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

Efeitos da hidroquinona sobre atividades funcionais da célula endotelial e de neutrófilos

Fernanda Júdice Pinedo

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

> São Paulo 2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicologias

Efeitos da hidroquinona sobre atividades funcionais da célula endotelial e de neutrófilos

Fernanda Júdice Pinedo

Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

> São Paulo 2009

FERNANDA JÚDICE PINEDO

Efeitos da hidroquinona sobre atividades funcionais da célula endotelial e de neutrófilos

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky orientador/presidente

1°. examinador
 2°. examinador

São Paulo, _____ de 2009.

Aos meus pais por todo o auxílio e incentivo nessa jornada...

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar a oportunidade de todo o aprendizado e me fazer merecedora de todas as conquistas da minha vida.

A minha família, meu irmão e aos meus pais, por todo o amor dedicado e por toda a formação. E por sempre me apoiarem em todas as decisões da minha vida .

A professora Sandra pela oportunidade e orientação .

Ao Bruno, por toda a paciência nesse período da minha vida e por sempre estar disposto a me ajudar, sempre procurando me deixar feliz e me ajudando a ver o lado bom das coisas.

Aos companheiros do laboratório, onde cada um se tornou especial: a Kaline, por toda amizade que cresceu entre nós, ao meninos, André e Rodrigo, que vieram equilibrar esse laboratório cheio de mulheres, as meninas Ana Lúcia e Karine, pela convivência, a Karen que sem dúvida se tornou uma amiga e me deu uma segunda casa aqui em SP, a Dani, que se tornou também uma grande companheira no fim desse mestrado e por estar sempre pronta a ajudar, a Cristina, pelas milhões de ajudas e pelos puxões de orelha, Gabi, pelas muitas risadas e Arícia, uma pessoa muito especial e que sempre me ajudou muito!!!

As minhas amigas que sempre estão comigo e também fizeram parte dessa conquista : Leca, Char, Isa, Bel, Fabrize, Marina, Sarah e ao meu amigo do coração, que mesmo longe está sempre presente, William.

A todos do departamento pelos 2 anos de convivência: Sidnei, Stella, Marli, Paula, Vânia, Fabiana, Tiago Peixe, Daniel (Erechim), Rafael Caio, Larissa, Ângelo, Dalva, Helena, Luzia e Roseli.

A todos os colaboradores e laboratórios que eu freqüentei nesse projeto: Prof Dr. Marcelo Múscara e Simone Teixeira, Prof Dr Sandro Rogério de Almeida e sua aluna Vanessa, Prof Dr Mário Hirata, Prof Dr Rui Cury e seu aluno Marco, Prof^a Dr^a Regina Markus e seus alunos Eduardo Tamuro e Èrika, Prof^a Dr^a Zulma Ferreira, Prof^a Dr^a Catarina de Fátima Pereira e seu aluno Sérgio, e Jorge Ferreira do Instituto Butantã.

E ao apoio financeiro do CNPg e da FAPESP.

Meus sinceros agradecimentos a todos que fizeram parte dessa conquista.

Muito Obrigada!

RESUMO

A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico obtido a partir da metabolização endógena do benzeno, está presente no cigarro, medicamentos, reveladores fotográficos, alimentos e plantas medicinais. Temos demonstrado que a intoxicação experimental de ratos à HQ compromete a migração de leucócitos para o pulmão na vigência de resposta inflamatória alérgica ou inespecífica. O presente trabalho visou avaliar os efeitos da HQ sobre atividades da célula endotelial e de neutrófilos envolvidas na inflamação.

Culturas primárias de células endoteliais da rede microcirculatória obtidas do músculo cremaster de ratos Wistar, machos, foram tratadas com HQ (10 ou 100 μ M, 2 horas) e posteriormente incubadas ou não com LPS de *E. coli* (LPS; 2 μ g/mL). Neutrófilos obtidos da cavidade peritoneal de ratos Wistar, 4 horas após a injeção local de glicogênio de ostra (10 mL, 1%) , foram tratados com HQ (5 ou 10 μ M, 1 hora) e, em seguida, foram incubados ou não com LPS (5 μ g/mL). Células controles receberam volumes equivalentes dos veículos da HQ e do LPS.

Os dados obtidos mostram que o tratamento com a HQ não induziu necrose ou apoptose em ambos os tipos celulares; reduziu a produção de NO pela célula endotelial e por neutrófilos, por bloqueio das atividades das óxido nítrico sintases; reduziu a expressão gênica e protéica de TNF-α, IL-6 e IL-1β induzida pelo LPS em neutrófilos, possivelmente decorrente de redução da translocação nuclear do NFκB; por outro lado aumentou a expressão gênica e protéica basal de TNF-α, IL-1β, ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1, bem como a translocação nuclear do NF-κB; reduziu a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos frente a *Candida albicans*; não afetou *a* expressão gênica da CYP2E1 em ambos os tipos celulares, mas aumentou a expressão gênica de MPO em neutrófilos.

Em conjunto, os dados permitem concluir que a HQ atua diferentemente nos dois tipos de células estudadas, ativando e inibindo propriedades

inflamatórias na célula endotelial e nos neutrófilos, respectivamente. É possível as ações sobre os neutrófilos possam contribuir, pelo menos em parte, pela redução da migração celular durante a resposta inflamatória observada após exposição *in vivo* à HQ.

ABSTRACT

Hydroquinone (HQ) is a fenolic compound obtained after benzene metabolism, it is a component of cigarette, medicines, photographic developer, and it is also finding in some foods and medicinal herbs. Our research group has been shown that rats *in vivo* exposed to HQ present impaired leukocyte migration into lung during allergic or non-specific inflammation. In the present study, we investigate the effects of HQ on functional activities of neutrophils and endothelial cells (EC) involved in inflammation.

Primary cultured EC was obtained from microcirculatory network of male Wistar rats, and treated with HQ (10 or 100 μ M, two hours). After the treatments, EC was incubated in presence or absence of lipopolissacharide of *E. coli* (LPS; 2 μ g/mL). Peritoneal neutrophils obtained four hours after local injection of oyster glycogen (10 mL, 1%) were incubated with HQ (5 or 10 μ M, one hour) and in sequence it was incubated in presence or absence of LPS (5 μ g/mL). Control cells were cultured with equivalent volumes of HQ and LPS vehicle.

Results obtained showed that treatment with HQ did not induce apoptosis or necrosis in both types of cells; impaired NO production by endothelial cells and neutrophils dependent on blockade of Ca^{+2} -dependent and independent NOS activity; decreased gene and protein expression of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in neutrophils induced by LPS, possibly due to reduced nuclear translocation of the NF- κ B. On the other hand, HQ treatment enhanced basal protein and gene expression of TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, PECAM-1 and VCAM and the nuclear translocation of NF- κ B; impaired *Candida albicans* phagocy and killing indexes; did not affect the gene expression of CYP2E1 in both types of cell, but increased the gene expression of MPO in neutrophils.

Taken together, results obtained show that HQ acts differently in the two types of cells studied, activating and inhibiting inflammatory properties in endothelial cells and neutrophils, respectively. Actions on neutrophils may contribute, at least in part, on the reduced leukocyte recruitment during *in vivo* HQ exposure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exposição à fumaça do cigarro por indivíduos não-fumantes	19
Figura 2. Representação esquemática da biotransformação do benzeno	22
Figura 3. Etapas da interação leucócito-endotélio	24
Figura 4. Esquema da obtenção da cultura de célula endotelial	40
Figura 5. Esquema de obtenção de neutrófilos migrados para peritônio	41
Figura 6. Caracterização da célula endotelial	53
Figura 7. Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade da célula	
endotelial	55
Figura 8. Efeito da HQ sobre a produção de NO pela célula endotelial	57
Figura 9. Efeito da HQ sobre a secreção de TNF- α e IL-1 β pela célula	
endotelial	58
Figura 10. Efeito da HQ sobre a secreção de IL-8, IL-10 e IL-6 pela célula	
endotelial	59
Figura 11. Efeito do tratamento com HQ 100µM sobre as atividades das	
NOS na presença de estimulação com LPS	61
Figura 12. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de eNOS e iNOS pela	
célula endotelial	62
Figura 13. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de IL-1β pela célula	
endotelial	63
Figura 14. Efeito da HQ sobre a expressão protéica de ICAM-1, PECAM-1,	
VCAM-1 pela célula endotelial	65
Figura 15. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de ICAM-1, PECAM-1,	
VCAM-1 pela célula endotelial	66
Figura 16. Efeito do tratamento com HQ $10\mu M$ e $100\mu M$ sobre a	
translocação do NF-кВ	67
Figura 17. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da MPO e CYP2E1	
pela célula endotelial	68
Figura 18. Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade de	
neutrófilos	68

Figura 19. Efeito da HQ sobre a produção de NO por neutrófilos	71
Figura 20. Efeito da HQ sobre a produção citocinas por neutrófilos	72
Figura 21. Efeito do tratamento com HQ sobre as atividades das NOS por	
neutrófilos	74
Figura 22. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da cNOS e iNOS por	
neutrófilos	75
Figura 23. Efeito do tratamento com HQ 5μM e 10μM sobre a translocação	
do NF-κB por neutrófilos	76
Figura 24. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de TNF- α , IL-6 e IL-1 β	
por neutrófilos	77
Figura 25. Efeito do tratamento com HQ sobre atividade fagocítica de	
neutrófilos frente a Candida albicans	79
Figura 26. Efeito do tratamento com HQ sobre atividade microbicida de	
neutrófilos frente a Candida albicans	80
Figura 27. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da MPO e CYP2E1 por	
neutrófilos	82

ABREVIATURAS

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BTX Benzene/toluene/xileno

CaCl₂ Cloreto de Cálcio

CYP Citocromo

Cpm Cintilações por minuto

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

dpm desintegrações por minuto

DNA Àcido desoxirribonucléico

DTT Dititrietol

E.COLI Echerichia Coli

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA Ácido etileno-glicol tetraacético

E-selectina Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1

FDA Food and Drug Administration

FITC Isoticianato de fluoresceína

H₂O₂ Peróxido de Hidrogênio

HCL Ácido clorídrico HQ Hidroquinona

ICAM-1 Molécula de adesão intercelular

IL-1β Interleucina 1
IL-3 Interleucina 3
IL-4 Interleucina 4
IL-6 Interleucina 6
IL-8 Interleucina 8

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina12

i.p Intraperitonial

KCL Cloreto de potássio

LFA-1 Antígeno-1 Associado a Função Leucocitária

L-selectina Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule

LPS Lipopolissacarideo

L- name NG-nitro-L-arginina metil éster

MAC-1 Macrophage Associate-1

MgCL₂ Cloreto de magnésio

MPO Mieloperoxidade

NaNO₂ Nitrito de sódio

NaCL Cloreto de sódio

NO Òxido Nítrico

NOS Oxido nitrito sintases

NO₂ Nitrito

NF-KB Fator de Transcrição nuclear

NOAEL No observable adverse effect level

VLA-4 Very Late Activation antigen-4

O₂ Superóxido

OH Radicais de hidrogênio

ONOO peroxinitrito

PBS Solução tamponada de de fosfatos

PECAM-1 Molécula de adesão de célula endotelial/ plaquetas

P.E Ficoeritrina

PI lodeto de propídio

PMSF Pentil – metil – sulfonil - fluor

RT-PCR Reação em cadeia da Polimerase com transcrição reversa

ROS Espécies reativas de oxigênio

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SFB Soro fetal bovino

TBE Tampão Tris-borato/EDTA

TNF-α Fator de necrose tumoral alfa

UFC Unidades formadoras de colônia

VCAM-1 Molécula de adesão vascular

SÚMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Fontes de exposição à Hidroquinona	18
1.2 Processo inflamatório – Relevância da célula endotelial e	
neutrófilo	24
1.3 Efeitos tóxicos da hidroquinona	31
1.4 Efeitos da hidroquinona sobre a célula endotelial	34
1.5 Efeitos da hidroquinona sobre os neutrófilos	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Reagentes	38
3.2 Animais	38
3.3 Obtenção das diferentes células	39
3.3.1 Obtenção de células endoteliais	39
3.3.2 Obtenção de neutrófilos migrados para o peritônio	40
3.4 Preparo da solução de HQ e tratamentos das células	41
3.4.1 Preparação da solução	41
3.4.2 Tratamento	41
3.5 Caracterização da célula endotelial por microscopia confocal	42
3.6 Ensaios de citometria de fluxo	42
3.6.1 Avaliação da viabilidade celular	42
3.6.2 Quantificação das moléculas de adesão	43
3.7 Reação de Greiss	44
3.8 Ensaio imuno-enzimático	44
3.9 Ensaios de RT-PCR	45
3.9.1 Reação em cadeia da polimerase – transcrição reversa	45
3.9.2 Transcrição do cDNA	46
3.9.3 Reação de transcriptase reversa	46
3.9.4 Separação dos produtos de PCR	47
3.10 Atividade de NOS ex-vivo	47
3 11 Ensains de del-shift	49

3.11.1 Obtenção do extrato nuclear da proteína	49
3.11.2 Ensaio de deslocamento em gel	49
3.12 Determinação da atividade fagocítica e microbicida	50
3.13 Análise Estatística	51
4. RESULTADOS	52
4.1 Célula endotelial	52
4.1.1 Caracterização da célula endotelial por microscopia	
confocal	52
4.1.2 Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade celular	54
4.1.3 Efeitos do tratamento com HQ sobre a produção de NO e	
sobre a secreção de citocinas inflamatórias	56
4.1.4 Efeito do Tratamento com HQ Sobre a Atividade	
Enzimática das NOS	60
4.1.5 Efeitos do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das	
eNOS e iNOS	62
4.1.6 Efeito do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das	
citocinas IL-1β e TNF-α	63
4.1.7 Efeitos dos tratamentos com HQ sobre a expressão de	
moléculas de adesão	64
4.1.8 Efeitos do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das	
moléculas de adesão	66
4.1.9 Efeitos do tratamento da HQ sobre a translocação do	
NF-ĸB	67
4.1.10 Efeito do tratamento com HQ sobre a expressão gênica	
enzimas MPO e CYP 2E1	68
4.2 Neutrófilos	69
4.2.1 Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade celular	69
4.2.2 Efeitos do tratamento com HQ sobre a produção de NO e	
sobre a secreção de citocinas inflamatórias	71
4.2.3 Efeito do Tratamento com HQ Sobre a Atividade	
Enzimática das NOS	73

4.2.4 Efeitos do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das	
iNOS e cNOS	75
4.2.5 Efeito do Tratamento com HQ sobre a translocação do	
NF-kB	76
4.2.6 Efeito do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das	
citocinas IL-1β, TNF-α e IL-6	77
4.2.7 Efeito do tratamento com a HQ na atividade fagocítica e	
microbicida	78
4.2.8 Efeito do tratamento com HQ sobre a expressão gênica	
enzimas MPO e CYP 2E1	81
5. DISCUSSÃO	83
6. RESUMOS DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	109

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fontes de exposição à Hidroquinona

A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico obtido a partir da biotransformação do benzeno, além de ser componente do cigarro de tabaco, de medicamentos, de agentes químicos usados como reveladores fotográficos e estar presente em alguns alimentos e plantas medicinais (DEISINGER *et al.*,1996, RDC n.º 79, 2000, DO CÉU SILVA *et al.*, 2003, para revisão ver NORDLUND *et al.*, 2006, LEE *et al.*, 2007).

Diante das várias fontes de exposições à HQ apontadas acima, podemos destacar algumas com maior relevância como; a fumaça do cigarro de tabaco; a utilização de benzeno em indústrias; como componente da gasolina e em laboratórios de revelação fotográfica (DO CEU SILVA et al., 2003; LEE et al., 2007).

O hábito de fumar consiste em uma forma importante de exposição à HQ, uma vez que esta é componente do alcatrão, além do cigarro possuir benzeno (COUTRIM *et al.*, 2000). É importante ressaltar as quantidades de HQ e benzeno liberadas pela fumaça de um único cigarro: cerca de 72,2 a 183,5μg de HQ ou 46,3 a 272μg de benzeno. Desta forma, há evidências de exposição significativa à HQ em fumantes ativos e passivos (RDC nº 105, 2001). A literatura mostra que o consumo de um único cigarro leva à absorção de 30 mg de benzeno. Se considerarmos um fumante ativo, que consome 20 cigarros diariamente, a concentração de HQ endógena é consideravelmente elevada (COUTRIM *et al.*, 2000).

A exposição involuntária ao cigarro em ambientes fechados é significativa, como demonstra a Figura 1A. Um estudo realizado pela Secretaria de Estado da Saúde na cidade de São Paulo (2009), avaliou pessoas não fumantes expostas regularmente à fumaça do tabaco, e revelou que 35,9% têm concentrações de monóxido de carbono compatíveis às de indivíduos fumantes. A Figura 1B mostra que do total de avaliados, cerca de 18% apresentaram valores compatíveis a de fumantes leves (que consomem menos de um maço de cigarros por dia), 15,27% apresentaram concentrações compatíveis a de

fumantes médios (menos de dois maços de cigarros diários) e 2,29% apresentaram níveis similares a de fumantes pesados (mais de dois maços por dia). Desta forma, a exposição de indivíduos não fumantes à fumaça do cigarro pode causar uma série de doenças, sendo que algumas podem ocasionar morte (BRASIL, SECRETARIA DA SAÚDE, 2009).

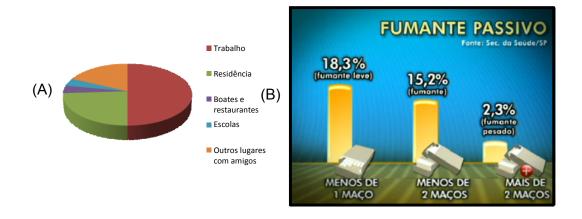


Figura 1. Exposição à fumaça do cigarro por indivíduos não-fumantes. (Adaptado da BRASIL, Secretaria da Saúde, 2009).

Apesar do benzeno ser um solvente de uso controlado (ACORDO DO BENZENO, 1996), estima-se que a utilização global média de benzeno é de 32 milhões de toneladas/ano, (TEMPORÃO, 2004). Só nos Estados Unidos, a emissão de benzeno anual chega a aproximadamente 3 x 10⁶ toneladas (GILLIS et al., 2007), proveniente tanto dos processos industriais, quanto das emissões pelos veículos automotivos. Segundo a CETESB, a queima dos combustíveis contribuem efetivamente para a poluição do ar. Em São Paulo, a queima diesel, gasolina e álcool liberam uma série de substâncias na atmosfera, como os hidrocarbonetos, nos quais o benzeno está situado. Desta forma, a exposição ao benzeno ainda pode conferir importância na exposição ambiental e ocupacional (COUTRIM et al., 2000; MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL, 2003). Atualmente o benzeno ainda é utilizado como matéria-prima dentro da indústria petroquímica, na síntese de substâncias químicas básicas que são, por sua vez, empregadas em uma vasta diversidade

de produtos industriais. O benzeno carboquímico, cuja utilização industrial é cada vez menor, está presente na composição do gás de coqueria, denominado BTX (benzeno, tolueno, xileno). que é utilizado como fonte energética na siderurgia. No setor sucroalcooleiro, o benzeno é utilizado para a produção do álcool anidro. As destilarias de álcool anidro são responsáveis pelo maior consumo identificável de benzeno. Há a possibilidade de o benzeno ser encontrado em concentrações acima do permitido por lei em solventes e produtos formulados utilizados em indústrias gráficas, de calçados e couros, de tintas e vernizes, em oficinas mecânicas e serviços de pintura. (MINISTÉRIO DA PREVIDÊNCIA SOCIAL, 2003).

Como já salientado, a gasolina automotiva é uma fonte de exposição ao benzeno, seja pela sua emissão natural na atmosfera ou pela possibilidade de vazamentos, que podem ocasionar contaminação de aquíferos e lençóis freáticos (COUTRIM et al., 2000; SILVA et al., 2002). A Agência Nacional do Petróleo (ANP) estabelece limites de benzeno como componente da gasolina para a sua comercialização de no máximo de 1,2% para a gasolina comum e 1,9% no caso de gasolina Premium (ANP n⁰ 5, 2001). O grande problema são as adulterações feitas pelos postos de gasolinas, onde já foram encontrados até 8% de benzeno em gasolinas adulteradas, aumentando, portanto, a emissão de benzeno pelos veículos automotores em grandes centros urbanos (COUTRIM et al., 2000, AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS, 2005). No Brasil, a preocupação com a contaminação dos aquiferos que servem de fonte de abastecimento de água, decorrentes do vazamento de gasolina, é crescente. Esta preocupação está centrada em acidentes, como o ocorrido em 2000, no Bairro Brisa Mar, Rio de Janeiro. Após o vazamento de gasolina do tangue subterrâneo de armazenamento, as concentrações de benzeno no lençol freático estavam 100 vezes maior que o recomendado (5 μg.L-1) (SILVA et al., 2002).

Recentemente, a Food and Drug Administratrion (FDA) divulgou que alguns refrigerantes possuem concentrações de benzeno maiores que os permitidos. Acredita-se que o benzeno seja gerado a partir do benzoato de

sódio e ácido ascórbico, que em algumas condições de exposição à luz e calor, podem reagir formando o benzeno (*Food and Drug Administration*, 2007).

Ainda, uma fonte de exposição doméstica ao benzeno é possível, uma vez que este é encontrado em produtos domissanitários, como por exemplo, sulfonatos alquil benzeno encontrados nos desinfetantes; naftalenos ou paradiclorobenzeno utilizados para a limpeza de pias e vasos sanitários; nitrobenzeno encontrado no lustra-móveis e ceras para o chão (CÔRREA, 2005). A partir de 1982, o limite de benzeno nas formulações passou a ser de 1% e, de acordo com uma consulta pública aberta pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), esse limite deverá ser diminuído para 0,1% (ANVISA, 2002).

A HQ é obtida pela biotransformação do benzeno, após a sua absorção pelas vias dérmicas, respiratória ou oral. Após absorção, é, subseqüentemente, metabolizado pelas enzimas do citocromo P450 presentes no fígado ou pulmão, gerando o óxido de benzeno. Este é amplamente metabolizado ou sofre rearranjo espontâneo gerando o fenol. Novamente a ação das enzimas do citocromo P450 hepática ou pulmonar converte o fenol em HQ. A HQ na corrente sanguínea alcança a medula óssea, onde sofre a ação de enzimas oxidativas como a mieloperoxidase e a prostaglandina H sintetase, para gerar quinonas mais reativas, como as p-benzoquinonas, esquema demonstrado na Figura 2 (SNYDER & HENDLI, 1996). A literatura mostra, enfaticamente, que a HQ é uma das principais responsáveis pelos efeitos tóxicos detectados após exposição ao benzeno (para revisão ver DECAPRIO, 1999; SNYDER, 2002; 2004).

