.

COCKCROFT, D.W. Direct challenge tests: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. **Chest**, v.138, p.18S-24S, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I.B.; CLIFFORDC, M.N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v.26, p. 1001–1043, 2009.

DARRALL, K.G.; FIGGINS, J.A.; BROWN, R.D.; PHILLIPS, G.F. Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. **The Analyst**, v.123, n.5, p. 1095-1101, 1998.

DECAPRIO, A.P. The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. **Critical Reviews in Toxicology**, v.29, n.3, p.283–330, 1999.

DEISINGER, P.J.; HILL, T.S.; ENGLISH, J.C. *et al.* Human exposure to naturally occurring hydroquinone. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.47, n.1, p.31-46, 1996.

DELCLAUX, C.; AZOULAY, E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. **European Respiratory Journal**, v.22, n.42, p.10s–14s, 2003.

DESHMANE, S.L.; KREMLEV, S.; AMINI, S.; SAWAYA, B.E. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1): An Overview. Journal of Interferon and Cytokine Research, v.29, n.6, p.313–326, 2009.

DIMITROVA, N.D.; KOSTADINOVA, R.Y.; MARINOVA, S.N.; POPOV, T.A.; PANEV, T.I. Specific immune responses in workers exposed to benzene. **International Immunopharmacology**, v.5, n.10, p.1554-1559, 2005.

DINARELLO, C.A.; DONATH, M.Y.; MANDRUP-POULSEN, T. Role of IL-1beta in type 2 diabetes. **Current Opinion Endocrinol, Diabetes and Obesity**, v.17, n.4, p.314-321, 2010.

DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v.6, p.19-34, 2008.

EPSTEIN, H. Cosmeceuticals and polyphenols. Clinics in Dermatology, v.27, p.475–478, 2009.

FARHAT, M.B; JORDAN, M.J.; CHAOUECH-HAMADA, R.; LANDOULSI, A.; SOTOMAYOR, A.S. Variations in Essential Oil, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity of Tunisian

Cultivated *Salvia officinalis* L. Journal of Agricultural Food Chemistry, v.57, p.10349–10356, 2009.

FERNANDES, L.B.; HUBBARD, W.C.; UNDEM, B.J. Release of inflammatory mediators from guinea pig trachea by electrical field stimulation: lack of neuronal involvement. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.270, n.3, p.1166-70, 1994.

FERNANDEZ-PANCHON, M.S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From *in vitro* Results to *in vivo* Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.48, p.649–671, 2008.

FERREIRA, A.; MACEDO, S.M.D.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A.P.; TAVARES DE LIMA, W.; FARSKY, S.H.P.; COELHO, F.R. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.43, n.3, p.455-464, 2007.

FLANNAGAN, R.S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v.7, p.355-366, 2009.

FONSECA, J.E.; SANTOS, M.J.; CANHÃO, H.; CHOY, E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. **Autoimmunity Reviews**, v.8, p.538–542, 2009.

GALE'S, A.; CONDUCHÉ, A.; BERNAD, J.; LEFEVRE, L.; OLAGNIER, D.; BÉRAUD, M.; MARTIN-BLONDEL, G.; LINAS, M.D.; AUWERX, J.; COSTE, A.; PIPY, B. PPARγ Controls Dectin-1 Expression Required for Host Antifungal Defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v.6, n.1, p.1-12, 2010.

GANOUSIS, L.G.; GOON, D.; ZYGLEWSKA, T.; WU, K.K.; ROSS, D. Cell-specific metabolism in mouse bone marrow stroma: studies of activation and detoxification of benzene metabolites. **Molecular Pharmacology**, v.42, n.6, p.1118-1125, 1992.

GARCÍA-VALLEJO, J.J.; VAN KOOYK, Y. Endogenous ligands for C-type lectin receptors: the true regulators of immune homeostasis. **Immunological Reviews**, v.230, p.22-37, 2009.

GEISER, M. Morphological Aspects of Particle Uptake by Lung Phagocytes. **Microscopy Research And Technique**, v.57, p.512–522, 2002.

GEISSMANN, F.; MANZ, M.G.; JUNG, S.; SIEWEKE, M.H.; MERAD, M.; LEY, K. Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. **Science**, v.327, p.656-661, 2010.

GIOULEKAS, E.; GOUTZIOULIS, M.; FARMAKIS, C.; DROSSOU, V.; KREMENOPOULOS, G.; TSIOURIS, J.; ROILIDES, E. Effects of Macrophage Colony-StimulatingFactor on Antifungal Activity of Neonatal Monocytes against *Candida albicans*. **Biology of the Neonate**, v.80, p. 251–256, 2001.

GORDON, S.B.; READ, R.C. Macrophage defences against respiratory tract infections. *British Medical Bulletin* v.61, p.45-61, 2002.

GOUWY, M.; STRUYF, S.; VERBEKE, H.; PUT, W.; PROOST, P.; OPDENAKKER, G.; VAN DAMME, J. CC chemokine ligand-2 synergizes with the nonchemokine G protein-coupled receptor

ligand fMLP in monocyte chemotaxis, and it cooperates with the TLR ligands LPS via induction of CXCL8. Journal of Leukocyte Biology, v.86, p.671-680, 2009.

GREER JP, FOERSTER J, LUKENS JN. **Wintrobe's Clinical Hematology.** 12th edition v.1. Lippincott Williams & Wilkins, 2003. p236-288.

GÜC, M.O.; ILHAN, M.; KAYAALP, S.O. The rat anococcygeus muscle is a convenient bioassay organ for the airway epithelium-derived relaxant factor. **European Journal of Pharmacology**, v.148, n.3, p.405-409, 1988.

GWINN, M.R.; VALLYATHAN, V. Respiratory burst: role in signal transduction in alveolar macrophages. *Journal of Toxicology and Environment Health*. **Part B Critical Reviews**, v.9, n.1, p. 27-39, 2006.

HARTWIG, A. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, n.1-2, p.269-272, 2010.

HAYAKAWA, M.; GHOSN, E.E.; DA GLORIA TEIXERIA DE SOUSA, M.; FERREIRA, K.S.; ALMEIDA, S.R. Phagocytosis, Production of Nitric Oxide and Pro-inflammatory Cytokines by Macrophages in the Presence of Dematiaceus Fungi that Causes Chromoblastomycosis. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.64, p.382–387, 2006.

HEBEDA, C.B.; PINEDO, F.J.; BOLONHEIS, S.M.; TEIXEIRA, S.A.; MUSCARÁ, M.N.; FARSKY, S. Post-transcriptional control of hydroquinone on nitric oxide production by endothelial cells. *Submetido para publicação*, 2010.

HEWITT, D.J. Interpretation of the "positive" methacholine challenge. **American Journal of Industrial Medicine**, v.51, n.10, p.769-781, 2008.

HICKEY, M.J.; ISSEKUTZ, A.C.; REINHARDT, P.H.; FEDORAK, R.N.; KUBES, P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. **Circulation Research**, v.83, n.11, p.1124-31, 1998.

HIRABAYASHI, Y.; INOUE, T. Benzene-induced bone-marrow toxicity: a hematopoietic stemcell-specific, aryl hydrocarbon receptor-mediated adverse effect. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, p.252-258, 2010.

HOBBS, A.J.; TUCKER, J.F.; GIBSON, A. Differentiation by hydroquinone of relaxations induced by exogenous and endogenous nitrates in non-vascular smooth muscle: role of superoxide anions. *British Journal of Pharmacology*, v.104, n.3, p.645-50, 1991.

HSU, C.L.; YEN, G.C. Phenolic compounds: Evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.52, p.53–61, 2008.

HUYSAMEN, C.; BROWN, G.D. The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated clusterof C-type lectin-like receptors. **FEMS Microbiology Letters**, v.290, p.121–128, 2009.

IARC. Hydroquinone. Monographs. Supplement 7, 1987. p. 691-719.

ILES, K.E; FORMAN, H.J. Macrophage Signaling And Respiratory Burst. Immunologic Research, v.26, n.95–105, 2002.

ILHAM, M.; SAHIN, I. Tracheal epithelium releases a vascular smooth muscle relaxant factor: demonstration by bioassay. **European Journal of Pharmacology**, v.131, p.293-6, 1986;

JAGANATHAN, S.K.; MANDAL, M. Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. Journal of Biomedicine and Biotechnology, p.1-13, 2009.

JIN, S.; SATO, N. Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear *Pyrus* spp. **Phytochemistry**, v.62, p.101–107, 2003.

JOHNSON, E.S.; LANGÅRD, S.; LIN, Y.S. A critique of benzene exposure in the general population. **Science of the Total Environment**, v.374, p.183–198, 2007.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 10ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. v. 1, p. 339-357.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 9ª edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 1999. v. 2, p.291-294.

KALF, G.F.; O'CONNOR, A. The effects of benzene and hydroquinone on myeloid differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Leukemia and Lymphoma**, v.11, n.5-6, p.331-338, 1993.

KANG, B.H.; KIM, E.; KIM, T.S. Regulatory mechanisms and their therapeutic implications of interleukin-12 production in immune cells. **Cellular Signalling**, v.17, p.665–673, 2005.

KEENAN, J.J.; GAFFNEY, S.H.; GALBRAITH, D.A.; BEATTY, P.; PAUSTENBACH, D.J. Gasoline: A complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure? **Chemico-Biological Interactions**, v.184, p.293–295, 2010.

KERZIC, P.J.; PYATT, D.W.; ZHENG, J.H.; GROSS, S.A.; LE, A.; IRONS, R.D. Inhibition of NF-kappaB by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alpha-induced apoptosis. **Toxicology**, v.187, n.2-3, p.127-137, 2003.

KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Oxidation of hydroquinone by myeloperoxidase. Mechanism of stimulation by benzoquinone. **The Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.12, p.8319-8324, 1992.

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-κB binding activity. **Immunology Letters**, v.99, p.24–29, 2005.

KIM, Y.J.; WOO, H.D.; KIM, B.M.; LEE, Y.J.; KANG, S.J.; CHO, Y.H.; CHUNG, H.W. Risk Assessment of Hydroquinone: Differential Responses of Cell Growth and Lethality Correlated

to Hydroquinone Concentration. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, v.72, p.1272–1278, 2009.

KUMAR, H. KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.388, p.621–625, 2009.

LEE, J.Y.; KIM, J.Y.; LEE, Y.G.; SHIN, W.C.; CHUN, T.; RHEE, M.H.; CHO, J.Y. Hydroquinone, a Reactive Metabolite of Benzene, Reduces Macrophage-mediated Immune Responses. **Molecules and Cells**, v.23, n.2, p.198-206, 2007.

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**, v.106, p.496–502, 2002.

LÉVAY, G.; ROSS, D.; BODELL, W.J. Peroxidase activation of hydroquinone results in the formation of DNA adducts in HL-60 cells, mouse bone marrow macrophages and human bone marrow. **Carcinogenesis**, v.14, n.11, p.2329-3234, 1993.

LIANG, C.; HUANG, C.; CHEN, Y. Potential for activated persulfate degradation of BTEX contamination. **Water research**, v.42, p.4091–4100, 2008.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; DAMAZO, A.S.; BERALDO DE SOUZA, H.R.; DOMINGOS, H.V.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; OLIANI, S.M.; COSTA, S.K.; TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.214, p.35–42, 2006.

LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.; SHIA, M.K.; DOMINGOS, H.V.; BREITHAUPT-FALOPPA, A.C.; DE OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; VARGAFTIG, B.B.; TAVARES-DE-LIMA, W. Connective tissue mast cells are the target of formaldehyde to induce tracheal hyperresponsiveness in rats: Putative role of leukotriene B4 and nitric oxide. **Toxicology Letters**, v.192, p.85–90, 2010.

LOHMANN-MATTHES, M.L.; STEINMÜLLER, C.; FRANKE-ULLMANN, G. Pulmonary macrophages. **European Respiratory Journal**, v.7, p.1678–1689, 2004.

LU, Y.C.; YEH, W.C.; OHASHI, P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, v.42, p.145–151, 2008.

MACEACHERN, L.; SNYDER, R.; LASKIN, D.L. Alterations in the morphology and functional activity of bone marrow phagocytes following benzene treatment of mice. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.117, n.2, p.147-54, 1992.

MACEDO, S.M.; LOURENÇO, E.L.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; FERREIRA, J.M. Jr.; FARSKY, S.H. Effect of *in vivo* phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. **Toxicology**, v.220, n.2-3, p.126-35, 2006.

MACEDO, S.M.; VAZ, S.C.; LOURENÇO, E.L.; DE SOUSA, M. da G.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A.P.; FERREIRA, J.M. Jr.; ALMEIDA, S.R.; DE LIMA, W.T.; FARSKY, S.H. *In vivo* hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. **Toxicology**, v.241, n.1-2, p.47-57, 2007.

MALAVIA, N.K.; RAUB, C.B.; MAHON, S.B.; BRENNER, M.; PANETTIERI, R.A. JR.; GEORGE, S.C. Airway Epithelium Stimulates Smooth Muscle Proliferation. **American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology**, v.41, p.298-304, 2009.

MANTOVANI, A.; SOZZANI, S.; LOCATI, M.; ALLAVENA, P.; SICA, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **TRENDS in Immunology**, v.23, n.11, p.549-555, 2002.

MARTINEZ, F.O.; SICA, A.; MANTOVANI, A.; LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. **Frontiers in Bioscience**, v.13, p.453-61, 2008.

MATOBA, K.; KAWANAMI, D.; ISHIZAWA, S.; KANAZAWA, Y.; YOKOTA, T.; UTSUNOMIYA, K. Rho-kinase mediates TNF-a-induced MCP-1 expression via p38 MAPK signaling pathway in mesangial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.402, p.725–730, 2010.

MAYNARD, C.L.; WEAVER, C.T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cellmediated immune regulation. **Immunological Reviews**, v.226, p.219–233, 2008.

MCGETTRICK, A.F.; O'NEILL, L.A.J. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion in Immunology**, v.22, p.20–27, 2010.

MCGREGOR, D. Hydroquinone: An Evaluation of the Human Risks from its Carcinogenic and Mutagenic Properties. **Critical Reviews in Toxicology**, v.37, p.887–914, 2007.

MEDINSKY, M.A.; KENYON, E.M.; SCHLOSSER, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**, v.105, n.2-3, p.225-33, 1995.

MELGAREJO, E.; MEDINA, M.A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; URDIALES, J.L. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p.998–1001, 2009.

MÉNDEZ-SAMPERIO, P. Role of Interleukin-12 Family Cytokines in the Cellular Response to Mycobacterial Disease. International Journal of Infectious Diseases, v.14, p.e366–e371, 2010.

MICHALOWICZA, J.; MAJSTEREK, I. Chlorophenols, chlorocatechols and chloroguaiacols induce DNA base oxidation in human lymphocytes *(in vitro)*. **Toxicology**, v.268, p.171–175, 2010.

