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

Estudo dos mecanismos de ação da hidroquinona e fenol sobre o
recrutamento leucocitário em respostas inflamatórias

Sandra Manoela Dias Macedo

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2008

M124i Macedo, Sandra Manoela Dias
Estudo dos mecanismos de ação da hidroquinona e fenol sobre o recrutamento
leucocitário em respostas inflamatórias / Sandra Manoela Dias Macedo.
- 2008.

167 f.

Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
“Orientação: Prof. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky”.

1.Hidroquinona 2. Fenol 3. Toxicologia I. Título

CDU: 615.9

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

Sandra Manoela Dias Macedo

Estudo dos mecanismos de ação da hidroquinona e fenol sobre o
recrutamento leucocitário em respostas inflamatórias

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Sandra Manoela Dias Macedo no Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 16 dias do mês de setembro de 2008, no(a) Auditório realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Sandra Manoela Dias Macedo, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Toxicologia e Análises Toxicológicas, intitulada:

"Estudo dos mecanismos de ação da hidroquinona e fenol sobre o recrutamento leucocitário em respostas inflamatórias"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Sandra Helena Polisel Farsky	Presidente	FCF - USP	Aprovada
Helenice de Souza Spinosa	Titular	FMVZ - USP	APROVADA
Primavera Borelli Garcia	Titular	FCF - USP	Aprovada
Catarina de Fatima Pereira Teixeira	Titular	I. Butantã - Externo	APROVADA
Soraia Kátia Pereira Costa	Titular	ICB - USP	Aprovada
Resultado Final:			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Maria Roseli Ramos, Secretária, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 16 dias do mês de setembro de 2008.

Helenice de Souza Spinosa

Primavera Borelli Garcia

Catarina de Fatima Pereira Teixeira

Soraia Kátia Pereira Costa

Sandra Helena Polisel Farsky
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação.

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional.

À Dra. Sandra H. P. Farsky, pela oportunidade e orientação.

Aos colegas do laboratório: Cristina Hebeda, Danielle Maia, Alexandre Ferreira, Emerson Lourenço, Suéllen Vaz, Kaline Waismam, Julyana Furukawa, Mario Pacheco e Leilane Barboza, pela amizade, companheirismo e colaboração.

Aos Professores Wothan Tavares de Lima, Primavera Borelli, Sandro Almeida e seus alunos, pela colaboração.

Aos colegas da URI-Campus Erechim: Fabiana Barcellos da Silva, Silvane Souza Roman, Neiva Grazziotin e Luis Carlos Cichota, pelo apoio e colaboração.

À CAPES pela bolsa de doutoramento.

À FAPESP pelo financiamento do projeto (#03/04013-8).

RESUMO

MACEDO, S.M.D. **Estudo dos Mecanismos de Ação da Hidroquinona e Fenol sobre o Recrutamento Leucocitário em Respostas Inflamatórias**. 2008. 167 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Hidroquinona (HQ) é um dos metabólitos do benzeno responsáveis pelos efeitos tóxicos da exposição ao solvente, além de ser componente da dieta, medicamentos, cigarro e poluente do meio ambiente. Considerando a imunotoxicidade desta substância, o grupo de pesquisa do laboratório investiga o papel da exposição à HQ por período prolongado de tempo sobre respostas inflamatórias agudas (RIA). Neste contexto, o presente trabalho avaliou os efeitos desta exposição sobre os mecanismos vasculares e celulares da RIA de diferentes doses diárias de HQ (5, 10 ou 50 mg/kg) em ratos Wistar machos, via i.p., por 17 ou 22 dias, uma vez ao dia, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses. Animais controles receberam o veículo (salina com 5% etanol). A resposta inflamatória aguda inata foi induzida pela administração de glicogênio de ostra (1% em PBS, 5 mL) na bolsa subcutânea dorsal ou pela instilação de lipopolissacarídeo de *Salmonella abortus* (LPS; 100 µL de solução 100µg/mL); A resposta inflamatória aguda adquirida foi provocada pela inalação de ovalbumina (10 mL de solução de OA 1% PBS, 15 min) em animais previamente sensibilizados (10 µg/100mg Al(OH)₃ no décimo dia de exposição). Os resultados obtidos mostraram que: 1) o aumento do número de leucócitos na bolsa dorsal de animais expostos a 50 mg/kg de HQ é dependente, pelo menos em parte, da maior interação de leucócitos circulantes à parede vascular da microcirculação, mas não é decorrente de alterações na reatividade microvascular; o aumento de expressão de moléculas de adesão (β_2 integrina), que pode ser a responsável pelo aumento de interação

leucócito-endotélio e migração celular; 2) a redução da migração de leucócitos para o pulmão inflamado pelo LPS em animais expostos a HQ, nas menores doses, não foi decorrente de modificações na interação leucócito-endotélio, nem da expressão de moléculas de adesão nos leucócitos circulantes ou na célula endotelial do tecido pulmonar; 3) a redução da migração celular para o pulmão durante a RIA alérgica em animais expostos a 5, 10 ou 50 mg/kg de HQ é dependente, pelo menos em parte, da menor concentração de anticorpos anafiláticos circulantes e conseqüentemente da desgranulação reduzida de mastócitos teciduais, visualizados no leito mesentérico após desafio *in situ* pela OA. A menor produção de anticorpos anafiláticos pode ser decorrente da ação da HQ em diferentes tipos celulares, uma vez que foi observada expressão reduzida de moléculas co-estimulatórias em linfócitos do baço (CD45R e CD6), menor atividade microbicida de macrófagos peritoniais frente a *Candida albicans* e menor secreção de interferon- γ por células do peritônio. Em conjunto, os resultados apresentados mostram os mecanismos da HQ sobre a resposta do organismo ao trauma de diferentes origens, interferindo com tipos celulares distintos envolvidos nas reações.

Palavras-chave: Hidroquinona. Fenol. Resposta inflamatória aguda.

ABSTRACT

MACEDO, S.M.D. **Study of Mechanisms of Action of Hydroquinone and Phenol on Leukocyte Recruitment in Inflammatory Response.** 2008. 167 f. Thesis (Ph.D.) - School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2008.

Hydroquinone (HQ) is one of the metabolites of benzene responsible for the toxic effects of exposure to solvent, as well as being part of the diet, medicines, tobacco and polluting the environment. Considering the immunotoxicity of this substance, our laboratory has investigated the role of exposure to HQ by prolonged period of time on acute inflammatory responses (AIR). In this context, this study evaluated the effects of this exposure on the vascular and cellular mechanisms of AIR of different daily doses of HQ (5, 10 or 50 mg/kg) in male rats, via ip, for 17 or 22 days, a once a day, with intervals of 2 days every 5 doses. Control animals received the vehicle (saline with 5% ethanol). Innate AIR was induced by the administration of oysters glycogen (1% in PBS, 5 mL) into subcutaneous back pouch or by instillation of lipopolysaccharide of *Salmonella abortus* (LPS, 100 μ L of soluo100 μ g/mL); Allergic AIR gained was caused by inhalation of ovalbumin (10 mL solution of 1% OA in PBS, 15 min) in previously sensitized animals (10 μ g/100mg Al (OH)₃ on the tenth day of exposure). Results showed that: 1) the increased number of white blood cells back into the pouch of animals exposed to 50 mg/kg of HQ is dependent, at least in part, of higher interaction of circulating leukocytes to the vascular wall of the microcirculation, but is not due to changes in microvascular reactivity; an increase of expression of molecules of accession (β_2 integrin), which may be responsible for the enhanced interaction of leukocyte-endothelial and cell migration 2) the reduced migration of leukocytes into the lung inflamed by LPS in animals exposed to 5 or 10 mg/kg was not due to changes in

the interactions of leukocyte to endothelium, either the expression of adhesion molecules in circulating white blood cells or in cell endothelial lung tissue, 3) the reduced cell migration to the lungs during the AIR allergic to animals exposed to HQ, in lower doses, is dependent on lower concentration of circulating anaphylactics antibodies which may be responsible for the mast cell desgranulation. The lower amount of anaphylatic antibodies in the circulation may be due to action of HQ in different cells, as reduced expression of co-stimulatory molecules by lymphocytes (CD45R and CD6), lower microbicide activity of macrophages and reduced secretion of interferon- γ by peritoneal cells were detected. Together, the results show the toxicity of HQ on the body's response to trauma from different sources, interfering with different cell types involved in the reactions.

Keywords: Hydroquinone. Phenol. Acute inflammatory response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das vias de biotransformação do benzeno.....	23
Figura 2. Número de leucócitos em rolamento (A) e aderidos (B) em vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) do mesentério de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	55
Figura 3. Reatividade microvascular depois de aplicação tópica de noradrenalina (NA) e acetilcolina (Ach) em ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	57
Figura 4. Número de mastócitos desgranulados no mesentério de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	58
Figura 5. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	60
Figura 6. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular de cremaster de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	61
Figura 7. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ isolados ou associados (5 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	64
Figura 8. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular do pulmão inflamado de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (5 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	65
Figura 9. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de	

ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	68
Figura 10. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular do pulmão de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	69
Figura 11. Desgranulação de mastócitos de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias).....	70
Figura 12. Reação de anafilaxia passiva cutânea na pele de animais naïve sensibilizados com injeção intradérmica no dorso de soro diluído obtido de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5, 10 ou 50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) e sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH) ₃ , i.p.).....	72
Figura 13. Proliferação de linfócitos de baço <i>in vitro</i> de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) e sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH) ₃ , i.p.) no décimo dia de exposição.....	73
Figura 14. Expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos circulantes e de baço, antes e 24h depois de do desafio com OA <i>in vivo</i>	75
Figura 15. Porcentagem diferencial de células peritoniais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição.....	77
Figura 16. Expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoniais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição.....	79
Figura 17. Secreção de citocinas em células peritoniais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição.....	80

Figura 18. Atividade fungicida de macrófagos peritoneais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição.....	82
Figura 19. Corte histológico do fígado de animal exposto ao veículo (A), ao FE (B) e HQ (C) - 50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias.....	84
Figura 20. Corte histológico do rim de animal exposto ao veículo (A) e à HQ (B) - 50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de leucócitos expressando moléculas co-estimulatórias de ratos expostos ao veículo ou HQ.....	76
Tabela 2 - Número total de células da cavidade peritoneal de animais expostos à HQ e FE isolados ou em associação e ao veículo, no décimo dia de exposição (fase de sensibilização).....	77
Tabela 3 - Análise histológica de fígado.....	84
Tabela 4 - Análise histológica de rim.....	85
Tabela 5 - Parâmetros funcionais hepáticos (ALT e AST) e renal (Creatinina) de animais expostos a 50mg/kg dos agentes químicos.....	86
Tabela 6 - Parâmetros funcionais hepáticos (ALT e AST) e renal (Creatinina) de animais expostos a 10 mg/kg de HQ ou FE e HQ+FE (5mg/kg de cada).....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

1,2-BQ	<i>orto</i> -benzoquinona
1,4-BQ	<i>para</i> -benzoquinona
Ach	Acetilcolina
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Célula apresentadora de antígeno
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
BZ	Benzeno
CAM	Molécula de adesão celular
CAT	Catecol
CD	Célula dendrítica
ConA	Concanavalina A
CYP	Citocromo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELAM	Molécula de adesão leucócito endotélio
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FE	Fenol
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
fMLP	<i>N</i> -formil metionil-leucil-fenilalanina
HBSS	Solução salina fosfato de Hanks'
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HQ	Hidroquinona
HQ+FE	Hidroquinona + fenol
i.p.	Intraperitoneal
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MN	Mononuclear
MPO	Mieloperoxidase
NK	Célula matadora natural
NA	Noradrenalina
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
NOEL	Nível que não se observa efeito

NQO1	NAD(P)H: quinona oxidoreductase – 1
OA	Ovalbumina
PBS	Solução tampão salina fosfato
PCA	Anafilaxia passiva cutânea
PE	Ficoeritrina
PECAM	Molécula de adesão celular plaqueta endotélio
PG	Prostaglandina
PMA	Acetato de forbol miristato
PMN	Polimorfonuclear
ppm	Partes por milhão
TCR	Receptor de célula T
RIA	Resposta inflamatória aguda
SFB	Soro fetal bovino
Th	Linfócitos T auxiliar
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa
UFC	Unidade formadora de colônia
VCAM	Molécula de adesão vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Hidroquinona.....	20
1.2 Recrutamento leucocitário e moléculas de adesão.....	29
2. OBJETIVOS.....	37
3. MATERIAL E METODOS.....	38
3.1 Reagentes.....	38
3.2 Animais.....	40
3.3 Protocolos de exposições <i>in vivo</i>	40
3.4 Protocolos de indução da RIA.....	41
3.4.1 Resposta inflamatória aguda inata.....	41
3.4.1.1 Modelo da bolsa de ar.....	41
3.4.1.2 Modelo da inflamação pulmonar pela instilação de LPS.....	42
3.4.2 Resposta inflamatória aguda adquirida.....	42
3.4.2.1 Sensibilização à OA.....	42
3.4.2.2 Desafio <i>in vivo</i> à OA.....	43
3.5 Ensaio de microscopia intravital.....	43
3.5.1 Interação leucócito – endotélio.....	44
3.5.2 Reatividade microvascular.....	45
3.5.3 Número e atividade de mastócitos.....	45
3.5.4 Desgranulação de mastócitos <i>in situ</i> em resposta à OA.....	46
3.6 Reação anafilática passiva cutânea.....	46
3.7 Ensaio de proliferação celular.....	47
3.8 Determinação de Citocinas.....	47
3.9 Ensaio de Atividade Fungicida.....	48
3.10 Ensaio de Citometria de Fluxo.....	48
3.11 Ensaio de Imunohistoquímica.....	50
3.12 Marcadores séricos de função hepática e renal e exame	

histopatológico.....	51
3.13 Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS.....	54
4.1 Mecanismos envolvidos no aumento da migração leucocitária para o tecido subcutâneo inflamado de animais expostos a 50 mg/kg de HQ.....	54
4.1.1 Interação leucócito – endotélio.....	54
4.1.2 Resposta microvascular à noradrenalina e acetilcolina.....	55
4.1.3 Número e Atividade de Mastócitos.....	56
4.1.4 Expressão de Moléculas de Adesão.....	59
4.2 Mecanismos envolvidos na redução da migração leucocitária para o pulmão inflamado por instilação de LPS de animais expostos a 5 mg/kg de HQ.....	62
4.2.1 Expressão de moléculas de adesão.....	62
4.3 Mecanismos envolvidos na redução da migração leucocitária para o pulmão alérgico inflamado de animais expostos a 50 e 10 mg/kg de HQ e FE.....	66
4.3.1 Expressão de moléculas de adesão.....	66
4.3.2 Desgranulação de mastócitos do mesentério.....	66
4.3.3 Níveis de anticorpos anafiláticos.....	71
4.3.4 Proliferação de linfócitos de baço <i>in vitro</i>	71
4.3.5 Expressão de moléculas co-estimulatórias na membrana de leucócitos.....	74
4.3.6 Número de células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica.....	74
4.3.7 Expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica.....	78
4.3.8 Secreção de citocinas por células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica.....	78
4.3.9 Atividade fungicida de macrófagos peritoniais na fase de sensibilização imunogênica.....	81