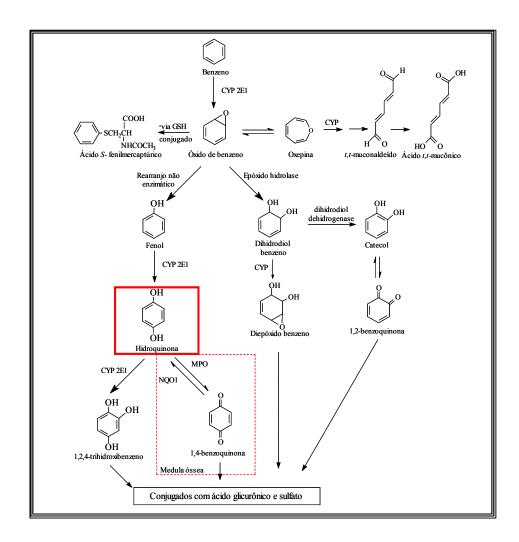


Figura 2. Representação esquemática da biotransformação do benzeno. (Adaptado de BOIS *et al.*, 1991; KIM *et al.*, 2006).

Além da fumaça do cigarro e da exposição ao benzeno, pode haver exposição direta à HQ. Neste caso se destacam:

- 1) a exposição ocupacional a HQ por soluções utilizadas para revelações de filmes fotográficos. A HQ é o principal ingrediente para a revelação de filmes em preto e branco. Casos de ingestão oral desse revelador em grande quantidade causaram falência do fígado e renal por mioglobinúria (para revisão ver NORDLUND et al., 2006);
- 2) ingestão de alguns alimentos e plantas medicinais que possuem HQ, tanto na sua forma livre e/ou na forma de uma substância denominada de Arbutina (hidroquinona-ß-D-glucopiranosídio), que em pH ácido é hidrolisada à HQ. A Uva Ursis contém grandes concentrações de arbutina e é utilizada como planta medicinal no tratamento de afecções urinárias (para revisão ver NORDLUND et al., 2006), além do arroz, cebola, pão, sementes de trigo, pêra, chás e café. A ingestão de comidas com alto índice de HQ/ arbutina elevam as concentrações plasmáticas e urinárias de HQ (para revisão ver NORDLUND et al., 2006);
- 3) HQ é encontrada nos medicamentos para a clareação da pele. Estudos demonstram que os cremes que contém HQ são relativamente bem absorvidos (cerca de 45% da dose) e chegam à circulação, de onde são transportados para o organismo. A HQ é mantida na circulação por um período superior a 24 horas. Vale ressaltar que a clareação da pele é observada após um período longo de tratamento, 4 a 6 semanas podendo chegar a 6 meses (para revisão ver KOOYERS & WESTERHOF, 2006; para revisão ver NORDLUND *et al.*, 2006).
- 4) HQ encontrada como agente de corante de oxidação para cabelos, tem nestes casos, regulamentação pela ANVISA que estabeleceu um valor limite para o uso dessa substância nas formulações (2%), além de uma série de recomendações de uso (RDC nº 79, 2000);

Um ponto importante que deve ser considerado na avaliação dos mecanismos envolvidos na toxicidade da HQ é a dose e a freqüência de exposição. Vale ressaltar que não existe uma dose ou tempo de exposição estabelecido para a atividade tóxica dos produtos de metabolização do benzeno. Estudos *in vivo* em ratos, onde a HQ ou fenol foram administrados por via parenteral, permitiram estabelecer a dose onde não foi observado qualquer efeito adverso (NOAEL), com doses diárias de 15 e 12 mg/kg, respectivamente (IPCS, 1994; TAYSSE *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1996, 1997; RYAN *et al.*, 2001).

Do exposto acima, fica claro que a exposição à HQ pode ocorrer por diferentes fontes exógenas, especialmente em cidades industrializadas, agravada pelo tráfego intenso. As conseqüências desta exposição ainda não são conhecidas, estudos são necessários para avaliar as ações de componentes da poluição sobre a saúde.

1.2 Processo inflamatório – Relevância da célula endotelial e neutrófilo

O recrutamento de células para o foco inflamatório compreende um dos eventos primordiais e fundamentais da resposta inflamatória, que envolve mediadores inflamatórios e moléculas de adesão entre os leucócitos e células endoteliais, como mostra a Figura 3 (COOK-MILLS & DEEM, 2005).

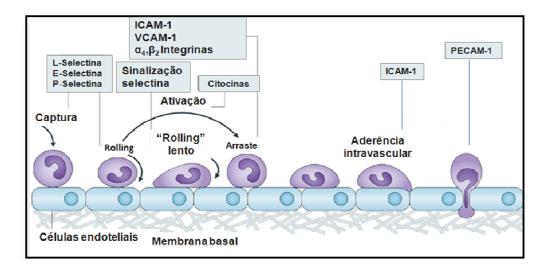


Figura 3. Etapas da interação leucócito-endotélio. (Adaptado de Ley et al., 2007).

As células endoteliais, por revestirem os vasos sangüíneos e estarem em contato direto com o sangue circulante, possuem importância fundamental na homeostasia e na gênese de doenças de origem inflamatória e cardiovasculares. No processo inflamatório, as células endoteliais participam dos aspectos vasculares e celulares, bem como, na secreção de mediadores químicos responsáveis pela instalação e manutenção do processo (COOK-MILLS & DEEM, 2005).

Os neutrófilos, que em conjunto com os eosinófilos, são chamados de leucócitos polimorfonucleares, constituem a população mais abundante de leucócitos circulantes em humanos, cerca de 4.000 a 10.000 por mm³, podendo chegar a até 120.000 em resposta a infecções. São células produzidas na medula óssea e circulam no sangue até que sejam recrutadas para o foco de uma lesão. Durante um processo de agressão ao hospedeiro, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o foco da lesão e desempenham papel fundamental na resposta imune inata e na passagem desta para adquirida. Na resposta inflamatória inata desempenham inúmeras funções, na liberação grânulos intracelulares, expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, secreção de mediadores químicos, produção de óxido nítrico (NO), fagocitose e potente atividade microbicida (ABBAS, 1998, FURZE & RANKIN, 2008, ZARBOCK, 2008).

Os eventos responsáveis pela instalação da resposta inflamatória, como a interação leucócito-endotélio, ocorrem, predominantemente, na porção venular da rede microcirculatória, em vênulas pós-capilares com diâmetros que variam entre 20 a 50µm (Brain, 1994). A parede destes vasos é composta por uma camada de célula endotelial, membrana basal e pericitos, sem a presença de musculatura lisa. Desta forma, a célula endotelial está em contato direto com os componentes do sangue e da parede do vaso e interstício, sendo assim alvo de substâncias presentes no sangue ou secretadas por células competentes no interstício durante o processo inflamatório (COOK-MILLS & DEEM, 2005).

As células endoteliais, por revestirem os vasos sangüíneos e estarem em contato direto com o sangue circulante, possuem importância fundamental

na homeostasia e na gênese de doenças de origem inflamatória e cardiovasculares. No processo inflamatório, as células endoteliais participam dos aspectos vasculares e celulares, bem como, na secreção de mediadores químicos responsáveis pela instalação e manutenção do processo (COOK-MILLS & DEEM, 2005).

Os neutrófilos, que em conjunto com os eosinófilos, são chamados de leucócitos polimorfonucleares, constituem a população mais abundante de leucócitos circulantes em humanos, cerca de 4.000 a 10.000 por mm³, podendo chegar a até 120.000 em resposta a infecções. São células produzidas na medula óssea e circulam no sangue até que sejam recrutadas para o foco de uma lesão. Durante um processo de agressão ao hospedeiro, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para o foco da lesão e desempenham papel fundamental na resposta imune inata e na passagem desta para adquirida. Na resposta inflamatória inata desempenham inúmeras funções, na liberação grânulos intracelulares, expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, secreção de mediadores químicos, produção de óxido nítrico (NO), fagocitose e potente atividade microbicida (ABBAS, 1998, FURZE & RANKIN, 2008, ZARBOCK, 2008).

Os eventos responsáveis pela instalação da resposta inflamatória, como a interação leucócito-endotélio, ocorrem, predominantemente, na porção venular da rede microcirculatória, em vênulas pós-capilares com diâmetros que variam entre 20 a 50µm (Brain, 1994). A parede destes vasos é composta por uma camada de célula endotelial, membrana basal e pericitos, sem a presença de musculatura lisa. Desta forma, a célula endotelial está em contato direto com os componentes do sangue e da parede do vaso e interstício, sendo assim alvo de substâncias presentes no sangue ou secretadas por células competentes no interstício durante o processo inflamatório (COOK-MILLS & DEEM, 2005).

Os leucócitos em condições fisiológicos circulam na parte central do vaso envolto pelos eritrócitos, localização essa dependente do tamanho da célula. Após um estimulo inflamatório, ocorre uma agregação eritrocitária, foram estrutura maiores que os leucócitos, fazendo com que ocorra uma

inversão da posição e os leucócitos passem a marginar na periferia do vaso. (CHIEN, 1982; para revisão ver HARLAN, 1985; RAMPART, 1994; WIEDLE *et al.*; 2001).

Quando os leucócitos passam a marginar e rolar sobre o endotélio de vênulas pós capilares, onde predominantemente ocorrem os fenômenos inflamatórios, ocorre então uma cascata de eventos mediada por uma série de substâncias, que tem como resultado o extravasamento do leucócito para o foco da lesão. O rolamento dos leucócitos sobre o endotélio é denominado de comportamento rolling, mediado pelas moléculas de adesão chamadas de selectinas, *Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule* (L-selectina) em leucócitos, *Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1* (E-selectina) no endotélio e P-selectina (CD62P) em plaquetas e no endotélio.

A P-selectina é encontrada nos grânulos α das plaquetas e nos corpúsculos de Weibel - Palade presentes no citoplasma das células endoteliais, sendo então rapidamente mobilizada até superfície celular na presença de um estímulo inflamatório (para revisão ver SPERANDIO, 2006). A E-selectina é expressa após estimulação, L-selectina é uma molécula constitutiva, já E- selectina necessita de indução transcricional (TAMARU & NARUMI, 1999). Após o comportamento *rolling*, o leucócito passa a aderir firmemente ao endotélio, comportamento esse mediado pela ação das integrinas (JUNG & DAILEY, 1990; JUNG & LEY, 1999).

As integrinas pertencem a uma grande família de receptores heterodiméricos (subunidades α e β), assim a subfamília das β 2 integrinas compreende Antígeno-1 Associado à Função Leucocitária (LFA-1); *Macrophage Associate-1* (MAC-1), sua principal função é a adesão de leucócitos ao endotélio mas também fazem quimiotaxia e a fagocitose, que são reguladas pelo aumento no número de receptores na superfície celular ou por alterações morfofuncionais (SHINJI *et al.*, 2003; HEIT *et al.*, 2005).

Na presença de uma estimulação, ocorre nas subunidades α e β uma mudança conformacional para um estado de alta afinidade, já que estes receptores são expressos constitutivamente em todos os leucócitos num

estado de baixa afinidade. Assim, β2 integrinas ligam-se firmemente a diferentes ligantes no endotélio, entre as quais as moléculas da superfamília das imunoglobulinas. Além da adesão entre leucócitos e endotélio(YANG *et al.*, 2004; para revisão ver JAKUS *et al.*, 2007).

À medida que os leucócitos rolam sobre a superfície endotelial, moléculas de adesão fazem a interação dos leucócitos à parede vascular, a superfamília das imunoglobulinas são importantes moléculas, entre elas a a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão intercelular-2 (ICAM-2), molécula de adesão vascular (VCAM-1) e molécula de adesão da célula endotelial/ plaquetas (PECAM-1).

A ICAM-1 e ICAM-2 são importantes ligantes endoteliais para β2 integrinas, LFA-1 e MAC-1 presentes nos leucócitos, a ICAM-1 é uma imunoglobulina que é expressa constitutivamente em vários tipos celulares incluindo leucócitos e na célula endotelial, sua expressão pode ser induzida por estímulos, como a ação de citocinas. A ICAM-1 é uma importante molécula cuja função está relacionada à firme adesão dos leucócitos, além de ativar uma série de sinais intracelulares que facilitam a diapedese do leucócito. Em contrapartida a ICAM-2 é expressa na membrana porém ela não é induzida por estímulos inflamatórios (para revisões ver YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002).

A VCAM-1 é uma molécula que é pouco expressa em células endoteliais não estimuladas, mas sua expressão pode ser induzida como por exemplo pela ação das citocinas TNF-α e IL-β. A VCAM-1 se liga ao receptor *Very Late Activation antigen-4* (VLA-4) presente nos leucócitos e medeia a firme adesão e transmigração dos leucócitos (BOCHNER *et al.*, 1991, POBER & COTRAN, 1991, para revisões ver PETRUZZELLI *et al.*, 1999).

A PECAM-1 é uma molécula expressa em plaquetas, neutrófilos, monócitos e em células endoteliais onde é largamente encontrada nas junções intercelulares (ALBELDA *et al.*, 1990; TANG *et al.*, 1993; LUTZKY *et al.*, 2006). O mecanismo pelo qual a PECAM-1 participa da transmigração de leucócitos é provindo da sinalização dessa molécula para a célula endotelial alterar sua conformação do citoesqueleto para a subseqüente transmigração e ainda a sua

fosforilação induz uma cascata de sinalizações intercelulares (para revisão ver COOK-MILLS & DEEM, 2005).

As citocinas são substâncias químicas (mediadores inflamatórios) produzidas por diversos tipos celulares e que atuam em todo o processo inflamatório emitindo sinais entre as células durante o desencadeamento inflamatório, como a interação leucócito-endotélio.

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) é produzido por diversas células como macrófagos, monócitos, fibroblastos, células B e células endoteliais. No endotélio estimula a expressão seqüencial de diferentes moléculas de adesão como ICAM-1, VCAM-1, E-selectina que medeiam a ligação preferencial de diferentes tipos de leucócitos a célula endotelial. As células endoteliais em 1 a 2 horas de exposição ao TNF-α, expressam a E-selectina, e posteriormente a molécula de adesão VCAM-1, ligante para a integrina VLA-4 e ICAM-1, ligante para LFA-1 e MAC-1, e ainda induz a produção de IL-1β e a ação das enzimas oxido nítrico sintases (NOS). No processo inflamatório além de facilitar a aderência de leucócitos a superfície endotelial, induz a fagocitose, e a geração de radicais livres de oxigênio (CHAKRABARTI *et al.*, 2006; CLARK *et al.*, 2005; CIRIONI *et al.*, 2005; para revisões ver DARNAY & AGGARWAL, 1997; HATAO *et al.*, 2005, KUNKEL *et al.*, 1997; YU & LIMPER, 1997; WOO *et al.*, 2005).

A interleucina 6 (IL-6) é produzida por monócitos, células endoteliais e linfócitos e esta fortemente relacionada a produção e liberação de proteínas de fase aguda, e dos efeitos pró inflamatórios, induzindo a produção de outras citocinas, tendo efeito sinérgico como por exemplo, IL-1 β e TNF- α (HELFGOTT et al., 1987; OPAL & DEPALO, 2000; VAN DAMME et al., 1989).

A interleucina-1 (IL-1 β) é produzida por uma gama de células como, macrófagos, monócitos, células endoteliais, fibroblastos, neutrófilos, e é um importante componente na resposta inflamatória e imune, age sinergicamente com o TNF- α , no endotélio induz uma série de mudanças a nível transcricional, ativando a expressão de moléculas de adesão como (ICAM-1,VCAM-1 e Eselectina) e mediadores químicos, como citocinas, NO, fatores de crescimento

(DUSTIN et al., 1986; CHING et al., 2005; CHING et al., 2006; KULDO et al., 2005; MEAGER, 1999; WONG et al., 1989).

A interleucina 8 (IL-8) é secretada por células como linfócitos, monócitos, células endoteliais, um fator essencial na infiltração dos neutrófilos na resposta inflamatória, denominada de quimiocina, ela ativa as propriedades de neutrófilos tais como a liberação de enzimas lisossomais, geração de superóxido e aumento de moléculas de adesão (ALI *et al.*, 1999; BIRONAITE et *al.*, 2004; DEJANA *et al.*, 1994).

A interleucina 10 (IL-10) sintetizada por células Th₂ CD4+, células B, monócitos, macrófagos e célula endotelial ativados, e ela inibe a síntese de citocinas como IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8, agindo como um *feedback negativo* aos efeitos pró inflamatórios (para revisão ver COUPER *et al.*, 2000, HICKEY *et al.*,1998)

Após o recrutamento dos leucócitos, uma função determinante dos neutrófilos é a capacidade de fagocitar e matar microorganismos. A fagocitose é um evento celular complexo no qual partículas são reconhecidas, internalizadas e eliminadas. Consistindo na primeira linha de defesa do organismo na remoção de microorganismos, esse processo envolve o reconhecimento de antígenos por receptores de superfície nas células fagocíticas, iniciando a polimerização e a internalização de partículas externas ou organismos no fagossomo (ALLEN & ADEREM, 1996). Além de microorganismos, a remoção de células em apoptose ocorre por fagocitose (FRANK et al., 1999). Na superfície do fagócito, são expressos vários receptores capazes de reconhecer e decodificar seus ligantes cognatos, presentes na superfície de agentes infecciosos e células apoptóticas, e desencadear o englobamento (STUART & EZEKOWITZ, 2005). Neste processo, ocorre interação de receptores de membrana com moléculas específicas ligantes, localizadas na superfície de partículas, o complexo ligante-receptor estimula a reorganização local do citoesqueleto de actina (KWIATKOWSKA & SOBOTA, 1999). A fagocitose é seguida pela fusão do fagossomo com lisossomos contendo enzimas digestivas, formando o fagolisossomo, seguindo-se a degradação da partícula (STUART & EZEKOWITZ, 2005).

Durante todo o processo de fagocitose, ocorre uma indução do metabolismo oxidativo conhecido como *burst* respiratório, que com o consumo de oxigênio (O₂) ocorre produção de uma série de substâncias como peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radicais de hidrogênio (OH[•]), ânion superóxido (O₂⁻), que possuem ação microbicida. O óxido nítrico (NO) é considerado crucial para o *killing* de diferentes patogênos, sendo considerado um agente microbicida, e seria um mecanismo intracelular alternativo de defesa contra microorganimos, agindo provavelmente como complemento ao sistema extracelular da produção de espécies reativas de oxigênio (FIERRO *et al.*, 1996).

Em conjunto, a descrição acima mostra que a célula endotelial e os neutrófilos possuem importância significativa no desenvolvimento inicial do processo inflamatório. Desta forma, o esclarecimento da ação de substâncias sobre essas células é um ponto relevante na elucidação do mecanismo de ação sobre a instalação e desenvolvimento da resposta do organismo a um agente lesivo.

1.3 Efeitos tóxicos da hidroquinona

Como salientado, um grande número de estudos tem sugerido que o metabolismo do benzeno é o passo fundamental para o desenvolvimento dos efeitos tóxicos (MEDINSKY et al., 1995; para revisão ver SNYDER 2002; 2004). Os metabólitos responsáveis por tais efeitos e os mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão completamente elucidados (SNYDER, 2002; SHEETS & CARLSOM, 2004), entretanto estudos têm mostrado que metabólitos com anéis aromáticos hidroxilados fechados, como HQ e fenol, e com anéis abertos, como trans,trans-muconaldeído (AMIN & WITZ, 2001; RIVEDAL & WITZ, 2005) são importantes para a gênese da toxicidade ao sistema imune.

Neste contexto, a literatura tem evidenciado amplamente os efeitos tóxicos da HQ sobre o sistema imune. No entanto, os mecanismos envolvidos não estão totalmente elucidados.

A HQ é um estimulador *in vitro* e *in vivo* da diferenciação de granulócitos e promove supressão da hematopoese (para revisão ver DECAPRIO, 1999; SNYDER, 2004). A administração de HQ *in vivo* promove neutrofilia (para revisão ver SNYDER, 2002, 2004), e reduz o número de células mononucleares no sangue periférico (GILL *et al.*, 1980; SNYDER *et al.*, 1980; GREEN *et al.*, 1981; CRONKITE *et al.*, 1984; FARRIS *et al.*, 1997), na medula e em órgãos linfóides secundários (FARRIS *et al.*, 1997; ROBINSON *et al.*, 1997, VELASCO-LEZAMA *et al.*, 2001). Além dos efeitos sob a produção e/ou maturação leucocitária, há evidências do papel da HQ sobre a atividade celular.

A HQ acarreta efeitos tóxicos em linfócitos, observados pelo prejuízo de diferentes funções celulares como a redução da atividade citotóxica natural de linfócitos, a produção de anticorpos (HSIEH et al., 1992; TAYSSE et al., 1995; LEE et al., 2002; DIMITROVA et al., 2005), na proliferação e secreção de citocinas, tanto das células circulantes e de órgãos linfóides secundários, como de células da provenientes da medula óssea (LI et al., 1996, 1997; PYATT et al., 1998, 2000; MCCUE et al., 2003; CHO et al., 2008) além de causar inibição da blastogênese e interferência na progressão do ciclo de células T (FRAZER-ABEL et al., 2007).

A HQ inibe a resposta imune mediada por macrófagos, pela diminuição da produção de peroxinitrito (ONOO-) por duas vias, a saber: ou pelo seqüestro de ONOO- ou pela diminuição da produção do NO pela inibição da expressão de óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) (KIM *et al.*, 2005; CHO *et al.*, 2008). Adicionalmente, a HQ acarreta diminuição na síntese de citocinas pró ou antiinflamatórias, como TNF-α, IL-1β, IL-6, interleucina 3 (IL-3), IL-10, por mecanismo mediado via fator de transcrição nuclear (NF-κB) (MA *et al.*, 2003, LEE *et al.*, 2007, CHO *et al.*, 2008).

Os efeitos sobre produção, maturação e função leucocitária podem ser decorrentes da capacidade da HQ ligar-se com alta afinidade iônica a ácidos nucléicos e proteínas, além de induzirem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), H₂O₂, O₂- e OH[•], responsáveis pelo estresse oxidativo e pela peroxidação lipídica (EASTMOND *et al.*, 1987; THOMAS *et al.*, 1990; KOLACHANA *et al.*, 1993; ROSS *et al.*, 1996; SHEN ET AL., 1996; IBUKI &

GOTO, 2004; RANA & VERMA, 2005). Ainda, tem sido mostrado que a HQ altera o microambiente medular, com prejuízo na secreção e atividade de fatores de crescimento, entre os quais IL-1, interleucina 4 (IL-4), interleucina 12 (IL-12), fator estimulador de crescimento de colônias de granulócitos e macrófagos (NICULESCU et al., 1995; 1996; LEE et al., 2002; ZHENG et al., 2004; KIM et al., 2005), induz a apoptose em mieloblastos e linfoblastos na medula óssea e linfócitos circulantes (HAZEL et al., 1996; LI et al., 1996; KERZIC et al., 2003), além de exercer efeitos genotóxicos, representados por danos oxidativos, inibição da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e aberrações cromossômicas (LI et al., 1997).