MIEAN, K.H.; MOHAMED, S. Flavonoid (Myricetin, Quercetin, Kaempferol, Luteolin, and Apigenin) Content of Edible Tropical Plants. Journal of Agricultural Food Chemistry, v.49, p. 3106-3112, 2001.

MILLER, A.C.; SCHATTENBERG, D.G.; MALKINSON, A.M.; ROSS D. Decreased content of the IL1 alpha processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after

treatment with the benzene metabolite hydroquinone. **Toxicology Letters**, v.74,n.2,p.177-184, 1994.

MORRISEY, E.E.; HOGAN, B.L.M. Preparing for the First Breath: Genetic and Cellular Mechanisms in Lung Development. **Developmental Cell**, v.18, p.8-23, 2010.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum ofmacrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v.8, p.958-969, 2008.

MOSSER, D.M.; ZHANG, X. Interleukin-10: New Perspectives on an Old Cytokine. Immunological Reviews, v.226, p.205–218, 2008.

MURCIANO, C.; YÁÑEZ A.; O'CONNOR, J.E.; GOZALBO, D.; GIL, M.L. Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v.53, p.214–221, 2008.

NETEA, M.G.; BROWN, G.D.; KULLBERG, B.J.; GOW, N.A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**, v.6, p.67-78, 2008.

NICHOLS, J.A.; KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: antiinflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of dermatological research**, v.302, p.71–83, 2010.

NICOLA, A.M.; CASADEVALL, A.; GOLDMAN, D.L. *et al.* Fungal killing by mammalian phagocytic cells. **Current Opinion in Microbiology**, v.11, n.4, p.313–317, 2008.

NICULESCU, R. Inhibition of the conversion of pre-interleukins- $1\alpha = 1\beta$  to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. **Chemico-Biological Interactions**, v.98, p.211-222, 1995.

NIOSH. Hydroquinone. Manual of Analytical Methods (NMAM), Method 5004, Issue 2. 4ª edition, 1994.

NOVOTNY, N.M.; MARKEL, T.A.; CRISOSTOMO, P.R.; MELDRUM, D.R. Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stemcells: Role of NF-kB. **Cytokine**, v.43, p.215–219, 2008.

OUYANG, Y.; VIRASCH, N.; HAO, P.; AUBREY, M.T.; MUKERJEE, N.; BIERER, B.E.; FREED, B.M. Suppression of human IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , and TNF- $\alpha$  production by cigarette smoke extracts. **Journal of Allergy Clinical Immunology**, v.106, n.2, p.280-287, 2000.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M.L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life-A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, n.3, p.299-308, 2010.

PARK, H.; PARK, S.G.; KIM, J.; KO, Y.G.; KIM, S. Signaling Pathways For Tnf Production Induced By Human Aminoacyl-Trna Synthetase-Associating Factor, P43. **Cytokine**, v.20, n.4, p.148–153, 2002.

PATEL, R.R.; RYU J.H.; VASSALLO, R. Cigarette Smoking and Diffuse Lung Disease. **Drugs**, v.68, n.11, p.1511-1527, 2008.

PEARLMAN, E.; LASS, J.H.; BARDENSTEIN, D.S.; DIACONU, E.; HAZLETT, F.E. Jr.; ALBRIGHT, J.; HIGGINS, A.W.; KAZURA, J.W. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. **Journal of Immunology**, v.158, n.2, p.827-833, 1997.

PIFER, J.W.; HEARNE, F.T.; SWANSON, F.A.; O'DONOGHUE, J.L. *et al.* Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone. **International Archives of Occupational Environmental Health**, v.67, n.4, p.267-280, 1995.

PISTOIA, V.; COCCO, C.; AIROLDI, I. Interleukin-12 Receptor β2: From Cytokine Receptor To Gatekeeper Gene In Human B-Cell Malignancies. **Journal Of Clinical Oncology**, v.27, p.4809-4816, 2009.

PRYOR, W.A.; STONE, K.; ZANG, L.Y.; BERMÚDEZ, E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. **Chemical Research in Toxicology**, v.11, n.5, p.441-448, 1998.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P.A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, v.72, p.1439–1452, 2006.

RANSOHOFF, R.M. Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. **Immunity**, v.31, n.5, p.711-721, 2009.

RIBEIRO, A.L.T.; SHIMADA, A.L.B.; HEBEDA, C.B.; OLIVEIRA, T.F.; LOUREIRO, A.P.M.; PEREIRA, W.R.F.; SANTOS, A.M.A.; DE LIMA, W.T.; FARSKY, S. *et al. In vivo* hydroquinone exposure alters circulating neutrophils activitiesand impairs LPS-induced lung inflammation. Submetido para publicação. **Toxicology**, 2010.

ROSS, D.; SIEGEL, D.; SCHATTENBERG, D.G.; SUN, X.M.; 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 for Modulation of Apoptosis in Benzene Toxicity. **Environmental Health Perspectives**, v.104, n.6, p.1177-1182, 1996.

RYCHLIŃSKA, I.; GUDEJ, J. Qualitative and quantitative chromatographic investigation of hydroquinone derivatives in *Pyrus communis* L. flowers. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v.60, n.4, p.309-312, 2003.

SCHINDLER, G.; PATZA, U.; BRINKHAUS, B.; VON NIECIECK, A.; WITTIG, J.; KRAHMER, N.; GLOCKL, I.; VEIT, M. Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of Arctostaphylos uvae ursi Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Human. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v.42, p.920-927, 2002.

SCHLEIMER, R.P. STERBINSKY, S.A.; KAISER, J.; BICKEL, C.A.; KLUNK, D.A.; TOMIOKA, K.; NEWMAN, W.; LUSCINSKAS, F.W.; GIMBRONE, M.A.JR.; MCINTYRE, B.W. IL-4 Induces Adherence Of Human Eosinophils And Basophils But Not Neutrophils To Endothelium.

Association With Expression Of VCAM-1. Journal of Immunology, v.148, n.4, p.1086-1092, 1992.

SHOLL-FRANCO, A.; DA SILVA, A.G.; ADÃO-NOVAES, J. Interleukin-4 as a Neuromodulatory Cytokine: roles and signaling in the nervous system. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1153, p.65–75, 2009.

SNYDER, R. Benzene and Leukemia. **Critical Reviews in Toxicology**, v.32, n.3, p.155-210, 2002.

SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Metabolism Reviews**, v.36, n.3-4, p.531-547, 2004.

SOLINAS, G.; GERMANO, G.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related Inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.86, p.1065-1073, 2009.

STILLMAN, W.S.; VARELLA-GARCIA, M.; IRONS, R.D. The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31- and -7 in human CD34+CD19- bone marrow cells. **Experimental Hematology**, v.28, n.2, p.169-176, 2000.

STOUT, R.D.; WATKINS, S.K.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: in situ reprogramming of tumor-associated macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v.86, p.1105-1109, 2009.

SUZUKI, T.; CHOW, C.W.; DOWNEY, G.P. Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.40, p.1348–1361, 2008.

SVARCOVA, I.; HEINRICH, J.; VALENTOVA K. Berry Fruits as a Source of Biologically Active Compounds: The Case of Lonicera Caerulea. **Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czech Republic**, v.151, n.2, p.163–174, 2007.

TACKE, F.; RANDOLPH, G.J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v.211, p.609–618, 2006.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v.140, p.805–820, 2010.

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**, v.98, n.1-3, p.207-14, 1995.

TEN HALLERS, E.J.; RAKHORST, G.; MARRES, H.A.; JANSEN, J.A.; VAN KOOTEN, T.G.; SCHUTTE, H.K.; VAN LOON, J.P.; VAN DER HOUWEN, E.B.; VERKERKE, G.J. Animal models for tracheal research. **Biomaterials**, v.25, n.9, p.1533-1543, 2004.

THAVARAJAH, P.; LOW, N.H. Adulteration of Apple with Pear Juice: Emphasis on Major Carbohydrates, Proline, and Arbutin. Journal of Agricultural Food Chemistry, v.54, p.4861-4867, 2006.

THOMAS, D.J.; SADLER, A; SUBRAHMANYAM, V.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 and fibroblastoid cells. **Molecular Pharmacology**, v.37, n.2, p.255-62, 2001.

THOMAS, P.S. Tumour necrosis factor- $\alpha$ : The role of this multifunctional cytokine in asthma. **Immunology and Cell Biology**, v.79, p.132–140, 2001.

THORNHILL, M.H.; KYAN-AUNG, U.; HASKARD, D.O. IL-4 Increases Human Endothelial Cell Adhesiveness For T Cells But Not For Neutrophils. Journal of Immunology, v.144, n.8, p.3060-3065, 1990.

TIBURTIUS, E.R.L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E.S. Contaminação de águas por btxs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v.27, n.3, p.441-446, 2004.

TREZENA, A.G.; DA SILVA, Z.L.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DAMAZO, A.S.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; OLIANI, S.M.; DE LIMA, W.T. Differential regulation of the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  and of eicosanoids by mast cells in rat airways after antigen challenge. **Mediators of Inflammation**, v.12, n.4, p.237-246, 2003.

VAN DEN HEUVEL, R.L.; SCHOETERS, G.; LEPPENS, H. Haematotoxicity Testing In Vitro Using Human Cord Blood Haemopoietic Cells. **Toxicology in vitro**, v.11, p.689-693, 1997.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. Science Signaling, v.3, n.105, p.1-6, 2010.

WEISEL, C.P. Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. **Chemico-Biological Interactions**, v.184, n.1-2, p.58-66, 2010.

WESTERHOF, W.; KOOYERS, T.J. Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.4, n.2, p.55-59, 2005.

YADAV, A.; SAINI, V.; ARORA, S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. **Clinica Chimica Acta** v.411, p.1570–1579, 2010.

YÁÑEZ, A.; FLORES, A.; MURCIANO, C.; O'CONNOR, J.E.; GOZALBO, D.; GIL, M.L. Signalling through TLR2/MyD88 induces differentiation of murine bone marrow stem and progenitor cells to functional phagocytes in response to *Candida albicans*. **Cellular Microbiology**, v.12, n.1, p.114–128, 2010.

YANG, E.J.; LEE, J.S.; YUN, C.Y.; KIM, I.S. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. **Toxicology in vitro**, v.25, n.1, p.131-137, 2010.

YANG, H.Y.; YANG, J.G.; WANG, G.H.; YU, K. Hydroquinone inhibits NF-kappaB expression in human bone marrow stromal cells *in vitro*. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v.14, n.4, p.804-807, 2006.

YONA, S.; JUNG, S. Monocytes: subsets, origins, fates and functions. **Current Opinion in Hematology**, v.17, p.53–59, 2010.

ZHANG, S.; WANG, Q. Factors determining the formation and release of bioactive IL-12: Regulatory mechanisms for IL-12p70 synthesis and inhibition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.372, p.509–512, 2008.

ZHAO, Y.H.; YUAN, X.; SU, L.M; QIN, W.C.; ABRAHAM, M.H. Classification of toxicity of phenols to *Tetrahymena pyriformis* and subsequent derivation of QSARs from hydrophobic, ionization and electronic parameters. **Chemosphere**, v.75, p.866–871, 2009.

ZHAO, Z.; ZHAO, Z.; HE, X.; BI, Y.; XIA, Y.; TAO, N.; LI, L.; MA, Q. Induction of CYP4F3 by Benzene Metabolites in Human White Blood Cells in Vivo in Human Promyelocytic Leukemic Cell Lines and ex Vivo in Human Blood Neutrophils. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n.2, p.282-291, 2008.

ZIPRIN, P.; RIDGWAY, P.F.; PFISTERMÜLLER, K.L.; PECK, D.H.; DARZI, A.W. ICAM-1 mediated tumor-mesothelial cell adhesion is modulated by IL-6 and TNF-alpha: a potential mechanism by which surgical trauma increases peritoneal metastases. **Cell Communication & Adhesion**, v.10, n.3, p.141-54, 2003.

# 8 Anexos

# 8.1 Ficha do aluno

Ficha do Aluno

https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf

🗿 anus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

9141 - 6720366/1 - Ana Lucia Borges Shimada					
Email:	alshimada@usp.br				
Data de Nascimento:	08/12/1986				
Local de Nascimento:	Estado de Santa Catarina				
Nacionalidade:	Brasileira				
Graduação:	Farmacéutico - Universidade Estadual de Maringá - Paraná - Brasil - 2009				
Curso:	Mestrado				
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas				
Data de Matrícula:	26/02/2009				
Início da Contagem de Prazo:	26/02/2009				
Data Limite:	26/08/2011				
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 26/02/2009 até o presente. E.Mail: sfarsky@usp.br				
Proficiência em Línguas:	Inglés, Aprovado em 21/10/2010				
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 13/09/2010				
Data do Depósito do Trabalho:					
Título do Trabalho:					
Data Máxima para Aprovação da Banca:					
Data de Aprovação da Banca:					
Data Máxim a para Defesa:					
Data da Defesa:					
Resultado da Defesa:					
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 26/02/2009				
	Matricula de Acompanhamento em 21/02/2011				

Última ocorrência: Matricula de Acompanhamento em 21/02/2011 Impresso em: 10/03/11 11:29:22  ${f Janus}\,$  - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas Documento sem validade oficial FICHA DO ALUNO

## 9141 - 6720366/1 - Ana Lucia Borges Shimada

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5802-2/1	Tópicos Avançados em Toxicologia I	09/03/2009	21/06/2009	30	2	100	А	Ν	Concluída
FBC5755-1/1	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	01/04/2009	05/05/2009	60	4	100	А	Ν	Concluída
FBC5746-2/2	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	19/05/2009	29/06/2009	60	4	100	А	Ν	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0440 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2009	30/11/2009	) _	3	0	-	-	-
FBC5784-2/2	Tópicos Avançados em Toxicologia II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	90	А	Ν	Concluída
EDM5791-5/3	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	19/08/2009	30/11/2009	120	8	100	А	Ν	Concluída
6045842-1/1	Escola de Altos Estudos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	30/11/2009	13/12/2009	60	4	100	A	Ν	Concluída
HSA5751-2/5	Higiene Ocupacional - Riscos Químicos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	05/10/2010	16/11/2010	60	0	0	-	Ν	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mín	Créditos obtidos	
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	27
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

## Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 12/04/2010.

## Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011 Impresso em: 10/03/11 11:29:22

# 8.2 Currículo lattes

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Ana Lucia Borges Shimada)

https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg\_impcv.trata

	Ana Lucia Borges Shimada
	Possui graduação em Farmácia com Habilitação em Análises Clínicas pela Universidade Estadual de Maringá (2008). Atualmente é mestranda do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Eaculdade de Ciências Earmanéticas da Universidade de São Paulo
	(Texto informado pelo autor)
	Última atualização em 20/03/2011
	Endereço para acessar este CV:
Dados Pessoais	mps/messenpy.b//2+02+22000+0110
٩	Nome Ana Lucia Borges Shimada
Fil	iação Jorge Shimada e Dagmar do Carmo Andrade Borges Shimada
Nascin	nento 08/12/1986 - Dionísio Cerqueira/SC - Brasil
Formação Acadêmica/T	Ţitulação
	2009 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO IN VIVO À HIDROQUINONA SOBRE FUNÇÕES DO TECIDO TRAQUEAL E DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAMUNDONGOS
	Orientador: Sandra Helena Poliselli Farsky 🖤
2004	- 2008 Graduação em Farmácia Bioquímica. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
Formação complement	ar
2009 - 2009	Escola de Altos Estudos em Toxicologia. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em O Uso de Nanopartículas em Produção de Vacina. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Boas Práticas Em Farmácia. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Atenção às Urgências Toxicológicas II. Universidade Estadual de Marinná. UEM Marinna, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Novos Sistemas de Liberação de Fármacos. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Terapia Fotodinâmica. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Trat. Fitoterápico, Téc. de Resistencia em Micobac. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Conhecendo a Farmácia. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Florais de Bach. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Curso Intensivo de Inglês Básico. Universidade Estadual de Maringá, UEM, Maringa, Brasil
Atuação profissional	
1. Universidade	e de São Paulo - USP

https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg\_impcv.trata

Vínculo institucional	
2009 - Atual V	ínculo: Livre , Enquadramento funcional: Aluna de Pós-Graduação, Regime: Dedicação Exclusiva
Atividades	
06/2009 - 12/2009	Extensão Universitária, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
	Especificação: Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Monitoria na disciplina Analises Toxicológicas (FBC0440) sob supervisão do Prof. Ernani Pinto Jr.
02/2009 - Atual	Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
	Participação em projetos: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO IN VIVO À HIDROQUINONA SOBRE FUNÇÕES DO TECIDO TRAQUEAL E DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE CAMUNDONGOS
2. Universidade Estad	lual de Maringá - UEM
Vinculo	
institucional	
2004 - 2008 V	ínculo: Livre , Enquadramento funcional: Acadêmica, Regime: Dedicação Exclusiva
Atividades	
03/2008 - 12/2008	Estágio, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Estágio: Monitoria na disciplina de Toxicologia sob supervisão da Prof. Simone Aparecida Galerani Mossini
11/2007 - 03/2008	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia e Farmacologia
	Participação em projetos: Projeto Extensão: Assistência Farmacêutica para o Aprimoramento do Profissional Farmacêutico
06/2007 - 02/2008	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Participação em projetos: Projeto Ensino: Vivência no Laboratório de Análises Clinicas do Hospital Universitário Regional de Maringá.
04/2006 - 04/2008	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Participação em projetos: Projeto Extensão: Atenção Farmacêutica às Pessoas Atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais
04/2006 - 11/2006	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia e Farmacologia
	Participação em projetos: Projeto Ensino: Melhoria do Ensino Profissionalizante em Farmácia
08/2005 - 07/2006	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Participação em projetos: Projeto de Iniciação Científica: Padronização e Validação de Técnica para a Determinação de Mercúrio em Material Biológico
09/2004 - 06/2005	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Participação em projetos: Projeto Extensão: Atenção Farmacêuticas às pessoas atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais
07/2004 - 04/2006	Projetos de pesquisa, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas
	Participação em projetos: Projeto Ensino: Sistematização das Análises Toxicológicas
04/2004 - 08/2004	Estágio, Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas

20/3/2011 19:09

## $https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg_impcv.trata$

	Estágio: Estágio em Práticas de Laboratório
Projetos	
2009 - Atual	EFEITOS DA EXPOSIÇÃO IN VIVO À HIDROQUINONA SOBRE FUNÇÕES DO TECIDO TRAQUEAL E DE MACRÓFAGOS ALVEÓLARES DE CAMUNDONGOS
	Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Sandra Helena Poliselli Farsky (Responsável) Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP Número de produções C,T & A: 5/
2007 - 2008	Projeto Ensino: Vivência no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional de Maringá.
	Descrição: 70 horas/aula Situação: Concluído Natureza: Outra Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Paula Nishiyama (Responsável) Financiador(es):
2007 - 2008	Projeto Extensão: Assistência Farmacêutica para o Aprimoramento do Profissional Farmacêutico
	Descrição: 95 horas/aula Situação: Conoluido Natureza: Extensão Alunos envolvidos: Graduação (4); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Elisiane Coan Boian; Patrícia de Souza Bonfim; Cássia Lopes Paixão; Angela Maria Campanha (Responsàvel); Raquel Soares Tasca Financiador(es): Número de produções C,T & A : 6/
2006 - 2007	Projeto Extensão: Atenção Farmacêutica às Pessoas Atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais
	Descrição: Para promover o acesso da população brasileira a medicamentos de qualidade em quantidade adequada ao menor preço possível, o Ministério da Saúde, vem implementando, desde 1998, ações que expressam de forma articulada os eixos assumidos no desenho da Política Nacional de Medicamentos. Uma dessas ações é o Programa de Medicamentos Excepcionais, onde são distribuidos gratuitamente medicamentos utilizados no nivel ambulatorial, onde a maioria deles é de elevado valor unitário ou de uso crônico. Em termos operacionais, os Estados é que planejam a aquisição desses medicamentos a partir das necessidades da população e controlam a distribuição e os estoques. Pretende-se com este projeto, acompanhar as pessoas que são beneficiadas por este Programa, levando informações e orientações tanto sobre a sua patologia ou agravo à saúde quanto dos medicamentos utilizados, de forma particular sobre a ocorrência de reações adversas a medicamentos. periodo 01/05/2006 a 31/12/2006 384h - bolsista periodo 01/01/2007 a 31/03/2007 e 01/05/2007 a 31/12/2007 528h - bolsista Situação: Concluido Natureza: Extensão Alunos envolvidos: Graduação (2); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Paula Nishiyama (Responsável); Luiz Peraro; Milca Ribeiro Saruhashi; Anderson Rodrigo Oliveira; João Henrique Torquato Oliveira Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá-UEM Número de produções C, T & A: 4/
2006 - 2006	Projeto Ensino: Melhoria do Ensino Profissionalizante em Farmácia
	Descrição: Setor: Farmácia Ensino 62 horas/aula Situação: Concluido Natureza: Outra Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Raquel Soares Tasca (Responsável) Financiador(es):
2005 - 2006	Projeto de Iniciação Científica: Padronização e Validação de Técnica para a Determinação de Mercúrio em Material Biológico
	Descrição: Projeto Iniciação Científica Período 01/08/2005 a 31/07/2006 Carga Horária 960 horas Situação: Concluído Natureza: Pesquisa Alunos envolvidos: Graduação (1); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Miguel Machinski Jr; Paula Nishiyama (Responsável); Gisele Neumann Zanella Financiador(es): Número de produções C,T & A: 1/
2004 - 2006	Projeto Ensino: Sistematização das Análises Toxicológicas

https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg\_impcv.trata

	Descrição: O Laboratório de Toxicologia do Departamento de Análises Clínicas (DAC) desenvolve atividades de pesquisa e extensão a fim de subsidiar o ensino de Toxicologia. São realizadas análises laboratoriais de urgência para o esclarecimento e/ou confirmação de suspeitas de intoxicações agudas ou não, para o acompanhamento de pessoas intoxicadas, para o confirmação de suspeitas de intoxicações agudas ou não, para o acompanhamento de pessoas intoxicadas, para o confornole do grau de exposição a medicamentos, drogas de abuso e produtos químicos de uso ocupacional. Como o Laboratório atende solicitações provenientes do LEPAC (Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas), Hospital Universitário e demais segmentos, este projeto tem como objetivo sistematizar e organizar as análises realizadas por este Laboratório, desenvolvendo e implementando a informatização dos dados para mehorar a qualidade das informações existentes e facilitar o seu uso nas atividades de ensino, pesquisa e extensão. Período 19/7/2004 a 30/04/2006 Carga Horária 360 horas/aula Situação: Concluido Natureza: Cutra Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Erika Bando; Miguel Machinski Jr; Paula Nishiyama (Responsável) Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá-UEM Número de produções C, T & A: &/
2004 - 2005	Projeto Extensão: Atenção Farmacêuticas às pessoas atendidas pelo Programa de Medicamentos Excepcionais
	Descrição: Para promover o acesso da população brasileira a medicamentos de qualidade em quantidade adequada ao menor preço possível, o Ministério da Saúde, vem implementando, desde 1998, ações que expressam de forma articulada os eixos assumidos no desenho da Política Nacional de Medicamentos. Uma dessas ações é o Programa de Medicamentos Excepcionais, onde são distribuídos gratuitamente medicamentos utilizados no nível ambulatorial, onde a maioria deles é de elevado valor unitário ou de uso crônico. Em termos operacionais, os Estados é que planejam a aquisição desses medicamentos a partir das necessidades da população e controlam a distribuição e os estoques. Pretende- se com este projeto, acompanhar as pessoas que são beneficiadas por este Programa, levando informações e orientações tanto sobre a sua patologia ou agravo à saúde quanto dos medicamentos utilizados, de forma particular sobre a ocorrência de reações adversas a medicamentos. Carga Horária: período 01/09/2004 a 30/06/2005 324h Situação: Em Andamento Natureza: Extensão Alunos envolvidos: Graduação (1); Especialização (0); Mestrado acadêmico (0); Mestrado profissionalizante (0); Doutorado (0); Integrantes: Ana Lucia Borges Shimada; Paula Nishiyama (Responsável); Milca Ribeiro Financiador(es): Universidade Estadual de Maringá-UEM

#### Áreas de atuação

- 1. Análise Toxicológica
- 2. Toxicologia
- 3. Farmácia
- 4. Saúde Coletiva

#### Idiomas

Inglês	Compreende Bem	, Fala Razoavelmente,	Escreve Bern, Lê Bern
--------	----------------	-----------------------	-----------------------

Português Compreende Bem , Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Produção em C, T& A

#### Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- SHIMADA, Ana Lucia Borges, RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Hydroquinone inhalation on secretion of trachea cells In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona. Toxicology Letters., 2010. p.34 -
- Inhaled Hydroquinone effects on leukocyte recruitment into the lung and adhesion molecules from circulating blood In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona.
  Toxicology Letters., 2010, p.33 - 34
- RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, Ana Lucia Borges, SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Inhalation of Hydroquinone on Lung Leukocyte Recruitment Induced by LPS In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 2009, São Paulo.
  Anais da XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP., 2009.
- RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, Ana Lucia Borges, HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Inhalation of Hydroquinone on Phagocitic and Fungicidal Activities on Alveolar Macrophages In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte-MG. Revista Brasileira de Toxicologia., 2009. v.22. p.220 -

 $https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg_impcv.trata$ 

5.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, RIBEIRO, A. L. T., SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Inhalation of Hydroquinone Impairs LPS-Induced Leukocyte Migration to the Lung In: 41° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto. Anais do XLI Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental., 2009.
6.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, ZANELLA, Gisele Neumann, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Exposição Ocupacional ao Mercúrio Metálico In: I Congresso de Farmácia de Maringá, 2007, Maringá-PR. <b>Arq. Mudi</b> . , 2007. v.11. p.186 -
7.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, NISHIYAMA, Paula O Programa de Medicamentos Excepcionais da 15º Regional de Saúde do Estado do Paraná In: I Congresso de Farmácia de Maringá, 2007, Maringá-PR. <b>Arq. Mudi</b> ., 2007. v.11. p.200 -
8.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, OLIVEIRA, Anderson Rodrigo, NISHIYAMA, Paula Pharmaceutical Care to the Wilson's Disease Patients In: 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences, CIFARP, 2007, Ribeirão Preto. Anais do 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences. , 2007.
9.	NISHIYAMA, Paula, BANDO, Erika, SHIMADA, Ana Lucia Borges, FERNANDES, Marcio Adriano, MACHINSKI JR, Miguel A contribuição do Laboratório de Análises Toxicológicas na Toxicovigilância In: VI Congresso Nacional da Rede UNIDA, 2005, Belo Horizonte-MG. <b>Olho mágico</b> . Londrina-PR: , 2005. v.12. p.353 - 354
10.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Análise Forense e Controle de Farmacodependência Realizadas pelo Laboratório de Toxicologia da UEM In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2005, Recife-PE. <b>Revista Brasileira de Toxicologia</b> ., 2005. v.8. p.186 -
11.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Análises de Substâncias Psicoativas em Material Biológico In: II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005, Maringá. II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas., 2005.
12.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Identificação de Substâncias Psicoativas Ilícitas pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá In: II Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas, 2005, Maringá. Il Seminário sobre Prevenção e Tratamento da Dependência Química e III Semana de Prevenção ao Uso Indevido de Drogas., 2005.
13.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Monitorização Biológica realizada pelo Laboratório de Toxicologia no ano de 2004 ln: I Congresso Internacional de Saúde, V Seminário Científico do CCS e XVIII Semana da Integração de Farmácia, 2005, Maringá. . , 2005.
Traba	alhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)
1.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, TASCA, Raquel Soares, CAMPANHA, Angela Maria, BONFIM, Patrícia de Souza, BOIAN, Elisiane Coan, PAIXAO, Cássia Lopes Benzodiazepínicos Dispensados pela Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá no Período de 1996 a Junho de 2007 In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá.
2.	BOIAN, Elisiane Coan, BOIAN, Marciele Coan, BORELLI, S., SHIMADA, Ana Lucia Borges Detecção de Antígenos HLA Classe I solúveis no plasma dos grupos étnicos: Caucasóides e Mulatos In: Il Congresso Internacional de Saíde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do Il Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS., 2007.
3.	BOIAN, Elisiane Coan, BONFIM, Patrícia de Souza, CAMPANHA, Angela Maria, PAIXAO, Cássia Lopes, SHIMADA, Ana Lucia Borges, TASCA, Raquel Soares Dispensação de Psicofármacos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007 In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007.
4.	BOIAN, Elisiane Coan, BONFIM, Patrícia de Souza, CAMPANHA, Angela Maria, PAIXAO, Cássia Lopes, SHIMADA, Ana Lucia Borges, TASCA, Raquel Soares Evolução da Dispensação dos Medicamentos Psicotrópicos Anorexígenos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007 In: Il Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, , 2007.
5.	SHIMADA, Ana Lucia Borges, NISHIYAMA, Paula, SARUHASHI, Milca Ribeiro, OLIVEIRA, João Henrique Torquato, OLIVEIRA, Anderson Rodrigo, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico Medicamentos de alto custo utilizados no tratamento da osteoporose In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anais do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS., 2007.
6.	SARUHASHI, Milca Ribeiro, SHIMADA, Ana Lucia Borges, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, NISHIYAMA, Paula, OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Orientação farmacêutica às pessoas portadores da Doença de Alzheimer In: II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS, 2007, Maringá. Anáis do II Congresso Internacional de Saúde / VI Seminário Científico do CCS., 2007.