4.4 Avaliação histológica e marcadores séricos funcionais de fígado e rins.....	83
5. DISCUSSÃO.....	87
6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	109
APÊNDICE.....	122
ANEXOS.....	154

1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Toxicologia Experimental, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, entre outras linhas de pesquisa, estuda os efeitos de xenobióticos sobre a mobilização e função de leucócitos e sobre os vasos da microcirculação. De acordo com esta linha de pesquisa, foi investigado o efeito de metabólitos do benzeno (BZ) em relação à mobilização e função de leucócitos além da relação leucócito-endotélio em modelo animal.

Lourenço (2005) demonstrou que a exposição a 13 doses de 50 mg/kg de hidroquinona (HQ) causa aumento no número de leucócitos na bolsa de ar inflamada pela injeção de glicogênio de ostra, em ratos machos Wistar. Este aumento de migração foi dependente de neutrofilia, uma vez que o número de neutrófilos foi maior no sangue circulante e menor na medula óssea, demonstrando a mobilização destes leucócitos do compartimento de reserva para a circulação.

Quando os animais foram submetidos a tratamento com doses menores de HQ, considerando o NOEL via oral para ratos que é menor que 25 mg/kg, apresentaram redução da migração de leucócitos (PMN e MN) para o espaço alveolar em resposta a instilação nasal de LPS. Esta inibição do recrutamento celular foi observado nas doses de 5 e 10 mg/kg e foi potencializada (para PMN) na associação com fenol (FE) na dose de 5 mg/kg de cada agente químico. Porém

a exposição a doses baixas de HQ não influenciou a mobilização de leucócitos do compartimento de reserva para o sangue circulante (FERREIRA, 2006).

Em modelo de inflamação alérgica pulmonar (Resposta Inflamatória Aguda - RIA – adquirida) animais expostos a 50, 10 ou 5 mg/kg dos compostos fenólicos, isolados ou associados (16 doses) apresentaram redução da migração de leucócitos (PMN e MN) para o espaço alveolar em resposta a broncoprovocação com OA. Esta inibição do recrutamento celular foi acompanhada por reduzida resposta anafilática *in vitro* em segmentos de traquéia. Porém as exposições não influenciaram a mobilização de leucócitos do compartimento de reserva para o sangue circulante (LOURENÇO, 2005; FERREIRA, 2006).

Portanto, o grupo de pesquisa tem mostrado que a exposição à HQ e ao FE por período de tempo prolongado altera a migração de leucócitos para focos inflamatórios de diferentes origens.

A resposta inflamatória foi avaliada na etapa onde os leucócitos são peças fundamentais no processo devido a hematotoxicidade do BZ - efeito atribuído aos seus metabólitos incluindo HQ e FE. Recrutamento de leucócitos para o local da inflamação compreende uma seqüência de interações entre leucócitos movendo-se rapidamente na corrente sanguínea e interagindo com células endoteliais de microvasos. O contato entre os dois tipos celulares é iniciado quando os leucócitos migram do centro do fluxo sanguíneo para fazer contato com as margens do vaso, rolando pela superfície endotelial. Leucócitos em rolamento estão habilitados para os eventos de ativação que induzem a parada do rolamento e subsequente firme aderência ao endotélio. Uma vez aderidos, os leucócitos estão prontos para migrar através dos vasos para penetrar no sítio inflamatório. Esta seqüência de eventos é

orquestrada por células endoteliais ativadas no tecido inflamado, pela expressão de várias moléculas com funções específicas na captura e ativação de leucócitos e pela secreção de mediadores inflamatórios de diferentes origens. Proteínas específicas, isto é, moléculas de adesão e quimiocinas fazem a mediação de cada etapa desta seqüência (HICKEY, 2001).

Modelos experimentais utilizando animais são imprescindíveis na área da toxicologia para predizer efeitos de exposições a agentes tóxicos. Avaliações em humanos são dependentes de dados epidemiológicos que podem levar anos para alcançar uma evidência toxicológica, além da dificuldade da coleta de dados. Mesmo que limitada para extrapolação em humanos, as evidências experimentais são importantes ferramentas para a elaboração da legislação toxicológica em todas as suas atribuições, nas quais a ocupacional e ambiental ocupam papel relevante.

1.1 Hidroquinona

Hidroquinona é utilizada industrialmente como agente redutor, antioxidante, inibidor de polimerização e como intermediário de síntese de outras substâncias. Também é componente de cremes para clareamento da pele e é encontrada naturalmente em vegetais, frutas, café, chá, cerveja e vinho. Contudo, efeitos adversos à saúde associados com a produção e uso de HQ está descrito na literatura relacionado ao fato de ser metabólito do BZ (DE CAPRIO, 1999). BZ é um solvente industrial amplamente utilizado (intermediário da síntese de várias substâncias químicas), constituindo-se em poluente ambiental gerado pelo processo de combustão e evaporação da gasolina e componente da fumaça do

cigarro (FARRIS et al., 1997). A via respiratória é a principal fonte de exposição do BZ no homem. Exposição crônica por inalação está associada com alterações hematopoiéticas implicadas no desenvolvimento de pancitopenia, anemia aplástica e leucemia em humanos (ROBINSON et al., 1997; SNYDER, 2004).

O limite de exposição permitido para o BZ pela *Occupational Safety and Health Administration* (OSHA) é de 1 ppm e o limite de exposição por curto período (15 min) é de 5 ppm (FEITSHANS, 1989). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica o BZ como carcinogênico para humanos (Grupo I) (IARC, 1987) e a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* o classifica como agente sensibilizante classe A1, reconhecidamente cancerígeno (ACGIH, 2003). No Brasil, a portaria interministerial nº 775, de 28 de abril de 2004, classifica o BZ como produto cancerígeno, para o qual não existe limite seguro de exposição e ficou proibida sua comercialização, mesmo como componente de produtos industrializados. A partir de dezembro de 2005 a portaria determinou que a concentração do BZ como contaminante de outros produtos não deveria ser superior a 0,4%, em volume, e 0,1% a partir de dezembro de 2007 (FUNDACENTRO, 2005).

O BZ quando absorvido é metabolizado por via hepática primeiramente sofrendo epoxidação, mediada pela CYP2E1. O resultante óxido de BZ estabelece um equilíbrio entre sua forma oxepina ou pode rearranjar-se não enzimaticamente a FE. Este pode sofrer subsequente hidroxilação a HQ, CAT e 1,2,4-benzenotriol. Tais produtos oxidados serão substratos para enzimas hepáticas de fase II (sulfotransferases e glicuroniltransferases) responsáveis pela geração de conjugados fenólicos que são excretados na urina (MEDINSKY et al., 1995). Ainda

podem ser transportados para a medula óssea onde são oxidados a 1,4-BQ e 1,2-BQ, respectivamente, pela ação de mieloperoxidases e prostaglandina H sintetase (SNYDER, 2004).

Óxido de BZ é também substrato para a epóxido hidrolase, esta adiciona água produzindo dihidrodiol BZ o qual pode ser oxidado pela dihidrodiol dehidrogenase a CAT. Uma via alternativa envolve a conjugação do óxido de BZ com glutathione que resulta em formação de ácido S-fenilmercaptúrico. Ainda o anel benzênico pode ser aberto no estágio óxido de BZ ou oxepina que resulta na formação de t,t-muconaldeído e posteriormente ácido t,t-mucônico (SCHRENK et al., 1996; SNYDER, 2004).

A figura 1 apresenta um esquema de metabolização do benzeno.

As diferentes vias de metabolização do BZ produzem diferenças quantitativas na fração de BZ transformada, dependente da espécie animal. Camundongos apresentam maior capacidade de metabolização do BZ quando comparados com ratos e primatas. Camundongos e macacos metabolizam mais BZ a HQ (e seus derivados) que ratos ou chimpanzés, especialmente a baixas doses. Primatas não humanos metabolizam pouco BZ a ácido t,t-mucônico que roedores e humanos. Em todas as espécies estudadas uma grande proporção de BZ é convertida a HQ e metabólitos de anel aberto quando submetidos a baixas ou altas doses. A maior formação destes metabólitos está relacionada com a toxicidade do BZ e explica, pelo menos em parte, a alta sensibilidade de camundongos em relação a ratos (HENDERSON, 1989, 1996; SNYDER e HEDLI, 1996).

Figura 1. Representação esquemática das vias de biotransformação do benzeno (adaptada de BOIS et al., 1991; LOURENÇO, 2005; KIM et al., 2006b).

No entanto, os produtos de biotransformação do BZ, FE e HQ, possuem classificação A4, não carcinógeno humano e A3 carcinogênico para animais, com relevância desconhecida para seres humanos, respectivamente (ACGIH, 2003).

Estudos com camundongos B6C3F₁ expostos ao BZ (1 e 10 mg/kg) por via oral demonstram que o metabolismo é dose dependente e o percentual de metabólitos na urina, até 10 mg/kg de BZ, foi: 26 ± 0,3% de sulfato de FE, 4,2 ± 0,3% de glicuronato de FE e 43 ± 0,8% de glicuronato de HQ (SABOURIN et al., 1989). Esta relação dose dependente pode ser explicada, em parte, pela interação entre BZ e seu principal metabólito, FE. Tanto FE como BZ são substratos para a CYP2E1 e tem similar afinidade pela enzima. Devido à concentração de FE no fígado ser menor que a de BZ, este pode competir com a oxidação do FE levando ao decréscimo da formação de HQ (MEDINSKY et al., 1989, 1996). Observação confirmada *in vitro* quando BZ, FE, HQ e CAT competiram pelo sítio catalítico da CYP2E1 em solução de microsoma hepático (SCHLOSSER et al., 1993). Em humanos, a formação de HQ é favorecida quando a exposição é a baixas doses (0,03 a 3 ppm), evidenciando a competição entre os compostos fenólicos pela CYP2E1, doses maiores favorecem a formação de ácido t,t-mucônico (KIM et al., 2006a, 2006b).

Estudos em coelhos expostos a BZ, por via oral ou i.p., mostraram que o limite de metabolização é de 400 mg/kg/dia e em doses maiores o excesso de BZ é exalado no ar expirado. Aproximadamente 1% da dose inicial é convertida a ácido fenilmercaptúrico, 0,5% em ácido t,t-mucônico, 11% de glicuronídeos (metabólitos conjugados), 25% de sulfatos (metabólitos conjugados) e 31% de FE (PARKE E WILLIAMS, 1950, 1953; PARKE, 1996).

Um modelo compartimental fisiológico foi desenvolvido para prever a concentração sanguínea estável de FE e HQ que pode ser alcançada durante contínua exposição a 0,01 μM de BZ (comparável a 1 ppm) no sangue de roedores e humanos. Os resultados obtidos sugerem que os ratos podem ser bons modelos de metabolismo do BZ comparável a humanos. A oxidação do benzeno foi de 0,625 nmol/mg/min, a sulfatação de FE foi de 1,195 nmol/mg/min e a glicuronização de HQ foi de 0,077 nmol/mg/min (SEATON et al., 1995).

Além da exposição ao BZ, outras fontes de exposição humana a estes compostos fenólicos já foram identificadas. McDonald e cols (2001) relatam que todos os indivíduos possuem níveis de FE e HQ no sangue e na urina provenientes da dieta (arbutin – conjugado de glicose e HQ encontrado em vegetais), do catabolismo da tirosina, do metabolismo bacteriano intestinal, da fumaça de cigarros e alguns medicamentos. Ainda, a baixa atividade da NQO1, a qual detoxica quinonas derivadas de FE e HQ, pode predispor um indivíduo a toxicidade destes compostos. Este mecanismo foi testado *in vitro* com linhagem celular promielocítica humana (KG-1), a qual quando tratada com HQ (10 a 100 μM) apresenta indução da expressão de NQO1 e proteção contra apoptose induzida por HQ (MORAN et al., 1999).

A literatura é ampla em relação aos efeitos tóxicos dos metabólitos do BZ expondo células humanas *in vitro*.