É importante ressaltar que os estudos com a HQ utilizam diferentes concentrações *in vitro* dependentes dos delineamentos experimentais empregados. Entre os estudos apresentados na literatura, observa-se que as concentrações variam de 12,5 - 100μM (MA *et al.*, 2003, KIM *et al.*, 2005, LEE *et al.*, 2007, CHO *et al.*, 2008) até 0,01-0,05mM (SCHLOSSER *et al.*, 1989) em macrófagos; de 10 - 50μM em linfócitos (FRAZER-ABEL *et al.*, 2007; CHOI *et al.*, 2008), 40μM em células hepáticas (HU *et al.*, 2008), 1-100μM em células brancas do sangue periférico (ZHAO *et al.*, 2009) e 5-20mM para estudos de carcinogênese em células renais (GASKELL *et al.*, 2004).

Dados do nosso grupo de pesquisa mostram que ratos, machos, Wistar, expostos cronicamente *in vivo* a HQ intraperitonial (i.p), na concentração de 50 mg/Kg/dia, por 24 dias, com intervalos de 2 dias, a cada 5 dias de tratamento, tiveram um comprometimento na migração de leucócitos para o pulmão na vigência de inflamação alérgica ou não-específica (MACEDO *et al.*, 2006, 2007). É importante ressaltar que esta exposição não causou efeitos tóxicos nos tecidos hepático ou renal e não alterou a produção de células brancas e vermelhas na medula óssea. Da mesma forma, a exposição crônica a HQ, em doses ainda mais baixas de 5 e 10 mg/Kg/dia (i.p), pelo mesmo período de tempo também afetaram a migração de leucócitos para o pulmão inflamado em resposta à instilação do lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella abortus* (FERREIRA *et al.*, 2007).

Baseado nos resultados acima é possível inferir que mesmo em concentrações de HQ, abaixo do NOAEL, podem causar prejuízos ao sistema imune detectados somente na vigência de resposta do organismo a uma agressão. Com relação à toxicidade da HQ, recentemente McGregor (2007), questionou sua classificação pelo "International Agency for Research on Cancer" (IARC) como sendo não carcinogênica para humanos (classe 3), propondo que talvez os modelos de avaliação aplicados aos animais sejam limitados e inadequados para a indicação da toxicidade a HQ a seres humanos.

1.4 Efeitos da hidroquinona sobre a célula endotelial

Os dados da literatura sobre o papel da HQ sobre a célula endotelial ainda são fragmentários, mas sugerem que este composto fenólico pode alterar a função celular por diferentes vias.

A primeira linha de investigações mostrou, na década de 1990, que a HQ exerce papel inibidor sobre a vasodilatação induzida pela acetilcolina e que o mecanismo envolvido poderia ser a inativação do NO produzido pela célula endotelial. O mecanismo proposto foi a capacidade da HQ induzir a geração de radicais livres, que reagindo com o NO inativaria seu efeito dilatador. Os ensaios foram conduzidos em arteríolas de diferentes leitos microcirculatórios e auxiliaram na caracterização do NO como um potente vasodilator derivado do endotélio (BING et al., 1987; BRASHERS et al., 1988; KALEY et al., 1989; ALONSO et al., 1993; BAKER & SUTTON, 1993). Desta forma, a HQ tem sido considerada um "inativador" ou "antagonista" do efeito vasodilator do NO. Neste contexto, é importante salientar que os compostos nitrosilados formados pela reação de radicais de oxigênio e óxido nítrico são reativos, contribuindo efetivamente para a lesão tecidual (COLEMAN, 2001).

Dados mais recentes têm inferido que a HQ exerce efeito sobre a capacidade de secreção de citocinas pelo endotélio, uma vez que a HQ induziu a secreção de interleucina-8 (IL-8) em linhagem de endotélio (HL-60) ou em célula endotelial de medula óssea humana. Ainda, a HQ acarretou apoptose em células HL-60, por um mecanismo não dependente de radicais de oxigênio,

indicando que outras vias intracelulares podem ser alteradas pela HQ (BIRONAITE et al., 2004).

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que a exposição à HQ *in vivo* pode afetar atividades de células endoteliais. A expressão de PECAM-1 na célula endotelial do músculo cremaster dos animais expostos à HQ e estimulado com LPS estava aumentada (MACEDO *et al.*, 2008).

Em conjunto, embora ainda escassos, os dados da literatura sugerem que a HQ possa interferir com funções na célula endotelial relevantes para manutenção do fluxo sanguíneo e para o desenvolvimento de resposta inflamatória.

1.5 Efeitos da hidroquinona sobre os neutrófilos

Os conhecimentos dos efeitos da HQ em neutrófilos ainda são escassos. Dados da literatura mostram que a HQ altera o processo de maturação destas células, levando à neutrofilia (SNYDER, 2004). De fato, resultados do nosso grupo de pesquisa mostram que ratos, machos, Wistar, expostos cronicamente a HQ (i.p), na concentração de 50 mg/Kg/dia, apresentaram neutrofilia, induzindo uma maturação precoce de neutrófilos no último estágio de diferenciação e ainda ocasionando um aumento do número de neutrófilos para o compartimento periférico. Nesse mesmo contexto, foi observado que a exposição da HQ induz a ativação neutrófilos, com aumento na expressão de B2 integrina na membrana celular, e um acúmulo dessas células no tecido subcutâneo dorsal de ratos Wistar inflamado pelo glicogênio de ostra (MACEDO *et al.*, 2006).

Por outro lado, o mesmo protocolo de exposição á HQ inibiu a migração de leucócitos polimorfonuclear e mononuclear para o pulmão na vigência de resposta inflamatória alérgica (MACEDO et al., 2007). Da mesma forma, a exposição crônica, in vivo, à HQ em doses ainda mais baixas de 5 e 10 mg/Kg/dia, também afetaram a migração de leucócitos para o pulmão inflamado em resposta à instilação do lipopolissacarídeo de Salmonella abortus (FERREIRA et al., 2007), sem alterar o número de leucócitos na circulação.

Apesar dos dados em neutrófilos ainda serem fragmentários, a literatura descreve os efeitos da HQ sobre outros tipos de fagócitos. Em macrófagos tem sido observado que a exposição à HQ, na vigência de um estímulo inflamatório (LPS) compromete a secreção de citocinas como IL-1β, TNF-α e IL-6 por inibir o fator de transcrição NF-κB e a expressão gênica, e suprimi a expressão da iNOS diminuindo a produção de NO. Ainda, tem sido mostrado que a HQ diminui a resposta mediada por macrófagos pela diminuição do peroxinitrito e pela inibição da via oxidativa (MA, *et al.*, 2003, CHO *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

Como já salientado, temos mostrado que a exposição *in vivo* à HQ altera o influxo de neutrófilos para focos inflamatórios de diferentes origens. No sentido de elucidar os mecanismos responsáveis por estas alterações, este trabalho foi desenvolvido para investigar os efeitos do tratamento *in vitro* da HQ sobre atividades funcionais da célula endotelial e de neutrófilos envolvidas no recrutamento leucocitário na vigência de inflamação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

BD Pharmingen, San Diego, CA, EUA: anticorpos monoclonais anti- ICAM-1 conjugado ao isoticianato de fluoresceína (FITC), anti- VCAM-1 conjugado a FITC, anti- PECAM-1 conjugado a Ficoeritrina (P.E), anti- anexina V conjugado a FITC.

VetBrands: Paulínia, São Paulo, Brasil: Ketamina e Xilazina.

LabSynth, São Paulo, Brasil: cloreto de sódio, fosfato de sódio potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico. cloreto de cálcio diidratado, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, etanol, clorofórmio, isopropanol.

Sigma Chemical CO, St.Louis, EUA: hidroquinona, glicogênio de ostra (grau II), lipopolissacarídeo de Echerichia coli (E.coli).

Cultibab, Brasil: RPMI 1640.

Gibco-BRL, MD, USA: soro fetal bovino, DMEM, Trizol, brometo de etídio.

Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, UK: dNTP, RNA guard, Transcriptase reversa (superscript II), Taq polimerase, Sefadex G-25.

Bio Rad, EUA: Kit comercial para método de Bradford.

BD Biosciences: Kits comerciais para quantificação de: TNF- α , IL-6,IL-10, IL-1 β e CINC-1.

3.2 Animais

Ratos Wistar, com peso entre 180-220g 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, com ciclo de luz e temperatura controlada e tiveram acesso a alimento e água *ad libidum* até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), protocolo CEEA nº 169.

Os procedimentos experimentais foram realizados após a indução de anestesia com Ketamina e Xilazina (2:1, vol/vol); (77,3 mg/Kg de cloridrato de ketamina / 7,6 mg/kg de cloridrato de xilazina).

3.3 Obtenção das diferentes células

3.3.1 Obtenção de células endoteliais

A cultura de células endoteliais foi realizada a partir do músculo cremaster dos ratos Wistar, seguindo a metodologia descrita por Chen et al., 1995 e modificada por Lotufo et al., 2001. Para tal procedimento, os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina e exsangüinados pela secção da artéria carótida e/ou jugular. Em seguida, incisão cirúrgica na bolsa escrotal foi realizada, em fluxo laminar, para remoção do músculo cremaster. Os tecidos foram lavados com solução tamponada fosfato salino (PBS: NaCl 125mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 8mM, NaH₂PO₄ 2mM; pH- 7.2) e cortados em pequenos cubos de aproximadamente 2 x 2 x 2 mm Dois cubos foram colocados em cada poço da placa de 24 poços, e após 2 a 5 minutos, foram cobertos com 600μM (total) de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) estéril suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (40mg/L; pH 7,4).

A placa foi incubada por 48h em estufa de CO_2 (5%) em atmosfera úmida. Após este período, o tecido foi removido e 200µL de meio foi adicionado. A placa foi mantida em estufa até que as células atingissem confluência quantificada em microscópio invertido (Leica DMI 4000B), e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas. Aproximadamente 8-10 dias, as células foram repicadas em uma nova placa de 24 poços e após atingirem 90% de confluência (\cong 48 horas) as células foram tratadas com a HQ.

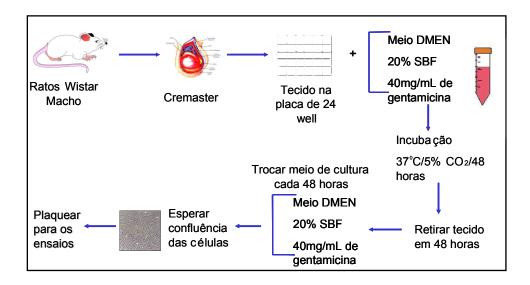


Figura 4. Esquema da obtenção da cultura de célula endotelial.

3.2.2 Obtenção de neutrófilos migrados para o peritônio

Para a obtenção dos neutrófilos migrados para o peritônio, os animais foram anestesiados com solução de ketamina/xilazina (2:1) e receberam injeção intraperitoneal de 10mL de solução de glicogênio de ostra 1%.

Após 4 horas, os animais foram re-anestesiados, exsangüinados pela secção da artéria carótida e veia jugular, foi injetado 20mL de PBS estéril na cavidade abdominal que foi exposta para coleta das células com auxílio de pipeta Pasteur de plástico estéril. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada (15 minutos, a 4° C, em 600g) e posteriormente ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de SBF e contadas em câmara de Neubauer.

Foram transferidas $1x10^6$ células para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços e o volume foi ajustado para $500\mu L$, utilizando meio de cultura RPMI 1640 contendo 10% de SFB.

A quantificação total e diferencial foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaços corados com Giemsa, respectivamente.

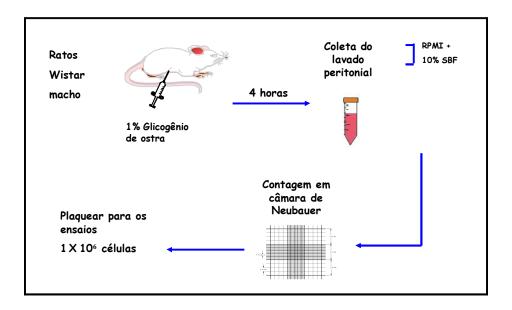


Figura 5. Esquema de obtenção de neutrófilos migrados para peritônio.

3.4 Preparo da solução de HQ e tratamentos das células

3.4.1 Preparação da solução

Uma solução de HQ a 10mM foi preparada, utilizando o etanol (p.a.) como solvente. A partir dessa solução foram obtidas as seguintes concentrações utilizadas nos ensaios: 5-10μM para neutrófilos e 10-100μM para a célula endotelial.

3.4.2 Tratamento

As células endoteliais foram pré-tratadas com a HQ nas concentrações de 10 ou 100μM por duas horas, na ausência ou presença de LPS (*Escherichia coli*; sorotipo 026:B6; 2 μg/mL). O tempo de incubação com o LPS variaram de acordo com cada delineamento experimental.

Os neutrófilos migrados com glicogênio de ostra para o peritônio foram pré-tratados com a HQ nas concentrações de 5 ou 10µM por uma hora, na ausência ou presença de LPS (*Escherichia Coli*; sorotipo 026:B6; 5µg/mL), o tempo de incubação com o LPS foi de 18 horas.

Durante todo o tratamento as células foram mantidas em atmosfera úmida a 37º C.

3.5 Caracterização da célula endotelial por microscopia confocal

Para a caracterização das células endoteliais foi utilizada a marcação com PECAM-1, uma molécula de adesão constitutiva presente na célula endotelial (WOODFIN *et al.*, 2007; GARRIDO-URBANI *et al.*, 2008). Aproximadamente 200μL da suspensão de células (10⁵ células/mL) foram plaqueadas em lamínulas de vidro posicionadas no fundo de placas de cultura de 14mm de diâmetro (MatTek Corporation) e mantidas por 48 horas em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas com meio de cultura DMEM sem SFB e foram incubadas por 30 minutos com o anticorpo monoclonal anti-PECAM-1 (0,1μg/ 10⁶ células) ligado a Ficoeritrina (P.E).

Para a avaliação da fluorescência emitida pelas células, foram selecionados campos contendo aproximadamente de 3 a 8 células e o nível de fluorescência emitida por cada célula foi avaliada através do programa LSM 510 (Zeiss). Os registros foram realizados com a objetiva de imersão em óleo (40X). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 496nm, 546 nm, 565nm e um filtro para emissão em 575nm.

3.6 Ensaios de citometria de fluxo

As quantificações foram analisadas em citômetro de fluxo (Becton & Dickinson – São Jose, CA, USA, FACS Calibur). Aproximadamente 10 000 eventos foram obtidos e somente células morfologicamente viáveis foram considerados aptos para a análise.

3.6.1 Avaliação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade da célula endotelial, as culturas foram tratadas com 10 ou 100µM de HQ por duas horas e posteriormente incubadas com meio DMEM ou acrescido de LPS (2 µg/mL) e foram mantidas por 48 horas, uma vez que este foi o maior tempo de incubação durante os ensaios.

Para os neutrófilos as culturas foram tratadas com 5 ou 10μM de HQ por 1 hora e posteriormente incubadas com meio RPMI ou acrescido de LPS (5μg/mL) por 18 horas.

A apoptose das células é quantificada através da ligação da ligação da anexina com a fosfotidilserina, que é externalizada quando a célula entra em processo apoptótico.

Após o período de incubação, 90μL de tampão de anexina com 10μL (1:10) de anticorpo anti-anexina V (proteína ligada ao FITC) foram adicionados às culturas de célula endotelial, as células foram retiradas das placas de cultura com auxilio de um "cell scraper" e transferidas para tubos específicos para o ensaios de citometria de fluxo. Neutrófilos foram ressuspensos em 90μL de tampão de anexina com 10μL (1:10) de anticorpo anti-anexina V (proteína ligada ao FITC). Ambas as células foram incubadas com o anticorpo por 20 minutos na geladeira, protegido da luz.

Neste mesmo ensaio foi avaliado o processo de necrose pela adição de 5 μL de iodeto de propídio (PI) por tubo (50μg/mL) no momento da leitura no citometro de fluxo.

A necrose das células é quantificada pela ligação direta de um marcador específico (fluorocromo) a moléculas estruturais ou funcionais. O PI, em princípio, não penetra a membrana citoplasmática de uma célula viva. Este fato reflete, portanto, uma integridade da membrana. Quando o PI cora intensamente o núcleo da célula, é porque a célula perdeu a integridade da sua membrana periférica, assim o PI que é excitável por laser argônio emite fluorescência na faixa de 560-580nm.

3.6.2 Quantificação das moléculas de adesão

Para a quantificação das moléculas de adesão as culturas de células endoteliais foram tratadas com HQ nas concentrações de 10 ou 100μM, por duas horas, na ausência ou na presença de LPS (2μg/mL). Os tempos de incubação foram variados de acordo com uma curva dose-resposta, na qual a célula demonstrou ter maior expressão para cada molécula após o estímulo com LPS. Para a quantificação de PECAM-1, o tempo de incubação com LPS

foi de 4 horas, para a quantificação de ICAM-1 e VCAM-1 o tempo de incubação foi de 8 horas.

Após esse período as células foram retiradas da placa cultura com auxílio de um *cell scraper* e colocadas em tubos para citometria de fluxo. Posteriormente as células foram incubadas com os anticorpos específicos (1:100uL; anti - ICAM-1 e anti - VCAM-1 conjugado com FITC e anti - PECAM-1 conjugado com P.E) por 20 minutos a 4°C, sob ausência de luz. Findo a incubação as células foram fixadas com a adição de p-formaldeído (2%).

3.7 Reação de Greiss

A concentração de nitrito (NO_2) , um dos metabólitos estáveis do NO, foi determinada nos sobrenadantes das culturas de célula endoteliais e de neutrófilos tratados com HQ utilizando a reação de Greiss. O nitrito das amostras, em meio ácido, reage com a sulfanilamida, produzindo um sal de diazônio que reage com a α -naftil etilenodiamina, formando um complexo de coloração rósea.

Em placas de 96 poços, foram adicionados 100μL dos sobrenadantes das culturas de célula endotelial ou de neutrófilos e 100μL do reagente de Greiss (1% de sulfanilamida e 0,1% de α-naftil etilenodiamina). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente na ausência de luz, a absorbância de cada amostra pode ser determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550nm. A concentração de NO₂- das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂).

3.8 Ensaio imuno-enzimático

As citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNFα, IL-1β, CINC-1 (que corresponde em ratos a IL-8 em humanos) (Kaibori et al., 2006), e a antiinflamatória IL-10 foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de células endoteliais, após tratamento com a HQ nas concentrações de 10 ou 100μM, por duas horas, na ausência ou na presença de LPS (2 μg/mL; 18h).

Dos sobrenadantes de neutrófilos, foram quantificadas as citocinas próinflamatórias IL-6 e TNF α , IL-1 β , após tratamento com a HQ nas concentrações de 5 ou 10 μ M, por uma hora, na ausência ou na presença de LPS (5 μ g/mL; 18h).

A quantificação foi realizada por ensaio imuno-enzimático (ELISA, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), utilizando kits comerciais de acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante destes kits.

Os protocolos de ensaios podem ser checados no *site* da BD Biosciences, http://www.bdbiosciences.com, pelos respectivos números de catálogo para TNF- α (558870), IL-6 (550319) e IL-10 (555134) e para IL-1 β (DY501) e CINC-1 (DY515) no *site* da RD Systems, www.rndsystems.com.

3.9 Ensaios de RT-PCR

Foram realizados ensaios de Reação da Transcriptase Reversa seguida de polimerase em cadeia (RT-PCR) para a avaliação da expressão gênica das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1), das enzimas mieloperoxidase (MPO), do citocromo P450(CYP), óxido nítrico sintases (NOS) e das citocinas (IL-1β, TNF-α, IL-6).

3.9.1 Reação em cadeia da polimerase - transcrição reversa

As células foram coletadas e imediatamente congeladas e mantidas a -70°C até o processamento das mesmas.

O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol[®]. As amostras foram homogeneizadas com 1 mL Trizol[®] para 5 x 10⁶ células, posteriormente foi adicionado 200µL de clorofórmio e os tubos foram mantidos em repouso por 3 minutos. Após centrifugação (12.000g, 15 minutos, a 4°C) a fase aquosa do sobrenadante foi pipetada e descartada e o RNA foi precipitado com 500µL de isopropanol, os tubos permaneceram em repouso por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram centrifugados (12.000g, 10 minutos, 4°C.), o sobrenadante foi descartado e o pellet de RNA lavado com 1mL de etanol 75%, e após agitação e centrifugação (7.500g, 10 minutos, 4°C),

os sobrenadantes foram desprezados e os tubos foram invertidos e apoiados sobre papel de filtro aos efeitos de eliminar totalmente o etanol.

Posteriormente, o RNA foi dissolvido com 20µL de água DEPC e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop™/ EUA) a 260nm.

A integridade do RNA isolado foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-borato/EDTA (TBE) corado com brometo de etídio por 20 minutos, a intensidade das bandas marcadas com brometo de etídio foi determinada usando o FLA3000 Fluorescent Analyzer (FUJIFILM).

3.9.2 Transcrição do cDNA:

Cuidadosamente $2\mu g$ (amostra) de RNA e $1\mu L$ de oligo dT foram misturados com H_2O DEPC (qsp $10\mu L$). A mistura foi aquecida $70^{\circ}C$ durante 5 minutos e mantida em temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente foram adicionados: $5\mu L$ de tampão de reação (5X *first strand buffer*), $5\mu L$ de dNTP (10mM), $0.5\mu L$ de inibidor de RNAses e por fim, $1\mu L$ da enzima transcriptase reversa. Novamente os tubos foram aquecidos a $42^{\circ}C$ por 1 hora.

As amostras foram mantidas a -20°C até serem submetidas ao PCR.

3.9.3 Reação de transcriptase reversa:

A reação de PCR foi realizada em um volume final de $25\mu L$ que continham: $2.5\mu L$ de cDNA (amostra), $2.5\mu L$ de tampão para PCR (10X), $1.5\mu L$ de MgCl₂ (1.5mM), $0.5\mu L$ de dNTPs (0.2 mM), $0.5\mu L$ do *primer sense* ($5\mu M$), $0.5\mu L$ do *primer anti - sense* ($5\mu M$), $16.75\mu L$ de H₂O para PCR e finalmente $0.5\mu L$ de Taq polimerase (2U).

Para cada molécula estudada o procedimento foi realizado respeitandose o número de ciclos e temperatura de anelamento (TM) para cada primer.