93

5 de 7

94

Apresentação de Trabalho

- SHIMADA, Ana Lucia Borges, RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., Lino dos Santos Franco, A., LIMA, W. T., FARSKY, S.
  Effects of Hydroquinone inhalation on functions of tracheal tissue, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, Ribeiro, ALT, HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Hydroquinone inhalation on functions of tracheal tissue, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, Ribeiro, ALT, HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of hydroquinone inhalation on secretion of trachea cells, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- Ribeiro, ALT, SHIMADA, Ana Lucia Borges, HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., LIMA, W. T., FARSKY, S. In vivo Hydroquinone exposure affects leukocyte recruitment and adhesion molecules expression on LPS inflamed lung, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, Ana Lucia Borges, HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Inhaled hydroquinone effects on leukocyte recruitment into the lung and adhesion molecules from circulating blood, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- Ribeiro, ALT, SHIMADA, Ana Lucia Borges, SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Inhalation of Hydroquinone on Lung Leukocyte Recruitment Induced by LPS, 2009. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
- Ribeiro, ALT, SHIMADA, Ana Lucia Borges, HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Effects of Inhalation of Hydroquinone on Phagocitic and Fungicidal Activities on Alveolar Macrophages, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, RIBEIRO, A. L. T., SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., LIMA, W. T., FARSKY, S. Inhalation of Hydroquinone Impairs LPS-induced Leukocyte Migration to the Lung, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, BONFIM, Patrícia de Souza, BOIAN, Elisiane Coan, PAIXAO, Cássia Lopes, CAMPANHA, Angela Maria, TASCA, Raquel Soares Benzodiazepínicos Dispensados pela Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá no Período de 1996 a Junho de 2007, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- BOIAN, Elisiane Coan, BOIAN, Marciele Coan, BORELLI, S., SHIMADA, Ana Lucia Borges Detecção de Antígenos HLA Classe I solúveis no plasma dos grupos étnicos: Caucasóides e Mulatos, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- 11. SHIMADA, Ana Lucia Borges, BONFIM, Patrícia de Souza, BOIAN, Elisiane Coan, PAIXAO, Cássia Lopes, CAMPANHA, Angela Maria, TASCA, Raquel Soares Dispensação de Psicofármacos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- 12. SHIMADA, Ana Lucia Borges, BOIAN, Elisiane Coan, BONFIM, Patrícia de Souza, PAIXAO, Cássia Lopes, CAMPANHA, Angela Maria, TASCA, Raquel Soares Evolução da Dispensação dos Medicamentos Psicotrópicos Anorexígenos na Farmácia Ensino da Universidade Estadual de Maringá - Paraná, no Período de Janeiro de 1996 a Junho de 2007, 2007. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
- 13. SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, PERARO, Luiz, NISHIYAMA, Paula, OLIVEIRA, Anderson Rodrigo, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, OLIVEIRA, João Henrique Torquato Medicamentos de Alto Custo Utilizados no Tratamento da Osteoporose, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, PERARO, Luiz, NISHIYAMA, Paula, OLIVEIRA,
- Anderson Rodrigo Orientação Farmacêutica às pessoas portadores da doença de Alzheimer, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- 15. SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, PERARO, Luiz, OLIVEIRA, Anderson Rodrigo, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico, NISHIYAMA, Paula
  - Pharmaceutical Care to the Wilson's Disease Patients, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, NISHIYAMA, Paula, MACHINSKI JR, Miguel, ZANELLA, Gisele Neumann Exposição Ocupacional ao Mercúrio Metálico, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, NISHIYAMA, Paula, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico O Programa de Medicamentos Excepcionais da 15º Regional de Saúde do Estado do Paraná, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- 18. SHIMADA, Ana Lucia Borges, SARUHASHI, Milca Ribeiro, NISHIYAMA, Paula, PERARO, Luiz, SHIMAZAKI, Lúcia Toshico Programa de Medicamentos Excepcionais: Os Primeiros Passos, 2006. (Outra, Apresentação de Trabalho)
- 19. SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, FERNANDES, Marcio Adriano, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula A contribuição do Laboratório de Análises Toxicológicas na Toxicovigilância, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Análise Forense e Controle de Farmacodependência Realizadas pelo Laboratório de Toxicologia da UEM, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
- SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Análises de Substâncias Psicoativas em Material Biológico, 2005. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
- 22. SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Identificação de Substâncias Psicoativas Ilícitas pelo Laboratório de Toxicologia da Universidade Estadual de Maringá, 2005. (Seminário,Apresentação de Trabalho)

https://wwws.cnpq.br/curriculoweb/pkg\_impcv.trata

23. SHIMADA, Ana Lucia Borges, BANDO, Erika, MACHINSKI JR, Miguel, NISHIYAMA, Paula Monitorização Biológica Realizada pelo Laboratório de Toxicologia no ano de 2004, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Eventos

Participação em eventos

- 1. 42º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2010. (Congresso)
- 2. XII International Congress of Toxicology, 2010. (Congresso)
- 3. XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009. (Congresso)
- 4. 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009. (Congresso)
- Fórum de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009. (Encontro)
- I Simpósio do Programa de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009. (Simpósio)
- 7. 6th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 2007. (Congresso)
- 8. Il Congresso Internacional de Saúde, VI Seminário Científico do CCS, 2007. (Congresso)
- 9. Apresentação (Outras Formas) no(a) Il Maratona de Revezamento Volta de Maringá Pare de Fumar Correndo, 2005. (Outra) Monitora.

#### Totais de produção

## Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	19
Apresentações de Trabalhos (Congresso)	19
Apresentações de Trabalhos (Seminário)	2
Apresentações de Trabalhos (Simpósio)	1
Apresentações de Trabalhos (Outra)	1

## Eventos

Participações em eventos (congresso)		
Participações em eventos (seminário)	1	
Participações em eventos (simpósio)	1	
Participações em eventos (encontro)	1	
Participações em eventos (outra)	4	

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 20/03/2011 às 19:06:42.

# 8.3 Comitê de ética



Oficio CEEA/FCF nº 53/2008

# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

the second second second second

# **CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto "Efeitos da exposição 'in vivo' à hidroquinona sobre a resposta inflamatória aguda: Caracterização dos mecanismos de ação" (Protocolo CEEA nº196), de responsabilidade da pesquisadora Profa. 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 13/10/2008.

São Paulo, 13 de outubro de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal CEEA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br

# 8.4 Artigo submetido para publicação n.1

# *In vivo* hydroquinone exposure alters circulating neutrophils activities and impairs LPS-induced lung inflammation

André Luiz Teroso Ribeiro<sup>1</sup>\*, Ana Lúcia Borges Shimada<sup>1</sup>\*, Cristina Bichels Hebeda<sup>1</sup>, Tiago Franco de Oliveira<sup>2</sup>, Ana Paula de Melo Loureiro<sup>2</sup>, Walter dos Reis Pereira Filho<sup>3</sup>, Alcinéa Meigikos dos Anjos Santos<sup>3</sup>, Wothan Tavares de Lima<sup>4</sup>, Sandra Helena Poliselli Farsky<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

<sup>2</sup> Laboratory of Exposure Markers to Xenobiotics; Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

<sup>3</sup> Division of Chemical Products, National Technical Center; Fundacentro – Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho; Ministério do Trabalho e Emprego; São Paulo.

<sup>4</sup> Department of Pharmacology, Bioscience Institute, University of São Paulo

\*The authors contributed similarly in this paper.

Corresponding author: Sandra Helena Poliselli Farsky<sup>1</sup>

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 BI 13B, Cidade Universitária. São Paulo, SP, Brazil. CEP 05.508-900.

Telephone: +55 11 3091-1193

Fax number: +55-11-3815-6593

Email: sfarsky@usp.br

# Abstract

Hydroquinone (HQ) is an environmental contaminant with important detrimental effects on immune cells. In this study the effects of low doses of HQ exposure on neutrophil mobilization into the LPS-inflamed lung has been investigated. Male Swiss mice were exposed to aerosolized vehicle (control) or 12.5, 25 or 50 ppm HQ (1 hour/day/5 days). One hour after, animals were or not inflamed by LPS inhalation (0.1 mg/ml/10 min) and three hours later, the oxidative burst, cellular cycle and DNA fragmentation in circulating neutrophils were determined by flow cytometer; plasma malondialdehyde (MDA) levels were measured by HPLC; the number of circulating leukocytes and in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were quantified using Neubauer chamber and stained smears; adhesion molecules expressions on circulating neutrophils and lung microvessels endothelial cells were quantified by flow cytometry and immunohistochemistry, respectively; myeloperoxidase (MPO) activity was measured in the pulmonary tissue by colorimetric assay; cytokines in the BALF were determined by ELISA. In vivo HQ exposure augmented plasma MDA levels and oxidative activity of neutrophils, but did not cause alterations on cellular cycle and DNA fragmentation. In this condition, the number of circulating leukocytes was not altered, but HQ exposure reduced LPS-induced neutrophil migration into the alveolar space, as these cells were maintained in the pulmonary tissue. The HQ toxic effect did not depend on impairment on cytokines secretions in the BALF and lung endothelial adhesion molecules expressions. However, HQ exposure elevated  $\beta_2$  and  $\beta_3$  integrins and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expressions in neutrophils, which were not further enhanced by fMLP in vitro stimulation, indicating that HQ exposure activates circulating neutrophils, impairing further stimulatory responses. Therefore, it has been shown, for the first time, the target action of lower levels of *in vivo* HQ exposure in specific pathways of circulating neutrophils activation, which may be considered in infectious diseases host defense.

Key words: environmental contaminant, adhesion molecules, cytokines, mice, DNA fragmentation.

## **1** Introduction

Hydroquinone (HQ) is an eminent environmental pollutant with important effects on immune cells. This phenolic compound is found in the atmosphere mainly as a result of burning of benzene (BZ) in the adulterated fuel. Together with BZ, HQ is also achieved as a component of tobacco, and high concentrations are released during smoking (McGregor, 2007). In addition, HQ is a relevant BZ endogenous metabolite and it has been clearly demonstrated that HQ is a key determinant for immune suppression and leukemias development in human exposed to BZ (Badham et al., 2010; Bi et al., 2010; Atkinson, 2009). These effects have been partially associated to DNA lesions, as HQ exposure causes oxidative DNA damage in a variety of cells, including circulating leukocytes and lung tissue (Melikian et al., 2008; McGregor, 2007; Várkonyi et al., 2006; Leanderson, 1993).

The industry development has caused a huge increase in the environmental pollutants, directly connected to the increment on human respiratory diseases (Perez-Padilla et al., 2010; D'Amato et al., 2010). Inhalation of these substances leads to different degrees of toxicity, depending on toxicants deposition site into the respiratory system and, therefore, make the lung an important target for xenobiotics actions. Lung is a highly specialized tissue composed by different type of cells (Azad et al., 2008; Emmendoerffer et al., 2000), which prompt reacts to breathing pollutants and/or microorganisms dispersed in the air, triggering a complex cascade of inflammatory events to mount a host defense. In this context, pulmonary resident cells release inflammatory mediators, such as reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS), cytokines and eicosanoids which, in turn, stimulates and recruit circulating cells to the lung (Azad et al., 2008).

As HQ is promptly absorbed by respiratory tract and derma, gaining access to other compartments, as bone marrow, it easily interacts with circulating immune cells. The HQ actions on different leukocytes types *in vitro* have shown impairment on secretory functions which are essential during an *in vivo* inflammatory response (Lee et al., 2010; Cho, 2008; Choi et al., 2008). Leukocyte-endothelial interactions are the initial and fundamental events to the leukocyte migration into an inflammatory focus. This highly coordinated process depends on sequential expressions of selectins, integrins and immunoglobulin superfamily molecules. These molecules are expressed on leukocytes and endothelial cells, which control rolling behavior, adherence and transmigration of circulating cells into the inflammatory focus (Wong et al., 2010; Ley et al., 2007). Vascular, metabolic, immune diseases, as well as environmental and occupational pollutants can modify the physiological pattern of adhesion molecules expression leading to altered host defense (Khan et al., 2010; Barreiro et al., 2010; Etzioni et al., 2001; Lino-dos-Santos-Franco et al., 2010).

We have previously shown that *in vivo* HQ exposure alters leukocyte migration into inflammatory sites during acute innate and acquired responses development. While the effects on acquired immunity are related to reduced anaphylactic immunoglobulin production, the mechanisms involved in the acute innate inflammation has not been clearly elucidated (Ferreira et al., 2007; Macedo et al, 2007; 2006).

We have now extended the studies regarding to innate inflammatory reaction using an *in vivo* lower level of systemic HQ exposure in mice and highlighted specific intracellular pathways in circulating neutrophils as a target of HQ action.

## 2 Materials and Methods

## 2.1 Reagents

Lipopolisaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (serotype 026:B6), *N*-Formylmethionyl-leucil-phenylalanine (fMLP), hydroquinone 99%, n-Butanol, 1,1,3,3tetramethoxypropane 99%, hexadecyltrimethylammonium bromide, orto-dianizidine, acetonitrile, butylated hydroxytoluene, potassium iodide, triton X100, propidium iodide and RNAse A were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); hexane, ethanol 99% hydrogen peroxide, acetic acid, trichloroacetic acid, sodium chloride, monobasic and dibasic phosphate sodium, ammonium chloride and acetone were obtained from Synth (Sao Paulo, SP, Brazil); DCFH was obtained from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA); ketamine (1.16 g/10 ml) and xylazine (2.3 g/100 ml) were acquired from Vetbrands (Jacareí, SP, Brazil); heparin (5.000 Ul/ml) and sodium citrate were purchased from Eurofarma (Sao Paulo, SP, Brazil); Panótico<sup>®</sup> was acquired from Laborclin (Pinhais, PR, Brazil); Tissue Tek<sup>TM</sup> OCT was acquired from Miles Scientific (Miles, IN, USA), and all antibodies used in the current study were purchased from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA). SuperBlock Blocking buffer was acquired from Pierce (Rockford, IL, USA).

# 2.2 Animals

Eighteen week old male Swiss mice were supplied by the Animal House of the School of Pharmaceutical Sciences and Chemistry Institute from University of Sao Paulo. The animals were fed a standard pellet diet and water *ad libitum* and before each experimental procedure, the animals were anaesthetized with ketamine/xylazine solution (80 mg/kg; 8 mg/kg; i.p.). All procedures were performed according the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals (SBCAL, number 196) for proper care and use of experimental animals.