Alanko e cols (1995, 1999) demonstraram que compostos fenólicos (CAT 10 μM , HQ 60 μM e FE 700 μM) aumentam a relação $\text{PGE}_2/\text{LTB}_4$ em leucócitos polimorfonucleares humanos, por inibição da síntese de PGE_2 . Efeito relacionado à capacidade de captar (*scavenging*) radicais peroxil e superóxido. Os autores

sugerem que os compostos fenólicos podem atuar como moduladores dos metabólitos do ácido araquidônico em condições fisiológicas e patofisiológicas.

A exposição de linfoblastos T humanos a 50 μ M de HQ inibe a proliferação celular dependente de IL-2 com perda da viabilidade celular. Este tipo celular sofre inibição da progressão (dependente de IL-2) do ciclo celular para a fase S. Esta ação inibitória da HQ estaria envolvida com o efeito imunossupressor da fumaça do cigarro nos linfócitos T pulmonares (LI et al., 1996; MCCUE et al., 2003).

Expondo células dendríticas (CD) humanas ao extrato aquoso de cigarro ocorre supressão da função das CDs e favorecimento da resposta imunológica humoral. Linfócitos T não são ativados pelas CDs na presença do extrato por inibição de secreção de IFN- γ enquanto aumenta produção de IL-4. Ainda ocorre supressão da indução de CD40, CD80 e CD86 mediada por LPS de bactéria (VASSALLO et al., 2005).

A ativação de macrófagos também é suprimida por HQ (25 a 100 μ M). Efeito acompanhado de inibição da produção de TNF- α , IL-1 β , IL-3, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-23, NO e EROs, mas com aumento da expressão de CD29 (molécula de adesão celular) quando as células foram estimuladas com LPS. O mecanismo deste efeito parece ser mediado pela indução da heme oxigenase 1 (HO-1), enzima envolvida no status oxidativo celular, e inibição da ativação de Akt (serina-treonina quinase) requerido para ativação de NF- κ B (LEE et al., 2007).

Os linfócitos T humanos têm redução da síntese de DNA por inibição da ribonucleotídeo redutase quando expostos a HQ e CAT em doses de 10 a 50 μ M (LI et al., 1997, 1998; MCCUE et al., 2000). Já 1 μ M de HQ inibe reversivelmente a ativação de NF- κ B induzida por TNF- α neste mesmo tipo celular e em linhagem

Jurkat (linfócito T transformado), fibroblastos e células epiteliais de pulmão indicando que o efeito anti-proliferativo não foi restrito a proliferação mediada por IL-2 (PYATT et al., 1998). Os linfócitos B (CD19+) também sofrem inibição da ativação de NF- κ B, mas de maneira irreversível (PYATT et al., 2000). Ainda, HQ sensibiliza células progenitoras da medula óssea aos efeitos pró-apoptóticos do TNF- α (KERZIC et al., 2003). Em células mononucleares de sangue periférico humano CAT (25 μ M), HQ (25 μ M), 1,2,4-benzenotriol (25 μ M) e 1,4-BQ (1 μ M) estimulam a produção de TNF- α , IL-6, IL-4 e IL-5. Quando estas células são ativadas ocorre supressão de IL-10. Ainda ocorre supressão dos genes relacionados com a regulação da expressão protéica, ativação dos genes que codificam as proteínas de choque térmico e da família das proteínas do citocromo P450 (GILLIS et al., 2007).

Em linhagem de células leucêmicas promielocíticas humanas (HL60) 1 a 6 μ M de HQ reduz a apoptose (HAZEL et al., 1996). Efeito contrário foi observado, no mesmo tipo celular, quando as células foram expostas a concentrações de 10 a 100 μ M de HQ. A indução de apoptose seria decorrente de dano no material genético através de geração de H₂O₂ (HIRAKU E KAWANISHI, 1996). A indução de apoptose, nesse tipo celular, é mediada por aumento de secreção de interleucina 8 (IL-8, uma citocina pró-apoptótica) em concentrações de 25 a 100 μ M de HQ, CAT e benzenotriol (BIRONAITE et al., 2004). Ainda, quando as células HL60 são expostas a 3 μ M de 1,4-BQ observa-se aumento na produção de EROs; efeito anulado quando catalase é adicionada ao meio de cultura. Esta exposição também determinou aumento na proporção de células na fase S do ciclo celular e consequentemente intensa síntese de DNA. Efeito acompanhado de

rápida e prolongada fosforilação de ERK1/2. A prolongada ativação de ERK1/2 contribui para explicar o aumento de células em fase S e para entender o processo leucêmico associado com a exposição aos metabólitos do BZ (RUIZ-RAMOS et al., 2005).

Células CD34+ de cordão umbilical humano expostas a HQ (1 a 50 μ M) apresentaram aberrações cromossômicas (trissomia e monossomia dos cromossomos 7 e 8) encontradas em leucemias mielóides, evidência do papel da HQ na leucemia induzida pelo BZ (SMITH et al., 2000). Ainda, a exposição de linfócitos humanos a HQ (12,5 a 200 μ M) induz anomalias cromossômicas, identificadas por aumento da incidência de micronúcleos (DOEPKER et al., 2000; PASQUINI et al., 2003). O sistema de reparo do DNA foi aumentado em linhagem de células de ovário de hamster Chinês (CHO) quando tratadas com FE, CAT, 1,2-BQ (1 a 30 μ M) e HQ (10 a 30 μ M), sendo este efeito abolido quando foi adicionado ao meio catalase (WINN, 2003). Ainda, CAT (100 μ M), 1,4-BQ (50 μ M) e HQ (50 μ M) aumentam a atividade de c-Myb, um oncogene, acompanhado de maior produção de EROs em células eritroblásticas de galinha (HD3) (WAN et al., 2005).

Os experimentos *in vitro* o qual uma célula é submetida aos efeitos dos compostos fenólicos é uma importante ferramenta para a elucidação dos mecanismos de ação tóxica, mas são limitados se for considerada a complexidade do sistema imunológico *in vivo*. Portanto este doutoramento é o estudo dos efeitos dos metabólitos do BZ (FE e HQ) no recrutamento celular da resposta inflamatória *in vivo*. Como protocolo experimental, ratos foram tratados com doses de 5, 10 e 50 mg/kg (0,04, 0,11 e 0,45 mmol/kg de HQ e 0,05, 0,09 e 0,53 mmol/kg de FE) de

compostos fenólicos por 17 ou 23 dias, doses não leucêmica e que não demonstrou evidências de toxicidade. Como exposto, os leucócitos são células alvo destes compostos e a proposta deste estudo é avaliar o recrutamento leucocitário quando estas células são produzidas na vigência do tratamento.

1.2 Recrutamento leucocitário e moléculas de adesão

O organismo possui como mecanismo de defesa a resposta inflamatória. Esta resposta é mediada por uma série de reações que compreende um complexo conjunto de células e tecidos que têm por função proteger o organismo da invasão de agentes estranhos e manter condições apropriadas para detecção de estímulos antigênicos ou não. No caso desta resposta ser deficiente, o organismo fica susceptível às agressões. No entanto se a resposta for exacerbada, as diferentes reações comprometem o tecido afetado, com prejuízo aos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (TRACEY, 2002, 2007; KUMAR et al., 2005).

Dois tipos de respostas são comuns: a imunidade natural, também chamada de inespecífica, é caracterizada pela presença dos componentes de defesa antes mesmo da exposição ao agente flogístico (microorganismos ou macromoléculas estranhas). Várias células estão envolvidas neste tipo de resposta imune, dentre elas os PMNs, que são células fagocíticas onde os neutrófilos são componentes importantes. São capazes de fagocitar o agente invasor ou liberar enzimas lisossomais na tentativa de destruir o agente estranho. Em situação de inflamação persistente, ocorre também, na área lesada, uma infiltração de células de outros tipos celulares, como MNs, incluindo monócitos e linfócitos (SUZUKI et al., 2003). Ativação de neutrófilos estimula a migração do

sangue circulante para o local da lesão e isto é primordial para o processo inflamatório (DAVIS et al., 2000).

A resposta inflamatória aguda é a principal forma de defesa do organismo contra bactérias e fungos. Os neutrófilos são as principais células envolvidas nesta resposta. A migração destes resulta principalmente da liberação de fatores quimiotáticos de células residentes no tecido afetado. Apesar do efeito protetor, no tecido lesado em doenças como artrite, glomerulonefrite, vasculites, colite ulcerativa e doença inflamatória intestinal é, em parte, consequência do acúmulo de neutrófilos (DAL SECCO et al., 2004).

A resposta inflamatória específica é caracterizada pela apresentação dos antígenos aos linfócitos T e B pelas APCs: macrófagos, células dendríticas, entre outros. Os linfócitos T e B, dotados de receptores específicos para antígenos são estimulados, proliferando e ativando-se em células efetoras como linfócitos T citotóxicos, T *helper* e plasmócitos produtores de imunoglobulinas (MULLER, 2001). O reconhecimento antigênico pelos linfócitos ocorre via compatibilidade dos antígenos ao MHC, subdividido em antígenos de Classe I para a ação linfocitária citotóxica e antígenos de Classe II, para o reconhecimento e indução da produção de imunoglobulinas. Estas são glicoproteínas compostas por cadeias polipeptídicas, cadeias leves, cadeias pesadas e dotada de atividade bifuncional, sendo capaz de ligar-se a antígeno e de exercer atividade efetora quando associada aos elementos do sistema complemento da resposta imune (TRACEY, 2002). Na vigência de resposta inflamatória, células APCs fagocitam os patógenos em peptídeos antigênicos que se ligam a moléculas do complexo MHC e posteriormente são apresentados na superfície celular sob a forma de um

complexo MHC-peptídeo para o devido reconhecimento por leucócitos B e T (ABBAS et al., 1998; KUMAR et al., 2005).

Após o reconhecimento do complexo MHC-peptídeo por linfócitos T, ocorre ativação da diferenciação dos subtipos (Th1 e Th2), proliferação e secreção de mais fatores de crescimento e quimiotáticos capazes de mobilizar outras células do sistema imune para o foco inflamatório (ALI et al., 1999). Linfócitos Th1 preferencialmente produzem INF- γ e IL-2 e estão envolvidos na indução de imunidade celular. Em contraste, linfócitos Th2 produzem IL-4, 5 e 10 e são envolvidos na imunidade humoral (SHIBAKI e KATZ, 2002). Ótima ativação de linfócitos T requer não somente a ligação do receptor de célula T e o complexo CD3 (TCR/CD3) com o peptídeo associado com MHC, mas também com sinais de estímulo por interação entre moléculas co-estimulatórias (CD4, CD2 e CD28) no linfócito T e seus ligantes, moléculas da família B7 (CD80 e CD86) nas APCs. Esta ligação TCR/CD3 é estimulada por CD6, molécula co-estimulatória encontrada em linfócitos T e B (GIMFERRER et al., 2004). Simultaneamente a ativação de linfócitos T, tem-se a primeira etapa da resposta inflamatória específica, onde o contato com o antígeno promove a sensibilização de linfócitos B, gerando especificidade e memória antigênica. Nesta etapa, os linfócitos B expressam receptores capazes de reconhecer antígenos solúveis não complexados às moléculas do MHC (ABBAS et al., 1998). No decorrer do processo, uma pequena parcela de linfócitos B se diferencia em plasmócitos, células produtoras de imunoglobulinas antígeno-específicas, entre as quais imunoglobulinas da classe E (IgE) que sensibilizam mastócitos presentes no tecido adjacente ao foco inflamatório por meio da ligação ao receptor Fc na

membrana dos mesmos. Esta ativação de linfócitos B ainda é estimulada por CD45, molécula co-estimulatória encontrada na superfície de células hematopoiéticas nucleadas (THOMAS, 1989). Outra parcela de linfócitos B e T se diferenciam em células de memória as quais permanecem na circulação garantindo uma resposta rápida e eficaz contra uma futura exposição ao antígeno sensibilizante (ABBAS et al., 1998; CALICH e VAZ, 2001; KUMAR et al., 2005).

No segundo encontro com o antígeno novamente linfócitos B são ativados, proliferam e se diferenciam em plasmócitos, passando a secretar quantidades elevadas de imunoglobulinas capazes de levar a destruição do agente agressor quando associado a enzimas do sistema complemento. Ainda, a formação de complexos entre o antígeno e imunoglobulinas fixadas em receptores da parede celular de mastócitos leva a ativação dos mesmos, resultando na liberação de mediadores quimiotáticos para MN. Entre os mediadores considerados quimiotáticos, citam-se os prostanóides como PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF₂α, derivados da via da lipoxigenase como LTB₄, cininas, substâncias liberadas dos neutrófilos entre outros. Desta forma, ocorre o que denominamos de amplificação da resposta inflamatória (TOMIOKA et al., 1984; de LIMA e da SILVA, 1998; ABBAS et al., 1998; TAN et al., 1999; TRACEY, 2002; 2007; KUMAR et al., 2005).

A reação de hipersensibilidade imediata mediada por IgE é um exemplo de resposta inflamatória específica. IgE exerce papel central em reações de hipersensibilidade como asma alérgica, rinite, alergia a alimentos, dermatite atópica e anafilaxia (CHEN et al., 2005). Asma alérgica é um processo inflamatório crônico das vias aéreas que é caracterizada por obstrução reversível em associação com intensa ativação de linfócitos Th2. Esta resposta via Th2 é

mediada pela produção de EROs e citocinas como: IL-4, IL-5 e IL-13. As alterações que caracterizam a asma alérgica são: elevada IgE sérica, intensa secreção de muco, eosinofilia e exacerbada reatividade brônquica (MATTEs et al., 2002; HYLKEMA et al., 2002; CAREAU et al., 2002). A resposta inflamatória pulmonar ainda envolve modificações na reatividade das vias aéreas e ativação de células residentes, como mastócitos, macrófagos e células epiteliais, que secretam mediadores químicos responsáveis, entre outras funções, pela constrição das vias aéreas e pelo influxo acentuado de leucócitos para o foco da lesão (MARTIN e FREVERT, 2005).