As seguintes sequências de primers foram utilizadas:

GAPDH: 5'-TATGATGACATCAAGAAGGTGG-3'(sense)

5'-CACCACCTGTTGCTGTA-3' (antisense),

PECAM-1: 5'-TCTCCATCCTGTCGGGTAACG-3' (sense)

5'-CTTGGGTGTCATTCACGGTTTC-3' (antisense)

ICAM-1: 5'-CAGTCCTCGGTGAGGCATC-3' (sense)

5'- CCCCTTGGAGTGGCAACAT-3' (antisense)

VCAM-1: 5'- GGTGCCCTGCCAGTATTCTC-3' (sense)

5'- GGCTCCCAACACAGGATGA-3' (antisense)

iNOS: 5'- ACAACAGGAACCTACCAGCTCA-3'(sense)

5'-GATGTTGTAGCGCTGTGTGTCA-3'(antisense)

eNOS: 5'-GGAGAAGATGCCAAGGCTGCTG-3'(sense)

5'-CTTCCAGTGTCCAGACGCACCA-3' (antisense)

IL-6: 5'-GGCGGATCGGATGTTGTGAT-3' (sense)

5'-GGACCCCAGACAATCGGTTG- 3' (antisense)

IL-1β: 5'-TGAAAACACAGAAGTAACGTCCG- 3' (sense)

5'-CCCAGGAGGAAATTGTAATGGGA- 3' (antisense)

TNF-α: 5'-GCCATGTTGACCGTACCACT-3' (sense)

5'- CAGACTCGCAGGCTCATGTT- 3' (antisense)

3.9.4 Separação dos produtos de PCR:

Alíquotas dos produtos da reação de PCR (aproximadamente $15\mu L$) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 2% e coradas com $0.5\mu g/mL$ de brometo de etídio. O GAPDH (gliceraldeído - 3 – fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle sendo ele um gene constitutivo. A densitometria foi realizada, utilizando o software de análise de imagem (Ocean), e o nível de cada expressão foi representado pela razão das densidades do gene alvo versus a banda correspondente ao GAPDH.

3.10 Atividade de NOS ex-vivo

Neste ensaio foi analisada a atividade das enzimas óxido nítrico sintases em amostras onde foi observada uma diminuição da produção de NO pelas células estudadas.

As células endoteliais (tratadas com $100\mu M$ de HQ na presença de LPS) e os neutrófilos (tratados com 5 e $10\mu M$ de HQ na presença ou ausência de LPS)

foram armazenadas com de tampão de incubação (Tris-HCI 50mM, pH 7,4) contendo 1mM de pentil – metil – sulfonil – flúor (PMSF) e 1mM de L-citrulina e mantidos em refrigeração (-70° C) até o momento da análise.

Para a análise, $50\mu\text{L}$ dessa solução foram incubados na presença de NADPH (1mM), cloreto de cálcio (CaCl₂; 2mM) e $10\mu\text{M}$ de L-arginina contendo 100.000 cpm de [2,3,4,5- 3 H]L-arginina mono hidrocloreto em um volume final de $100\mu\text{L}$ a temperatura ambiente (25 - 27°C) durante 30 minutos, em duplicata. Todos os reagentes foram preparados em tampão de incubação (sem PMSF e L-citrulina).

Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1mL de tampão HEPES (20mM, pH 5,4) contendo 1mM de ácido etileno-glicol tetraacético (EGTA) e 1mM de EDTA. Os tubos foram centrifugados (5 minutos; 10.000 rpm) e os sobrenadantes aplicados em colunas contendo 0,6mL de resina de troca iônica (tipo aniônica forte, Dowex AG 50X-8). Os eluatos foram recolhidos em viais de cintilação. As colunas foram lavadas com 1mL adicional de tampão HEPES e os eluatos foram misturados aos anteriores. Após a adição de 10mL de líquido de cintilação a radioatividade foi medida durante um minuto em espectrômetro de cintilação. As contagens foram corrigidas por subtração do "branco" (onde o homogenato de tecido foi adicionado após o tampão HEPES).

Para o cálculo das atividades enzimáticas, as contagens cintilações por minuto (cpm) foram relacionadas à atividade total (os conteúdos destes tubos receberam [2,3,4,5-3H]L-arginina mono hidrocloreto diretamente nos viais de cintilação) pela equação:

pmol L-cit/min = 1000 x (dpm amostra - dpm branco) / dpm totais / 30

onde 1000 é a quantidade de L-arginina adicionada à mistura de incubação (em pmols) e 30 é o tempo de incubação (dpm, desintegrações por minutos).

Em cada ensaio foram realizados, em paralelo, controles farmacológicos da atividade enzimática que consistem na omissão do CaCl₂ e na adição de 1 mM de EGTA no meio de incubação (a fim de caracterizar o tipo de NOS) e na

adição de 1 mM de NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor inespecífico para as NOS.

O conteúdo de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando-se kit comercial. A atividade da NOS foi expressa como pmols de L-citrulina produzidos por minuto e por mg de proteína. A atividade de NOS dependente de Ca²⁺ foi obtida pela subtração da atividade independente de Ca²⁺, que possuía EGTA no meio de incubação da atividade total.

3.11 Ensaios de gel-shift

3.11.1-Obtenção do extrato nuclear da proteína

Os neutrófilos migrados para peritônio e as células endoteliais obtidas em cultura, foram homogeinizados com $100\mu L$ de tampão de lise (10mM ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico), 10mM cloreto de potássio (KCL), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 10% de glicerol, 1mM ditiotrietol (DTT), 0.1mM fluoreto de fenilmetilsulfonilo, $1\mu g mL^{-1}$ leupeptina, $1\mu g mL^{-1}$ pepstatina, $0.08\mu g mL^{-1}$ aprotinina e colocados no gelo por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se $10\mu L$ de Nonidet-P40 e as amostras foram agitadas em vortex e centrifugadas ($12\,000g$; $1\,min$; 4^0C).

O pellet resultante foi lavado com 50μL de tampão de lise e centrifugado por (12 000g; 1 min; 4°C). O pellet nuclear foi ressuspendido em tampão de extrato nuclear: tampão de lise (10mM;), KCL (10mM), EDTA (1mM), 10% de glicerol, ditiotrietol (1mM), fluoreto de fenilmetilsulfonilo (0,1mM), 1μg mL⁻¹ leupeptina, 1μg mL⁻¹ pepstatina, 0.08μg mL⁻¹ aprotinina. Os tubos foram colocados em agitador por 15 minutos a 4°C. As amostras foram centrifugadas (20 000g; 5 minutos; 4°C), o sobrenadante (extrato nuclear) foi aliquotado e armazenado a – 70°C até o uso. A quantificação de proteína foi determinada através do espectrofotômetro (NanoDrop™/ EUA).

3.11.2- Ensaio de deslocamento em gel

Para verificar a participação do fator de transcrição NF-κB foi utilizada a técnica de deslocamento da ligação em gel por eletroforese. Esta técnica baseia-se na observação de que complexos estáveis proteína/DNA migram, através de gel de poliacrilamida, mais vagarosamente que os fragmentos de DNA livres. Resumidamente, o oligonucleotídeo de dupla-fita com consenso para NF-κB (5'AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') foi marcado nas extremidades com [γ^{32} P]ATP na presença da T4 polinucleotídeo quinase por 10 minutos a 37°C. Os nucleotídeos não incorporados foram removidos através da coluna de Sefadex G-25.

Os extratos nucleares migrados foram incubados com tampão do ensaio (10mM Tris-HCl pH 7,5; cloreto de magnésio(1mM MgCl₂); cloreto de sódio (50mM NaCl); 0,5mM DTT; 0,5mM EDTA; 4% glicerol e 1 μ g de poli dldC) por 20 minutos em temperatura ambiente, em volume final de 20 μ L. Posteriormente, cada amostra foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente com \pm 40.000 cpm dos oligonucleotídeos. Os complexos proteína-DNA foram avaliados em gel não-desnaturante 6% de acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) em 0,25x TBE a 150V por 1 hora e 30 minutos. Após secagem o gel foi exposto a um filme autoradiográfico por 24 - 48 horas a -70°C e analisados densitometricamente.

3.12 Determinação da atividade fagocítica e microbicida

Neste ensaio foi analisada a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos migrados para o peritônio. Após o tratamento com a HQ nas concentrações de 5μM e 10μM por uma hora, 1 x 10⁶ células foram incubados com a *Candida albicans* (1x 10³) por 18 horas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro estéreis. Findo este período, as lamínulas foram retiradas e após secagem foram coradas com corante panótico. A quantificação foi realizada através de microscópio óptico (FERREIRA *et al.*, 2004), no qual foi analisado: (i) total de 100 células, (ii) número de células que fagocitaram fungos e (iii) quantidade de fungos fagocitados.

A porcentagem de fagocitose foi determinada pela fórmula:

número de células que fagocitaram pelo menos 1 fungo x 100 número de células totais

O índice de fagocitose foi determinado pela fórmula:

número de células que fagocitaram X número de fungos que foram fagocitados

Para a quantificação da atividade microbicida, após 18 horas de incubação com a *Candida albicans*, o sobrenadante da cultura foi centrifugado (600rcf, 4°C, 15 minutos), e descartado. O pellet de células foi lisado com 1mL de água destilada, gelada e estéril e uma alíquota (1:250) foi semeada em placas contendo agar Sabouraud. Os resultados foram expressos pelo número de as unidades formadoras de colônia (UFC) após 24 horas de incubação a 30°C.

3.13 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós – testes estatísticos apropriados (Bonferroni e Tukey). O teste "t" de Student foi empregado para amostras não pareadas. As analises estatísticas foram conduzidas utilizando o GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Prism Software Inc, 1992-2003). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão média (e.p.m) com nível de significância menor que 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Célula endotelial

4.1.1 Caracterização da célula endotelial por microscopia confocal

A caracterização das culturas primárias de célula endotelial foi realizada pela marcação da célula com PECAM-1, uma molécula constitutiva da célula endotelial (WOODFIN et al., 2007; GARRIDO-URBANI et al., 2008), de forma a assegurar pureza das culturas. A análise por microscopia confocal mostrou marcação intensa para PECAM-1, como mostrado na Figura 6. Esta caracterização foi realizada com periodicidade durante os ensaios.

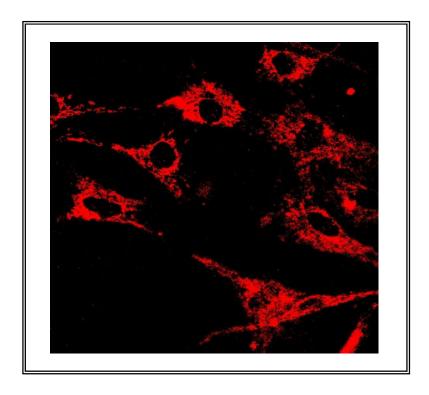


Figura 6. Caracterização da célula endotelial. Foto representativa de células endoteliais em cultura obtidas do músculo cremaster de ratos Wistar machos. A imagem foi capturada por microscopia confocal (aumento de 400x) após marcação com anticorpo anti-PECAM-1 conjugado a P.E.

4.1.2 Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade, as culturas de células endoteliais foram mantidas em condições normais (meio DMEM e 20% SFB) e pré-tratadas com HQ (10 ou 100μM, 2 horas) e posteriormente incubadas ou não com LPS (2μg/mL) por 48 horas. Os resultados apresentados na Figura 7 mostram que os tratamentos não afetam a viabilidade da célula endotelial, uma vez que estas permaneceram viáveis após os tratamentos com a HQ e após a incubação com meio de cultura ou LPS (Figura 7B). Estes dados refletem a incapacidade da HQ causar necrose ou apoptose (Figuras 7A).

Como controle positivo, a cultura de célula endotelial foi exposta a U.V, por 30 segundos, à radiação de 300J, e mantida por 48 horas em meio DMEM contendo 10% de SBF. Os dados apresentados na Figura 7B indicam que o controle positivo empregado foi adequado, uma vez que houve redução acentuada na viabilidade da célula endotelial.

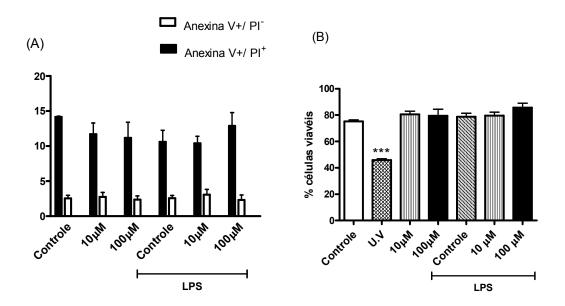


Figura 7. Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade da célula endotelial. Células endoteliais em cultura foram incubadas com meio de cultura DMEM (células controles), ou pré-tratadas com 10 ou 100μM de HQ por duas horas, posteriormente foram incubadas na presença e ausência de LPS (2μg/mL, 48 horas), ou irradiadas (U.V. 300J por 30 segundos). A viabilidade foi quantificada em ensaios de citometria de fluxo com marcação pela Anexina V e PI. Os valores expressam a média \pm e.p.m. de 6 culturas de células obtidas de diferentes animais. **(A)** Células positivas para anexina V e PI **(B)** Células viáveis. *** P□ 0,001 vs controle.

4.1.3 Efeitos do tratamento com HQ sobre a produção de NO e sobre a secreção de citocinas inflamatórias

Os dados apresentados na Figura 8 mostram que as incubações com HQ não alteraram a produção basal de NO. No entanto, a incubação prévia com 100µM de HQ inibiu significantemente a produção de NO induzida pelo LPS.

Diferentemente, a incubação com $100\mu M$ de HQ causou um aumento significante na concentração basal de TNF- α , similar à concentração encontrada em células estimuladas pelo LPS e diferente da observada em células controles incubadas somente com meio de cultura (Figura 9A). A incubação prévia com HQ, nas duas concentrações estudadas, não modificou a secreção de TNF- α provocada pelo LPS (Figura 9A).

As concentrações de IL-1 β no sobrenadante de células incubadas com ambas as doses de HQ ($10\mu M$ e $100\mu M$) foram significantemente maiores que as observadas em células controles incubadas com meio de cultura, mas de menor magnitude que a encontrada em células incubadas com LPS. A pré-incubação com a HQ não alterou a secreção desta citocina induzida pelo LPS (Figura 9B).

As concentrações de CINC-1, IL-10 e IL-6 em células incubadas com HQ não foram diferentes das encontradas em sobrenadantes de células controles incubadas com meio de cultura (Figuras 10A, B e C). Da mesma forma, a incubação prévia com HQ não modificou a secreção das citocinas em células estimuladas pelo LPS. Os valores encontrados foram equivalentes ao encontrado no sobrenadante de células incubadas com meio de cultura e LPS (Figuras 10A, B e C).

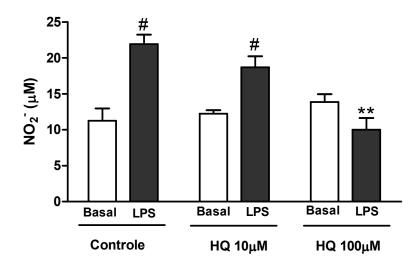
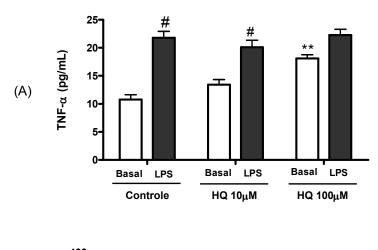


Figura 8. Efeito da HQ sobre a produção de NO pela célula endotelial. Células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com 10 ou 100μM de HQ por duas horas. Posteriormente foram incubadas na presença e ausência de LPS (2μg/mL, 48 horas). Os sobrenadantes foram empregados para as determinações de NO $_2$ por reação de Griess. Os valores expressam a média \pm e.p.m. de 4 culturas de células obtidas de diferentes animais. *P 0,001 vs respectivo basal, *P 0,01 vs respectivos valores estimulados pelo LPS no grupo HQ 10μM e controle.



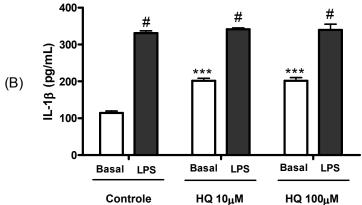
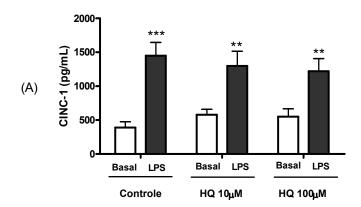


Figura 9. Efeito da HQ sobre a secreção de TNF- α e IL-1 β pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com 10 ou 100µM de HQ por duas horas. Posteriormente foram incubadas na presença e ausência de LPS (2µg/mL, 18 horas). Os sobrenadantes foram empregados para as determinações de citocinas por ELISA. Os valores expressam a média \pm e.p.m. de 6 culturas de células obtidas de diferentes animais. (A) TNF- α , (B) IL-1 β . ,*P \Box 0,001 vs respectivo basal, **P \Box 0,01,*** P \Box 0,001 vs valor basal do grupo controle.



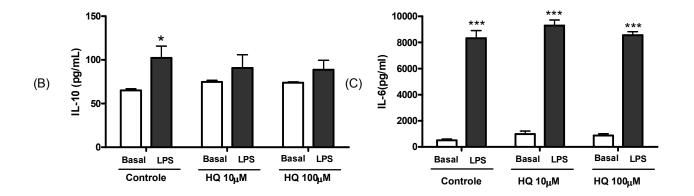


Figura 10. Efeito da HQ sobre a secreção de CINC-1, IL-10 e IL-6 pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com 10 ou $100\mu M$ de HQ por duas horas. Posteriormente foram incubadas na presença e ausência de LPS ($2\mu g/mL$, 18 horas). Os sobrenadantes foram empregados para as determinações de citocinas por ELISA. Os valores expressam a média \pm e.p.m. de 6 culturas de células obtidas de diferentes animais. (A) CINC-1 (B) IL-10, (C) IL-6. * $P\Box$ 0,05, * $P\Box$ 0,01, *** $P\Box$ 0,001 vs respectivo basal .

4.1.4 Efeito do Tratamento com HQ sobre a Atividade Enzimática das NOS

A diminuição da produção de NO₂ por células endoteliais tratadas com HQ (100μM) sob estimulação com o LPS delineou os ensaios para investigação dos efeitos da HQ sobre a atividade das enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Foram determinados os efeitos da HQ sobre as atividades das NOS totais, dependentes e independente de Ca⁺². Os resultados mostraram que a atividade das NOS totais estava reduzida nas células endoteliais tratadas com HQ e posteriormente incubadas com LPS (Figura 11). Este valor refletiu a redução da atividade das NOS dependentes e independente de Ca⁺², uma vez que suas atividades foram menores do que em células controles tratadas com meio de cultura adicionado de LPS.

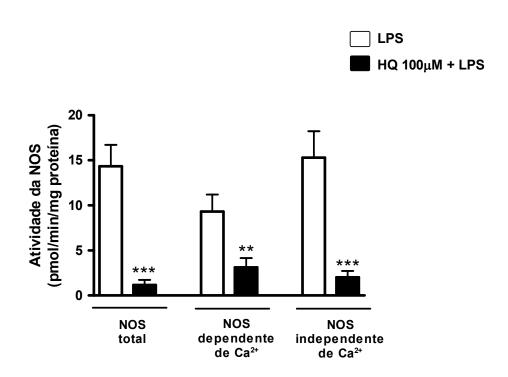


Figura 11. Efeito do tratamento com HQ $100\mu M$ sobre as atividades das NOS na presença de estimulação com LPS.

As células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com $100\mu M$ de HQ por duas horas. Posteriormente foram incubadas com LPS ($2\mu g/mL$; 24h) para determinações da atividade enzimática das NOS, por ensaio enzimático. Os resultados expressam a média \pm e.p.m dos valores obtidos de 6 a 8 animais. ** P<0,01 , *** P<0,001 vs. respectivo LPS.

4.1.5 Efeitos do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das eNOS e iNOS

A expressão gênica das enzimas iNOS e óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) foi avaliada por ensaios de RT-PCR para investigar se a diminuição detectada na atividade das enzimas (iNOS; eNOS) era dependente de uma diminuição da sua síntese. Os resultados obtidos mostram que a expressão gênica das enzimas iNOS e eNOS não estava alterada após tratamento com a HQ (100μM) na presença de LPS (Figura 12A). A Figura 12B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm para iNOS e eNOS.

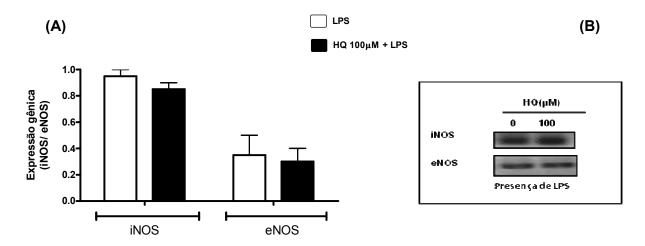


Figura 12. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da eNOS e iNOS pela célula endotelial.

As células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com $100\mu M$ de HQ. Posteriormente foram incubadas com LPS ($2\mu g/mL$; 24h). O RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para eNOS e iNOS. **(A)** expressa a média \pm e.p.m. de 3 a 5 culturas de células obtidas de diferentes animais. **(B)** imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.1.6 Efeito do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das citocinas IL-1 β e TNF- α

Para investigar se o aumento das concentrações de citocinas, IL-1 β e TNF- α nos sobrenadantes de célula endoteliais eram decorrentes de alterações na síntese destas moléculas, a expressão gênica das mesmas foi determinada por reação de RT- PCR. Os dados obtidos mostram que a expressão gênica da IL-1 β , na ausência do LPS, estava aumentada em células endoteliais tratadas com HQ (Figura 13A). A Figura 13B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm para IL-1 β .

O mesmo perfil de elevação dos níveis de RNAm para TNF-α não foi detectado. O motivo desta ausência de efeito pode ser decorrente de sensibilidade da técnica, mas também pode ser devido a capacidade da HQ causar elevação da secreção da citocinas por induzir clivagem do pró-TNF-α à sua forma ativa e secretada (UTSUMI *et al.*, 2001).

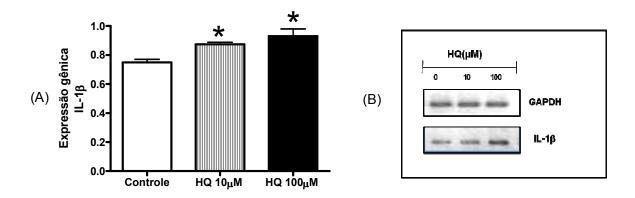


Figura 13. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de IL-1β pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram pré-tratadas ou não com 10 ou $100\mu M$ de HQ por duas horas. O RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para IL-1 β . (A) expressa a média \pm e.p.m. de 3 a 5 culturas de células obtidas de diferentes animais. *P<0,05 vs controle. (B) imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.1.7 Efeitos dos tratamentos com HQ sobre a expressão de moléculas de adesão

As expressões das moléculas de adesão nas células endoteliais foram quantificadas após tratamento com a HQ (10 e 100 µM) na ausência e presença de LPS (2 µg/mL). É importante salientar que os períodos de incubação com LPS variaram de acordo com a cinética de expressão destas moléculas. Previamente a estes estudos, a cinética de expressão das diferentes moléculas de adesão frente ao LPS foi padronizada. Também vale ressaltar que os períodos de incubação não ultrapassaram os períodos de incubação utilizados para se avaliar a viabilidade celular.