# 2.3 HQ exposure

Five mice were randomly placed in an exposure box and exposed to aerosolize HQ at concentrations of 12.5, 25 or 50 ppm or vehicle (saline solution with 5% ethanol) during 1 h, once a day, during 5 days. An ultrasonic nebulizer (NS<sup>®</sup>, Sao Paulo, Brazil) was used to nebulise the solutions in the box. Two openings at the opposite side of entrance solutions in the chamber served as air seeps out. This process was performed in an exhaustion chapel.

# 2.4 Levels of HQ in the exposure box

HQ concentrations in the exposure box were quantified accordingly to the NIOSH protocol N<sup>o</sup> 5004. Briefly, a cassette containing a 0.8 µm cellulose ester membrane was placed on the bottom of the exposure box. The cassette was linked to a sampling pump (A. P. BUCK inc., model VSS5. Orlando, FI, USA) and the air in the exposure box was captured in a flow rate of 2 l/min, during one hour. After that, the cassette was opened and the cellulose ester membrane was removed and placed in a bottle containing 10 ml of glacial acetic acid 1%. Twenty four hours later, the membrane was washed 3 times with 5 ml of glacial acetic acid 1% and the fluid resulting from washing was added to the initial volume of glacial acetic acid 1% (10 ml). HQ concentration levels were analyzed by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). The analytical system consisted

of a Shimadzu HPLC (Kyoto, Kansai, Japan) equipped with two LC-20AT pumps, a CTO-10AS/VP column oven, a PDA-20AV diode array detector, an Proeminence SIL-20AC auto sampler, controlled by a CBM-20A communication module. The following chromatography condition was used for the analyses. A 250 x 4,6 mm ID, 5 μm C18 column (Phenomenex, Torrance, CA) with a C18 security guard cartridge, 4.0 x 3.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), was eluted in isocratic mode with a mobile phase consisting of glacial acetic acid 1% in water and 10 % acetonitrile at a flow rate of 1 ml/min and 30°C. The diode array detector was set at 290 nm for quantification of HQ. Calibration curves were constructed at intervals of 0 to 500 ng of HQ. The data were acquired and processed using LC-Solution Software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). All solvents used were previously filtered (cellulose acetate membrane filter 5 μm – Millipore) and degassed.

# 2.5 Induction of LPS lung inflammatory reaction

The induction of pulmonary inflammation was performed one hour after the last vehicle or HQ exposure using a similar exposure box approach. LPS (0.1 mg/ml) was aerosolized during 10 min at a frequency of 1 ml/min.

# 2.6 Blood leukocytes

Three hours after LPS inhalation, the animals were anesthetized as described above and arterial blood was collected from the abdominal aorta using plastic syringe containing heparin; 5000 UI/ml. Total and differential leukocytes counts were determined in a Neubauer chamber and stained smears with Panotico<sup>®</sup>, respectively. Counts were performed using an optical microcopy (Carl-Zeiss).

## 2.7 Bronchoalveolar lavage (BALF) and cell counts

BALF was collected from vehicle or HQ exposed animals to determine the number of migrated leukocytes and concentrations of cytokines. Briefly, the trachea was exposed and cannulated with a polyethylene tube and the lung washed by flushing with phosphate buffered saline solution (PBS; 0.1 mM NaCl, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 ml). The volumes recovered were similar in all experimental groups and equated to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in a Neubauer chamber and differential cell counts were carried out on cytocentrifuge (Cytospin; Fanen, Sao Paulo, SP, Brazil) and subsequently stained with Panotico<sup>®</sup>.

# 2.8 Myeloperoxidase (MPO) activity

Pulmonary tissue obtained from vehicle or HQ exposed animals was homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB, 1 ml/50 mg of tissue). The homogenates were maintained at 60°C d uring 2 h and then centrifuged (9,300 × g, 2 min). The supernatant (10  $\mu$ l) was added to ortho-dianisidine solution (200  $\mu$ l). The kinetic activity of MPO was determined on spectrophotometer at 460 nm based on velocity of ortho-dianisidine oxidation product formation. Results are presented as MPO units per milligram of tissue.

# 2.9 Adhesion molecules expression

# 2.9.1 Immunohistochemistry

Lung of vehicle or HQ exposed mice were surgically removed, frozen in nitrogen-hexan solution, cryosectioned (8 µm thickness) and fixed in cold acetone (10 min). Briefly, sections were incubated overnight with Superblock solution to avoid nonspecific binding. After that, sections were incubated overnight with the monoclonal antibodies phycoeritrin (PE)-labelled anti-E-selectin, anti-platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), and intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1); fluorescein isothiocyanate (FITC) labelled-anti-vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and anti-P-selectin, at 4° C. Fluorescent-stained areas of vessel walls were selected and the fluorescence intensity was quantified using image analyzer software (Axio Vision<sup>®</sup> 4.8 version, Carl-Zeiss, Germany). The same procedures were carried out in sections of testes incubated without antibody or using goat anti-mouse immunoglobulin G to evaluate the background reaction.

## 2.9.2 Flow cytometry

Leucocytes collected from blood of the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify L-selectin,  $\beta_2$ -integrin,  $\beta_3$ -integrin and PECAM-1 expression. Briefly, erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13M) to the samples and leukocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). To quantify the expression of adhesion molecules, leukocytes (1 x 10<sup>5</sup>) were incubated for 20 to 60 minutes in the dark at 4° C with 10 µl of monoclonal antibody (L-selectin conjugated with FITC;  $\beta_2$  or  $\beta_3$ -integrin conjugated with FITC or PECAM-1 conjugated with PE). After that, the

cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results are presented as arbitrary units of fluorescence.

# 2.10 Malondialdehyde (MDA) levels

In order to study the HQ ability to induce lipid peroxidation in fatty acids on cell membranes, levels of MDA were quantified in plasma of vehicle or 25 ppm HQ exposed mice. For this purpose, 250 µl of plasma were added to 36 µl of butylated hydroxytoluene (BHT) 0.2% in ethanol and 12.5 µl NaOH 10 M followed by incubation at 60 ℃ for 30 min. After that, 1500 µl of trichloroacetic acid 7.2% with potassium iodide 1% were included into the sample and placed on ice for 10 min. The sample was centrifuged (1000  $\times$  q/10 min), the volume of 1000 µl of the supernatant was isolated and mixed with 500 µl of thiobarbituric acid (TBA) 0.6%. The solution was incubated at 90 °C during 45 min. In sequence, the sample received 250 µl *n*-butanol, it was mixed on vortex and centrifuged ( $600 \times q/5$  min). The *n*-butanol phase was collected and injected in the HLPC-DAD system, using the following chromatography condition. A 150 x 4,6 mm ID, 5 µm C18 column (Phenomenex, Torrance, CA) with a C18 security guard cartridge, 4.0 x 3.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), was eluted in isocratic mode with a mobile phase consisting of 35 % MeOH and 65% potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), at a flow rate of 1 ml/min and 30°C. The diode array detector was set at 532 nm and calibration curves were constructed at intervals of 0.5 - 5.0 µM of MDA standard dissolved in PBS.
#### 2.11 ROS generation

Leukocytes collected from blood from the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify oxidative burst. Intracellular ROS was measured by using a non fluorescent probe, 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) that can penetrate into the intracellular matrix of cells where it is oxidized by ROS to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) (Elbim and Lizard, 2009). Erythrocytes were lysed by adding ammonium chloride solution (0.13M) to the samples, and leukocytes were recovered after washing with PBS. Fluorescent dye DCFH-DA (340  $\mu$ M; diluted in PBS) was added to 2 x 10<sup>5</sup> cells in a final volume of 1.1ml. Cells were maintained at 37°C for 30 min and rinsed with EDTA (3 mM; 2 ml) to remove the excess dye. Cells were ressuspended with PBS. The cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results are presented as arbitrary units of fluorescence.

#### 2.12 Cellular cycle and DNA fragmentation

The effects of *in vivo* HQ exposure on cellular cycle and DNA fragmentation were studied using flow cytometry. Blood was collected, using heparin as anticoagulant, from the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice and erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13M). Leukocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). Afterward, RNAse A (20  $\mu$ l; 15mg/ml) and lysis buffer (140  $\mu$ l; PBS, 2 % fetal bovine serum, 0.05 % Triton X 100, 0.1 % sodium citrate) containing propidium iodide (20 $\mu$ g/ml) were added to leukocytes (1 x 10<sup>5</sup> cells). The samples were maintained at room temperature during 30 minutes and immediately analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained. Results of DNA fragmentation are presented as mean of arbitrary units of fluorescence and cellular cycle as percentage of marked cell in each cycle. As a positive control leukocytes were previously incubated with 10 % dimethyl sulfoxide.

#### 2.13 Statistical Analyses

The mean and standard error of the mean (s.e.m.) of all data presented here were compared by Student's *t*-tests or ANOVAs. Tukey's multiple comparisons test was used to determine the significance of differences calculated between the values for the experimental conditions. The statistical software GraphPad Prism<sup>®</sup> was used for this purpose. P<0.05 was consider significant.

#### **3 Results**

#### 3.1 Concentration of HQ into the exposure chamber

In order to know the amount of HQ in the exposure chamber, HPLC analyses were performed in sample obtained in the ester cellulose membrane 1 hour after 25 ppm of HQ exposure. Data obtained showed that concentrations of HQ in the filter was 1.59  $\mu$ g ± 0.26 (n=5), which determines 0.20 mg/m<sup>3</sup> ± 0.09 in the box (according NIOSH, protocol 5004). This concentration is equivalent to 0.04 ppm of HQ (http://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-101/calc.htm) and it is 10 × lower than allowed to human exposure during a journey of 8 hours/day (0.44 ppm Threshold Limit Value - Time Weighted Average (TLV – TWA); NIOSH, 1994).

#### 3.2 Effects of in vivo HQ exposure on cell oxidative processes

The effects of HQ on cellular oxidative damages were investigated by quantifying MDA levels in plasma samples by HPLC, and ROS generation and global DNA fragmentation in circulating neutrophils by flow cytometry. Data obtained showed that mice exposed to HQ presented augmented levels of MDA and increment on ROS generation by neutrophils in comparison to samples obtained from vehicle exposed animals (Figure 1A and B, respectively). Differently, similar global DNA fragmentation (Figure 1C) and no alteration on cellular cycle (Figure 2) were detected in both animal groups.

# *3.3.* Effects of *in vivo* HQ exposure on neutrophil traffic during LPS-induced lung inflammation

*In vivo* HQ exposure at 12.5, 25 or 50 ppm did not modify the number of circulating leukocytes after LPS challenge. The number of neutrophils and mononuclear cells was equivalent in vehicle and HQ exposed animals (Table 1). Normal values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in mice blood are around 15-20%, which is highly enhanced after acute inflammation. This pattern of response was here detected in both groups of animals, indicating that neutrophil mobilization from storage compartments is not affected by HQ exposure. It is noteworthy that PMN and mononuclear cells (MN) values in vehicle and HQ exposed animals (Table 1) must be compared in the same concentration exposure, as assays were performed on different days and mice total leukocyte numbers range about 3,500 to 6,000 mm<sup>3</sup>.

On the other hand, exposure to 12.5, 25 or 50 ppm of HQ reduced the neutrophils numbers recovered in the BALF (Figure 3A) and these cells seemed to persist inside the lung tissue, as MPO levels of lung were higher than those obtained from vehicle exposed animals (Figure 3B).

Numbers of neutrophils in the BALF, obtained in vehicle exposed and no inflamed animals, is almost 50% less in comparison to the LPS-stimulated control group (Figure 3A, dotted line), indicating an efficiency of LPS to induce lung inflammation and that circulating neutrophils were able to migrate to the alveolar compartment.

#### 3.4 Effects of in vivo HQ exposure on cytokines levels in the BALF

As IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 are involved in leukocyte migration by inducing adhesion molecules expressions and secretion of chemoattractants mediators (Barreiro et al., 2010), the effects of HQ exposure on BALF levels of these cytokines into the BALF were investigated using ELISA. Data obtained demonstrated that HQ did not modify basal or LPS-induced secretion of these cytokines (Figure 4).

#### 3.5 Effects of in vivo HQ exposure on adhesion molecules expression

*In vivo* HQ exposure did not modify the LPS-induced endothelial E- and Pselectins (Figure 5A) and ICAM-1, VCAM-1 and PECAM-1 expressions (Figure 5B). Basal expressions of these molecules were very low and did not differ in lung tissue from both animal groups studied (data not shown).

On the other hand, HQ exposure affected the expression of adhesion molecules in circulating neutrophils in the absence of inflammatory stimulus. While L-selectin expression was not altered by HQ intoxication (Figure 6A), levels of  $\beta_2$  and  $\beta_3$  integrins and PECAM-1 were significantly enhanced in neutrophil membranes (Figures 6B, C and D, respectively). In addition, levels of L-selectin,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  integrins and PECAM-1 were enhanced after *in vitro* fMLP stimulation in neutrophil obtained from vehicle exposed animals. Differently, these enhancements were not observed in neutrophils collected from HQ exposed mice (Figures 6B, C and D, respectively).

#### 4 Discussion

Epidemiological studies have associated the pivotal role of environmental pollutants on genesis of a diversity of human diseases, and special attention has been provided to low concentration of pollutants exposures, even though lower than those allowed by legislation of international agencies (NIOSH, OSHA). In this context, *in vivo* experimental animal studies have contributed to amplify the knowledge of the toxic mechanism of actions. Based on these evidences, here we have shown that low levels of *in vivo* HQ exposure impairs LPS-induced host defense and interfere with blood neutrophils traffic, notably modifying adhesion molecules expressions.

The American Conference of Industrial Hygienists (ACGIH) and the National Institute of Occupational Safety & Health (NIOSH) defines 2 mg/m<sup>3</sup> (0.44 ppm) TWA for HQ (WHO, 1994; NIOSH, 1994) as non hazardous exposure. Albeit we did not correlate humans and animal exposures, it is conceivable suppose that, in this study, mice were subjected to low levels of HQ, as defined by their air concentrations in the exposure chamber (0.044 ppm). Our subsequent studies reinforced such point of view, by observations that relevant biochemical and biological end-points described in the literature to *in vivo* BZ or HQ exposure, as number of circulating leukocytes and DNA alterations (Bi et al., 2010, McGrgeor, 2007, Macedo et al., 2006), were not affected by the experimental intoxication procedure here employed.

*In vitro* HQ exposure causes oxidative damage in different cell types, including leukocytes, and DNA lesion is an out coming effect (Ji et al., 2009; Várkoni et al., 2006; Gaskell et al., 2005a; 2005b; Gaskell et al., 2004). The mechanism is based on HQ biotransformation into semiquinones via redox cycling which induces ROS

production, including superoxide radical anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), nitric oxide (NO<sup>•</sup>) and hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) (Winn et al., 2003). Here we have demonstrated that even low concentrations of *in vivo* aerosolized HQ exposure evoked activation of oxidative pathways, as measured by MDA plasma levels and ROS production by circulating cells. Nevertheless, oxidative stress was not accompanied by DNA fragmentation and cell cycle changes.