Os leucócitos são células extremamente importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória. São provenientes de um precursor comum na medula óssea, no entanto proliferam em linhagens distintas, onde as células mielóides maturam e originam granulócitos e monócitos e as células linfóides originam os linfócitos. As células linfóides, em diferentes fases de seu desenvolvimento, migram carregadas pelo sangue, para os órgãos linfóides, onde a maturação será completada, enquanto as células mielóides proliferam e maturam na medula. Após a etapa de maturação, os leucócitos são mobilizados para a circulação, onde permanecem por período de tempo específico e variável e posteriormente serão removidas por macrófagos (THOMAS et al., 2006; ROESSLER e GROSSCHEDL, 2006).

Durante a circulação, uma pequena parcela destas células migra para os tecidos, dentre eles o pulmonar, permanecem por curto período de tempo, sofrem apoptose e são fagocitadas por macrófagos residentes. Vale ressaltar que os linfócitos são dotados de comportamento diferenciado de migração regido pelo

seu estado de ativação e memória. São capazes de realizar percurso cíclico, onde são lançados pelo sistema linfático ao sangue circulante e deste para os tecidos e, posteriormente, retornam ao sangue e para tecidos linfóides secundários (WORTHYLAKE e BURRIDGE, 2001; WIEDLE et al., 2001).

Em condições normais, a interação dos leucócitos circulantes com o endotélio da microcirculação é pequena, uma vez que estes circulam no centro da corrente sangüínea envoltos por eritrócitos. Porém existe um *pool* periférico de leucócitos aderido à parede dos vasos da microcirculação e uma recirculação de linfócitos, que interagem com células endoteliais especializadas de tecidos linfóides secundários (WIEDLE et al., 2001). Na vigência de resposta inflamatória, a interação dos leucócitos ao endotélio é exacerbada, no interstício, os leucócitos migram direcionalmente para o foco de lesão. A migração das células brancas é decorrente da ação de fatores quimiotáticos, como por exemplo, proteínas do sistema complemento e as cininas, que são gerados na corrente sanguínea e encontrados também no sítio da lesão, mediadores lipídicos e citocinas secretados por células competentes no foco de lesão (ALI et al., 1999; FRANGOIANNIS et al., 2001; KUBES, 2002).

Inicialmente os leucócitos marginam o endotélio de microvasos, predominantemente de vênulas pós-capilares próximas à área lesada e a aderência à parede vascular. A etapa a subsequente a aderência é caracterizada pela migração celular por entre as junções interendoteliais numa dinâmica de mobilização desencadeada pela indução do rolamento quando em contato direto com o endotélio. Esta etapa é fundamental para o recrutamento de células para o tecido lesado e é mediado por moléculas de adesão. Dentre as células que

expressam moléculas de adesão estão os PMN, os MN, os fibroblastos, as plaquetas, as células endoteliais, entre outras (KADONO et al., 2002; KUMAR et al., 2005).

As CAMs são glicoproteínas presentes na superfície das células que tem participação ativa no crescimento e diferenciação celular, bem como na formação de junções intracelulares e adesão celular a proteínas específicas. As CAMs quando influenciadas por citocinas e outros mediadores inflamatórios, desempenham funções importantes na adesão intercelular, adesão celular ao epitélio e endotélio, recrutamento e migração seletiva de células brancas da microcirculação até o foco de lesão. Tais funções fazem delas importantes moléculas sinalizadoras e imprescindíveis na regulação da inflamação (GONZALEZ-AMARO e SANCHEZ-MADRID, 1999; KADONO et al., 2002; MULLER, 2003).

As CAMs são classificadas em famílias distintas, dependentes de características moleculares comuns. As principais famílias são: selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas (KUMAR et al., 2005).

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

As integrinas são receptores compostos pela ligação das subunidades α e β . A associação de várias subunidades α a uma subunidade β comum subdividiu esta família. Assim, a subfamília das $\beta 2$ integrinas compreende a LFA-1 (CD11a); MAC-1 (CD11b); e Gp150,95 (CD11c). Dentre as funções deste complexo estão a adesão leucocitária ao endotélio, a quimiotaxia e a fagocitose, regulados pelo aumento do número de receptores na superfície celular e por alterações morfofuncionais dos receptores já expressos (MEREDITH e SCHWARTZ, 1997; RIDGER et al., 2001; POPPER et al., 2002).

A superfamília das imunoglobulinas abrange um grupo de CAM caracterizadas pela presença unidades semelhantes à classe das imunoglobulinas G. São compostas por ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, PECAM-1 e Mad-CAM-1 (LEBEDEVA et al., 2005). A participação desta classe de CAM na resposta inflamatória é de suma importância, uma vez que são expressas em membranas de células endoteliais e leucócitos migrados para o foco de lesão (MULLER, 2003).

2. OBJETIVOS

Este trabalho visou elucidar os mecanismos envolvidos na migração de leucócitos alterada pela exposição à HQ e ao FE, focando as interações leucócito-endotélio e as funções de mastócitos, linfócitos e macrófagos. Ademais, foi caracterizada a toxicidade sistêmica da exposição, pela medida da atividade de enzimas hepáticas e concentração de creatinina (marcador de função renal) e histopatologia hepática e renal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

O anestésico pentobarbital sódico foi adquirido da Cristália (São Paulo, Brasil) e o hidrato de cloral da Quims (Brasil).

O anticoagulante EDTA foi adquirido da Merck & Co (NJ, EUA) e a heparina da Roche Químicos e Farmacêuticos S.A. (Brasil).

Os anticorpos monoclonais anti moléculas de adesão: anti-CD62L marcado com FITC (L-selectina, LECAM-1); anti-CD18 marcado com FITC (β_2 integrina); anticorpos monoclonais anti moléculas co-estimatórias: anti-CD86 marcado com FITC; anti-CD40 marcado com FITC; anti-CD6 marcado com FITC; anti-CD45R marcado com PE; anti-CD80 marcado com PE; anti-CD31 marcado com PE (PECAM-1); anti-CD106 marcado com PE (VCAM-1) foram adquiridos da BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA) e o anticorpo anti molécula de adesão monoclonal anti-CD54 marcado com FITC (ICAM-1) da Southern Biotechnology Associates (San Diego, CA, EUA).

Os corantes: azul de Evans, azul de toluidina, May-Grünwald e Giemsa foram adquiridos da Merck & Co (NJ, EUA).

Os filtros de éster celulose 0,25 μ m foram adquiridos da Milipore (SP, Brasil).

Os kits: Kits ALT/GPT Liquiform, AST/GOT Liquiform, Creatinina Liquiform foram adquiridos da Labtest (SP, Brasil).

O meio de suporte para congelamento de tecido (O.C.T. Tissue Tek TM) foi adquirido da Raymond A Lamb (London, UK) e o meio de cultura RPMI 1640 da Sigma Chemical CO. (St. Louis, EUA).

Os sais e substâncias químicas: cloreto de sódio, fosfato de potássio dibásico, fosfato de potássio monobásico, nitrito de sódio, cloreto de cálcio diidratado, cloreto de potássio, e bicarbonato de sódio foram adquiridos da LabSynth (São Paulo, Brasil). Etanol, cloreto de amônio, hidróxido de alumínio, peróxido de hidrogênio (30 volumes) e glicose da Merck & Co (NJ, EUA). Hidroquinona, fenol, glicogênio de ostra (grau II), ovalbumina (grau II e V), noradrenalina, acetilcolina, concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (grau IV), lipopolissacarídeo de *Salmonella abortus*, composto 48/80, N-formil metionil-leucil-fenilalanina e acetato de forbol miristato da Sigma Chemical CO. (St. Louis, EUA).

Os solventes: formaldeído e hexano foram adquiridos da LabSynth (São Paulo, Brasil).

A solução de bloqueio para ensaios de imunohistoquímica foi adquirida da Pierce CO. (Rockford, Illinois).

O soro fetal bovino foi adquirido da Gibco-BRL (MD, USA).

A timidina marcada com trítio (³H] timidina) foi adquirida da Amersham Pharmacia Biotech UK Limited (UK).

3.2 Animais

Ratos Wistar machos, pesando entre 180-220g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com ciclo claro e escuro de 12h, livre acesso à ração e água durante todo o período experimental. A metodologia deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, com pareceres emitidos no Ofício CEEA n.25, protocolo 21 e Ofício CEEA n.53, protocolo 65.

3.3 Protocolos de exposições *in vivo*

Os animais foram expostos aos produtos de biotransformação do benzeno, FE e/ou HQ, por administrações intraperitoneais diárias em doses de 5, 10 e 50 mg/kg com volume final de 1 mL. Os agentes químicos foram solubilizados em solução salina estéril com 5% de etanol absoluto. Os animais receberam 5 doses/semana dos agentes químicos ou volumes equivalentes dos veículos pela mesma via. O esquema de exposição química tem como objetivo mimetizar uma jornada semanal de trabalho e o período de exposições levou em consideração a cinética de produção e maturação de leucócitos para resposta inflamatória inata e adquirida.

Para estudo do efeito das exposições na resposta inflamatória aguda inata e adquirida, os animais receberam 13 ou 16 doses, respectivamente, dos compostos fenólicos diariamente com intervalo de dois dias a cada cinco doses. Após 24h da última dose, os experimentos foram conduzidos.

3.4 Protocolos de indução da RIA

3.4.1 Resposta inflamatória aguda inata

3.4.1.1 Modelo da bolsa de ar

No 8º dia de exposição aos compostos fenólicos, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico e 20 mL de ar estéril foram injetados no subcutâneo do dorso. Depois de 7 dias, a bolsa de ar foi reforçada com injeção de 5 mL de ar estéril. Este protocolo foi descrito por Edwards et al., 1981. No 10º dia seguido a primeira injeção de ar, 1 mL de glicogênio de ostra a 5% em solução salina foi injetado na bolsa. Seis horas depois, os animais foram sacrificados e as bolsas lavadas com 4 mL de PBS com heparina. O número total de leucócitos do exsudato foi determinado em câmara de Neubauer. Contagem diferencial das células foi obtida por microscopia (400x) em extensão celular por citocentrifugação corada por Giemsa.

O esquema abaixo apresenta o protocolo de tratamento e indução da resposta inflamatória inata pelo modelo da bolsa de ar:

Tratamento químico (FE ou HQ 50 mg/kg em salina com 5% etanol, i.p.);

Sem tratamento químico;

Tratamento químico e indução (20 mL ar estéril) e após reforço da bolsa de ar (5 mL ar estéril);

Indução da resposta inflamatória (injeção 1 mL glicogênio de ostra 5% em solução salina) e 6h após coleta do exsudato inflamatório.

3.4.1.2 Modelo da inflamação pulmonar pela instilação de LPS

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/kg, ip). A seguir, 25 µL de LPS de *Salmonella abortus*, em salina estéril (100 µg/mL), foram instilados na cavidade nasal dos animais com auxílio de uma micropipeta. Seis horas mais tarde, os animais foram anestesiados e o pulmão foi removido (para imunohistoquímica) ou 24h após os lavados broncoalveolares foram coletados.

O esquema abaixo apresenta o protocolo de tratamento e indução da resposta inflamatória pulmonar induzida pela instilação de LPS:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Tratamento químico (FE e/ou HQ 5 ou 10 mg/kg em salina com 5% etanol, i.p.);

Sem tratamento químico;

24h após a última dose, instilação de 100 µg/mL de LPS na cavidade nasal dos animais; 6h depois remoção dos pulmões ou 24h após coleta do lavado broncoalveolar.

3.4.2 Resposta inflamatória aguda adquirida

3.4.2.1 Sensibilização à OA

Os animais foram sensibilizados por única injeção intraperitoneal de ovalbumina (OA grau II– 10 µg) misturado ao adjuvante hidróxido de alumínio (10 mg) em PBS, no 10º dia de exposição aos compostos fenólicos. Os experimentos foram executados 13 dias depois da sensibilização. Este tempo foi baseado no estudo de Coleman et al. (1983), que demonstraram aumento do nível de

anticorpos do tipo IgE em ratos, 7 a 14 dias depois de injeção intraperitoneal de OA.

3.4.2.2 Desafio *in vivo* à OA

No 13º dia após a sensibilização a OA e 24h após a última dose dos compostos fenólicos, os animais foram submetidos à inalação por 15 min de OA 1% em PBS usando inalador ultrasonico (Icel®, SP, Brasil) em câmara plástica (18,5 cm x 18,5 cm x 13,5 cm).

O esquema abaixo apresenta o protocolo de tratamento e indução da resposta inflamatória adquirida:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Tratamento químico (HQ 50 mg/kg ou FE e/ou HQ 5 ou 10 mg/kg em salina com 5% etanol, i.p.);

Sem tratamento químico;

Tratamento químico e sensibilização (10 µg OA e 10 mg de Al(OH)₃ em PBS, i.p.);

Indução da resposta inflamatória *in vivo* por broncoprovocação (OA 1% em PBS, 15 min inalação).

Indução de estímulo *in vitro*: reação anafilática passiva cutânea, desgranulação de mastócitos do mesentério, proliferação de esplenócitos e expressão de moléculas co-estimulatórias.