O tratamento das células endoteliais com as concentrações de 10 ou 100µM provocou aumento significante na expressão de ICAM-1 na membrana celular semelhantemente à expressão desencadeada pelo estímulo com LPS (Figura 14A). Por outro lado, a incubação prévia com as duas concentrações de HQ não afetou a expressão da molécula induzida pelo LPS (Figura 14A).

Semelhantemente à molécula ICAM-1, os tratamentos com as concentrações de 10 ou 100μM de HQ estimularam a expressão de PECAM-1 na membrana celular (Figura 14B). No entanto, esta expressão foi menor que a provocada pelo LPS. A incubação com HQ, não modificou a expressão de PECAM-1 induzida pelo LPS. Os valores obtidos foram equivalentes aos encontrados em células controles incubadas com meio de cultura e posteriormente com LPS (Figura 14B). O tratamento com ambas as concentrações de HQ (10 ou 100μM) também aumentou a expressão basal de VCAM-1 na membrana das células endoteliais, com magnitude semelhante à desencadeada pelo LPS (Figura 14C). Por outro lado, a incubação prévia com as duas concentrações de HQ não afetou a expressão da molécula induzida pelo LPS (Figura 14C).

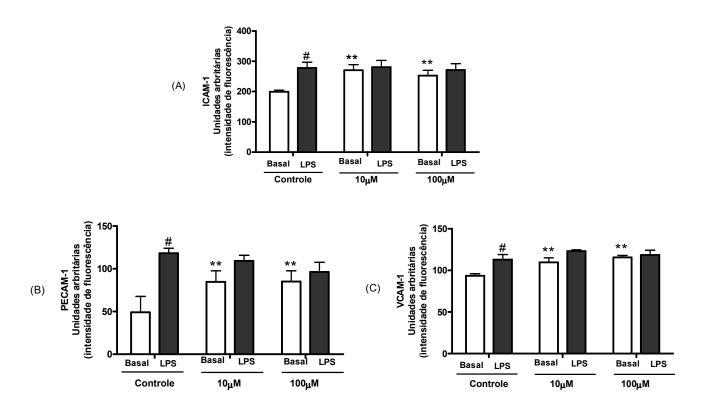


Figura 14. Efeito da HQ sobre a expressão protéica de ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram incubadas com meio de cultura DMEM, ou pré-tratadas com 10 ou 100 μ M de HQ por duas horas, posteriormente foram incubadas na presença e ausência de LPS (2 μ g/mL, 4 ou 8 horas). As moléculas de adesão foram quantificadas por citometria de fluxo. Os valores expressão a média \pm e.p.m. de 6 culturas de células obtidas de diferentes animais. (A) ICAM-1, (B) PECAM-1 e (C) VCAM-1. **P \Box 0,01, **P \Box 0,001 vs valor basal do grupo controle.

4.1.8 Efeitos do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das moléculas de adesão

Para investigar se o aumento detectado na expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e PECAM na célula endotelial eram decorrentes de alterações na síntese destas moléculas, a expressão gênica das mesmas foi determinada por reação de RT- PCR.

Os dados obtidos mostram que a expressão gênica das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1, na ausência de LPS, estava aumentada em células endoteliais tratadas com HQ (Figura 15A). A Figura 15B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm para ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1.

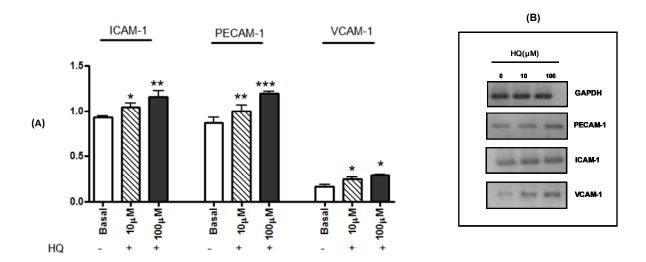


Figura 15. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de ICAM-1, PECAM-1, VCAM-1 pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram incubadas com meio de cultura DMEM, ou pré-tratadas com 10 ou $100\mu\text{M}$ de HQ por duas horas. O RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 (A) expressa a média \pm e.p.m. de 3 a 7 culturas de células obtidas de diferentes animais. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001 vs respectivo basal. (B) imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.1.9 Efeitos do tratamento da HQ sobre a translocação do NF-κB

Os dados que mostraram o efeito indutor da HQ sobre a produção de citocinas (TNF- α e IL-1 β) e das moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) pela célula endotelial, conduziram os ensaios para a investigação dos efeitos deste composto fenólico sobre a translocação do NF- κ B, um importante fator de transcrição responsável pela síntese de citocinas inflamatórias e moléculas de adesão. Como mostrado na Figura 16A, as células tratadas com a HQ em ambas as concentrações (10μ M e 100μ M) na ausência do LPS, tiveram uma aumento na translocação do fator de NF- κ B para o núcleo em relação às células controles tratadas somente com meio de cultura. A Figura 16B mostra uma imagem representativa do gel para NF- κ B.

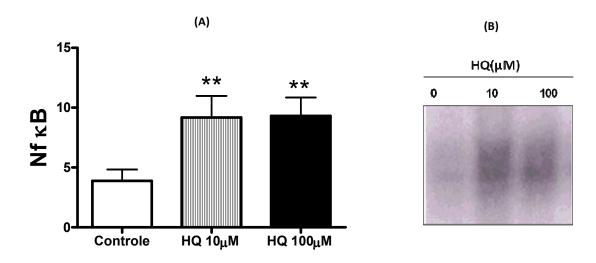


Figura 16. Efeito do tratamento com HQ 10 μ M e 100 μ M sobre a translocação do NF-κB.

Células endoteliais em cultura foram incubadas com meio de cultura DMEM, ou pré-tratadas com 10 ou $100\mu M$ de HQ por duas horas. Para a quantificação do fator de transcrição NF- κB roram empregados ensaios de deslocamento em gel. Os resultados expressam a média \pm e.p.m dos valores obtidos 4 animais por grupo. ** P<0,01 vs controle.

4.1.10 Efeito do tratamento com HQ sobre a expressão gênica enzimas MPO e CYP 2E1

Com o intuito de investigar a capacidade da célula endotelial metabolizar a HQ, a expressão gênica de mieloperoxidase e CYP2E1 foi quantificada. Os resultados obtidos mostraram que a célula endotelial expressa CYP2E1 constitutivamente e que sua expressão não sofre influência do tratamento com HQ (Figura 17A). Por ouro lado, os dados mostraram que a célula endotelial não apresenta enzima mieloperoxidase (Figura 17B). O controle positivo do ensaio foi neutrófilos, que expressam a mieloperoxidase.

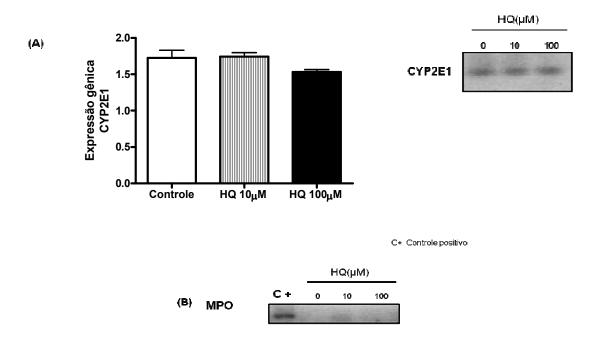


Figura 17. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da MPO e CYP2E1 pela célula endotelial.

Células endoteliais em cultura foram incubadas com meio de cultura DMEM, ou pré-tratadas com 10 ou $100\mu\text{M}$ de HQ por duas horas. O RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* especifico MPO e CYP2E1 (A) expressa a média \pm e.p.m de RNAm obtido de 4 animais por grupo e imagem representativa para CYP2E1. (B) Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para MPO, sendo visualizado apenas o controle positivo utilizado que foi a presença de mieloperoxidase em neutrófilos.

4.2 Neutrófilos

4.2.1 Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade, neutrófilos migrados para o peritônio foram mantidos em condições normais (meio RPMI e 10 % SBF) e tratados com HQ na maior concentração utilizada nos ensaios ($10\mu M$) por 1 hora e posteriormente incubados ou não com LPS ($5\mu g/mL$) por 18 horas. Os resultados apresentados na Figura 18 mostram que os tratamentos não afetaram a viabilidade dos neutrófilos, uma vez que estes permaneceram viáveis após os tratamentos com a HQ e após a incubação com meio de cultura ou LPS (Figura 18A). Estes resultados refletem a incapacidade da HQ causar necrose ou apoptose (Figura 18B).

Os resultados da viabilidade de neutrófilos delinearam as concentrações de HQ empregadas no estudo, já que concentrações superiores a estas causaram morte celular por apoptose (dados não mostrados).

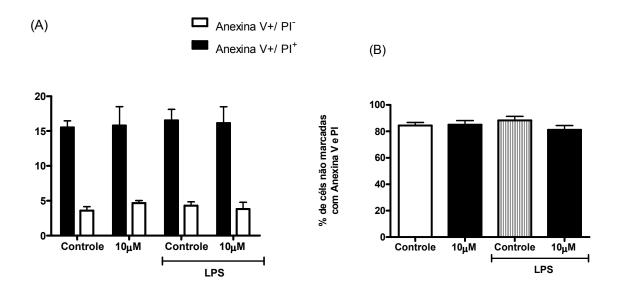


Figura 18. Efeito do tratamento com HQ sobre a viabilidade de neutrófilos. Neutrófilos em cultura foram foram incubados com meio de cultura RPMI (células controles), ou pré-tratados com $10\mu M$ de HQ por uma hora, posteriormente foram incubados na presença e ausência de LPS ($5\mu g/mL$, 18 horas). A viabilidade foi quantificada em ensaios de citometria de fluxo com marcação pela Anexina V e PI. Os valores expressam a média \pm e.p.m. de 7 culturas de células obtidas de diferentes animais. **(A)** Células positivas para Anexina V e PI **(B)** Células viáveis.

4.2.2 Efeitos do tratamento com HQ sobre a produção de NO e sobre a secreção de citocinas inflamatórias

Os dados apresentados na Figura 19 mostram que as incubações com as duas concentrações de HQ diminuíram a produção basal de NO. Os valores obtidos foram significantemente menores que os observados em células controles, incubadas com meio de cultura. Da mesma forma, a incubação prévia com as duas concentrações de HQ inibiu a produção de NO induzida pelo LPS.

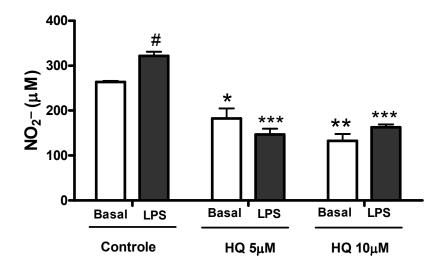


Figura 19. Efeito da HQ sobre a produção de NO por neutrófilos. Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10μM de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença e ausência de LPS (5μg/mL, 18 horas). Os sobrenadantes foram empregados para as determinações de NO $_2$ por reação de Griess. Os valores expressão a média \pm e.p.m. de 4 culturas de células obtidas de diferentes animais. $^{\#}P$ 0,001, $^{*}P$ 0,05, $^{**}P$ 0,01, vs valor basal do grupo controle. $^{***}P$ 0,001 vs valores estimulados pelo LPS no grupo controle.

Diferentemente, a incubação com HQ não causou alterações significativas na concentração basal de TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Figura 20A, B e C). No entanto, a incubação com HQ, nas duas concentrações estudadas, previamente à incubação com LPS, reduziu significantemente a concentração das citocinas nos sobrenadante das células. Os valores obtidos em células incubadas com a HQ e estimuladas pelo LPS foram significantemente menores que as encontradas em células controles incubadas com meio de cultura e LPS e similares à produção basal das citocinas (Figura 20A, B e C).

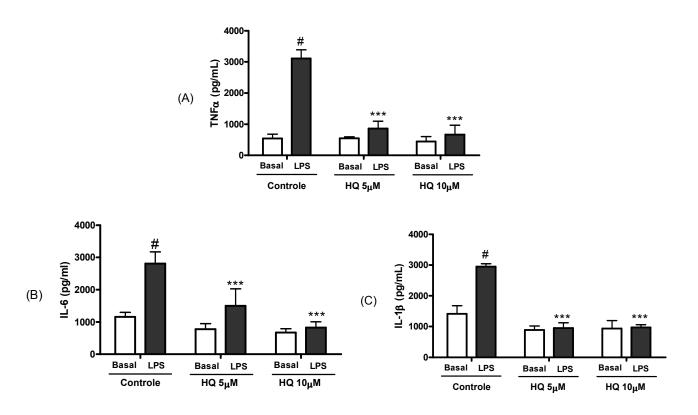


Figura 20. Efeito da HQ sobre a produção citocinas por neutrófilos. Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10μM de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença e ausência de LPS (5μg/mL, 18 horas). Os sobrenadantes foram empregados para as determinações de citocinas por ELISA. Os valores expressão a média \pm e.p.m. de 6 culturas de células obtidas de diferentes animais. **(A)** TNF-α, **(B)** IL-6, **(C)** IL-1β. $^{*}P\Box 0,001$ vs respectivo valor basal do grupo controle, $^{***}P\Box 0,001$ vs respectivo valor estimulado pelo LPS no grupo controle.

4.2.3 Efeito do Tratamento com HQ sobre a Atividade Enzimática das NOS

A diminuição da produção de NO₂ em neutrófilos tratados com HQ (5 e 10μM) na presença ou ausência de LPS delineou os ensaios para investigação dos efeitos da HQ sobre a atividade das enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Foram determinados os efeitos da HQ sobre as atividades das NOS totais, dependentes e independente de Ca⁺², na ausência ou presença de LPS. Os resultados mostraram que a atividade das NOS totais, dependente e independente de Ca²⁺ não estavam alteradas em neutrófilos tratados com HQ na ausência de LPS, Figura 21A.

Em neutrófilos estimulados com LPS, verificou–se uma redução da atividade das NOS total, independentes e dependente de Ca⁺², uma vez que suas atividades foram menores do que em células controles tratadas com meio de cultura adicionado de LPS (Figura 21B e C).

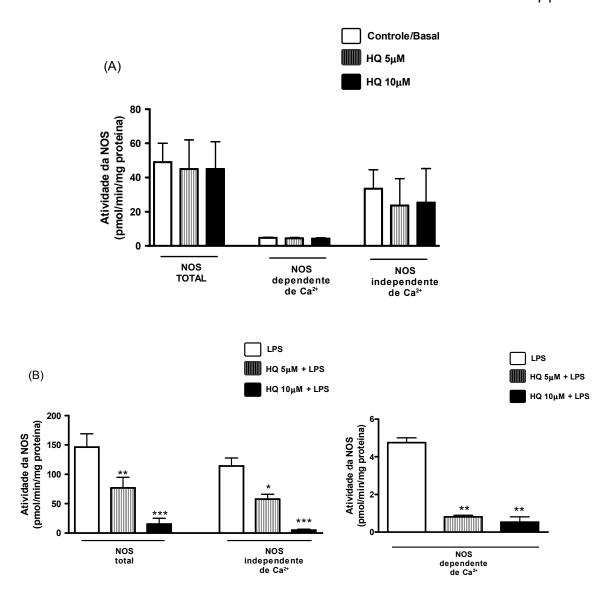


Figura 21. Efeito do tratamento com a HQ sobre a atividade das NOS de neutrófilos

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10 μ M de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença e ausência de LPS (5 μ g/mL, 18 horas) para determinações da atividade enzimática das NOS, por ensaio enzimático. Os valores expressão a média \pm e.p.m. de 3 a 5 culturas de células obtidas de diferentes animais. (A) NOS basal, (B) NOS estimulada com LPS. * P<0,05, ** P<0,01 vs respectivos valores estimulados pelo LPS, *** P<0,001 vs respectivos valores estimulados pelo LPS no grupo HQ 5 μ M e controle.

4.2.4 Efeito do Tratamento com HQ sobre a expressão gênica da iNOS cNOS

A expressão gênica das enzimas enzimas iNOS e óxido nítrico sintetase constitutiva (cNOS) foi avaliada por ensaios de RT-PCR para investigar se a diminuição detectada na atividade das enzimas (iNOS; eNOS) era ou não dependente de uma diminuição da sua síntese protéica.

Os dados obtidos mostram que a expressão gênica das enzimas iNOS e cNOS, na presença de LPS, não estava alterada após tratamento com a HQ na concentração de 5 e 10µM na presença de LPS, Figura 22A. A Figura 22B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm para iNOS e eNOS.

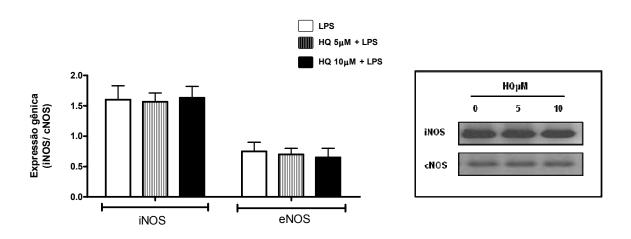
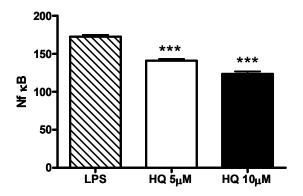


Figura 22. Efeito do tratamento da HQ na expressão gênica da eNOS e iNOS por neutrófilos.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou $10\mu M$ de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença de LPS ($5\mu g/mL$, 18 horas). O RNAm foi extraído com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com *primer* específico para cNOS e iNOS. **(A)** expressa a média \pm e.p.m. de 4 culturas de células obtidas de diferentes animais. **(B)** imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.2.5 Efeito do Tratamento com HQ sobre a translocação do NF-kB

Os dados que mostraram o efeito inibitório da HQ sobre a produção de citocinas estimuladas pelo LPS em neutrófilos, conduziram os ensaios para a investigação dos efeitos deste composto fenólico sobre a translocação nuclear do NF- κ B, um importante fator de transcrição responsável pela síntese de citocinas inflamatórias. Como mostrado na Figura 23, células tratadas com a HQ (5 μ M e 10 μ M) e estimuladas com o LPS, tiveram diminuição na translocação do fator de NF- κ B no núcleo em relação às células controles tratadas somente com meio de cultura adicionado com LPS.



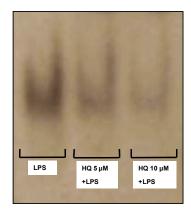


Figura 23. Efeito do tratamento com HQ $5\mu M$ e 10 μM sobre a translocação do NF- κB por neutrófilos.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10 μ M de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença de LPS (5 μ g/mL, 4 horas).Para a quantificação do fator de transcrição NF- κ B foram empregados ensaios de deslocamento em gel .Os resultados expressam a média \pm e.p.m dos valores obtidos 4 animais por grupo. *** P<0,001 vs LPS.

4.2.6 Efeito do tratamento da HQ sobre a expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6

Para investigar se a diminuição de citocinas nos sobrenadantes de neutrófilos era decorrente de alterações na síntese destas moléculas, a expressão gênica das mesmas foi determinada por reação de RT- PCR. Os resultados mostram que a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-6 e IL-1 β , na presença do LPS, estava diminuída em neutrófilos tratados com HQ (Figura 24A). A Figura 24B mostra uma imagem representativa da eletroforese em gel de agarose para RNAm para TNF α , IL-6 e IL-1 β .

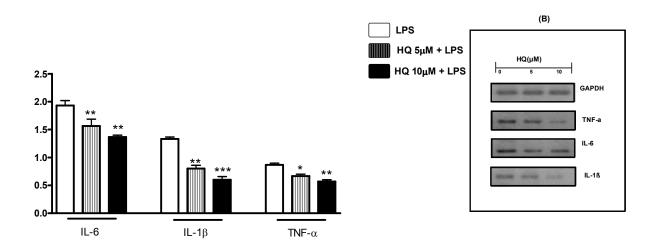


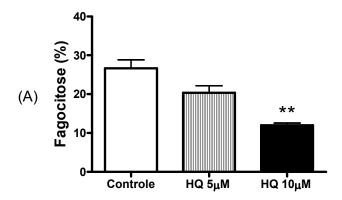
Figura 24. Efeito da HQ sobre a expressão gênica de TNF- α , IL-6, IL-1 β por neutrófilos.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10 μ M de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença de LPS (5 μ g/mL, 4 horas). O RNAm foi extraído com reagente Trizol[®]. A reação de PCR foi realizada com *primer* especifico para TNF- α , IL-6, IL-1 β (A) expressa a média \pm e.p.m de RNAm obtido de 4 animais por grupo * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001 vs respectivos valores estimulados pelo LPS. (B) Imagem representativa da eletroforese em gel de agarose.

4.2.7 Efeito do tratamento com a HQ na atividade fagocítica e microbicida

Os efeitos da HQ sobre a atividade fagocítica e microbicida de neutrófilos foi determinada frente à *Candida albicans* em células previamente incubadas com a HQ (5 e 10 μ M) durante 1 hora. As células tratadas com 10 μ M de HQ apresentaram atividade fagocítica menores que as tratadas com meio de cultura ou com 5 μ M de HQ (Figura 25A). O índice de fagocitose, que representa a relação entre o número de células que fagocitaram e o número de fungos fagocitados também se apresentou diminuído (Figura 25B).

Para avaliar os efeitos da HQ sobre a atividade microbicida de neutrófilos, estas células foram incubadas com a HQ ou meio de cultura e incubadas com fungo *Candida albicans* por 18 horas. Findo o período de incubação, os neutrófilos foram lisados e os fungos fagocitados foram novamente cultivados. Quanto maior o número de colônias formadas, menor a atividade microbicida. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento com as duas concentrações de HQ reduziu a atividade microbicida frente à *Candida albicans*. O número de colônias de fungos foi maior em culturas realizadas com lisados de neutrófilos tratados com a HQ em relação a neutrófilos controles tratados com meio de cultura (Figura 26).



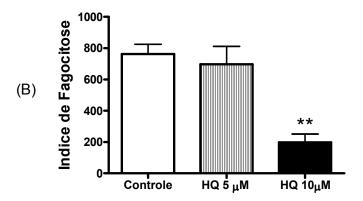
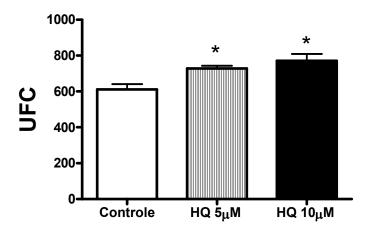


Figura 25. Efeito do tratamento com HQ sobre atividade fagocítica de neutrófilos frente a *Candida albicans*.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10 μ M de HQ por uma hora e foram incubados com *Candida albicans* (1 x 10³; 18 horas). Posteriormente as células foram quantificadas por coloração em lâmina para avaliar a atividade fagocítica. Os resultados expressam a média \pm e.p.m dos valores obtidos 4 animais por grupo. ** P<0,01 vs valor do grupo controle e HQ 5 μ M.