HQ exposure accelerates neutrophil maturation steps in the bone marrow leading to incomplete granulopoiesis (Hazel et al., 1996; 1995), and, upon more severe toxicity, HQ damages bone marrow cells impairing white and red cells production and maturation (Wiemels et al., 1999; Hazel et al., 1996). In this latter condition, drastic reduction on the circulating cell number is detected, which contributes to anemias and immunosupressions observed in the intoxications (Lee et al., 2010; Kim et al., 2005). Our data showing that HQ exposure did not affect the blood leukocyte profile after LPS inhalation, could suggest that upon infection event, HQ exposure did not affect the neutrophil mobilization from the bone marrow. Nevertheless, neutrophil migration into lung was impaired, as indicated by the reduced number of neutrophils recovered in the BALF after LPS inhalation in mice upon HQ exposure. Interestingly, as lung MPO activity was significantly increased, we hypothesize that HQ exposure causes a defect on cell transmigration from the lung microvascular vessels into alveolar compartment. MPO activity is an indirect marker of neutrophils presence at injured site (Gosemann et al., 2010). It is worth mentioning that HQ stimulates MPO expression and activity, as HQ is endogenous metabolized by MPO into more reactive guinones (McGregor, 2007; Snyder, 2002; Subrahmanyam et al., 1991). Overall, our findings revealing elevated lung MPO activity does not reflect a direct action of HQ on MPO metabolism system, since HQ exposure did not alter the MPO activity in others relevant tissues to HQ toxicity, as bone marrow and hepatic cells (data not shown).

Neutrophil migration into inflamed areas depends on a diversity of chemical mediators secreted by resident and migrated cells into inflammatory site, and by membrane receptors expressed on leukocytes and endothelial cells (Ley et al., 2007). While cytokines display pleiotropic actions, adhesion molecules exert specific actions on pathways of leukocyte migration. E and P-selectins mediates the fundamental and initial leukocyte interaction on endothelium, the subsequent expression of ICAM-1 and VCAM-1 mediates the cell firm adhesion and PECAM-1 expression is responsible for the leukocyte transmigration into the inflamed tissue (Borregaard, et al., 2010; Ley et al., 2007). In our model, in vivo HQ exposure did not affect secretory activity of inflammatory resident cells and the adhesive functions of the microvascular endothelium. Of the interest, synthesis of cytokines and endothelial adhesion molecules depends on nuclear factor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) transcriptional activation (Lawrence, 2009), and although inhibitory action on this pathway is involved in the BZ and HQ toxicity (Choi et al., 2008; Ma et al., 2003; Kerzic et al., 2003), it seems to be not related to HQ actions on lung resident or endothelial cells.

Interestingly, *in vivo* HQ exposure markedly enhanced integrins and PECAM-1 expressions on circulating neutrophils, which, respectively, mediates the firm leukocyte adhesion to the vessel wall and transmigration (Ley et al., 2007). These surprisingly data may be implicated in the HQ toxicity, as integrins and PECAM-1 quiescent expressions in the absence of inflammatory diseases are pivotal to homeostasis and for mounting the host defense (Borregaard, et al., 2010; Ley et al., 2007). Elevated levels of circulating  $\beta$ 2 and  $\beta$ 3 integrins and PECAM-1 molecules, which may be the result of higher membrane expressions and/or subsequent

cleavage, are found in artherosclerosis, diabetes, cancer and others (Mousa, 2008). Integrin membrane expressions on neutrophil depend on gene synthesis, via activation of NF-κB or activating protein-1 (AP-1) transcription factors (Borregaard, 2010); and PECAM-1 membrane levels are determined by membrane cleavage, reinternalization and gene synthesis (Privratsky et al, 2010; Garnacho et al., 2008). Considering that mice have low number of neutrophils into the blood, it is not possible to extract mRNA and nuclear proteins to elucidate the mechanisms of *in vivo* HQ exposure on adhesion molecule expressions.

Adhesion molecules mediate adhesive interactions between cells and activate intracellular signaling. In this context, PECAM-1 and integrin activation are involved on NO production via eNOS stimulation and superoxide generation, respectively (Privratsky et al., 2010; Zarbock and Ley, 2009; Fleming et al, 2005). Therefore, elevated integrins and PECAM-1 expressions may be determined by a direct action of HQ on cell membranes or indirectly by increasing the ROS production. In fact, it has been clearly demonstrated that ROS induces adhesion molecules expression on diverse types of cells (Sadok et al., 2009; Dworakowski et al., 2008; Wu, 2006; Mori et al., 2004). Specifically,  $H_2O_2$  is able to induce  $\beta$  integrins expressions on epithelial cells, contributing to the modifications on its phenotype (Mori et al., 2004). In the current study we have shown that HQ exposure induced adhesion molecules expressions and ROS generation in neutrophils, which, in association, may render a state of inactivation in response to a second stimulus. In fact, here it has been shown that in vitro fMLP stimulation did not induce increment on adhesion molecule expressions on cells obtained from HQ animals. Therefore, it is possible to infer that this mechanism of HQ action may be relevant to the impaired mounting of the acute inflammatory reaction here detected in the lung after LPS inhalation. It is difficult to be sure if HQ is acting directly on adhesion molecule expression or via ROS production or whether both mechanisms occur simultaneously. This assumption needs further investigation.

Notwithstanding we did not establish a direct correlation among human and rodent exposure of HQ, we infer that low levels of HQ exposure are prompt to modify host defense ability, reinforcing the perception that a more profound analyses of environmental risks of HQ exposure are required.

#### **5** References

Atkinson, T.J., 2009. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types. Int. J. Hyg. Environ. Health 212, 1-10.

Azad, N., Rojanasakul, Y., Vallyathan, V., 2008. Inflammation and lung cancer: roles of reactive oxygen/nitrogen species. J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev. 11, 1-15.

Badham, H.J., Winn, L.M., 2010. In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species. Toxicol. Appl. Pharmacol. 244, 273-279.

Barreiro, O., Martin, P., Gonzalez-Amaro, R., Sanchez-Madrid, F., 2010. Molecular cues guiding inflammatory responses. Cardiovasc. Res. 86, 174-182.

Bi, Y., Li, Y., Kong, M., Xiao, X., Zhao, Z., He, X., Ma, Q., 2010. Gene expression in benzene-exposed workers by microarray analysis of peripheral mononuclear blood cells: induction and silencing of CYP4F3A and regulation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA double strand break repair. Chem. Biol. Interact. 184, 207-211.

Borregaard, N., 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity 33, 657-670.

Cho, J.Y., 2008. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. Mediators Inflamm. 2008, 298010.

Choi, J.M., Cho, Y.C., Cho, W.J., Kim, T.S., Kang, B.Y., 2008. Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces IFN-gamma production in antigen-primed lymphocytes. Arch. Pharm. Res. 31, 337-341.

D'Amato, G., Cecchi, L., D'Amato, M., Liccardi, G., 2010. Urban air pollution and climate change as environmental risk factors of respiratory allergy: an update. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 20(2), 95-102.

Dworakowski, R., Alom-Ruiz, S.P., Shah, A.M., 2008. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype. Pharmacol. Rep. 60, 21-28.

Elbim, C., Lizard, G., 2009. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. Cytometry A. 75, 475-481.

Emmendoerffer, A., Hecht, M., Boeker, T., Mueller, M., Heinrich, U., 2000. Role of inflammation in chemical-induced lung cancer. Toxicol. Lett. 112-113, 185-191.

Etzioni, A., 2010. Defects in the leukocyte adhesion cascade. Clin. Rev. Allergy Immunol. 38, 54-60.

Ferreira, A., Macedo, S.M.D., Oliveira, A.P.L., Lima, W.T., Farsky, S.H.P., Coelho, F.R., 2007. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactérias. Rev. Brás. Ciên. Farma. 43, 455-464.

Fleming, I., FissIthaler, B., Dixit, M., Busse, R., 2005. Role of PECAM-1 in the shear-stressinduced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. J. Cell Sci. 118, 4103-4111. Garnacho, C., Albelda, S.M., Muzykantov, V.R., Muro, S., 2008. Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes. J. Control. Release 130, 226-233.

Gaskell, M., McLuckie, K.I., Farmer, P.B., 2004. 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. Mutat. Res. 554, 387-398.

Gaskell, M., McLuckie, K.I., Farmer, P.B., 2005a. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone. Chem. Biol. Interact. 153-154, 267-270.

Gaskell, M., McLuckie, K.I., Farmer, P.B., 2005b. Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and p-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity. Carcinogenesis 26, 673-680.

Gosemann, J.H., van Griensven, M., Barkhausen, T., Kobbe, P., Thobe, B.M., Haasper, C., Pape, H.C., Krettek, C., Hildebrand, F., Frink, M., 2010. TLR4 influences the humoral and cellular immune response during polymicrobial sepsis. Injury 41, 160-167.

Hazel, B.A., O'Connor, A., Niculescu, R., Kalf, G.F., 1996. Induction of granulocytic differentiation in a mouse model by benzene and hydroquinone. Environ. Health Perspect. 104 Suppl. 6, 1257-1264.

Hazel, B.A., O'Connor, A., Niculescu, R., Kalf, G.V., 1995. Benzene and its metabolite, hydroquinone, induce granulocytic differentiation in myeloblasts by interacting with cellular signaling pathways activated by granulocyte colony-stimulating factor. Stem Cells 13, 295-310.

Hazel, B.A., Baum, C., Kalf, G.F., 1996. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts. Stem Cells 14, 730-742.

Ji, Z., Zhang, L., Guo, W., McHale, C.M., Smith, M.T., 2009. The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells. Mutagenesis 24, 367-372.

Kerzic, P.J., Pyatt, D.W., Zheng, J.H., Gross, S.A., Le, A., Irons, R.D., 2003. Inhibition of NF-kappaB by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alpha-induced apoptosis. Toxicology 187, 127-137.

Kim, E., Kang, B.Y., Kim, T.S., 2005. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor-kappa B binding activity. Immunol. Lett. 99, 24-29.

Khan, F., Galarraga, B., Belch, J.J., 2010. The role of endothelial function and its assessment in rheumatoid arthritis. Nat. Rev. Rheumatol. 6, 253-261.

Lawrence, T., 2009. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. Cold Spring Harb Perspect. Biol. 1, 001651.

Leanderson, P., 1993. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells. Ann. N. Y. Acad. Sci. 686, 249-259; discussion 259-261.

Lee, J.Y., Lee, Y.G., Lee, J., Yang, K.J., Kim, A.R., Kim, J.Y., Won, M.H., Park, J., Yoo, B.C., Kim, S., Cho, W.J., Cho, J.Y., 2010. Akt Cys-310-targeted inhibition by hydroxylated

benzene derivatives is tightly linked to their immunosuppressive effects. J. Biol. Chem. 285, 9932-9948.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 7, 678-689.

Lino dos Santos Franco, A., Domingos, H.V., Damazo, A.S., Breithaupt-Faloppa, A.C., de Oliveira, A.P., Costa, S.K., Oliani, S.M., Oliveira-Filho, R.M., Vargaftig, B.B., Tavares-de-Lima, W., 2009. Reduced allergic lung inflammation in rats following formaldehyde exposure: long-term effects on multiple effector systems. Toxicology 256, 157-163.

Lino-dos-Santos-Franco, A., Domingos, H.V., de Oliveira, A.P., Breithaupt-Faloppa, A.C., Peron, J.P., Bolonheis, S., Muscara, M.N., Oliveira-Filho, R.M., Vargaftig, B.B., Tavares-de-Lima, W., 2010. Differential effects of formaldehyde exposure on the cell influx and vascular permeability in a rat model of allergic lung inflammation. Toxicol. Lett. 197, 211-218.

Ma, Q., Kinneer, K., Ye, J., Chen, B.J., 2003. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. Mol. Pharmacol. 64, 211-219.

Macedo, S.M., Lourenco, E.L., Borelli, P., Fock, R.A., Ferreira, J.M., Jr., Farsky, S.H., 2006. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. Toxicology 220, 126-135.

Macedo, S.M., Vaz, S.C., Lourenco, E.L., de Sousa Mda, G., Ligeiro-Oliveira, A.P., Ferreira, J.M., Jr., Almeida, S.R., de Lima, W.T., Farsky, S.H., 2007. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. Toxicology 241, 47-57.

McGregor, D., 2007. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. Crit. Rev. Toxicol. 37, 887-914.

Medeiros, A.M., Bird, M.G., Witz, G., 1997. Potential biomarkers of benzene exposure. J. Toxicol. Environ. Health 51, 519-539.

Melikian, A.A., Chen, K.M., Li, H., Sodum, R., Fiala, E., El-Bayoumy, K., 2008. The role of nitric oxide on DNA damage induced by benzene metabolites. Oncol. Rep. 19, 1331-1337.

Mori, K., Shibanuma, M., Nose, K., 2004. Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells. Cancer Res. 64, 7464-7472.

Mousa, S.A., 2008. Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications. Mol. Biotechnol. 38, 33-40.

NIOSH. 1994. Manual of Analytical Methods (NMAM). www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5004.pdf.

Perez-Padilla, R., Schilmann, A., Riojas-Rodriguez, H., 2010. Respiratory health effects of indoor air pollution. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 14, 1079-1086.

Privratsky, J.R., Newman, D.K., Newman, P.J., 2010. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. Life Sci. 87, 69-82.

Sadok, A., Pierres, A., Dahan, L., Prevot, C., Lehmann, M., Kovacic, H., 2009. NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins. Mol. Cell Biol. 29, 3915-3928.

Snyder, R., 2002. Benzene and leukemia. Crit. Rev. Toxicol. 32, 155-210.

Subrahmanyam, V.V., Kolachana, P., Smith, M.T., 1991. Metabolism of hydroquinone by human myeloperoxidase: mechanisms of stimulation by other phenolic compounds. Arch. Biochem. Biophys. 286, 76-84.

Varkonyi, A., Kelsey, K., Semey, K., Bodell, W.J., Levay, G., Mark, E., Wain, J.C., Christiani, D.C., Wiencke, J.K., 2006. Polyphenol associated-DNA adducts in lung and blood mononuclear cells from lung cancer patients. Cancer Lett. 236, 24-31.

WHO, 1994. International Programme on Chemical Safety. www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc\_alphabetical/en/.

Wiemels, J., Smith, M.T., 1999. Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. Free Radic. Res. 30, 93-103.

Winn, L.M., 2003. Homologous recombination initiated by benzene metabolites: a potential role of oxidative stress. Toxicol. Sci. 72, 143-149.