3.5 Ensaio de microscopia intravital

Ratos expostos a 13 doses de 50 mg/kg de HQ, FE ou veículo foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg) e após tricotomia e incisão do músculo abdominal o mesentério foi exteriorizado. Neste ensaio o mesentério dos

animais foi exteriorizado e transiluminado em microscópio para avaliação da interação leucócito – endotélio *in vivo*. Os animais foram mantidos em plataforma transparente que possibilita a transiluminação do tecido. A preparação foi constantemente irrigada com a solução Ringer – Locke (pH 7,2, NaCl 154 mM; KCl 5,6 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; NaHCO_3 6 mM e glicose 5 mM) contendo 1% de gelatina. As imagens transiluminadas foram obtidas via microscopia (Axioplan II, Carl-Zeiss equipado com x 5,0/0,30 Plan-neofluar ou x 10,0/0,25 Achroplan objetivas/abertura numérica e x 1,0, 1,25 ou 1,60 optovar) e as imagens foram capturadas em câmera de vídeo (ZVS, 3C75DE, Carls-Zeiss) e transmitidas simultaneamente ao monitor de televisão e ao computador. Imagens obtidas no monitor de televisão foram gravadas em vídeo – tape, enquanto as imagens digitalizadas no computador foram sequencialmente analisadas por software analisador de imagens (KS 300, Kontron).

3.5.1 Interação leucócito – endotélio

A interação entre os leucócitos e o endotélio da parede vascular foi avaliada por determinação do número de leucócitos em rolamento e aderidos à parede de vênulas pós-capilar (20 -30 μm de diâmetro e 200 μm de comprimento) do mesentério no intervalo de 10 min. Três campos do mesentério de cada animal foram avaliados. Leucócitos movendo-se na periferia do fluxo sanguíneo, em contato com o endotélio, foram considerados em rolamento. Os leucócitos foram observados individualmente e contados a partir de sua passagem por um ponto fixo selecionado na vênula. O número de leucócitos aderidos ao endotélio (fixados

na parede do vaso) foi determinado no mesmo segmento vascular (DAHLEN et al., 1981; FORTES et al., 1991; FARSKY et al., 1995, 2004).

3.5.2 Reatividade microvascular

A resposta constritora à aplicação tópica de 10 μ L de NA (2,5 ou 5,0 μ g/mL) ou vasodilatadora em resposta a 10 μ L de Ach (300 μ g/mL) foi analisada em animais expostos aos agentes fenólicos. Os neurotransmissores foram dissolvidos em solução balanceada de Hanks' e aplicados topicamente nos vasos (20-30 μ m) do mesentério. O período de latência requerido para estase da arteríola em resposta a cada dose de NA e o subsequente refluxo em resposta a Ach foram registrados. Os resultados foram obtidos após a observação de cinco campos de cada animal.

3.5.3 Número e atividade de mastócitos

A desgranulação de mastócitos frente à aplicação tópica de 10 μ L de N-metil-p-metoxifenetilamina (composto 48/80 – 1 μ g/ μ L) foi determinada no tecido conjuntivo adjacente as vênulas pós-capilares do mesentério. O número de mastócitos constitutivos desgranulados em área de 7200 μ m² e o tempo de latência requerido para o começo do processo foi avaliado em 10 campos em cada animal. O número de mastócitos constitutivos foi avaliado depois de 10 min da aplicação tópica de azul de toluidina em 10 campos por animal, em microscópio (400x).

3.5.4 Desgranulação de mastócitos *in situ* em resposta à OA

O mesentério de animais sensibilizados a OA e expostos aos compostos fenólicos (24h após a última dose) foram exteriorizados, após anestesia com pentobarbital sódico, e analisados por microscopia intravital.

A desgranulação dos mastócitos em resposta a aplicação tópica de 10 µL de OA 1% em solução salina ou 10 µL de composto 48/80 (1 µg/µL) foi determinada no tecido conjuntivo adjacente a vênulas pós-capilares do mesentério. As imagens foram adquiridas 5 min após a aplicação do estímulo de mastócitos desgranulados corados por aplicação tópica de azul de toluidina. Dez campos foram analisados em cada animal, em microscópio (400x).

3.6 Reação anafilática passiva cutânea

A reação anafilática passiva cutânea é um ensaio para medida indireta dos níveis de anticorpos anafiláticos (MOTA e WONG, 1969; SHIN et al., 2000; HONG et al., 2003). A reação cutânea IgE – dependente foi produzida por sensibilização da pele do dorso de ratos não manipulados com injeção intradérmica de soro diluído de animais expostos aos compostos fenólicos. Após 24h da sensibilização, os animais receberam, pela veia peniana, 1 mL de solução contendo 500 µg de OA associada a 2,5 mg do corante azul de Evans. Após 30 min, os animais foram sacrificados, a pele removida e o diâmetro dos halos azuis determinados. O título de PCA foi determinado pela quantidade de soro que produziu halo maior que 5 mm de diâmetro (extravasamento protéico significativo). Quanto maior o título mais anticorpos anafiláticos estavam presentes no soro.

3.7 Ensaio de proliferação celular

Leucócitos do baço de animais expostos aos compostos fenólicos (24h após a última dose) foram coletados por maceração do órgão em meio de cultura RPMI. Após lise dos eritrócitos, 2×10^5 células foram cultivadas em RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB com 25 a 125 $\mu\text{g/mL}$ de OA ou com ConA (7 $\mu\text{g/mL}$). Durante as últimas 18h dos 4 dias de cultura, [^3H] timidina foi adicionada (1 μCi). Ao final do tempo de cultura, as células foram coletadas e a radioatividade incorporada foi medida por espectrometria de cintilação líquida. Os dados estão expressos em contagens por minuto de [^3H] timidina incorporada.

3.8 Determinação de citocinas

Neste ensaio foi analisada a secreção de citocinas de células do peritônio de animais expostos aos compostos fenólicos. No 10º dia de exposição (período de sensibilização), os macrófagos do peritônio foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal com 20 mL de PBS em ambiente estéril, 1×10^6 células foram incubadas em placas de vidro com 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 por 2h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após, as células não aderidas foram removidas e os macrófagos então estimulados *in vitro* com 1 mg de OA por 3h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Após este período, o meio de cultura foi coletado para determinação de IFN- γ , IL-10 e IL-4. As citocinas foram quantificadas por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (BD - Pharmingen, USA), empregando curvas de calibração com diluição seriada de IFN- γ , IL-10 e IL-4 recombinante.

3.9 Ensaio de atividade fungicida

Neste ensaio foi analisada a atividade fungicida de macrófagos do peritônio de animais expostos aos compostos fenólicos. No 10º dia de exposição (período de sensibilização), os macrófagos do peritônio foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal com 20 mL de PBS em ambiente estéril. Suspensão de células peritoniais contendo 2×10^5 células foram incubadas com 4×10^5 *Candida albicans* em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% SFB por 24h ou 48h a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ em placas de 24 poços. Após este período os poços foram lavados com PBS (3x) para remoção de células não aderidas e fungos livres. Os macrófagos aderidos foram lisados com 1 mL de água destilada estéril e uma alíquota diluída (1:200) foi semeada em ágar Sabouraud. Os resultados foram expressos pelo número de UFC após 24h de incubação a 37°C (SOUZA et al., 2001).

3.10 Ensaio de citometria de fluxo

Neste ensaio foi analisada a expressão de moléculas de adesão e moléculas co-estimulatórias na membrana celular de leucócitos do sangue circulante, do baço e de macrófagos do peritônio.

O sangue foi coletado pelo plexo orbital com heparina ou da aorta abdominal com EDTA. Os leucócitos do baço foram obtidos por maceração do órgão em meio de cultura RPMI 1640. Nos dois casos, os eritrócitos foram lisados com solução de cloreto de amônia (0,13 M, agitação 1 min) e os leucócitos recuperados após lavagem com HBSS.

Os macrófagos do peritônio foram obtidos por lavagem da cavidade peritoneal com 20 mL de PBS em ambiente estéril, 1×10^6 células foram incubadas em placas de vidro com 2 mL de meio de cultura RPMI 1640 por 2h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após, as células não aderidas foram removidas e os macrófagos então selecionados.

Para análise da expressão de L-selectina e β_2 integrina, 1×10^6 leucócitos de ratos expostos a 13 doses de 50 mg/kg de HQ, FE ou veículo foram incubadas com ou sem fMLP (10^{-8} M por 10 ou 30 min). A expressão destas moléculas de adesão também foi analisada 6 ou 12h após o desafio com OA ou LPS em leucócitos de ratos expostos a 5, 10 e 50 mg/kg de HQ, 5 e 10 mg/kg de FE e associação de 5 mg/kg de HQ e FE ou veículo. Após lavagem, as células foram incubadas por 20 min a 4°C com 10 μ L de anticorpos monoclonal anti-L-selectina (Anti-LECAM) ou anti- β_2 integrina (anti-CD18), respectivamente, na ausência de luz.

Para análise da expressão de moléculas co-estimulatórias, leucócitos circulantes e de baço foram coletados 24h após o desafio com OA. Os macrófagos foram coletados no período de sensibilização (10º dia de exposição) e estimulados *in vitro* com 1 mg de OA por 3h a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. A seguir, as células foram incubadas por 20 min a 4°C com 10 μ L de anticorpos monoclonal anti-CD45R, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD6, anti-CD18 e anti-CD54, na ausência de luz. Nos macrófagos também foi analisada a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e β_2 integrina.

Após o período de incubação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (Becton & Dickinson - San Jose, CA, USA, FACS Calibur). Aproximadamente 10.000 células foram obtidas e somente leucócitos ou macrófagos morfológicamente viáveis foram considerados aptos para a análise.

3.11 Ensaio de imunohistoquímica

Neste ensaio foi analisada a expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular dos vasos do músculo cremaster e do pulmão.

Ratos expostos a 13 doses de 50 mg/kg de HQ, FE ou veículo foram anestesiados com pentobarbital sódico (65 mg/kg) e exsanguinados através da aorta abdominal. Os testículos foram retirados e imersos em hexano em nitrogênio líquido para congelamento.

O pulmão de ratos expostos a 5, 10 e 50 mg/kg de HQ, 5 e 10 mg/kg de FE e associação de 5 mg/kg de HQ e FE ou veículo, sensibilizado e desafiado com OA foi retirado 6 ou 24h após o desafio. Em ratos expostos a 5 ou 10 mg/kg de HQ e FE, isolados ou associados e desafiados com LPS, os pulmões foram retirados 6h após o desafio. Pela traquéia, o pulmão foi preenchido com meio de congelamento (OCT, Tissue Tek™) diluído em PBS na proporção de 2 para 1. Regiões dos lobos direito e esquerdo foram seccionadas e congeladas em hexano imerso em nitrogênio líquido para congelamento gradativo.

Após o congelamento os tecidos foram cortados em criostato a -25°C (Leica Microsystem). Os cortes foram confeccionados na espessura de 8 µm e depositados em lâminas silanizadas. Após, foram colocados em acetona gelada

para fixação por 10 minutos a -25°C . Em seguida, os cortes foram armazenados em freezer (-22°C) para posterior estudo imunohistoquímico.

Nos ensaios de imunohistoquímica direta por fluorescência, os cortes foram incubados com solução de bloqueio para sítios inespecíficos por 24 horas em atmosfera umidificada a 4°C , seguido de período de incubação *overnight* (câmara umidificada, 4°C) com anticorpos monoclonal de ratos anti-molécula de adesão ICAM-1 (1:50) marcado com FITC, anticorpos monoclonal anti-molécula de adesão PECAM-1 (1:500) e VCAM-1 (1:100), marcado com R-PE. Como ontrole positivo foram manipulados igualmente na bateria dos ensaios cortes conhecidamente positivos e como controle negativo da técnica alguns cortes foram incubados sem anticorpos, somente PBS. As preparações foram analisadas através de Software analisador de imagens (KS 300, Kontron) em microscópio de fluorescência.

3.12 Marcadores séricos de função hepática e renal e exame histopatológico

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital (65 mg/Kg, i.p.) no final dos períodos de exposição a 50, 10 e 5 mg/kg de HQ ou FE e 5 mg/kg de cada substância em associação. Sangue foi coletado através da artéria abdominal e o soro foi separado por centrifugação (500 g por 10 min). Amostras do soro de cada animal foram utilizadas para determinação das atividades das transaminases hepáticas, AST e ALT, como marcadores da função hepática. Para avaliar a função renal foi determinado o nível sérico de creatinina.

A atividade enzimática das transaminases (ALT e AST) foi determinada pela metodologia na qual as enzimas catalisam a transferência do grupamento amino de um α -aminoácido para um α -cetoácido. O oxalacetato ou piruvato, então formado reage com dinitrofenilhidrazina. A intensidade de coloração da hidrazona produzida é diretamente proporcional à quantidade de oxalacetato ou piruvato, que é determinado pela função enzimática.

A quantidade de creatinina foi determinada através do método colorimétrico de ponto final, na qual a creatinina reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido colorimetricamente.

Após a coleta de sangue dos animais anestesiados, um dos rins e uma porção do fígado dos animais expostos a 50 mg/kg de HQ ou FE foram removidos cirurgicamente e conservados em formol tamponado (PBS, pH 7,0) a 10%.

Os tecidos fixados foram processados de acordo com técnica de inclusão em parafina. Os órgãos emblocados foram cortados (0,4 μ m) em micrótomo (Leica RM 2145), depositados em lâminas de microscopia previamente revestidas com albumina/glicerina e desparafinizadas. Os cortes foram corados com sistema de coloração de hematoxilina-eosina e analisados em microscópio. A análise da morfologia dos tecidos foi realizada de acordo com a intensidade dos parâmetros avaliados, atribuindo-se escores: 0-ausente, 1-pouco, 2-moderado, 3-acentuado e 4-intenso. Os parâmetros avaliados na análise microscópica dos rins e fígado foram alterações morfológicas quanto: vacuolização dos hepatócitos, áreas claras, hipercromatismo nuclear, tumefação celular, congestão vascular, aumento do

espaço de filtração, vacuolização das células tubulares e presença de células eosinofílicas.