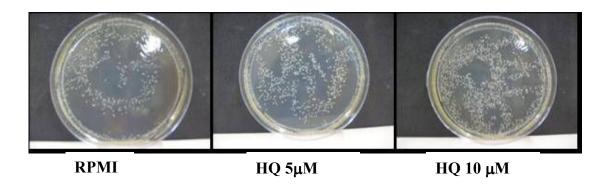


Figura 26. Efeito do tratamento com HQ $5\mu M$ e $10\mu M$ e incubação com *Candida albicans* na atividade microbicida de neutrófilos.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou $10\mu M$ de HQ por uma hora e foram incubados com *Candida albicans* (1 x 10^3 ; 18 horas). Posteriormente as células foram lisadas e semeadas em agar sabourand e mantidas em estufa por 18 horas, a determinação da atividade microbicida foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônias. Os resultados expressam a média \pm e.p.m dos valores obtidos 4 animais por grupo * P<0,05 vs controle.

4.2.8 Efeito do tratamento com HQ sobre a expressão gênica enzimas MPO e CYP 2E1

Para investigar a capacidade de neutrófilos de metabolizar a HQ, a expressão gênica de mieloperoxidase e CYP2E1 foi quantificada. Os dados obtidos mostram que neutrófilos estimulados com LPS expressam a enzima mieloperoxidase. Os resultados mostram que os tratamentos com a HQ aumentam a expressam de MPO (Figura 27A). A CYP2E1 é expressa por neutrófilos após estímulo com LPS, mas os tratamentos com a HQ nas concentrações de 5μM e 10μM não alteraram sua expressão gênica (Figura 27B).

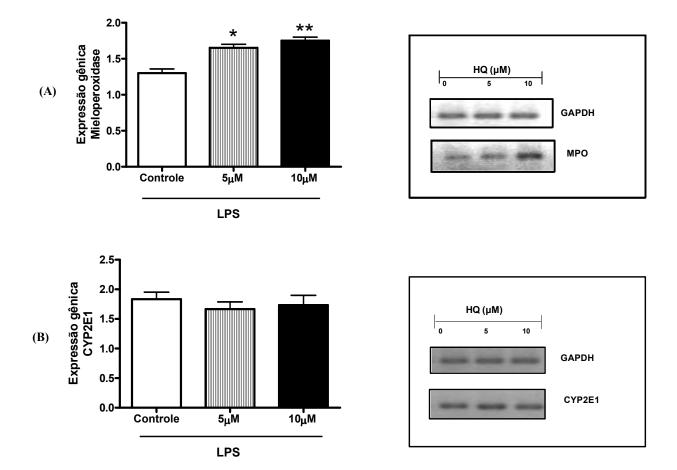


Figura 27. Efeito da HQ sobre a expressão gênica da MPO e CYP2E1 por neutrófilos.

Neutrófilos em cultura foram pré-tratados ou não com 5 ou 10µM de HQ por uma hora. Posteriormente foram incubados na presença de LPS (5µg/mL, 18 horas). O RNAm foi extraído com reagente Trizol®. A reação de PCR foi realizada com primer específico mieloperoxidase e CYP2E1 (A) expressa a média \pm e.p.m de RNAm obtido de 4 animais por grupo e imagem representativa para MPO, *P<0,05, **P<0,01 vs valor estimulado pelo LPS (B) expressa a média \pm e.p.m de RNAm obtido de 4 animais por grupo e imagem representativa para CYP2E1.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o tratamento *in vitro* com HQ acarreta efeitos anti e pró-inflamatórios em neutrófilos e célula endotelial, respectivamente. Mostramos que HQ induz, *per se*, a expressão de moléculas de adesão da super família das imunoglobulinas e a secreção de TNF-α e IL-1β em células endoteliais, que possivelmente seja decorrente do aumento da translocação nuclear do NF-κB. No entanto, o tratamento com HQ inibe a produção de NO, sob estimulação pelo LPS, via inibição das atividades das enzimas NO sintases. Em neutrófilos, a HQ exerce efeitos antiinflamatórios, mostrados pela diminuição da atividade fagocítica e microbicida, inibição da produção de NO, pela inibição das atividades das enzimas NO sintases, inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias frente estimulação pelo LPS. Este último efeito pode ser decorrente de redução da translocação nuclear do NF-κB.

Foi empregada cultura de célula endotelial primária obtida do músculo cremaster de ratos Wistar, machos. O procedimento experimental permite crescimento específico de células endoteliais de vasos da microcirculação, caracterizadas, rotineiramente, por microscopia confocal pela marcação da expressão de PECAM-1. Esta cultura tem sido usada pelo nosso grupo de pesquisa para elucidar mecanismos pró ou anti-inflamatórios de mediadores endógenos ou de novas moléculas de origem sintética ou animal (LOTUFO et al., 2001; CAVALCANTI et al., 2007; WAISMAN et al., 2009). A utilização desta cultura foi escolhida em detrimento às obtidas de cordão umbilical humano ou de aorta bovina, duas culturas de fácil obtenção, pelos seguintes motivos: (i) os eventos de interação leucócito-endotélio e a transmigração de leucócitos ocorrem, predominantemente, em vênulas da microcirculação (HARLAN, 1985; RAMPART, 1994); (ii) as células endoteliais de vasos de grande e pequeno calibre diferem em inúmeras características, entre as quais a expressão de moléculas de adesão (RAMPART, 1994); (iii) nossos resultados que

demonstram que a exposição à HQ *in vivo* prejudica a evolução da resposta inflamatória têm sido obtidos em ratos Wistar, machos (FERREIRA *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2007).

Os estudos foram realizados em neutrófilos migrados para o peritônio, por meio da injeção de agente irritante, no caso o glicogênio de ostra, uma vez que a concentração deste tipo de células na circulação de roedores é pequena em relação aos demais tipos de leucócitos (10 a 20%), inviabilizando sua coleta em número expressivo. Esta estratégia metodológica é amplamente descrita e os neutrófilos obtidos são empregados para avaliação de inúmeras atividades, entre as quais as aqui investigadas (para revisão ver STEWART *et al.*, 1993),

As concentrações de HQ empregadas nestes estudos nos ensaios com as células endoteliais foram obtidas a partir de dados preliminares do nosso laboratório, que mostraram a menor concentração para indução da expressão de moléculas de adesão. No caso dos neutrófilos, as concentrações e tempos utilizados foram menores que os empregados nos ensaios com a célula endotelial, devido ao fato que concentrações iguais ou superiores a 50µM afetaram a viabilidade.

A literatura mostra que a concentração de exposição, bem como o período de incubação com HQ são muito variáveis, dependendo da célula e do efeito tóxico estudado. Como já salientado na Introdução, as concentrações de HQ encontradas na literatura variaram de 10 μM a 20 mM para os diferentes tipos celulares estudados e para os efeitos observados (HAZEL, 1996; HENSCHLER et al., 1996; LI et al., 1997; ANDREOLI et al., 1999; WIEMELS & SMITH, 1999; OUYANG et al., 2000; VAN DEN HEUVEL et al. 2001; POIRIER et al., 2002; MA et al., 2003; GASKELL et al., 2004; LINDSEY et al., 2005; MORETTI et al., 2005; ZHAO, 2008). Apesar da grande quantidade de estudos in vitro com a HQ, dados sobre suas ações sobre as células endoteliais e neutrófilos ainda são escassos, portanto os delineamentos experimentais empregados foram padronizados durante a realização deste trabalho.

Para determinar se os tratamentos não provocavam morte celular, o primeiro passo deste trabalho foi investigar se o tratamento com HQ e a subsequente incubação com LPS não acarretavam apoptose e necrose. Os

dados obtidos mostraram que os tratamentos não causaram ambos os tipos de morte celular, tanto na célula endotelial quanto nos neutrófilos. Estes dados diferem dos da literatura que indicam que a HQ interfere com as vias de apoptose em diferentes linhagens celulares, induzindo ou inibindo o processo, dependendo do tipo celular, tempo e concentração de HQ usados (IBUKI & GOTO, 2004; ROSS et al., 1996; ZHAO et al., 2008). Tem sido mostrado que a incubação de células da medula óssea com HQ inibe proteases envolvidas no processo de apoptose de células neoplásicas e que espécies reativas de oxigênio participam do processo (ROSS et al., 1996; IBUKI E GOTO, 2004). Por outro lado, várias evidências sugerem seu papel na indução do processo, especialmente em células não neoplásicas (BIRONAITE et al., 2004; INAYAT-HUSSAIN & ROSS, 2005; TERASAKA et al., 2005; ZHAO et al., 2008). Os mecanismos envolvidos ainda não estão totalmente esclarecidos, mas sugerem fortemente a participação de espécies reativas de oxigênio (TERASAKA et al., 2005) e discordam quanto a dependência ou não da ativação de caspases (INAYAT-HUSSAIN & ROSS, 2005). É importante salientar que, tanto a cultura de célula endotelial como os neutrófilos empregados em nossos estudos, possuem as vias intracelulares necessárias para indução de apoptose, uma vez que temos mostrado suas mortes por apoptose pela ação de diferentes estímulos (CAVALCANTI et al., 2007; WAISMAN et al., 2009).

Os tratamentos com HQ aqui empregados induziram a expressão de moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas na célula endotelial, responsáveis pela aderência de leucócitos à parede vascular. Os resultados mostram que as duas concentrações de HQ empregadas causaram aumento na expressão de ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 na membrana celular, mas não alterou a expressão elevada provocada pelo LPS. A ICAM-1 é expressa constitutivamente na célula endotelial e sua expressão gênica é aumentada por diferentes estímulos inflamatórios (YANG et al., 2006). Diferentemente, a expressão de VCAM-1 é quase que inteiramente dependente de estimulação (POBER & COTRAN, 1991) e a PECAM-1 possui expressão constitutiva e localiza-se preferencialmente na bordas das células endoteliais, onde participa efetivamente da junções entre estas células (GARRIDO-URBANI et al., 2008).

A expressão e ativação da PECAM-1 na membrana é dependente de síntese protéica e é induzida por estímulos inflamatórios e pelo *shear stress* (COOK-MILL & DEEM, 2005; FUJIWARA, 2006), além de reinternalização ou clivagem (WANG *et al.*, 1997; GARNACHO *et al.*, 2008). Interessantemente, os resultados obtidos mostraram que a HQ induz a expressão na membrana, dependentemente, de síntese gênica. Níveis de RNAm para as três moléculas estavam elevados após incubação com HQ.

A literatura é carente quanto à ação da HQ sobre a expressão de moléculas de adesão. Nossos estudos prévios mostraram que animais expostos *in vivo* à HQ expressam maiores concentrações de PECAM-1 no endotélio de vênulas pós- capilares do músculo cremaster após estimulação com LPS (MACEDO, 2008).

O tratamento com HQ na célula endotelial não induziu a secreção de IL-10, IL-6 e CINC-1, mas aumentou a secreção basal de TNF-α e IL-1β. Esta ação da HQ sobre a IL-1β é dependente de expressão gênica. Por outro lado, o mesmo perfil de elevação dos níveis de RNAm para TNF-α não foi detectado. O motivo desta ausência de efeito pode ser decorrente de sensibilidade da técnica, mas também pode ser devido a capacidade da HQ causar elevação da secreção da citocinas por induzir clivagem do pró-TNF-α à sua forma ativa e secretada (UTSUMI *et al.*, 2001)

Interessantemente, o tratamento com HQ inibiu a secreção de IL-6, TNF-α e IL-1β após estimulação com LPS por neutrófilos e essa inibição foi dependente de inibição na expressão gênica dessas citocinas. Os dados da literatura são contraditórios sobre a ação da HQ sobre a secreção da imensa gama de citocinas pró ou anti-inflamatórias. Tem sido mostrado que HQ provoca aumento na secreção de IL-8 (BIRONAITE *et al.*, 2004), mas por outro lado o pré-tratamento com HQ inibiu a produção de TNF-α por células mononucleares humanas estimuladas por anti-CD3 ou acetato de forbol miristato (PMA) (OUYANG *et al.*, 2000), e de IL-1β impedindo a conversão proteolítica da pró-II-1 a IL-1β em macrofágos (NICULESCU *et al.*, 1995; 1996).

Tanto a expressão gênica de moléculas de adesão quanto de citocinas é dependente da translocação do NF-κB. Em neutrófilos verificou-se que a HQ tem a capacidade de diminuir esse fator de transcrição, enquanto que na célula endotelial, o efeito é oposto. Em conjunto, estes dados podem explicar o mecanismo responsável pela diminuição ou aumento na secreção destas citocinas. Estes dados corroboram uma série de trabalhos, realizados em diferentes linhagens celulares e estímulos pró-inflamatórios, que sugere que o NF-κB é alvo de ação das HQ. PYATT et al., (2000) demonstraram redução da atividade de NF-κB em linfócitos B CD19+ e T CD4 estimulados pelo PMA e pelo TNF-α, respectivamente. Nesta mesma linha de evidências, foi mostrado que a expressão protéica de NF-κB está diminuída em célula do estroma da medula óssea humana estimulada pelo PMA, no entanto, a intensidade de resposta variou com a concentração (superior a 100 μM) e o tempo de incubação empregados (YANG et al., 2006). Adicionalmente, estudos de MA et al., (2003) mostraram em macrófagos estimulados pelo LPS, que a HQ também é capaz de bloquear a transcrição gênica para TNF-a, por inibir a ligação do NF-κB ao DNA. Em conjunto, os dados sugerem que a HQ interfere positivamente ou negativamente com a translocação nuclear do fator de transcrição dependendo do tipo celular tratados com a HQ. Ademais, vale ressaltar que a indução ou inibição da translocação nuclear do fator de transcrição leva a ações específicas, uma vez que mostramos na célula endotelial, indução da expressão de moléculas de adesão e da expressão protéica de gênica de IL-1β, mas não afetou a secreção de outras citocinas transcritas pelo fator, como a IL-6 e IL-8, nem mesmo a expressão das NO sintases. Em conjunto, estes dados mostram a especificidade da HQ afetar a translocação do NF-κB para sítios específicos no DNA.

A produção de espécies reativas de oxigênio está relacionada à toxicidade de metabólitos do benzeno, entre os quais a HQ (WIEMELS & SMITH, 1999; ANDREOLI et al., 1999). Esta afirmação está baseada em inúmeras evidências, entre as destacadas a seguir: (i) a pré-incubação com HQ estimula células da medula óssea a produzirem NO em resposta ao LPS ou

IFN-γ (LASKIN *et al.*, 1995); (ii) a HQ, gera produção de ânion superóxido e ativação das óxido nítrico sintases por células da medula óssea de camundongos (MELIKIAN *et al.*, 2008) e que a conseqüente geração de peroxinitritos pode ser a responsável pela citotoxicidade da HQ (ROSS *et al.*, 1996, IBUKI & GOTO ,2004 , RANA & VERMA, 2005); (iii) HQ é um potente indutor de lesão de DNA, dependente da presença de NO (LI *et al.*,1997).

Pesquisas descritas recentemente mostram que a HQ, na presença de LPS, causa uma diminuição da produção de NO (dose-dependente) em macrófagos, suprimindo a expressão gênica da iNOS (CHO et al., 2008). Os resultados aqui apresentados nos ensaios com culturas de célula endotelial corroboram esta afirmação, mas incluem outras informações importantes não ainda descritas. Mostramos que a exposição à HQ reduz a produção de NO na vigência de estimulação pelo LPS, não pela alteração da expressão gênica de iNOS e eNOS, mas sim pela inibição de suas atividades. Em neutrófilos, o tratamento com HQ também diminuiu a secreção de NO, tanto em níveis basais como após a estimulação pelo LPS. Da mesma forma que o observado nas células endoteliais, o mecanismo responsável por este efeito é a inibição da atividade das enzimas, sem comprometimento das suas expressões gênicas. Se associados, os dados obtidos em neutrófilos e célula endotelial são concordantes quanto a ação da HQ sobre as funções das NOS, sugerindo que estas enzimas sejam alvo de ação da HQ.

A eNOS está localizada na membrana plasmática ligada à caveola e no aparato de Golgi. As caveolas são invaginações da membrana plasmática onde ficam ancoradas numerosas proteínas sinalizadoras, incluindo subunidades da proteína G, fosfatidil-3-inositol, e proteínas tirosina quinases (para revisão ver FLEMING & BUSSE, 1999). A eNOS e a nNOS existem nas células como proteínas pré-formadas e suas atividades dependem da elevação intracelular de cálcio em resposta a neurotransmissores e substâncias vasoativas (para revisão ver BOGDAN, 2001). Esta ativação ocorre de maneira rápida e transitória sendo que a cinética de ativação é dependente da biodisponibilidade do cálcio intracelular. A regulação da atividade das cNOS está relacionada a diferentes mecanismos pós-tradução, incluindo interação das enzimas com

proteínas ou fosfolípides de membrana, fosforilação de resíduos de serina ou treonina, biodisponibilidade de cofatores e do substrato L-arginina (para revisão ver FLEMMING & BUSSE, 1999). Por exemplo, a fosforilação da treonina no domínio de ligação da CaM exerce efeito inibitório na atividade da NOS enquanto a fosforilação dos resíduos de serina causa uma ativação em resposta ao shear stress (força paralela ou tangencial exercida pelo fluxo sanguíneo no endotélio), estrógeno ou insulina, (ALP & CHANNON, 2004; MOUNT et al., 2007).

O controle da geração de NO pela atividade da iNOS pode envolver eventos como: fosforilação de sítios da proteína, biodisponibilidade de O₂ e da L-arginina além da dimerização da proteína e da ligações de cofatores, como o tetrahidrobiopterina (BH₄) um co-fator essencial para a atividade NOS, facilitando estabilização dos dímeros e reforçando a ligação com a L- arginina (para revisão ver AKTAN, 2004, CHATTERJEE *et al.*, 2008). Como a HQ exerce este efeito inibitório sobre a atividade da NOS ainda será elucidado.

A diminuição das atividades fagocíticas e microbicidas de fagócitos está diretamente ligada à produção de NO e íon-superóxido. Recentemente CHO et al., (2008) demonstraram que a inibição da via oxidativa em macrófagos reduz a atividade fagocítica e microbicida de macrófagos. Como resultados semelhantes foram aqui obtidos em neutrófilos, este pode ser um mecanismo relevante para este efeito da HQ em neutrófilos. No entanto, como observamos que a HQ interfere com vias intracelulares que levam a secreção de citocinas, é plausível que outras investigações sejam conduzidas.

Em conjunto, os dados aqui obtidos mostram que os neutrófilos são células mais susceptíveis aos efeitos tóxicos da HQ, uma vez que concentrações, bem como períodos de incubação menores que os empregados para célula endotelial causaram morte celular. Adicionalmente, os efeitos em neutrófilos parecem levar a um estado de paralisia celular, diferente do observado no outro tipo celular estudado. Como já salientado na Introdução, a HQ é metabolizada à benzoquinonas mais reativas pela ação da mieloperoxidase e prostaglandina H sintetase (Casarrett, 2007). Desta forma, inferimos que diferenças nos efeitos encontrados nos dois tipos celulares aqui

empregados, sejam dependentes, pelo menos em parte, da capacidade destas células metabolizarem distintamente a HQ. Desta forma, a expressão gênica da mieloperoxidase foi quantificada em ambos os tipos celulares e somente neutrófilos, como já era esperado, expressam a enzima, e interessantemente, sua expressão gênica é aumentada frente a incubação com a HQ. Este dado ratifica a literatura, uma vez que tem sido mostrado que a incubação de agentes fenólicos com diferentes tipos celulares aumenta a síntese de expressão de enzimas de biotransfomação, entre as quais as oxidativas do sistema do citocromo P450 e MPO (Zhu et al., 1995; Trush et al., 1996). Apesar de não estar muito bem estabelecido na literatura a MPO é expressa em células endoteliais do endocárdio humano submetidas a estresse oxidativo (La Rocca et al., 2008).

Por outro lado, a célula endotelial, bem como os neutrófilos, expressam CYP2E1, outra enzima importante na conversão de benzeno a óxido de benzeno e este à HQ (FARIN et al., 1994). A incubação com HQ não induziu sua expressão gênica. Este fato é relevante, uma vez que tem sido mostrado na literatura que a incubação de agentes fenólicos a diferentes tipos celulares aumenta a síntese de expressão de enzimas de biotransformação, entre as quais as oxidativas do sistema do citocromo P450 e MPO (ZHU et al., 1995; TRUSH et al., 1996). Neste contexto, podemos sugerir que as diferenças de efeitos aqui encontrados pela ação da HQ possam decorrer de sua metabolização a benzoquinonas, que são mais reativas que a HQ. Tem sido mostrado que as benzoquinonas possuem alto poder oxidativo, que lesa substratos endógenos com maior facilidade que a HQ, como DNA, proteínas e lipídeos, com conseqüências mais deletérias que a HQ (SMITH, et al., 1989, SNYDER & HENDLI, 1996). Esta hipótese será investigada brevemente.

Em conjunto, os resultados obtidos mostram que a HQ ativa propriedades inflamatórias da célula endotelial, como a expressão de moléculas de adesão e secreção de citocinas, mas por outro lado, inibe as NOS e a produção de NO. Diferentemente, os dados indicam que a HQ inibe efeitos pró-inflamatórios em neutrófilos, como a secreção de citocinas pró-inflamatórias e inibe as NOS e a produção de NO, bem como as atividades

fagocíticas e microbicidas. É possível que estas ações sobre os neutrófilos possam contribuir, pelo menos em parte, pela redução da migração celular durante a resposta inflamatória observada após exposição *in vivo* à HQ.