Wong, C.H., Heit, B., Kubes, P., 2010. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. Cardiovasc. Res. 86, 183-191.

Wu, W.S., 2006. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. Cancer Metastasis Rev. 25, 695-705.

Zarbock, A., Ley, K., 2009. Neutrophil adhesion and activation under flow. Microcirculation. 16, 31-42.

### **Conflict of interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

### Acknowledgments

The authors thank FAPESP for financial support (grant no. 08/55382-7). Sandra H. P. Farsky and Wothan Tavares de Lima are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), and Cristina B. Hebeda is a Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) postdoctoral fellow. The authors also thank PhD Simone Margues Bolonheis for technical assistance.



**Fig.1.** Effects of HQ exposure on cellular oxidative biomarkers. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Plasma was used to quantify MDA levels (HPLC) and leukocytes were recovery to determine ROS generation (DCFH; flow cytometry) and global DNA fragmentation (flow cytometry). Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group.\*P<0.05 vs. respective control.



**Fig. 2.** Effects of HQ exposure on cellular cycle. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Leukocytes were recovery to determine cellular cycle by flow cytometry. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group.



**Fig. 3.** Effects of HQ exposure on leukocyte migration into the BALF and MPO activity in the lung tissue. The animals were exposed to vehicle or HQ (12.5, 25 or 50 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and the number of neutrophils was quantified using Neubauer chamber and stained smears (A). In sequence, lungs were collected and used to quantify MPO activity by o-dianisidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> assay (B). The dotted line indicates neutrophil counts of vehicle and non inflamed exposed animals. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 vs. respective control.



**Fig. 4.** Effects of HQ exposure on IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 levels into the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were or not exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and levels of cytokines were quantified by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. \*P<0.05 vs. respective basal control.



**Fig. 5.** Effects of HQ exposure on adhesion molecules expression on lung microvascular endothelium. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, lung was collected and used to determine expression of E-selectin and P-selectin (A), ICAM-1, PECAM-1 and VCAM-1 (B) by immunohistochemistry. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group.



**Fig. 6.** Effects of HQ exposure on adhesion molecules expressions on neutrophils membranes. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Expressions of L-selectin (A),  $\beta_2$  integrin (B),  $\beta_3$  integrin (C) and PECAM-1 (D) were quantified on neutrophil membranes in the absence (basal) or presence of fMLP *in vitro* (10<sup>-9</sup>M) by flow cytometry. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*P<0.01 vs. respective basal values; <sup>a</sup>P<0.05 vs. respective control stimulated with fMLP.

Leucogram (leukocytes/mm³)				
HQ concentration	Vehicle		HQ	
	PMN	MN	PMN	MN
12.5 ppm	2108 ± 189.1	1432 ± 170.4	2534 ± 290.6	1663 ± 235.4
25 ppm	1978 ± 420.7	2737 ± 356.7	1884 ± 357.0	3358 ± 542.9
50 ppm	3214 ± 277.9	856.3 ± 173.2	4143 ± 397.8	1194 ± 255.3

**Table 1.** Effects of HQ exposure on the number of circulating leukocytes after LPS stimulation. The animals were exposed to vehicle or HQ (12.5, 25 or 50 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, blood was collected from the abdominal aorta and the total and differential counts of leukocytes were determined in Neubauer chamber and stained smears, respectively. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from ten animals in each group.

# 8.5 Draft do artigo para publicação n.2

# RELEVANCE OF MONOCYTE CHEMOTACTIC PROTEIN-1 ON *IN VIVO* HQ EXPOSURE TOXICITY

Ana Lúcia Borges Shimada<sup>1</sup>; André Luiz Teroso Ribeiro<sup>1</sup>; Cristina Bichels Hebeda<sup>1</sup>; Simone Marques Bolonheis<sup>1</sup>; Wothan Tavares de Lima<sup>2</sup>; Sandra Helena Poliseli Farsky<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Bioscience Institute, University of São Paulo

Corresponding author: Sandra Helena Poliselli Farsky<sup>1</sup> Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl 13B, Cidade Universitária. São Paulo, SP, Brazil. CEP 05.508-900. Telephone: +55 11 3091-1193 Fax number: +55-11-3815-6593 Email: sfarsky@usp.br

#### Abstract

Hydroquinone (HQ) is a component of indoor and outdoor pollution. Here it has been demonstrated that mice exposed to low levels of aerosolized HQ (25 or 50 ppm; 1h/day/5 days) presented impaired mononuclear cell (MN) migration to the LPS-inflamed lung as consequence of reduced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) secretion, without affect circulating MN, cytokines secretion and adhesion molecules alterations on MN membranes. Reduced MCP-1 concentrations detected on supernatant of *ex vivo* alveolar macrophages (AM) and tracheal tissue (TT) from HQ exposed mice were also found. A direct action of HQ on MCP-1 secretion was verified by incubating naïve AM or TT with HQ. Using the human monocytic lineage THP-1 in the Boyden chamber, it was confirmed that in fact reduced concentrations of MCP-1 found in the BALF or cell supernatant from HQ exposed mice determined reduced MN migration. Considering that resident MN are involved on lung tissue homeostasis, in the innate and acquired immunity, the mechanism of HQ toxicity here presented may be relevant on genesis of lung diseases.

**Keywords**: LPS-induced mononuclear cell migration; tracheal tissue; alveolar macrophages; chemotaxis; THP-1; environmental pollution.

#### 1. Introduction

Since new politics of tobacco fume restriction on public places, cigarette smoking has contributed to the indoor pollution. In this context, hydroquinone (HQ) and benzene (BZ) cooperate to this type of pollution as they are present in high concentrations on tobacco. In addition, HQ is endogenously produced during BZ biotransformation mainly in the lung, liver and bone marrow (McGregor, 2007; Snyder, 2002; 2004).

During breathing, cells and tissue present in the respiratory system are easy targets of toxic actions of pollutants dispersed in the atmosphere. Alveolar macrophages (AM) are lung resident cells and the most frequent cell found into bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Since AM are directly in contact with inhaled air, they are functionally responsible for eliminate invading agents such as particles and microorganisms by producing multiple inflammatory mediators including ROS, cytokines and chemokines (Imrich et al, 2007; Nicod, 1999).

Macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1 or CCL2) is a member of the CC chemokines subfamily, produced by different cell types as a result of induction by oxidizing agents, cytokines or growth factors (Yadav et al., 2010). Although MCP-1 is constitutively produced, higher concentrations are observed during inflammatory response. By interacting with G-protein-coupled receptors as the chemokine (C-C motif) receptor 2 and the Duffy antigen receptor for chemokines (DARC) expressed on leukocyte membranes, MCP-1 controls the monocyte/macrophage and lymphocyte traffic during inflammation (Yadav et al., 2010; Deshmane et al., 2009).

It has been clearly demonstrated that HQ causes different degrees of toxicity to the immune cells, and immune responses mediated by mononuclear (MN) cells seem to be the most affected (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Choi et al., 2008). The toxicity has been related to the impairment on MN functions, fundamental for an efficient inflammatory response. In this context, HQ has shown inhibited secretion of several cytokines as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 and other mediators such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) by MN/macrophages (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Choi et al., 2008; Kim et al., 2005; Carbonnelle et al., 1995). In addition, HQ reduced cell-cell adherence mediated by

the integrins CD29 and CD18 and phagocytic uptake mediated by the co-stimulatory molecules CD80 and CD86. *In vitro* but not *in vivo* HQ exposure inhibited lymphocyte proliferation from bone marrow and spleen (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Macedo et al. 2007, Kim et al., 2005). This broad spectrum of immunosuppressive effects has been associated to the HQ inhibition on NF-κB. The role of HQ on MCP-1 production has recently observed. *In vitro* HQ exposure inhibited MCP-1 secretion via transcriptional modification by human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 (Pons and Marin-Castaño, 2011).

Considering the *in vitro* toxicity of HQ on MN cells, the present study was undertaken to investigate the role of *in vivo* HQ exposure on MN recruitment in mice. Our data demonstrated that HQ directly controls MCP-1 secretion, which is straight related to the MN chemotaxis. To our knowledge, this is a new mechanism of *in vivo* HQ toxicity and may be relevant during MN-dependent immune responses.

#### 2. Material and Methods

#### 2.1 Chemicals

Lipopolisaccharide (LPS) from Escherichia coli (serotype 026:B6), N-Formylmethionyl-leucil-phenylalanine (fMLP), hydroquinone 99% were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); human MCP-1 from eBioscience (San Diego, CA, USA); Rat IFN- $\gamma$  Recombinant was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA); all RT-PCR reagents were purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA); MCP-1 ELISA kit and antibodies anti-L-selectin, anti- $\beta_2$  or  $\beta_3$ integrin and anti-PECAM-1 from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA).

#### 2.2 Animals

Eighteen-week-old male Swiss mice were supplied by the Animal House of the School of Pharmaceutical Sciences and Chemistry Institute from University of Sao Paulo. The animals were fed a standard pellet diet and water *ad libitum*. All procedures were performed according to the Brazilian Society of Science of Laboratory Animals (SBCAL, number 196), for proper care and use of experimental animals. Before each experimental procedure, the animals were anaesthetized with ketamine/xylazine (80:8mg/Kg; i.p.) to avoid stress.

# 2.3 Protocols of exposure 2.3.1 In vivo HQ exposure

Animals were exposed to aerosolized HQ at 25 or 50 ppm (1.5 mg or 3.0 mg/60 mL/1h, respectively) during 5 days, once a day. Control animals were exposed to vehicle (ethanol 5%, in saline). An ultrasonic nebulizer (NS<sup>®</sup>, Sao Paulo, Brazil) was used to nebulise the solutions in the box.

#### 2.3.2 In vivo LPS exposure

The animals were exposed to LPS (*E. coli* 026:B6; 0.1 mg/mL; 10 minutes) one hour after the last *in vivo* HQ or vehicle exposure using a similar approach as described above.

#### 2.3.3 In vitro HQ exposure

Tracheal tissue or alveolar macrophages (AM) obtained from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of naïve animals were incubated with 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 100  $\mu$ M HQ or RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS (control) during 1 hour. Afterward, the treatments were removed and trachea and AM were stimulated for 24 hours with LPS (1  $\mu$ g/ml) and LPS+IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/ml + 10 ng/ml), respectively. Supernatants were collected and used for determination of the MCP-1 levels.

#### 2.4 Blood and Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collection

One hour after vehicle or HQ exposure or three hours after LPS exposure, the animals were anaesthetized. Blood was collected from abdominal aorta to quantify circulating mononuclear cells and BALF was collected according to De Lima et al. (1992). The total and differential cell numbers in the blood and BALF were determined in Neubauer chambers and smears stained with Panotico.

#### 2.5 Adhesion molecules expression

Leukocytes collected from blood of the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify L-selectin,  $\beta_2$ -integrin,  $\beta_3$ -integrin and PECAM-1 expression. Briefly, erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13 M) to the samples and leukocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). Leukocytes (1 x 10<sup>5</sup>) were stimulated or not with fMLP (10<sup>-9</sup>M, 1 h) and to quantify the expression of adhesion molecules, they were incubated for 20 to 60 minutes in the dark at 4 °C with monoclonal antibody (L-selectin,  $\beta_2$  or  $\beta_3$ -integrin conjugated with FITC or PECAM-1 conjugated with PE). After that, the cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results were presented as arbitrary units of fluorescence.

#### 2.6 Alveolar macrophages culture

One hour after the last vehicle or HQ exposure, the BALF was collected and resident alveolar macrophages (AM) were isolated, as following. Total cells ( $1 \times 10^5$  /well) were placed in a 24-well plastic microplate containing RPMI-1610 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum during 3h to allow adherence. Then, non-adherent cells were removed by washing with culture medium and adhered cells

were stimulated or not with LPS (1  $\mu$ g/ml) and IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) and incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, for 24 hours. The supernatant was collected to determine the concentrations of MCP-1.

#### 2.7 Ex vivo trachea culture

One hour after the last vehicle or HQ exposure, the animals were anaesthetized and killed by sectioning the abdominal aorta. The trachea was collected and placed in a 24-well plastic microplate containing DMEM medium (2 ml) containing 40 mg/L of gentamicin. The tissue was incubated in the absence or presence of LPS (1  $\mu$ g/ml) and maintained at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, during 24 hours. The supernatant was collected to determine concentrations of MCP-1.

#### 2.8 MPC-1 levels quantification

Concentrations of MCP-1 were quantified in BALF and in the supernatant of trachea or AM culture, using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits according to the manufacturer's specifications. The results were expressed as pg/mL.

#### 2.9 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted from *in vitro* LPS-stimulated trachea using Trizol reagent following the manufacturer's instructions. RNA extraction was carried out in an RNAse free environment. RNA was quantified by reading the absorbance at 260 nm.

cDNA was synthesized from total RNA (2 µg) using an oligo(dT)<sub>15</sub> primer (20 µg/ml) after incubation (70 °C, 5 min) in the presence of deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTP, 2 mM), ribonuclease inhibitor (20 U) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (200 U) in reverse transcriptase buffer (25 µL final volume). The reverse transcription occurred by incubation at 42 °C (60 min). For PCR, the cDNA obtained was incubated with Taq DNA Polymerase (2.5 U), 3'- and 5'- specific primers (0.4 µM) and dNTP mix (200 µM) in buffer-thermophilic DNA polymerase containing MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM). The following primer sequences were used:  $\beta_2$ -microglobulin (internal control): 5'-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3' (forward) and 5'-AATGTGAGGCGGGTGGAACTG-3' (reverse), MCP-1: 5'-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3' (forward) and 5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3' (reverse).

## 2.10 In vitro chemotaxis 2.10.1 THP-1 cell culture

Human monocytic leukaemia cell line, THP-1 cells, were cultivated in suspension in RPMI-1640 medium containing 10% FBS, penicillin (100 U/mI) and streptomycin (100  $\mu$ g/mI) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

#### 2.10.2 Boyden chamber

THP-1 cell migration was evaluated in a 48-well Boyden chamber with the top and bottom wells separated by cellulose filters (8  $\mu$ m pore size, Milipore). As chemotactic stimuli, solutions using recombinant human MCP-1 were prepared in RPMI culture medium at concentrations mimicking MPC-1 levels found in the supernatant of *ex vivo* control or HQ exposure tracheal tissue (0.1 or 0.9 ng/ml, respectively). LPS (10  $\mu$ g/ml) was added to MCP-1 solutions to counterfeit residual LPS present in the ex vivo cultures. MCP-1/LPS solutions were added to the bottom wells. The THP-1 cells (1x10<sup>5</sup> cells/ml) were placed in the top wells. RPMI alone was used as negative control. Following an incubation period of 24 hours (37 °C; 5% CO<sub>2</sub>), the filters were stained and the distance travelled by cells through the filters was counted in optic microscope.