3.13 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni ou Tukey. O teste “*t*” de Student foi empregado para amostras não pareadas. As análises estatísticas foram conduzidas utilizando GraphPad Prism versão 4.00 (GraphPad Software Inc., 1992-2003). Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM com nível de significância menor que 0,05.

A análise estatística dos dados referentes à morfologia dos tecidos foi realizada pelo teste de distribuição não paramétrica Kruskal Wallis e as diferenças entre os grupos foram estabelecidas pelo teste de Mann Whitney, com nível de significância de 0,05. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM.

4. RESULTADOS

4.1 Mecanismos envolvidos no aumento da migração leucocitária para o tecido subcutâneo inflamado de animais expostos a 50 mg/kg de HQ

4.1.1 Interação leucócito – endotélio

O comportamento dos leucócitos no sangue circulante foi avaliado por observação direta da microcirculação. A exposição aos compostos fenólicos aumenta o contato inicial entre os leucócitos e o endotélio vascular, por aumento do número de leucócitos em comportamento de rolamento nas vênulas pós-capilares do mesentério (Fig. 2). Nos animais expostos a HQ, esta interação inicial progrediu para firme adesão dos leucócitos na parede vascular, fenômeno observado pelo maior número de células aderidas no endotélio quando comparado ao número de células aderidas na parede vascular dos animais expostos a FE ou veículo (Fig. 2).

Figura 2. Número de leucócitos em rolamento (*rolling*) e aderidos em vênulas pós-capilares (20-30 µm de diâmetro) do mesentério de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os resultados foram obtidos por microscopia intravital, 24h após a última dose de exposição. Os resultados estão expressos como média ± EPM de seis animais por grupo. * $P < 0,01$ ou ** $P < 0,001$ em comparação com os respectivos valores nos animais expostos somente ao veículo, por ANOVA de 1 via seguido do teste de Tukey.

4.1.2 Resposta microvascular à noradrenalina e acetilcolina

Para investigar a reatividade vascular depois das exposições químicas, NA e Ach foram topicamente aplicadas na rede microvascular do mesentério dos animais dos diferentes grupos estudados. Os resultados mostraram que as exposições não modificam a reatividade arteriolar em resposta a NA e Ach. A constrição da arteríola em resposta a NA e subsequente dilatação a Ach foram similares nos três grupos de animais estudados. Estão apresentados os tempos necessários para a estase causada pela vasoconstrição e restabelecimento do fluxo sanguíneo após aplicação de Ach (Fig. 3).

Em condições basais, o diâmetro das arteríolas e vênulas avaliadas no ensaio foi equivalente e variaram entre 20 e 30 μm .

4.1.3 Número e atividade de mastócitos

O número e atividade de mastócitos foram observados em imagens *in vivo* do mesentério dos animais. A exposição à HQ ou ao FE não influencia no número de mastócitos ou habilidade de desgranular. Aplicação tópica de composto 48/80 produz desgranulação de mastócitos equivalente nos três grupos de animais estudados, fenômeno observado pelo número similar de mastócitos adjacentes às vênulas pós-capilares (Fig. 4) e pelo tempo requerido para desgranulação (10 a 15 s).

Figura 3. Reatividade microvascular depois de aplicação tópica de noradrenalina (NA) e acetilcolina (Ach) em ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os resultados foram obtidos por microscopia intravital do mesentério, 24h após a última dose de exposição. Os dados representam o tempo requerido para cessação do fluxo sanguíneo em resposta a NA e recuperação do fluxo por adição de Ach. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de seis animais por grupo.

Figura 4. Número de mastócitos desgranulados no mesentério de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os resultados foram obtidos por microscopia intravital, 24h após a última dose de exposição e 10 min depois da aplicação tópica de composto 48/80. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de seis animais por grupo.

4.1.4 Expressão de moléculas de adesão

A expressão de moléculas de adesão na membrana de leucócitos circulantes foi caracterizada por citometria de fluxo e nas células endoteliais por imunohistoquímica.

Os resultados obtidos mostraram que a expressão de L-selectina nos leucócitos PMN de animais expostos a 50 mg/kg de HQ ou FE foi menor que a observada nas células dos animais expostos somente ao veículo. Após estimulação *in vitro* por fMLP, os leucócitos dos animais expostos à HQ perderam a habilidade de aumentar a expressão de L-selectina na membrana celular (Fig. 5). O aumento da expressão de L-selectina no PMNs coletados dos animais expostos a FE depois da estimulação com fMLP foi equivalente ao encontrado nas células dos animais controle (Fig. 5). A expressão de L-selectina nas células mononucleares não foi alterada pelas exposições.

A análise da expressão de β_2 integrina nas células PMN mostrou que as células coletadas dos animais expostos a FE e veículo apresentaram padrão similar de expressão desta molécula de adesão, tanto antes como depois da estimulação com fMLP (Fig. 5). Em contraste, PMNs obtidos de animais expostos à HQ apresentaram níveis elevados de β_2 integrina em ambas condições, antes e depois da estimulação *in vitro* (Fig. 5). A expressão de β_2 integrina nas células mononucleares não foi alterada pelas exposições.

O endotélio dos vasos do músculo cremaster não sofreu influência das exposições químicas (13 doses de 50 mg/kg de HQ ou FE) na expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 (Fig. 6).

Figura 5. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Leucócitos foram obtidos de alíquotas de sangue da aorta abdominal. A expressão de L-selectina ou β_2 integrina foi quantificada em neutrófilos quiescentes (basal) ou após estímulo por fMLP (10^{-8} M) por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata. *P<0,01 vs valor basal de ratos expostos somente ao veículo, **P<0,05 vs respectivos valores basal e ***P<0,05 vs valores de PMNs estimulados de ratos expostos ao veículo ou FE, por ANOVA de 2 vias seguido do teste de Bonferroni.

Figura 6. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular de cremaster de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). A expressão de ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1 foi quantificada por ensaio de imunohistoquímica. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de quatro animais por grupo.

4.2 Mecanismos envolvidos na redução da migração leucocitária para o pulmão inflamado por instilação de LPS de animais expostos a 5 mg/kg de HQ

4.2.1 Expressão de moléculas de adesão

Com o intuito de avaliar se as exposições aos agentes químicos na dose de 5 mg/kg isolados ou associados modificam a habilidade de leucócitos interagirem com o endotélio microvascular pulmonar, foi quantificado a expressão de L-selectina e β_2 integrinas na membrana de leucócitos PMN antes e 6 horas após a instilação intranasal de LPS.

Os valores obtidos mostraram que as exposições aos agentes químicos isolados ou associados não foram capazes de modificar as expressões de L-selectina em PMN (Fig. 7) em condições basais ou 6 horas após estímulo com LPS. Os valores encontrados em leucócitos PMN de animais expostos aos agentes químicos foram similares aos obtidos no grupo de animais controles e os incrementos após RIA foram equivalentes.

Da mesma forma que os dados encontrados nas expressões de L-selectina, as exposições aos agentes químicos também não alteraram as expressões de moléculas β_2 integrina em leucócitos PMN (Fig. 7). Os valores encontrados foram equivalentes aos obtidos em células de animais que foram expostos somente ao veículo. Nesta etapa do processo inflamatório também não foi observado aumento de expressão desta molécula em células provenientes de todos os grupos de animais testados.

Células estimuladas *in vitro* com LPS, o controle positivo, exibiu aumento de 80% na expressão de β_2 integrina, como esperado (dados não mostrados).

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

A figura 8 mostra que as expressões destas moléculas não foram alteradas em animais expostos à HQ, ao FE ou à associação HQ+FE quando comparados com valores obtidos de cortes histológicos de animais expostos ao veículo.

Figura 7. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ isolados ou associados (5 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Leucócitos foram obtidos de alíquotas de sangue do plexo orbital. A expressão de L-selectina ou β_2 integrina foi quantificada em neutrófilos antes e 6 horas após instilação nasal do LPS por ensaio de citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata. * $P < 0,001$ vs respectivos valores antes, por ANOVA de 2 vias seguido do teste de Bonferroni.

Figura 8. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular do pulmão inflamado de ratos expostos ao veículo, FE ou HQ (5 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). A expressão de ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1 foi quantificada 6 horas após instilação intranasal do LPS por ensaio de imunohistoquímica. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata.

4.3 Mecanismos envolvidos na redução da migração leucocitária para o pulmão alérgico inflamado em animais expostos a 5, 10 e 50 mg/kg de HQ ou FE

4.3.1 Expressão de moléculas de adesão

A expressão de moléculas de adesão na membrana de leucócitos circulantes foi caracterizada por citometria de fluxo e nas células endoteliais por imunohistoquímica em animais expostos aos compostos fenólicos e sensibilizados.

Os resultados obtidos mostraram que o padrão da expressão de L-selectina e β_2 integrina nos leucócitos PMN de animais expostos a 50 mg/kg de HQ foi igual ao observado nas células dos animais expostos somente ao veículo. Após 12h do estímulo *in vivo* com OA, os leucócitos dos animais expostos à HQ e ao veículo mostraram que o pico de expressão de L-selectina já ocorreu e sua hidrólise acontecia (Fig. 9). Neste tempo não houve alteração na expressão de β_2 integrina nos dois grupos estudados (Fig.9). A expressão de L-selectina e β_2 integrina nas células mononucleares não foi alterada pelas exposições.

O endotélio dos vasos pulmonares não sofreu influência da exposição à HQ (16 doses de 50 mg/kg) na expressão das moléculas de adesão ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1 (Fig. 10).

4.3.2 Desgranulação de mastócitos do mesentério

O mesentério de animais sensibilizados e expostos a 50 mg/kg HQ ou veículo foi exteriorizado e a desgranulação de mastócitos do tecido conjuntivo

adjacente à rede microvascular foi analisada por microscopia intravital. Os resultados obtidos mostraram que a desgranulação induzida por OA nos mastócitos do mesentério de animais expostos à HQ foi significativamente reduzido quando comparado aos animais alérgicos e expostos somente ao veículo (Fig. 11). Porém, a magnitude da desgranulação dos mastócitos em resposta a aplicação tópica ao composto 48/80 foi similar em ambos os grupos de animais (Fig. 11).

Figura 9. Expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os animais foram sensibilizados (10 μg OA com 10 mg de Al(OH)₃, i.p.) no décimo dia de exposição e desafiado (solução OA 1%, 15 min, inalação) no 23º dia. Os leucócitos foram coletados 12h após o desafio. A expressão de L-selectina ou β₂ integrina foi quantificada em neutrófilos antes ou após estímulo com OA *in vivo* por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média ± EPM de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata. *P<0,05 e **P<0,01 vs respectivos valores antes do estímulo *in vivo*, por ANOVA de 2 vias seguido do teste de Bonferroni.

Figura 10. Expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular do pulmão de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os animais foram sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH)₃, i.p.) no décimo dia de exposição e desafiado (solução OA 1%, 15 min, inalação) no 23º dia. Os pulmões foram coletados 24h após o desafio. A expressão de ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1 foi quantificada por ensaio de imunohistoquímica. Os resultados estão expressos como média ± EPM de quatro animais por grupo.

Figura 11. Desgranulação de mastócitos de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias). Os animais foram sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH)₃, i.p.) no décimo dia de exposição. Desgranulação foi induzida 13 dias depois por aplicação tópica de OA ou composto 48/80. As imagens foram obtidas por microscopia intravital 5 min depois da aplicação tópica do estímulo. As microfotografias representam mastócitos desgranulados corados com azul de toluidina (setas). Quatro animais foram analisados por grupo. *P<0,001 vs valores obtidos em animais expostos somente ao veículo, pelo teste “t” de Student.

4.3.3 Níveis de anticorpos anafiláticos

A capacidade dos soros obtidos dos animais alérgicos e expostos à HQ (5, 10 ou 50 mg/kg), FE (5 ou 10 mg/kg), HQ+FE (5 mg/kg de cada) ou ao veículo em induzir aumento da permeabilidade microvascular cutânea em animais naïve foi utilizada como indicativo dos níveis de anticorpos anafiláticos. Os dados obtidos mostraram que a quantidade de soro de animais expostos aos compostos fenólicos requerido para induzir a reação foi maior que a quantidade de soro de animais expostos somente ao veículo, indicando menor quantidade de anticorpos anafiláticos (IgE e IgG) nos animais expostos aos agentes químicos em todas as doses testadas e em associação (Fig. 12).

4.3.4 Proliferação de Linfócitos de Baço *in vitro*

Linfócitos de baço de animais expostos a 50 mg/kg de HQ foram estimulados à proliferação em resposta a OA ou ConA *in vitro*. A proliferação de linfócitos foi equivalente em ambos os grupos de exposição, HQ e veículo (Fig. 13). Ainda, a exposição à HQ também não alterou o número total de linfócitos de baço: $18,6 \pm 1,7 \times 10^6$ células/mL para o grupo HQ e $18,6 \pm 1,1 \times 10^6$ células/mL para o grupo veículo (n=4, para cada grupo).