6. RESUMOS DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- Os dados obtidos mostraram que o tratamento de células endoteliais com HQ, nas concentrações de 10 ou 100μM, na presença ou ausência de LPS (2μg/mL):
- * não afetou a viabilidade da célula endotelial;
- ❖ reduziu a produção de NO sob estimulação pelo LPS, não dependente de diminuição de síntese das enzimas iNOS e eNOS, mas de inibições de suas atividades;
- aumentou a expressão gênica e protéica de citocinas pró inflamatórias,
 TNF-α e IL-1β, em condições basais;
- aumentou a expressão gênica e protéica de moléculas de adesão ICAM 1, PECAM-1 e VCAM-1 em condições basais;
- ❖ aumentou a translocação nuclear do NF-кВ em condições basais;
- ❖ não interferiu com a expressão de CYP2E1;
- O que permite concluir que a HQ ativa as propriedades próinflamatórias da célula endotelial, como aumento da expressão gênica e protéica de moléculas de adesão e citocinas, possivelmente devido a um aumento no translocação nuclear do fator de transcrição NF-κB. Por outro lado, reduz, em condições de inflamação, a produção de NO por inibir a atividade das NOS.
- 2) Os dados obtidos mostraram que o tratamento de neutrófilos com HQ, nas concentrações de 5 ou 10 μM, na presença ou ausência de LPS (5μg/mL):
- não afetou a viabilidade de neutrófilos;
- reduziu a produção de NO, não dependente de síntese, mas de redução das atividades enzimáticas das cNOS e iNOS;

- reduziu a expressão gênica e protéica das citocinas pró–inflamatórias, TNF-α, IL-1β e IL-6 sob estimulação pelo LPS.
- inibiu a translocação nuclear do NF-κB sob estimulação pelo LPS;
- * reduziu a capacidade microbicida e fagocítica frente a Candida albicans;
- ❖ aumentou a expressão da enzima de biotransformação MPO;
- ❖ não modificou a expressão gênica de CYP2E1;

O que permite concluir que a HQ inibe as propriedades pró–inflamatórias de neutrófilos, pela diminuição da expressão gênica e protéica de citocinas e moléculas de adesão, possivelmente pela interferência com a capacidade de translocação nuclear do NF-κB. Ainda, diminui a secreção de NO, pelo bloqueio da atividade das NOS e inibe a capacidade de fagocítica e microbicida de neutrófilos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunologia celular e molecular. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

Agência Estadual de Notícias. Encontro vai debater saúde dos trabalhadores em postos de gasolina. Curitiba, Paraná, 06 de Dezembro de 2005, Disponível em">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?storyid=16903>">http://www.aenoticias.pr.gov.br/modules/news/article.php?st

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Resolução nº 79**, de 28 de agosto de 2000, Brasil, DF, 2000.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, **Resolução nº 105**, 31 de maio de 2001, Brasil, DF, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA. **Anvisa propõe limites de benzeno em produtos de limpeza e inseticidas.** Disponível em http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias2002/090402.htm Acesso em 29 de novembro de 2008.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sci**, Sydney, v. 25, n. 6, p. 639-653, 2004.

ALBELDA, S. M., OLIVER, P. D. et al. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. **J Cell Biol**, Filadélfia, v.110, n. 4, p.1227-1237, 1990.

ALI, H., RICHARDSON R. M. et al. Chemoattractant receptor cross-desensitization. **J Biol Chem**, Durham, v. 274, n. 10, p. 6027-6330, 1999.

ALLEN, L. A., ADEREM, A. Mechanisms of phagocytosis. **Curr Opin Immunol**, New York, v. 8, n. 1, p. 36-40, 1996.

ALONSO, M. J., SALAICES, M. et al. Nitric-oxide-related and non-related mechanisms in the acetylcholine-evoked relaxations in cat femoral arteries. **J Vasc Res**, Madrid, v. 30, n. 6, p. 339-347, 1993.

ALP, N. J., CHANNON, K. M. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** Oxford, v. 24, n. 3, p. 413-420, 2004.

- AMIN, R. P., WITZ, G. DNA-protein crosslink and DNA strand break formation in HL-60 cells treated with trans,trans-muconaldehyde, hydroquinone and their mixtures. **Int J Toxicol**, Piscataway, v. 20, n. 2, p. 69-80, 2001.
- ANDREOLI, C., ROSSI, S. et al. DNA damage by hydroquinone in human white blood cells: analysis by alkaline single-cell gel electrophoresis. **Mutat Res**, Rome, v. 438, n. 1, p. 37-45, 1999.
- BAKER, C. H., SUTTON, E. T. Antagonism of acetylcholine and adenosine rat cremaster arteriolar vasodilation by combination of NO antagonists. **Int J Microcirc Clin Exp**, Tampa, v. 12, n. 3, p. 275-286, 1993.
- BING, R. J., SAEED, M. et al. The vasodilator effect of coronary vascular endothelium in situ: its inactivation by hydroquinone. **J Mol Cell Cardiol,** Pasadena, v. 19, n. 4, p. 343-348, 1987.
- BIRONAITE, D., SIEGEL, D. et al. 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. **Chem Biol Interact,** Denver, v. 149, n. 2-3, p. 177-188, 2004.
- BOCHNER, B. S., LUSCINSKAS, F. W. et al. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. **J Exp Med,** Baltimore, v. 173, n. 6, p. 1553-1557, 1991.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, Erlangen, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.
- BOIS. F. Y.. SMITH M. Т. et al. Mechanisms of benzene carcinogenesis:application of psysiological а model of benzene pharmacokinetics and metabolism. Toxicology Letters, Baltimore, v. 58, p. 283-298, 1991.
- BRAIN, S.D. Introduction: the microcirculation Immunopharmacology of the microcirculation. Academic Press, 1994.
- BRASHERS, V. L., PEACH, M. J. et al. Augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in the isolated perfused rat lung by in vitro antagonists of endothelium-dependent relaxation. **J Clin Invest**, Virginia, v. 82, n. 5, p. 1495-1502, 1988.
- BRASIL. Ministério da Previdência Social. **Atualização clínica da intoxicação ocupacional pelo benzeno**. Disponível em: http://www.mpas.gov.br/periciamedica/01_01.asp>. Acesso em: 10 de maio de 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Petróleo. **ANP nº 05, 2001**. Brasil, 2001.

- BRASIL. Secretaria da Saúde. **36% dos fumantes passivos têm monóxido de carbono elevado no organismo.** Disponível em: < http://www.saude.sp.gov.br/content/chedrecete.mmp>. Acesso em 19 de maio de 2009.
- CASARRETT AND DOULLS. Toxicology: The basic science of poisons. Ed., Mc graw Hill: 420pp, 2007.
- CAVALCANTI, D. M., LOTUFO, C. M. et al. Endogenous glucocorticoids control neutrophil mobilization from bone marrow to blood and tissues in non-inflammatory conditions. **Br J Pharmacol,** São Paulo, v. 152, n. 8, p. 1291-1300, 2007.
- CHAKRABARTI, S., ZEE, J. M. et al. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. **J Leukoc Biol**, Alberta, v. 79, n. 1, p. 214-222, 2006.
- CHATTERJEE, A., CATRAVAS, J. D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. **Vascul Pharmacol**, Augusta, v. 49, n. 4-6, p. 134-140, 2008.
- CHIEN, S. Rheology in the microcirculation in normal and low flow states. **Adv Shock Res**, v. 8, p. 71-80, 1982.
- CHING, S., HE, L. et al. IL-1 type I receptor plays a key role in mediating the recruitment of leukocytes into the central nervous system. **Brain Behav Immun**, Columbus, v.19, n. 2, p. 127-137, 2005.
- CHING, S., ZHANG, H. et al. Peripheral injection of lipopolysaccharide prevents brain recruitment of leukocytes induced by central injection of interleukin-1. **Neuroscience**, Columbus, v.137, n. 2, p. 717-726, 2006.
- CHO, J.Y. Suppressive effect of hydroquinone, a Benzene metabolite,on in vitro inflamatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. **Mediators of inflammation,** South Korea, 2008.
- CHOI, J.M., CHO, Y.C. et al. Hydroquinone, a Major Component in Cigarette Smoke, Reduces IFN-γ Production in Antigen-Primed Lymphocytes. **Arch Pharm Res**, Korea, v. 31, n. 3, p. 337-341, 2008.
- CHOUCHANE, S., WOOTEN, J. B. et al. Involvement of semiquinone radicals in the in vitro cytotoxicity of cigarette mainstream smoke. **Chem Res Toxicol**, Richmond, v.1 9, n. 12, p. 1602-1610, 2006.
- CIRIONI, O., GIACOMETTI, A. et al. Temporin A alone and in combination with imipenem reduces lethality in a mouse model of staphylococcal sepsis. **J Infect Dis,** Ancona, v. 192, n. 9, p. 1613-1620, 2005.

CLARK, J., VAGENAS, P. et al. What does tumour necrosis factor excess do to the immune system long term?. **Ann Rheum Dis**, London, v. 64, n. 4, p. 70-76, 2005.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol**, Liverpool, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.

COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **J Leukoc Biol**, Cincinnati, v.77, n.4,p.487-495, 2005.

Corrêa, L. M. L. Saneantes domissanitários e saúde: um estudo sobre a exposição de empregadas domésticas. Rio de Janeiro: UFRJ, 2005, 92pp.

COUPER, K. N., BLOUNT, D. G. et al. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol**, London, v. 180, n. 9,p. 5771-5777, 2008.

Coutrim, M. X., L. Carvalho, R. F. et al. Avaliação dos Métodos Analíticos para determinação de metabólitos do Benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. **Química Nova,** v. 23, n. 5, p. 653-663, 2000.

CRONKITE, E. P., BULLIS, J. et al. Benzene inhalation produces leukemia in mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 75, n. 2, p. 358-361, 1984.

DARNAY, B. G., AGGARWAL, B. B. Early events in TNF signaling: a story of associations and dissociations. **J Leukoc Biol**, Houston, v. 61, n. 5, p. 559-566, 1997.

DECAPRIO, A. P. The Toxicology of Hydroquinone-Relevance to Occupational and Environmental Exposure. **Crit Rev in Toxicol**, Albany, v. 29, n. 3, p. 283-330, 1999.

DEISINGER, P., HILL, T. et al. Human exposure to naturally occuring Hydroquinone. **J Toxicol and Environ Health**, New York, v. 47, n. 1, p. 31-46, 1996.

DEJANA, E., BREVIARIO, F. et al. Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. **Clin Exp Rheumatol**, Grenoble, v.12, n. 10, p. 25-28, 1994.

DELISSER, H. M., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M. et al. Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.

DIMITROVA, N. D., KOSTADINOVA, R. Y. et al. Specific immune responses in workers exposed to benzene. **Int Immunopharmacol**, Sofia, v. 5, n. 10,p. 1554-1559, 2005.

- DO CEU SILVA, M., GASPAR, J. et al. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells. **Mutagenesis**, Lisboa, v. 18, n. 6, p. 491-496, 2003.
- DUSTIN, M. L., ROTHLEIN, R. et al. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). **J Immunol**, Boston, v. 137, n. 1, p. 245-254, 1986.
- EASTMOND, D. A., SMITH, M. T. et al. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. **Toxicol Appl Pharmacol**, Berkeley, v. 91, n. 1, p. 85-95, 1987.
- ELIAS, C. G. 3RD., SPELLBERG, J. P. et al. Ligation of CD31/PECAM-1 modulates the function of lymphocytes, monocytes and neutrophils. **Eur J Immunol**, Amgen Boulder, v. 28, n. 6, p. 1948-58, 1998.
- FARIN, F. M., POHLMAN T. H. et al. Expression of cytochrome P450s and microsomal epoxide hydrolase in primary cultures of human umbilical vein endothelial cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, Seattle, v. 124, n. 1, p. 1-9, 1994.
- FARRIS, G. M., ROBINSON, S. N. et al. Effects of benzene on splenic, thymic, and femoral lymphocytes in mice. **Toxicology**, v. 118, n. 2-3, p. 137-148, 1997.
- FERREIRA, K. S., LOPES, J. D. et al. Down-regulation of dendritic cell activation induced by Paracoccidioides brasiliensis. **Immunol Lett** ,São Paulo, v. 94, n. 1-2, p. 107-114, 2004.
- FERREIRA, A., MACEDO, S. M. D. et al. Exposição à hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, p. 455-464, 2007.
- FIERRO, I. M., BARJA-FIDALGO, C. et al. The involvement of nitric oxide in the anti-Candida albicans activity of rat neutrophils. **Immunology**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 2, p. 295-300, 1996.
- FLEMING, I. Cytochrome P450 epoxygenases as EDHF synthase(s). **Pharmacol Res**, Frankfurt, v. 49, n. 6, p. 525-533, 2004.
- FLEMING, I., BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovasc Res,** Frankfurt, v. 43, n. 3, p. :532-341, 1999.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Data on Benzene in Soft Drinks and Other Beverages**. USA, 2007. Disponível em: http://www.cfsan.fda.gov/~dms/benzdata. Acesso em 29 de agosto de 2008.
- FRANK, N. C., WHITE, K. et al. Phagocytosis and development: back to the future. **Curr Opin Immunol**, Massachusetts, v. 11, n. 1, p. 47-52, 1999.

- FRANGOGIANNIS, N. G., MENDOZA, L. H. et al. Induction and suppression of interferon-inducible protein 10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. **FASEB J**, Houston, v. 15, n. 8, p. 1428-1430, 2001.
- FRAZER-ABEL, A.A., MCCUE, J.M. et al. Cigarette tar phenols impede T cell cycle progression by inhibiting cyclin-dependent kinases. **Mol Immunol**, Denver, v. 44, n. 4, p. 488- 493, 2007.
- FUJIWARA, K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells. J Intern Med, Rochester, v. 259, n. 4, p. 373-380, 2006.
- FURZE, R. C., RANKIN, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, London, v. 125, n. 3, p. 281-288, 2008.
- GARNACHO, C., ALBELDA, S. M. et al. Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes. **J Control Release**, Philadelphia, v. 130, n. 3, p. 226-233, 2008.
- GARRIDO-URBANI, S., BRADFIELD, P. F. et al. Vascular and epithelial junctions: a barrier for leucocyte migration. **Biochem Soc Trans**, Geneva, v. 36, n. 2, p. 203-211, 2008.
- GASKELL, M., MCLUCKIE, K. I. et al. 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**, Leicester, v. 554, n. 1-2, p. 387-398, 2004.
- GAUT, J. P., YEH, G. C. et al. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, St. Louis, v. 98, n. 21, p. 11961-11966, 2001.
- GILL, D. P., JENKINS, V. R. et al. The importance of pluripotential stem cells in benzene toxicity. **Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 163-171, 1980.
- GILLIS, B., GAVIN, M. I. et al. Identification of human cell responses to benzene and benzene metabolites. **Genomics**, Chicago, v. 90, n. 3, p. 324-33, 2007.
- GREEN, J. D., SNYDER, C. A. et al. Acute and choronic dose/response effects of inhaled benzene on multipotential hematopoietic stem (CFU-S) and granulocyte/macrophage progenitor (GM-CFU-C) cells in CD-1 mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 58, n. 3, p. 492-503, 1981.
- HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial interactions. **Blood**, v. 65, n. 3, p. 513-25, 1985.

- HAROUN, L., WINDHAM, G. et al. Health effects of exposure to environmental tabacco smoke. Final Heport. **California- Environmental Protection Agency**, p. 01-84, 1997.
- HATAO, F., HIKI, N. et al. The induction of super-resistance using synthetic lipopolysaccharide receptor agonist rescues fatal endotoxemia in rats without excessive immunosuppression. **Shock**, Tokyo, v. 23, n. 4, p. 365-370, 2005.
- HAZEL, B. A., BAUM, C. et al. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts. **Stem Cells,** Philadelphia, v. 14, n. 6, p. 730-742, 1996.
- HEIT, B., COLARUSSO, P. et al. Fundamentally different roles for LFA-1, Mac-1 and alpha4-integrin in neutrophil chemotaxis. **J Cell Sci,** Calgary, v. 118, n. 22, p. 5205-5220, 2005.
- HELFGOTT, D. C., MAY, L. T. et al. Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. **J Exp Med**, New York, v. 66, n. 5, p. 1300-1309, 1987.
- HENSCHLER, R., GLATT, H. R. et al. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro and in vivo. **Environ Health Perspect**, Freiburg, v. 104, n. 6, p. 1271-1274, 1996.
- HICKEY, M. J., ISSEKUTZ, A. C. et al. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. **Circ Res**, Calgary, v. 83, n. 11, p. 1124-1131, 1998.
- HORDIJK, P. L. Endothelial signalling events during leukocyte diapedesis. **FEBS,** Amsterdam, v. 273, n. 19, p. 4408-4415, 2006.
- HSIEH, G. C., SHARMA, R. P. et al. Immunological and neurobiochemical alterations induced by repeated oral exposure of phenol in mice. **Eur J Pharmacol**, Utah ,v. 228, n. 2-3, p. 107-114, 1992.
- HU, G., ZHUANG, Z. et al. Study on expression regularity of XPV mRNA in L-02 hepatic cells induced by hydroquinone. **Wei Sheng Yan Yiu**, Ganzhou, v. 37, n. 5, p. 522-528, 2008.
- IBUKI, Y., GOTO, R. Dysregulation of apoptosis by benzene metabolites and their relationships with carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, Shizuoka, v. 1690, n. 1, p. 11-21, 2004.
- ILAN, N., MADRI, J. A. PECAM-1: old friend, new partners. **Curr Opin Cell Biol**, Haifa, v. 15, n. 5, p. 515-524, 2003.

- INAYAT-HUSSAIN, S. H., ROSS, D. Intrinsic pathway of hydroquinone induced apoptosis occurs via both caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. **Chem Res Toxicol**, Denver, v. 18, n. 3, p. 420-427, 2005.
- INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA (IPCS), 1994. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc197.htm Acesso em:14 de
- http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc197.htm Acesso em:14 de agosto de 2007.
- JAKUS, Z., FODOR, S. et al. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. **Trends Cell Biol**, Budapest, v. 17, n. 10,p. 493-501, 2007.
- JUNG, T. M., DAILEY, M. O. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. **J Immunol**, lowa, v. 144, n. 8, p. 3130-3136, 1990.
- JUNG, U., LEY, K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. **J Immunol,** Charlottesville, v. 162, n. 11, p. 6755-6762, 1999.
- KALEY, G., RODENBURG, J. M. et al. Endothelium-associated vasodilators in rat skeletal muscle microcirculation. **Am J Physiol**, New York, v. 256, n. 3-2, p. 720-725, 1989.
- KERZIC, P. J., PYATT, D. W. et al. Inhibition of NF-kappaB by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alpha-induced apoptosis. **Toxicology**, Colorado, v. 187, n. 2-3, p. 127-137, 2003.
- KIM, E., KANG, B. Y. et al. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor-kappaB binding activity. **Immunol Lett,** Kwangju, v. 99, n. 1, p. 24-29, 2005.
- KIM, S., VERMEULEN, R. et al. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. **Carcinogenesis**, Bethesda v. 27, n. 4, p. 772-781, 2006.
- KOLACHANA, P., SUBRAHMANYAM, V. V. et al. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. **Cancer Res,** Berkeley, v. 53, n. 5, p. 1023-1026, 1993.
- KOOYERS, T. J., WESTERHOF, W. Health risk of hydroquinone Toxicology and health risks of hydroquinone in skin lightening formulations. **JEADV**, v. 20, p. 777–780, 2006.
- KULDO, J. M., WESTRA, J. et al. Differential effects of NF-{kappa}B and p38 MAPK inhibitors and combinations thereof on TNF-{alpha}- and IL-1{beta}-

- induced proinflammatory status of endothelial cells in vitro. **Am J Physiol Cell Physiol,** Groningen, v. 89, n. 5, p. 1229-1239, 2005.
- KUMAR, A. P., PIEDRAFITA, F. J. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands regulate myeloperoxidase expression in macrophages by an estrogen-dependent mechanism involving the -463GA promoter polymorphism. **J Biol Chem**, San Diego, v. 279, n. 9, p. 8300-8315, 2004.
- KUNKEL, E. J., JUNG, U. et al. TNF-alpha induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles. **Am J Physiol**, Charlottesville, v. 272, n. 3-2, p. 1391-1400, 1997.
- KWIATKOWSKA, K., SOBOTA, A. Signaling pathways in phagocytosis. **Bioessays,** Warsaw, v. 21, n. 5, p. 422-431, 1999.
- LA ROCCA, G., DI STEFANO, A. et al. Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endocardial endothelial cells from patients with chronic heart failure. **Basic Res Cardiol**, Palermo, v. 51, n. 2, p. 544-548, 2008.
- LASKIN, J. D., RAO, N. R. et al. Distinct actions of benzene and its metabolites on nitric oxide production by bone marrow leukocytes. **J Leukoc Biol**, New Jersey v. 57, n. 3, p. 422-446, 1995.
- LEE, J. Y., KIM, J. Y. et al. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. **Mol Cells,** Chuncheon, v. 23, n. 2, p. 198-206, 2007.
- LEE, M. H., CHUNG, S. W. et al. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4+ T cells and increases immunoglobulin E levels in antigen-primed mice. **Immunology**, Kwangju, v. 106, n. 4, p. 496-502, 2002.
- LI, Q., GEISELHART, L. et al. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. **Toxicol Appl Pharmacol,** New York, v. 139, n. 2, p. 317-323, 1996.
- LI, Q., AUBREY, M. T. et al. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. **Fundam Appl Toxicol**, New York, v. 38, n. 2, p. 158-165, 1997.
- LINDSEY, R. H. JR., BENDER, R. P. et al. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha: 1,4-hydroquinone is a topoisomerase II poison. **Chem Res Toxicol,** Nashville, v. 18, n. 4, p. 761-770, 2005.
- LORENZON, P., VECILE, E. et al. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. **J Cell Biol,** Trieste, v. 142, n. 5, p. 1381-1391, 1998.

- LOTUFO, C., YAMASHITA, C. et al. Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B4. **Eur J Pharmacol,** São Paulo, v. 534, p. 258-263, 2006.
- LUTZKY, V. P., CARNEVALE, R. P. et al. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. **J Cell Biochem**, Buenos Aires, v. 98, n. 5, p. 1334-1350, 2006.
- MA, Q., KINNEER, K. et al. Inhibition of nuclear factor kappaB by phenolic antioxidants: interplay between antioxidant signaling and inflammatory cytokine expression. **Mol Pharmacol**, Morgantown, v. 64, n. 2, p. 211-219, 2003.
- MACEDO, S. M., LOURENCO, E. L. et al. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. **Toxicology** ,São Paulo, v. 220, n. 2-3, p. 126-135, 2006.
- MACEDO, S. M., VAZ, S. C. et al. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. **Toxicology,** São Paulo, v .241, n. 1-2, p. 47-57, 2007.
- MACEDO, S. M. Interação leucócito endotélio e expressão de moléculas de adesão na vigência de tratamento com a hidroquinona. 2008. 176pp. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- MCCUE, J. M., LAZIS, S. et al. Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G1 phase. **Mol Immunol**, Denver, v. 39, n. 16, p. 995-1001, 2003.
- MCGREGOR, D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. **Crit Rev Toxicol**, Scotland, v. 37, n. 10, p. 887-914, 2007.
- MEAGER, A. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**. Potters Bar, v. 10, n. 1, p. 27-39, 1999.
- MELIKIAN, A. A., CHEN, K. M. et al. The role of nitric oxide on DNA damage induced by benzene metabolites. **Oncol Rep**, New York, v. 19, n. 5, p. 1331-1337, 2008.
- MENDINSKY, M. A., KENYON, E. M. et al. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**, v. 105, n. 2-3, p. 225-233, 1995.
- MORETTI, M., VILLARINI, M. et al. Effects of co-exposure to extremely low frequency (ELF) magnetic fields and benzene or benzene metabolites determined in vitro by the alkaline comet assay. **Toxicol Lett,** Perugia,v. 157, n. 2, p. 119-128, 2005.