#### 2.11 Statistical analyses

Mean and standard error of the mean (s.e.m.) of all data presented herein were compared by Student's *t*-test or ANOVA. Turkey's multiple comparisons were used to determine the significance of differences calculated between the values for the experimental conditions. GraphPad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA) was used. The differences were considered significant for P < 0.05.

#### 3 Results

#### 3.1 In vivo HQ exposure impairs mononuclear cells migration into inflamed lung

The number of circulating MN cells was not modified after *in vivo* HQ exposure, both in basal or LPS-stimulated conditions (Figure 1). However, MN cells migration to the BALF in response to LPS inhalation was markedly impaired (Figure 2).

# 3.2 In vivo HQ exposure does not affect adhesion molecules expression on circulating mononuclear cell membranes

To verify whether reduced cell migration into the BALF was caused by alterations on adhesion molecules expressions of circulating MN cells, flow cytometry assay was employed. However, *in vivo* HQ 25ppm exposure did not modify the expression of the adhesion molecules, L-selectin,  $\beta$ 2 integrin,  $\beta$ 3 integrin and PECAM-1 in circulating MN cells in the absence or presence of fMLP (Figura 3).

#### 3.3 In vivo and in vitro HQ exposure on MCP-1 levels

To clarify the mechanisms by which HQ impairs MN cell migration to the BALF, its actions on MCP-1 secretion by lung/BALF cells were investigated. *In vivo* HQ 25ppm exposure impaired MCP-1 levels on BALF (Figure 4). Data was *ex vivo* confirmed as reduced MCP-1 levels were observed in the supernatant of AM and tracheal tissue from HQ-exposed animals in the absence or presence of stimulus (Figure 5A and B). This effect seems to be related to a lower MCP-1 mRNA content in tracheal tissue after HQ exposure (Figure 5C).

A direct HQ action on the chemoattractant chemokine secretion was observed as reduced levels of MCP-1 were found in the supernatant of *in vitro* HQ treated naïve AM and tracheal tissue in the presence of LPS or LPS/IFN-γ (Figure 6).

# 3.3 Diminished levels of MCP-1 evoked by HQ exposure are related to the impaired mononuclear cell migration

To understand the connection of *in vivo* HQ exposure on MCP-1 secretion and MN migration, THP-1 monocytic cells were used in a Boyden chamber model. Using MCP-1 (0.1 and 0.9 ng/ml) and/or LPS (10  $\mu$ g/ml) as chemotactic agents, data obtained showed that MCP-1 (0.9 ng/ml) plus LPS induced cell migration into the filter. On the order hand, distance travelled by THP-1 cells was shorter when the lowest concentration of MCP-1 was employed (Figure 7).

#### Discussion

The increment on environment pollution has been attributed not only to the technology advent, but also to the anthropogenic activities. Epidemiological studies have associated the increase on air pollutants with respiratory, cardiac and metabolic diseases (Sasaki et al., 1998; Chiba; Abe, 2003; Yang; Omaye, 2009; Brook, 2008; Brook; Rajagopalan, 2010; Burgan, 2010; Pearce; Braverman, 2009). In this context, *in vivo* experimental studies have contributed to amplify the comprehension of the air pollutants toxicity. Therefore, here a new mechanism of HQ toxicity is shown. *In vivo* HQ exposure inhibited MN cell migration to the LPS-inflamed lung dependent on MCP-1 secretion by resident cells.

Accordingly McGregor (2007) there are limited evidences of HQ toxic actions after *in vivo* exposure, which may contribute to the inadequate HQ classification as non carcinogenic to humans (group 3) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). In this context, our research group has investigated the effects of *in vivo* HQ exposure on mechanisms related to leukocyte migration and leukocyte-endothelium interactions (Macedo et al., 2006, 2007; Ferreira et al., 2006; Ribeiro et al., 2011 – submitted).

The National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) states 2mg/m<sup>3</sup> (0.44ppm) as threshold limit value – threshold weighted average (TLV-TWA) for human HQ exposure (NIOSH, 1994). Based on this information and considering HQ toxicity in mice (Snyder, 2006; 2007), the HQ concentrations used in the current study were 10 times lower (25ppm = 0.044ppm) than that defined by NIOSH (0.44ppm) (Ribeiro et al, 2011 – submitted). In this condition, HQ exposure did not alter the number of circulating MN cells but reduced MN cells into the BALF after LPS inhalation. Leukocyte migration to the inflammatory site depends on highly controlled sequential expression of adhesion molecules and inflammatory mediators (Ley et al., 2007; Borregaard, 2010) and it has been described that *in vivo* HQ exposure caused impairment on neutrophil migration due to altered adhesion molecules expression on cell membranes (Cho et al., 2008; Ross et al., 2010; Ribeiro et al., 2011 – submitted). Differently, expressions of adhesion molecules on MN membranes were not altered in the present study, suggesting that other mechanisms may be involved.

To study the mechanisms related to the reduced MN cell migration, a screening of inflammatory cytokines secreted in the BALF was performed and the HQ actions on

TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 secretions were ruled out (data not shown). Interestingly, diminished levels of MCP-1 were found into the BALF after LPS inflammation. The effect was dependent on functional alterations on resident macrophages and tracheal tissue as reduced MCP-1 levels were found in the supernatant of these cultured cells. Since a limited number of alveolar macrophages is found into the BALF of mice and HQ exposure also reduced this number, it was performed RT-PCR assay only on tracheal tissue which demonstrated that MCP-1 reduction was defined by impaired gene synthesis. HQ directly modulates MCP-1 secretion as reduced levels of this cytokine were also detected when naïve MN cells and tracheal tissue were in vitro incubated with HQ. Recently, it was demonstrated that *in vitro* HQ exposure reduced MCP-1 secretion by human neutrophils by unknown mechanism (Yang et al., 2010).

MCP-1 is a fundamental chemotatic molecule mainly released after stimulation. It is transcriptionally induced after NF-κB, AP-1 and/or STAT activation in a highly controlled process which is tissue and stimulus-specific (Ding et al., 2010; Yadav et al., 2010; Tanimoto et al., 2008). Differently from other cytokines here investigated, which are synthesized via NF-KB activation, only MCP-1 levels were reduced by HQ exposure. We suppose that this effect may be related to the following: 1) partial activation of transcription factors; 2) reduced interaction between transcription factors and specific gene promoter region or 3) diminished mRNA stability (Yadav et al., 2010; Ding et al, 2010; Tanimoto et al., 2008). In fact, it has been demonstrated that MCP-1 mRNA stability may be decreased by some conditions and substances like SP600125, an inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase and atorvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor (Ding et al, 2010; Tanimoto et al., 2008).

It has been clearly demonstrated that by binding to CCR2, MCP-1 control MN traffic, mainly under inflammatory conditions (Yadav et al., 2010; Melgarejo et al., 2009; Young; Arndt, 2009; Huffnagle et al, 1995). Here the impairment on MN cells migration observed in *in vivo* HQ exposed mice dependent on reduced MCP-1 levels was confirmed using the human monocytic lineage THP-1 and Boyden chamber assay. THP-1 was used as scarce MN cells are present in the blood and BALF of mice. In fact, similar MCP-1 concentrations to that detected in *ex vivo* HQ exposed tracheal tissue reduced THP-1 migration in the Boyden chamber. This data confirmed

that *in vivo* HQ exposure reduced MCP-1 secretion by resident cells in the respiratory system which is involved in reduced MN cell migration to the inflamed lung.

Taken together, here it has been highlighted that *in vivo* HQ exposure modifies cellular functions connected to the innate immune response. The harmful effects of *in vivo* HQ exposure seem to be only detected after a challenge. This is a new mechanism of *in vivo* HQ action on MN cell migration which could be relevant during inflammatory lung diseases.

#### 5 References

Borregaard, N. 2010. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity. 33,657-70.

Brook R.D.; Rajagopalan S. 2010. Particulate matter air pollution and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* v.12, 291-300.

Brook, R.D. 2008. Cardiovascular effects of air pollution. Clin Sci (Lond). 115, 175-187.

Burgan, O. et al. 2010. Cardiovascular effects of sub-daily levels of ambient fine particles: a systematic review. Environ Health. 15, 9-26.

Carbonnelle, P. et al. 1995. Effect of the benzene metabolite, hydroquinone, on Interleukin-1 secretion by human monocytes in vitro. Toxicol Appl Pharmacol. 132, 220-226.

Chiba, H.; Abe S. 2003. The environmental risk factors for COPD--tobacco smoke, air pollution, chemicals. Nippon Rinsho. 61, 2101-2106.

Cho, J.Y. 2008. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. Mediators Inflamm. 2008:298010, 1-11.

Choi, J.M. et al. 2008. Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces IFNgamma production in antigen-primed lymphocytes. Arch Pharm Res. 31, 337-41.

De Lima, W.T. et al. 1992. Immune-complex alveolitis in the rat: evidence for platelet activating factor and leukotrienes as mediators of the vascular lesions. Eur J Pharmacol. 213, 63-70.

Deshmane, S.L. et al. 2009. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. J Interferon Cytokine Res. 29, 313-26.

Ding, G.X. et al. 2010. SP600125, an inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase, blocks expression of angiotensin II-induced monocyte chemoattractant protein-1 in human mesangial cells. World J Pediatr. 6, 169-176.

Ferreira, A. et al. 2006. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. Braz. J. Pharm. Sci. 43, 455-464.

Imricha, A. et al. 2007. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol. 218, 256–264.

Lee, J.Y. et al., 2007. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. Mol Cells. 23, 198-206.

Ley, K. et al. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat Rev Immunol. 7, 678-89.

Macedo, S.M. et al. 2006. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. Toxicology. 220, 126-35.

Macedo, S.M. et al. 2007. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. Toxicology. 241, 47-57.

McGregor, D. 2007. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. Crit Rev Toxicol. 37, 887-914.

Nicod, L.P., 1999. Pulmonary defence mechanisms. Respiration. 66, 2-11.

Pearce, E.N.; Braverman, L.E. 2009. Environmental pollutants and the thyroid. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism. 23,801–813.

Pons, M., Marin-Castaño, M.E., 2011. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates mcp-1, vegf and pedf expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. PLoS One. 6, e16722.

Ribeiro, A.L.T. et al., 2011. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophils activities and impairs LPS-induced lung inflammation. In press.

Ross, D. et al., 2010. Benzene toxicity: The role of the susceptibility factor NQO1 in bone marrow endothelial cell signaling and function. Chem Biol Interact. In press.

Sasaki, H. et al. 1998. Effects of air pollution and smoking on chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. Tohoku J Exp Med. 186, 151-167.

Snyder, R. 2002. Benzene and Leukemia. Critical Reviews in Toxicology. 32, 155–210.

Snyder, R. 2004. Xenobiotic Metabolism and the Mechanism(s) of Benzene Toxicity. Drug Metabolism Reviews. 36, 531–547.

Tanimoto, A. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 expression is enhanced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor via Jak2-Stat5 signaling and inhibited by atorvastatin in human monocytic U937 cells. J Biol Chem. 283, 4643-4651.

Yadav A. et al. 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. Clin Chim Acta. 411, 1570-1579.

Yang, W; Omaye, S.T. 2009. Air pollutants, oxidative stress and human health. Mutation Research. 674, 45–54.

Melgarejo, E. et al., 2009. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 41, 998–1001.

Young, S.K.; Arndt, P.G. 2009. c-Jun NH2-terminal kinase regulates lipopolysaccharideinduced pulmonary mononuclear cell recruitment via CCL2. Exp Lung Res. 35, 682-700.

Huffnagle, G.B. et al, 1995. The Role of Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1) in the Recruitment of Monocytes and CD4+ T Cells During a Pulmonary *Cryptococcus neoformans* Infection. The journal of Immunology, 155, 4790-4797.

## 6 Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

# 7 Acknowledgment

The authors thank FAPESP for financial support (grant no. 08/55382-7and no. 09/03964-5). Sandra H. P. Farsky and Wothan Tavares de Lima are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), Cristina B. Hebeda and Simone M. Bolonheis are Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) postdoctoral fellows.

### Legend for figures



**Fig. 1.** Effects of HQ exposure on the number of circulating mononuclear leukocytes after LPS stimulation. The animals were exposed to vehicle or HQ (50 or 25ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10min). Three hours later, blood was collected from the abdominal aorta and the total and differential counts of leukocytes were determined in Neubauer chamber and stained smears, respectively. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from ten animals in each group.



**Fig. 2.** Effects of HQ in vivo exposure on mononuclear leukocyte migration into the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (50 or 25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and the number of mononuclear cells was quantified using Neubauer chamber and stained smears. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. The dotted line indicates mononuclear counts of vehicle and non inflamed exposed animals. \*P<0.05 vs. control.



**Fig.3.** Effects of HQ exposure on adhesion molecules expressions on mononuclear cells membranes. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later, blood was collected from the abdominal aorta. Expressions of L-selectin (A),  $\beta_2$  integrin (B),  $\beta_3$  integrin (C) and PECAM-1 (D) were quantified on mononuclear cells membranes in the absence (basal) or presence of fMLP in vitro (10<sup>-9</sup>M), by flow cytometry. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals.



**Fig.4.** Effects of HQ exposure on MCP-1 levels in the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were or not exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and levels of MCP-1 were quantified by ELISA. Results are expressed as the mean  $\pm$  s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals. \*P<0.05 vs. respective basal control; <sup>#</sup>P<0.05 vs. LPS control.



**Fig.5.** Effects of *in vivo* HQ exposure on MCP-1 concentration in AM (A) and trachea (B) culture supernatants. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h the trachea and BALF were collected. Levels of MCP-1 were quantified by ELISA on supernatants of AM and trachea culture. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. \*P<0.05, \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 vs. respective basal control; #P<0.001 vs. LPS control. (C) Densitometric analysis of RT-PCR from trachea tissue culture was illustrated.



**Fig.6.** Effects of *in vitro* HQ exposure on MCP-1 concentration in AM and trachea culture supernatants. The trachea and AM from naïve animals were incubated with 1, 10 and 100  $\mu$ M of HQ from 1 hour. Levels of MCP-1 were quantified by ELISA on supernatants of these cultures. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. \*P<0.05 vs. control.


**Fig.7.** Effects of MCP-1 on THP-1 chemotaxis. THP-1 cells  $(1 \times 10^5)$  were incubated in Boyden chamber for 24 hours (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). As chemotatic stimuli were used human MCP-1 (0.1 and 0.9 ng/ml) and/or LPS (10 µg/ml). The distance travelled by the cells was quantified by optical microscopy. The results are expressed as the mean ± s.e.m. of 2 independent experiments. \*\*\*P<0.001 vs control (RPMI alone); <sup>#</sup>P<0.05 vs MCP-1 (0.9 ng/ml + LPS 10 µg/ml).