Figura 12. Reação de anafilaxia passiva cutânea na pele de animais não manipulados sensibilizados com injeção intradérmica no dorso de soro diluído obtido de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5, 10 ou 50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) e sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH)₃, i.p.). O título de PCA está expresso em média das maiores diluições que produziram halos maiores de 5 mm. Os resultados estão expressos como média ± EPM de soros coletados de quatro animais por grupo. **P<0,001 e *P<0,05 em comparação com os valores dos ratos expostos somente ao veículo, por ANOVA de 1 via seguido do teste de Tukey e teste “t” de Student.

Figura 13. Proliferação de linfócitos de baço *in vitro* de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) e sensibilizados (10 μg OA com 10 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, i.p.) no décimo dia de exposição. As células foram coletadas 13 dias depois da sensibilização e 2×10^5 células foram cultivadas por poço da placa de cultura com 25 – 125 $\mu\text{g/mL}$ de OA ou com 7 $\mu\text{g/mL}$ de ConA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de três animais por grupo. * $P < 0,001$ em comparação com os valores basais, por ANOVA de 2 via seguido do teste de Bonferroni.

4.3.5 Expressão de moléculas co-estimulatórias na membrana de leucócitos

O estímulo à diferenciação de leucócitos circulantes e de baço foi avaliado por expressão de moléculas co-estimulatórias. Os resultados obtidos mostraram que a exposição a 50 mg/kg de HQ não altera a expressão de CD80, CD86 ou CD40, mas reduz a expressão de CD45R e CD6 na membrana celular de leucócitos de baço depois do desafio *in vivo* a OA. As células circulantes não apresentaram alteração na expressão das moléculas co-estimulatórias analisadas (Fig. 14).

A redução da expressão de CD45R ou CD6 detectadas nos leucócitos de baço dos animais expostos à HQ não é dependente no número total de células (Tabela 1). A porcentagem de células que expressaram CD45R ou CD6 foi equivalente nos animais de ambos os grupos no estado basal e depois do estímulo por OA *in vivo*.

4.3.6 Número de células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica

Para avaliar a influência das exposições químicas na fase de sensibilização da resposta inflamatória alérgica dos animais, células da cavidade peritoneal foram coletadas no décimo dia de exposição, antes da sensibilização à OA.

Os resultados obtidos mostraram que o número e tipo de células do peritônio (eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e MN) dos animais expostos aos compostos fenólicos isolados (10 mg/kg) ou associados (5 mg/kg de cada) foram equivalentes aos animais expostos somente ao veículo (Tabela 2 e Fig. 15).

Figura 14. Expressão de moléculas co-estimulatórias em linfócitos circulantes e de baço, antes e 24h após o desafio com OA *in vivo*. Leucócitos circulantes e do baço foram obtidos de ratos expostos ao veículo ou HQ (50 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) e sensibilizados (10 µg OA com 10 mg de Al(OH)₃, i.p.) no décimo dia de exposição. O desafio com OA (solução 1%, 15 min inalação) foi imposto no 23º dia. A expressão de moléculas co-estimulatórias foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média ± EPM de amostras coletadas de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata. *P<0,001 vs aos respectivos valores antes do desafio com OA e #P<0,05 vs valores dos ratos expostos somente ao veículo depois do desafio com OA, por ANOVA de 2 vias seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 1 - Porcentagem de leucócitos expressando moléculas co-estimulatórias de ratos expostos ao veículo ou HQ

	Veículo		HQ	
	Antes	Após OA	Antes	Após OA
CD86	27,01 ± 3,24	73,21 ± 12,10*	27,28 ± 5,02	81,61 ± 2,66*
CD80	41,09 ± 2,55	78,93 ± 5,47**	30,63 ± 8,10	92,75 ± 1,64**
CD40	29,03 ± 3,91	77,74 ± 9,35**	21,42 ± 1,21	86,19 ± 8,10**
CD45R	60,11 ± 5,97	94,29 ± 2,10**	64,49 ± 3,60	97,44 ± 1,18**
CD6	52,95 ± 4,47	89,64 ± 1,79**	48,49 ± 3,89	90,34 ± 5,45**

*P<0,01 e **P<0,001 em comparação aos respectivos valores antes do desafio com OA, por ANOVA de 2 vias seguido do teste de Bonferroni.

Tabela 2 - Número total de células da cavidade peritoneal de animais expostos à HQ e FE isolados ou em associação e ao veículo, no décimo dia de exposição (fase de sensibilização)

	Veículo	HQ 10mg/kg	FE 10mg/kg	HQ+FE
x 10 ⁶ cel./mL	9,84 ± 1,04	15,28 ± 1,78	10,08 ± 1,44	9,12 ± 0,79

Os resultados estão expressos como média ± EPM de cinco animais por grupo.

Figura 15. Porcentagem diferencial de células peritoneais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição. Os resultados estão expressos como média ± EPM de cinco animais por grupo.

4.3.7 Expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica

A capacidade de estimulação das células peritoniais em resposta à OA foi avaliada no décimo dia de exposição aos agentes químicos. As células peritoniais foram coletadas e estimuladas *in vitro* com OA e a expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD40 e CD86 e moléculas de adesão CD18 e CD54 (ICAM-1) foi quantificada por citometria de fluxo.

A expressão das moléculas co-estimulatórias e de adesão estudadas não tiveram sua expressão alterada pelas exposições à HQ ou FE (10 mg/kg) isolados ou em associação na membrana de macrófagos peritoniais no décimo dia de exposição depois do estímulo com OA *in vitro* (Fig. 16).

4.3.8 Secreção de citocinas por células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica

A secreção de IL-4, IL-10 e INF- γ foi quantificada no meio de cultura após estímulo (3 horas) *in vitro* com OA, no décimo dia de exposição, para avaliar se as exposições aos compostos fenólicos alteram a capacidade de estimulação de células peritoniais.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ e FE isolados (10 mg/kg) ou associados não alteram a secreção de IL-4 e IL-10 das células peritoniais, mas reduz drasticamente a secreção de INF- γ (Fig. 17).

Figura 16. Expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão em células peritoneais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição. As células foram coletadas por lavagem da cavidade peritoneal com 20 mL de PBS. A expressão de moléculas co-estimulatórias e de adesão foram avaliadas por citometria de fluxo. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de células coletadas de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata.

Figura 17. Secreção de citocinas em células peritoneais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição estimuladas com OA (3h). As citocinas foram quantificadas por ELISA. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM de células coletadas de quatro animais por grupo. O ensaio foi produzido em duplicata.

4.3.9 Atividade fungicida de macrófagos peritoniais na fase de sensibilização imunogênica

Macrófagos peritoniais foram coletados no décimo dia de exposições químicas e sua atividade fungicida foi avaliada *in vitro*. A atividade fungicida de macrófagos peritoniais foi mensurada por quantificação do número de UFC formadas por *Candida albicans* fagocitadas em 24h e 48h de incubação a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O conteúdo intracelular de macrófagos peritoniais de animais expostos a HQ e FE isolados (10 mg/kg) ou associados foi cultivado por 24h em ágar Sabouraud e apresentou maior número de UFC quando comparado com os macrófagos de animais expostos somente ao veículo (Fig. 18).

Figura 18. Atividade fungicida de macrófagos peritoneais de ratos expostos ao veículo, HQ e/ou FE (5 ou 10 mg/kg, i.p., 16 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias) no décimo dia de exposição. A atividade fungicida foi quantificada pelo crescimento do fungo fagocitado em ágar Sabouraud. Os resultados estão expressos como média $\pm$ EPM do número de UFC após 24h de incubação a 37°C, de quatro animais por grupo. * $P < 0,01$ vs respectivo veículo, ** $P < 0,001$ vs respectivo veículo, *** $P < 0,05$ vs FE e HQ+FE, por ANOVA de 1 via seguido do teste de Tukey.

4.4 Avaliação histológica e marcadores séricos funcionais de fígado e rins

O exame histopatológico de fígado mostrou que a exposição a 50 mg/kg de HQ determinou hipercromatismo nuclear, quando comparado aos tecidos dos animais expostos ao veículo e ao FE. Os animais expostos ao FE (50 mg/kg) apresentaram maior congestão vascular, em relação aos animais expostos ao veículo e à HQ. Eles também apresentaram megalocitose quando comparado aos animais expostos ao veículo (Tabela 3 e Fig. 19).

O exame histopatológico de rim somente mostrou aumento do espaço de filtração glomerular nos animais expostos a 50 mg/kg de HQ, quando comparado aos animais expostos ao veículo e ao FE (Tabela 4 e Fig. 20). Os animais expostos ao FE não apresentaram significantes alterações morfológicas no tecido renal.

A análise dos parâmetros sorológicos de função hepática e renal não mostrou alteração nessas estruturas pelos compostos fenólicos em todas as doses estudadas, quando comparados com os valores obtidos dos animais expostos ao veículo (Tabela 5 e 6).

Tabela 3 - Análise histológica de fígado

	Veículo	FE	HQ
Vacuolização Citoplasmática	2,38 ± 0,69	0,25 ± 0,25*	1,50 ± 0,50
Células Eosinofílicas	0,25 ± 0,25	0,88 ± 0,32	1,00 ± 0,70
Hipercromatismo	0,50 ± 0,29	0,12 ± 0,12**	2,00 ± 0,41 [#]
Tumefação Celular	2,63 ± 0,24	1,75 ± 0,14***	2,75 ± 0,25
Congestão Vascular	1,25 ± 0,14	2,12 ± 0,12***	1,00 ± 0,00
Megalocitose	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00*	0,50 ± 0,29
Proliferação de Ductos	0,50 ± 0,29	0,88 ± 0,31	1,25 ± 0,48

Os resultados estão expressos como média ± EPM dos escores obtidos na análise, em duplicata, dos cortes histológicos de quatro animais por grupo. *P<0,05 vs veículo; **P<0,05 vs HQ; ***P<0,05 vs veículo e HQ; [#]P<0,05 vs veículo e FE, por Kruskal Wallis seguido do teste de Mann Whitney.

Figura 19. Corte histológico do fígado de animal exposto ao veículo, ao FE e HQ - 50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias. Fotomicrografia de cortes histológicos corados com hematoxilina – eonsina observados em microscópio (400x). Observar tumefação celular (estrela), congestão vascular (seta vazada) e megalocitose (seta cheia).

Tabela 4 - Análise histológica de rim

	Veículo	FE	HQ
Amplo Espaço de Filtração	0,50 ± 0,29	1,00 ± 0,41	2,50 ± 0,29*
Tumefação de Célula Cortical	1,00 ± 0,58	2,50 ± 0,64	2,00 ± 0,00
Tumefação de Célula Medular	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Congestão Vascular Cortical	0,25 ± 0,25	0,50 ± 0,29	1,25 ± 0,25
Vacuolização	1,00 ± 0,41	0,50 ± 0,29	1,50 ± 0,29
Células Eosinofílicas Medular	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Vacuolização de Túbulos Coletores	0,50 ± 0,29	0,00 ± 0,00	0,50 ± 0,29

Os resultados estão expressos como média ± EPM dos escores obtidos na análise, em duplicata, dos cortes histológicos de quatro animais por grupo. *P<0,05 vs veículo, por Kruskal Wallis seguido do teste de Mann Whitney.

Figura 20. Corte histológico do rim de animal exposto ao veículo, ao FE e à HQ - 50 mg/kg, i.p., 13 doses, diariamente com dois dias de intervalo a cada cinco dias. Fotomicrografia de cortes histológicos corados com hematoxilina – eonsina observados em microscópio (100x). Observar amplo espaço de filtração (seta).

Tabela 5 - Parâmetros funcionais hepáticos (ALT e AST) e renal (Creatinina) de animais expostos a 50mg/kg dos agentes químicos

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinina (mg/dL)
Veículo	97,34 ± 3,33	27,67 ± 1,67	0,63 ± 0,03
FE	95,67 ± 17,90	27,67 ± 1,67	0,63 ± 0,03
HQ	81,67 ± 7,53	31,00 ± 2,89	0,73 ± 0,03

Os resultados estão expressos como média ± EPM das dosagens obtidas, em duplicata, dos soros de quatro animais por grupo.

Tabela 6 - Parâmetros funcionais hepáticos (ALT e AST) e renal (Creatinina) de animais expostos a 10 mg/kg de HQ ou FE e HQ+FE (5mg/kg de cada)

	AST (U/L)	ALT (U/L)	Creatinina (mg/dL)
Veículo	149,70 ± 27,20	41,20 ± 10,60	0,45 ± 0,02
FE	121,20 ± 1,20	31,00 ± 3,50	0,42 ± 0,02
HQ	130,60 ± 14,50	31,00 ± 8,80	0,44 ± 0,04
HQ+FE	149,00 ± 18,20	44,00 ± 6,20	0,50 ± 0,00

Os resultados estão expressos como média ± EPM das dosagens obtidas, em duplicata, dos soros de quatro animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

A toxicologia tem, como um dos seus objetivos, a avaliação de riscos ambientais considerando exposições a substâncias químicas, as quais podem ser prejudiciais ao meio ambiente e aos seres vivos. Avaliação do risco é baseada em estudos experimentais que visam o conhecimento dos mecanismos de ação tóxica e em dados epidemiológicos. As agências regulatórias optam por recomendar limites de exposição extremamente baixos e, portanto, seguros. Estudos de mecanismos em sistemas fisiológicos bem determinados podem indicar evidências valiosas para o entendimento de relações de causa-efeito e risco de exposição a substâncias químicas em específicas condições (SNYDER, 2007). Portanto, a determinação dos efeitos da exposição à HQ e seus mecanismos de ação em diferentes tecidos podem aprimorar a avaliação de risco.

Os efeitos tóxicos do BZ são atribuídos aos seus metabólitos, especialmente HQ e subsequente quinonas e semiquinonas na medula óssea, culminando em supressão hematopoiética e leucemia em humanos e animais de experimentação (FARRIS et al., 1997; DE CAPRIO, 1999; MC DONALD et al., 2001).