- MOUNT, P. F., KEMP, B. E, et al. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. **J Mol Cell Cardiol**, Victoria, v. 42, n. 2, p. 271-279, 2007.
- NEWMAN, P. J., NEWMAN, D. K. Signal transduction pathways mediated by PECAM-1: new roles for an old molecule in platelet and vascular cell biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol,** Milwaukee, v. 23, n. 6, p. 953-964, 2003.
- NICULESCU, R., BRADFORD, H. N. et al. Inhibition of the conversion of preinterleukins-1 alpha and 1 beta to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. **Chem Biol Interact**, Philadelphia, v. 98, n. 3, p. 211-222, 1995.
- NICULESCU, R., RENZ, J. F. et al. Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1alpha and -1beta to active cytokines by hydroquinone, a biological reactive metabolite of benzene. **Adv Exp Med Biol**, Philadelphia, v. 387, p. 329-337, 1996.
- NORDLUND, J. J., GRIMES, P. E. et al. The safety of hydroquinone. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 20, n. 7, p. 781-787, 2006.
- OPAL, S. M., DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest,** Providence, v. 117, n. 4, p. 1162-1172, 2000.
- OUYANG, Y., VIRASCH, N. et al. Suppression of human IL-1beta, IL-2, IFN-gamma, and TNF-alpha production by cigarette smoke extracts. **J Allergy Clin Immunol**, Denver, v. 106, n. 2, p. 280-287, 2000.
- PETRUZZELLI, L., TAKAMI, M. et al. Structure and function of cell adhesion molecules. **Am J Med,** Ann Arbor, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.
- POBER, J., COTRAN, R. S. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? **Lab Invest**, v. 64, n. 3, p. 301-305, 1991.
- POIRIER, M., FOURNIER, M. et al. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. **J Toxicol Environ Health A,** Pointe-Claire, v. 65, n. 19, p. 1437-1451, 2002.
- PYATT, D. W., STILLMAN, W. S. et al. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, Denver, v. 149, n. 2, p. 178-184, 1998.
- PYATT, D. W., YANG, Y. et al. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NFkappaB in primary human CD19+ B lymphocytes. **Cell Biol Toxicol**, Denver, v. 16, n. 1, p. 41-51, 2000.

- RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interaction. **The Handbook of immunopharmacology of microcirculation**, San Diego, p. 77-107, 1994.
- RANA, S. V., VERMA, Y. Biochemical toxicity of benzene. **J Environ Biol,** Meerut, v. 26, n. 2, p. 157-168, 2005.
- RIVEDAL, E., WITZ, G. Metabolites of benzene are potent inhibitors of gap-junction intercellular communication. **Arch Toxicol,** Oslo, v. 79, n. 6, p. 303-311, 2005.
- ROBINSON, S. N., SHAH, R. et al. Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. **Toxicology**, North Carolina, v. 119, n. 3, p. 227-237, 1997.
- RODRIGUES, M. R., RODRIGUEZ, D. et al. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun,** São Paulo, v. 292, n. 4, p. 869-873, 2002.
- ROSS, D., SIEGEL, D. et al. 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. **Environ Health Perspect**, Denver, v.104, v.6, p.1177-1182, 1996.
- RYAN, B. M., SELBY, R. et al. Two-generation reproduction study and immunotoxicity screen in rats dosed with phenol via the drinking water. **Int J Toxicol**, Chicago, v. 20, n. 3,p. 121-142, 2001.
- SACERDOTI, D., GATTA, A. et al. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. **Prostaglandins Other Lipid Mediat,** Padova, v. 72, n. 1-2, p. 51-71, 2003.
- SCHLOSSER, M.J., SHURINA, R.D. et al. Metabolism of phenol and hydroquinone to reactive products by macrophage peroxidase or purified prostaglandin H synthase. **Environ Health Perspect,** Philadelphia, v. 82, p. 229-237, 1989.
- SHEETS, P. L., CARLSOM, G. P. Kinetic factors involved in the metabolism of benzene in mouse lung and liver. **Journal of toxicology and Environmental Health,** West Lafayette, v. 67, n. 5, p. 421-430.
- SHEN, Y., SHEN, H. M. et al. Benzene metabolites enhance reactive oxygen species generation in HL60 human leukemia cells. **Hum Exp Toxicol**, Singapore, v. 15, n. 5, p. 422-427, 1996.
- SHINJI, H., SEKI, K. et al. Fibronectin bound to the surface of Staphylococcus aureus induces association of very late antigen 5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. **Infect Immun**, Nagoya, v. 71, n. 1, p. 140-146, 2003.

- SILVA, R. L. B., BARRA, C. M. et al. Estudo da contaminação de poços rasos e possíveis conseqüências para a saúde pública para o município de Itaguaí, Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1599-1607, 2002.
- SMITH, M.T., YAGER, J.W, et al. Peroxidase-dependent metabolism of benzene's phenolic metabolites and its potential role in benzene toxicity and carcinogenicity. **Environ Health Perspect**, Berkeley, v. 82, p. 23-29, 1989.
- SNYDER, C. A., GOLDSTEIN, B. D. et al. The inhalation toxicology of benzene:incidence oh hematopoietic neoplasms and hematoxicity in AKR/J and C57BL/6J mice. **Toxicol Appl.Pharmacol**, v. 54, p. 323-331, 1980.
- SNYDER, R., HEDLI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environ Health Perspect**, New Jersey, v. 104, n. 6, p. 1165-1171, 1996.
- SNYDER, R. Benzene and leukemia. **Crit Rev Toxicol,** New Jersey, v. 32, n. 3, p. 155-210, 2002.
- SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Metabolism Reviews,** New Jersey, v. 36, n. 3-4, p. 531-547, 2004.
- SPERANDIO, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. **FEBS J,** Heidelberg, v. 273, n. 19, p. 4377-4389, 2006.
- STEWART, A. G., DUSTING, G. J. et al. Nitrite is produced by elicited but not by circulating neutrophils. **Mediators Inflamm,** Melbourne, v. 2, n. 5, p. 349-356, 1993.
- STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. Phagocytosis: elegant complexity. **Immunity**, Boston, v.22, n.5, p.539-550, 2005.
- TAMARU, M., NARUMI, S. E-selectin gene expression is induced synergistically with the coexistence of activated classic protein kinase C and signals elicited by interleukin-1beta but not tumor necrosis factor-alpha. **J Biol Chem,** Yokohama, v. 274, n. 6, p. 3753-3763, 1999.
- TANG, D. G., CHEN, Y. Q. et al. Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. **J Biol Chem,** Detroit, v. 268, n. 30, p. 22883-22894, 1993.
- TAYSSE, L., TROUTAUD, D. et al. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone on natural lymphocytotoxicity of carp (Cyprinus carpio). **Toxicology,** Limoges, v. 12, n. 1-3, p. 207-214, 1995.
- TEMPORÃO, J. G. I Fórum Multidisciplinar sobre Ciência, Meio Ambiente e Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia,** Rio de Janeiro, v. 50, n. 2, p. 139-175, 2004.

- TERASAKA, H., KADOMA, Y. et al. Cytotoxicity and apoptosis-inducing activity of bisphenol A and hydroquinone in HL-60 cells. **Anticancer Res,** Saitama, v. 25, n. 3B, p. 2241-2247, 2005.
- THOMAS, D. J., SADLER, A. et al. Bone marrow stromal cell bioactivation and detoxification of the benzene metabolite hydroquinone: comparison of macrophages and fibroblastoid cells. **Mol Pharmacol,** Morgantown, v. 37, n. 2, p. 255-262, 1990.
- TRUSH, M. A., TWERDOK, L. E. et al. Analysis of target cell susceptibility as a basis for the development of a chemoprotective strategy against benzene-induced hematotoxicities. **Environ Health Perspect**, Baltimore, v. 104, n. 6, p. 1227-1234, 1996.
- UTSUMI, T., TAKESHIGE, T. et al. Transmembrane TNF (pro-TNF) is palmitoylated. **FEBS**, Yamaguchi, v. 500, n. 1-2, p. 1-6, 2001.
- VAN DAMME, J., SCHAAFSMA, M. R. et al. Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. **Eur J Immunol**, Leuven, v. 19, n. 1, p. 163-168, 1989.
- VAN DEN HEUVEL, R. L., LEPPENS, H. et al. Use of in vitro assays to assess hematotoxic effects of environmental compounds. **Cell Biol Toxicol**, Belgium, v. 17, n. 2, p. 107-116, 2001.
- VELASCO LEZAMA, R., BARRERA ESCORCIA, E. et al. A model for the induction of aplastic anemia by subcutaneous administration of benzene in mice. **Toxicology,** Mexico, v. 162, n. 3, p. 179-191, 2001.
- WAISMAM, K., CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. et al. Lopap: A non-inflamatory and cytoprotective molecule in neutrophils and endothelial cells. **Toxicon**, São Paulo, v. 53, n. 6, p. 652-659, 2009.
- WANG, J., BROWN, M. A. et al. Effects of diet on measurement of nitric oxide metabolites. **Clin Exp Pharmacol Physiol,** Sydney, v. 24, n. 6, p. 418-420, 1997.
- WIEDLE, G., DUNON, D. et al. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. **Crit Rev. Clin. Lab. Sci,** Geneva, v. 38, n. 1, p. 1-31, 2001.
- WIEMELS, J., SMITH M. T. Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. **Free Radic Res**, Berkeley, v. 30, n. 2, p. 93-103, 1999.
- WONG, G.H., ELWELL, J.H. Mangenous superoxide dismutase is essential for cellular resistence by cytotoxity of tumor necrosis factor. **Cell**, v. 58, p. 923–931, 1989.

- WOO, C. H., LIM, J. H. et al. VCAM-1 upregulation via PKCdelta-p38 kinase-linked cascade mediates the TNF-alpha-induced leukocyte adhesion and emigration in the lung airway epithelium. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, Seoul, v. 288, n. 2, p. 307-316, 2005.
- WOODFIN A., VOISIN, M. B. et al. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, London, v. 27, n. 12, p. 2514-2523, 2007.
- YANG, H. Y., YANG, J. G. et al. Hydroquinone inhibits NF-kappaB expression in human bone marrow stromal cells in vitro. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, Taizhou, v. 14, n. 4, p. 804-807, 2006.
- YANG, W., SHIMAOKA, M. et al. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. **Proc Natl Acad Sci U S A,** Boston, v. 101, n. 8, p. 2333-2338, 2004.
- YU, M. L., LIMPER, A. H. Pneumocystis carinii induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-alpha-mediated mechanism. **Am J Physiol**, Rochester, v. 273, n. 6, p. 1103-1111, 1997.
- YUSUF-MAKAGIANSAR, H., ANDERSON, M. E. et al. Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. **Med Res Rev**, Lawrence, v. 22, n. 2, p. 146-167, 2002.
- ZARBOCK. A., LEY, K. Mechanism and consequences of neutrophil interaction with endothelium. **Am J Pathol**, Charlottesville, v. 172, n. 1, 2008.
- ZHAO, Z., HE, X. et al. 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 Metab Dispos**, Wuhan, v. 37, n. 2, p. 282-291, 2009.
- ZHENG, J. H., PYATT, D. W. et al. Hydroquinone modulates the GM-CSF signaling pathway in TF-1 cells. **Leukemia**, Denver, v. 18, n. 7, p. 1296-1304, 2004.
- ZHU, H., LI, Y. et al. Differences in xenobiotic detoxifying activities between bone marrow stromal cells from mice and rats: implications for benzene-induced hematotoxicity. **J Toxicol Environ Health,** Baltimore, v. 46, n. 2, p. 183-201, 1995.
- ZIPRIN, P., RIDGWAY, P. F. et al. 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 Commun Adhes,** London, v. 10, n. 3, p. 141-154, 2003.

ANEXOS

Anexo A - Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Oficio CEEA nº 06/2008

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Efeitos da hidroquinona na função e viabilidade da célula endotelial" (Protocolo CEEA nº169), de responsabilidade da pesquisadora Fernanda Júdice Pinedo sob a orientação da Profa. Sandra Helena P. 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 11/02/2008.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2008.

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes Presidente da CEEA

ANEXO B - Ficha do Aluno Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

9141 - 6013482/1 - Fernanda Judice Pinedo

Email: fepinedo@usp.br

Data de Nascimento: 23/12/1984

Cédula de Identidade: RG - 43.448.124-5 - SP

Local Nascimento:

Nacionalidade:

Graduação: Farmacêutico - Universidade de Mogi das Cruzes - - São Paulo -

Brasil - 2006

Curso: Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Área: Toxicologia e Análises Toxicológicas

 Data da Matrícula:
 12/07/2007

 Início da Contagem de Prazo:
 12/07/2007

 Data Limite:
 12/01/2010

Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 12/07/2007 a --

E.Mail: sfarsky@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 12/07/2007

Exame de Qualificação: Aprovado em 30/04/2009

Data do Depósito do Trabalho:

Data máxima para aprovação da

Banca:

Título do Trabalho:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Ocorrência:

Última matrícula em 07/02/2009

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Sit. Matric.
FBC5802-1	Seminários Gerais em Toxicologia I	30/07/2007	11/11/2007	30	2	80.00	А	N	Concluída
EDM5791-4	Metodologia do Ensino Superior	15/08/2007	06/11/2007	120	0	0.00	-		Pré- matrícula indeferida

VPT5762-2	Neuroimunomodulação: aspectos básicos e aplicações terapêuticas		11/12/2007	60	4	90.00	А	N	Concluída
CBD5259-1	A Pesquisa e a Elaboração do Trabalho Científico	10/03/2008	27/06/2008	105	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
EDM5049-2	Fundamentos das Ciências Experimentais e Implicações para o Ensino-Aprendizagem	10/03/2008	01/06/2008	120	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
EDM5791-4	Metodologia do Ensino Superior	12/03/2008	03/06/2008	120	0	0.00	-		Pré- matrícula indeferida
FBC5747-1	Toxicologia Forense	15/04/2008	19/05/2008	75	5	90.00	Α	Ν	Concluída
FBC5748-3	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	06/05/2008	16/06/2008	60	4	100.00	А	N	Concluída
FBC5723-4	Mecanismos das interações patológicas entre células endoteliais e elementos circulantes e sua importância em processos vaso-oclusivos	09/06/2008	29/06/2008	75	5	88.90	А	N	Concluída
FBC5703-5	Resposta Inflamatória, Citocinas e Hematopoiese	15/09/2008	19/10/2008	60	0	0.00	-	N	Turma cancelada
FBF5766-2	Biodisponibilidade e bioequivalência de medicamentos	30/09/2008	01/12/2008	90	6	85.00	В	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	26
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		26

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

Conceito até 31/12/1996:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.

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.

Situação em: 29/06/2009 12:02

Anexo C - Currículo Lattes



Fernanda Júdice Pinedo

Possui graduação em Farmácia pela Universidade de Mogi das Cruzes (2005). Em 2007 ingressou na pós-graduação pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo na àrea de Toxicologia Experimental, com término previsto para julho de 2009.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 01/06/2009

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/4819693170596596

Dados Pessoais

Nome Fernanda Júdice Pinedo

Nome em citações PINEDO, F. J.

bibliográficas

Sexo feminino

Nascimento 23/12/1984 - Mogi das Cruzes/SP - Brasil

Carteira de Identidade 434481245 SSP - SP - 11/08/2003

CPF 33750403856

Endereço residencial Rua Joaquim Martins Coelho,701

Vila Oliveira - Sao Paulo 08790-700, SP - Brasil Telefone: 11 47963385

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Avenida Professor Lineu Prestes, 580

- Sao Paulo 05508-000, SP - Brasil Telefone: 11 30912197

Endereço eletrônico

e-mail para contato : fepinedo@usp.br e-mail alternativo : fepinedo@hotmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2007 Mestrado em Análises Toxicológicas.

Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Título: Efeitos da Hidroquinona sobre a atividade funcional da célula endotelial e neutrófilos.

Orientador: Sandra Helena Poliselli Farsky

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Palavras-chave: célula endotelial, hidroquinona, mediadores inflamatórios, Moléculas de adesão, inflamação

Áreas do conhecimento : Análise Toxicológica

2002 - 2005 Graduação em Farmácia.

Universidade de Mogi das Cruzes, UMC, Moji Das Cruzes, Brasil

1999 - 2001 Ensino Médio (2o grau).

Colégio São Marcos, CSM, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vinculo institucional

2007 - Atual Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Aluno de pós graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva Outras informações:

Bolsista Fapesp (processo número:07/56299-3)

Atividades

2007 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Participação em projetos:

"Efeito da hidroquinona na atividade funcional da célula endotelial e neutrófilos"

Projetos

2007 - 2009 "Efeito da hidroquinona na atividade funcional da célula endotelial e neutrófilos"

Descrição: A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico obtido a partir da metabolização endógena do benzeno, além de ser componente do cigarro, de medicamentos, revelador fotográfico e estar presente em alguns alimentos e plantas medicinais. Uma vez que a população está constantemente exposta à HQ, nosso grupo de pesquisa demonstrou que em doses consideradas seguras pelos órgãos regulamentadores, a exposição à HQ compromete a migração de leucócitos para o pulmão na vigência de inflamação alérgica ou não-específica .Este projeto visa dar continuidade à investigação dos mecanismos de ação da HQ sobre a indução da resposta inflamatória, enfocando os efeitos sobre a célula endotelial, uma vez que esta reveste os vasos sanguíneos e exerce papel fundamental no controle da resposta inflamatória, e neutrófilos, que são as primeiras células de defesa a ser recrutada para foco de lesão, avaliando a expressão de mediadores inflamatórios (NO, IL-1B,IL-10,IL-8,TNF-a), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1), e atividade fagocitica e microbicidade de neutrófilos.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Integrantes: Fernanda Júdice Pinedo (Responsável);

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Áreas de atuação

1. Análise Toxicológica

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

2008 Mensão Honrosa no 40º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, SBFTE

2004 1º Menção Honrosa no VII Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Mogi das Cruzes, Universidade de Mogi das Cruzes

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. PINEDO, F. J., FARSKY, S.

EFEITOS DA HIDROQUINONA NA FUNÇÃO E VIABILIDADE DA CÉLULA ENDOTELIAL In: 40 Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008, Àquas de Lindóia.

EFEITOS DA HIDROQUINONA NA FUNÇÃO E VIABILIDADE DA CÉLULA ENDOTELIAL., 2008.

Palavras-chave: célula endotelial, hidroquinona, Moléculas de adesão, mediadores inflamatórios

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

Poster Premiado com mensão honrosa.

2. PINEDO, F. J., TRINDADE, C. B.

"Estudo da Citotoxicidade de Biomateriais Metálicos em Cultura Primária de Células Precursoras Hematopoiéticas" In: 57ª Reunião Anual da SBPC, 2005. Fortaleza

"Estudo da Citotoxicidade de Biomateriais Metálicos em Cultura Primária de Células Precursoras Hematopoiéticas"., 2005. Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. PINEDO, F. J., TRINDADE, C. B.

"Estudo da Citotoxicidade de Biomateriais Metálicos em Cultura Primária de Células Precursoras Hematopoiéticas" In: VII Congresso de Iniciação Científica, 2004, Mogi das Cruzes.

"Estudo da Citotoxicidade de Biomateriais Metálicos em Cultura Primária de Células Precursoras Hematopoiéticas"., 2004. Palavras-chave: biomateriais metálicos, células precursoras hematopoiéticas, citotoxicidade

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

Trabalho premiado com a 1 mensão honrosa.

Apresentação de Trabalho

1. PINEDO, F. J., FARSKY, S.

"Efeitos da Hidroquinona na função e viabilidade da célula endotelial", 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: célula endotelial, hidroquinona, inflamação, mediadores inflamatórios, Moléculas de adesão
Referências adicionais: Brasil/Português; Evento: 40 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental"

2. 🌟 PINEDO, F. J., TRINDADE, C. B.

ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DE BIOMATERIAIS METÁLICOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PRECURSORAS HEMATOPOIÉTICAS, 2005. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: biomateriais metálicos, células precursoras hematopoiéticas, citotoxicidade

Áreas do conhecimento : Análise Toxicológica, Farmácia

Setores de atividade : Saúde humana

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Universidade Estadual do Ceará; Cidade: Fortaleza; Evento: 57º Reunião Anual da SBPC

3. PINEDO, F. J., TRINDADE, C. B.

" Estudo da citotoxicidade de biomateriais metálicos em cultura primária de células precursoras hematopoiéticas", 2004. (Outra.Apresentação de Trabalho)

Referências adicionais : Brasil/Português; Evento: "XII Semana Farmacêutica"; Inst.promotora/financiadora: UMC

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. FARSKY, S., PINEDO, F. J.

Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações, 2009. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Palavras-chave: Imunotoxicidade Áreas do conhecimento : Farmácia

Referências adicionais : Brasil/Português. 2 horas. Meio de divulgação: Meio digital

Aula ministrada na disciplina de Pós graduação, FBC5746- Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações, a convite do docente responsável Profa.Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky.

Eventos

Participação em eventos

- Apresentação de Poster / Painel no(a) 40º Congresso de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2008. (Congresso)
 EFEITOS DA HIDROQUINONA NA FUNÇÃO E VIABILIDADE DA CÉLULA ENDOTELIAL.
- 2. Apresentação de Poster / Painel no(a) 573 Reunião Anual da SBPC, 2005. (Congresso) ESTUDO DÁ CITOTOXICIDADE DE BIOMATERIAIS METÁLICOS EM CULTURA PRIMÁRIA DE CÉLULAS PRECURSORAS HEMATOPOIÉTICAS.
- Apresentação Oral no(a) "VII Congresso de Iniciação Científica", 2004. (Congresso)
 " Estudo da citotoxicidade de biomateriais metálicos em cultura primária de células precursoras hematopoiéticas".
- Apresentação Oral no(a) " XII Semana Farmacêutica", 2004. (Encontro)
 " Estudo da citotoxicidade de biomaterias metálicos em cultura primária de células precursoras hematopoiéticas".
- 5. "XI Semana Farmacêutica", 2003. (Encontro)

Totais de produção Produção bibliográfica Trabalhos publicados em anais de eventos 3 2 Apresentações de Trabalhos (Congresso) Apresentações de Trabalhos (Outra) 1 Produção Técnica Curso de curta duração ministrado (outro) 1 **Eventos** Participações em eventos (congresso) 3 2 Participações em eventos (encontro)

Anexo D: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras



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

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

- 1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
- 2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
- 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
 - 3. A sessão de defesa será aberta ao público.
- 4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.
- 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
- 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
- 5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 18 de março de 2005. Profa Bernadete D.G.M.Franco Presidente da CPG/FCF/USP