Este estudo, então, submeteu ratos à exposição, por período prolongado de tempo, à HQ ou FE e avaliou a capacidade imunológica frente a um estímulo lesivo. Inicialmente foi proposto um modelo experimental envolvendo as exposições a 50 mg/kg dos compostos fenólicos, para investigar seu papel nos

mecanismos responsáveis pela mobilização de neutrófilos, assim como seus efeitos durante a resposta inflamatória aguda. Neutrófilos estão entre os primeiros leucócitos recrutados dos compartimentos de reserva para o local da lesão e sua interação com diferentes células durante o processo de migração desencadeia eventos intracelulares, responsáveis pela manutenção e desenvolvimento da resposta inflamatória. Alterações neste complexo processo de mobilização podem reduzir ou aumentar o acúmulo de células brancas na área lesada; em ambos os casos, a defesa do hospedeiro é prejudicada.

Modelos experimentais *in vivo* de RIA inata e adquirida foram empregados para estudar a interferência da exposição à HQ nos eventos relacionados à migração, função e relação dos leucócitos com o endotélio vascular. Os períodos de exposição (17 dias ou 22 dias) supõem que os leucócitos são produzidos e diferenciados sob influência das substâncias químicas, possibilitando obter informações desde a gênese até a resposta ao agente agressor.

Os resultados mostraram que a exposição a 50 mg/kg (0,45 mmol/kg) de HQ induz neutrofilia, provavelmente por maior intensidade de mobilização de células segmentadas da medula óssea (LOURENÇO, 2005; MACEDO et al., 2006). Previamente foi sugerido que HQ prejudica a produção e/ou maturação de granulócitos (SNYDER, 2002, 2004). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que HQ não interfere com o número de células precursoras na medula óssea, mas induz maturação precoce de neutrófilos no último estágio de diferenciação. Em animais expostos a 50 mg/kg HQ foi detectado uma redução significativa no número de PMNs na última fase de maturação na medula óssea e aumento do número de neutrófilos no compartimento periférico.

É importante salientar que neste estudo foram também avaliados os efeitos decorrentes da exposição ao FE, uma vez que a HQ é produzida a partir da metabolização do FE. Em contraste, a exposição ao FE (50 mg/kg - 0,53 mmol/kg) não alterou nenhuma das fases de maturação na medula óssea e não modificou o número de leucócitos no sangue circulante (LOURENÇO, 2005; MACEDO et al., 2006). Estes efeitos podem ser esperados desde que o FE parece atuar sinergicamente com HQ ou outros compostos fenólicos nas alterações da linhagem granulocítica (KOLACHANA et al., 1993; MORAN et al., 1996; HENSCHLER et al., 1996).

Na circulação, os leucócitos movem-se no centro do fluxo sanguíneo. Contudo, durante estados de ativação, os leucócitos interagem com a parede do vaso da microcirculação para subsequente migração para o local da lesão (CALICH e VAZ, 2001). Modificações na reatividade da parede microvascular e na ativação de leucócitos – ambos os efeitos mediados por substâncias endógenas secretadas no sítio da lesão – promovem a interação leucócito–endotélio. Os dados obtidos mostraram que as exposições a 50 mg/kg HQ ou FE induzem o rolamento de leucócitos nas vênulas pós-capilares no mesentério. Contudo, somente leucócitos de animais expostos à HQ foram capazes de avançar no processo e aderir à parede do vaso.

Alguns estudos indicam que HQ é um potente constritor de pequenas arteríolas, principalmente por bloqueio da dilatação de microvasos dependente de NO (LUBBE et al., 1994; ZHAO e JOSHUA, 1998). É bem conhecido que a produção de NO é aumentada em resposta a Ach e que NO se difunde da célula endotelial para o citosol da célula do músculo liso adjacente para ativar a enzima

guanilil ciclase, aumentando os níveis de GMPc, resultando em relaxamento da célula muscular vascular (RAPOPORT et al., 1983). Assim, a possibilidade do aumento da interação leucócito–endotélio, detectada nos animais expostos aos compostos fenólicos, poderia resultar de modificações na reatividade microvascular foi investigada por constrição arteriolar e sua subsequente dilatação depois de aplicação tópica de NA e Ach no mesentério, respectivamente. Os resultados obtidos mostraram que o tempo requerido para resposta farmacológica foi similar em todos os grupos estudados, sugerindo que a interação leucócito–endotélio observada não depende de mudanças na reatividade microvascular. Adicionalmente, o tecido conjuntivo adjacente aos vasos da microcirculação possui mastócitos constitutivos, que uma vez ativados durante o processo inflamatório secretam mediadores que induzem o comportamento de rolamento, tais como histamina (KUBES e GRANGER, 1996; YAMAKI et al., 1998). Uma vez que as exposições à HQ e ao FE foram por via intraperitoneal e os ensaios de microscopia intravital foram realizados no leito mesentérico, foi avaliado se os agentes poderiam ter alterado o número e a habilidade de desgranulação destas células. Os resultados obtidos mostraram que as injeções dos compostos fenólicos por período de tempo prolongado não altera o número de mastócitos do mesentério, nem sua habilidade de desgranular em resposta ao composto 48/80, sugerindo que o elevado número de leucócitos em rolamento nas vênulas pós-capilares dos animais expostos aos compostos fenólicos não envolve substâncias secretadas por mastócitos ativados.

A interação de moléculas de adesão expressas nas membranas de leucócitos e endotélio medeia as ligações iniciais entre estas células e suas

expressões exacerbadas medeiam a ativação celular (LEY, 2002; EHRHARDT et al., 2004). Neutrófilos rapidamente expressam L-selectina e subsequentemente β_2 integrina sob estimulação por fatores quimiotáticos. Este padrão de expressão de moléculas de adesão durante a ativação de leucócitos em algumas doenças inflamatórias tem sido extensivamente demonstrado (FERNANDEZ-SEGURA et al., 1996; WALCHEK et al., 1996; WILLIAMS e SOLOMKIN, 1999; KABA e KANAUF, 2001; NOGUERA et al., 2004; CAIMI et al., 2005). Os resultados obtidos sugerem que a exposição a 50 mg/kg HQ induz ativação de neutrófilos, como indicado pela diminuição da expressão de L-selectina e aumento da expressão de β_2 integrina na membrana celular. Esta ativação não acontece no endotélio vascular do músculo cremaster, já que a expressão de moléculas de adesão ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 foi similar em tecidos de animais expostos aos agentes químicos e ao veículo. As mudanças de expressão de moléculas de adesão em neutrófilos podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela maior migração de neutrófilos para a região subcutânea inflamada comparada aos animais expostos ao FE ou veículo (LOURENÇO, 2005; MACEDO et al., 2006).

Em conjunto, estes resultados suportam a hipótese que os metabólitos do BZ exercem sua toxicidade nos granulócitos e influenciam na defesa do hospedeiro contra agentes não específicos. Estes dados foram publicados (MACEDO et al., 2006) e foi o primeiro estudo indicando ativação de neutrófilos por exposição *in vivo* a 50 mg/kg de HQ, resultando em excessiva resposta inflamatória. Adicionalmente, os dados obtidos demonstraram um papel diferencial dos compostos fenólicos na reatividade celular, já que ao contrário da exposição a 50 mg/kg de HQ, a administração de 50 mg/kg de FE não promoveu alterações na

maturação e ativação de neutrófilos. Embora, o FE seja endogenamente transformado em HQ, esta metabolização pode não ser suficiente para gerar o mesmo nível de ativação dos neutrófilos, como a direta exposição à HQ. É importante enfatizar que ratos metabolizam BZ e tem sido usado como modelo comparável da exposição humana pela similaridade de biotransformação do solvente (SAMMENTT et al., 1979; ORZECOWSKI et al., 1995; HENDERSON, 1996).

Infecções bacterianas são causas relevantes de morbidade e mortalidade no mundo. As respostas às infecções envolvem uma interação complexa entre os componentes bacterianos e o sistema imune. Endotoxinas liberadas por bactérias gram-negativas são estímulos potentes para o sistema imune e a resposta competente do organismo a estes agentes determina a evolução do processo. Como a pele e a mucosa gastrintestinal, os pulmões são continuamente expostos a diversos microorganismos pelo contato com o meio externo (MARTIN e FREVERT, 2005). Desta forma, outro objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das exposições sobre a RIA induzida pela inalação de LPS de *S. abortus* e, também, exposições a doses menores que a preconizada pela literatura e reconhecida como segura por agências regulamentadoras. Assim, os animais foram expostos a 5 e 10 mg/kg (0,04 e 0,11 mmol/kg) de HQ, 5 e 10 mg/kg (0,05 e 0,11 mmol/kg) de FE ou HQ associada ao FE (5 mg/kg de cada agente químico) e a RIA induzida no 18º dia após o início das exposições. É importante salientar que também foram estudados os efeitos em animais expostos ao FE e expostos simultaneamente à HQ e FE, pelas razões citadas acima.

Os resultados obtidos demonstraram que os animais expostos a baixas doses de HQ (isolada e associada ao FE) e desafiados a resposta inflamatória pulmonar, usando lipopolisacarídeo de *S. abortus* como indutor, houve comprometimento da resposta do organismo, por inibição do recrutamento celular. FE não alterou a migração de leucócitos para o pulmão inflamado, mas potencializou o efeito inibidor do recrutamento de leucócitos PMNs da HQ (FERREIRA, 2006; FERREIRA et al., 2007). Eastmond et al. (1987) demonstraram o efeito potencializador do FE na mielotoxicidade mediada por HQ em camundongos, enquanto que FE isolado não foi mielotóxico. A mielotoxicidade está diretamente envolvida com a oxidação da HQ a quinonas e semiquinonas, reação catalisada por MPO na medula óssea. FE estimula a atividade de MPO (SUBRAHMANYAM et al. 1991).

Alterações na secreção de mediadores ou nas funções celulares responsáveis pela migração do leucócito no interstício podem estar envolvidas no mecanismo da inibição do recrutamento celular induzido pela exposição à HQ, uma vez que a expressão de moléculas que medeiam a interação leucócito-endotélio não foi alterada. As expressões de L-selectina e β_2 integrina nos leucócitos circulantes, bem como das imunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) na célula endotelial da microcirculação pulmonar foram equivalentes em todos os grupos de animais estudados. Estes dados foram publicados (FERREIRA et al., 2007).

É importante ressaltar que os limites de exposição à HQ (2 mg/m³) e ao FE (19 mg/m³) são dependentes de dose e tempo de exposição, via de administração e variabilidade genética (ACGIH, 2003).

A exposição crônica a poluentes atmosféricos está relacionada ao desenvolvimento de doenças respiratórias como a asma. Esta é uma inflamação alérgica crônica das vias aéreas determinada pela interação de fatores genéticos e ambientais (PEDEN, 2005; MOORE, 2008). Inflamação alérgica pulmonar é caracterizada por constrição das vias aéreas, aumento da permeabilidade capilar, secreção de muco e recrutamento de células inflamatórias (GALLI et al., 2005), contribuindo para disfunção pulmonar. Neste contexto, foi observado que a exposição à HQ (5, 10 e 50 mg/kg) e ao FE (5 e 10 mg/kg) isolado ou em associação (5 mg/kg de cada) reduz a reatividade das vias aéreas e inflamação pulmonar, evidenciado por decréscimo da força de contração traqueal *ex vivo* e diminuído recrutamento de células inflamatórias para o espaço alveolar depois do desafio com o antígeno (LOURENÇO, 2005; FERREIRA, 2006). Embora eosinófilos estejam ligados a gênese de doenças inflamatórias alérgicas, no modelo de inflamação alérgica, utilizado neste estudo, neutrófilos são as células predominantes no LBA, pois estas são as primeiras células a serem recrutadas para as vias aéreas depois da exposição a um antígeno ou lesão (FOLEY e HAMID, 2007).

Estudando os mecanismos deste efeito e os resultados obtidos revelam claramente que a exposição 5, 10 ou 50 mg/kg de HQ e 5 ou 10 mg/kg de FE isolado ou associado (5 mg/kg de cada) modifica a resposta alérgica pulmonar imediata e tardia. Em função do recrutamento celular durante o processo inflamatório envolver tráfego celular da corrente circulatória para o sítio da lesão foi investigado se a exposição à HQ e ao FE pode estar associada a mudanças no tráfego de leucócitos. Interessantemente, as exposições não alteram o perfil de

leucócitos circulantes, neste modelo, indicativo que exclui a hematotoxicidade da HQ (KING et al., 1987, 1989; ROSS et al., 1996; SMITH et al., 2000; KALF et al., 1996; SNYDER, 2002). Adicionalmente, a exposição a 50 mg/kg de HQ não altera a expressão das moléculas de adesão L-selectina e β_2 integrina na membrana de leucócitos periféricos. Também não há modificação na expressão de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 no endotélio vascular do pulmão. De forma geral, o prejuízo da migração de leucócitos em ratos alérgicos expostos à HQ parece não estar relacionado com mudanças na mobilização periférica de leucócitos da medula óssea, seu estado de ativação na corrente circulatória ou ativação do endotélio vascular. Ainda, a atividade diminuída da MPO em homogeneizado de pulmão de ratos expostos a 5 e 10 mg/kg de HQ e FE, isolados e associados (5 mg/kg de cada), demonstra que os leucócitos não ficaram retidos no tecido pulmonar (LOURENÇO, 2005).

Portanto, a hipótese proposta foi que as exposições poderiam modificar a ativação imunológica de mastócitos. Como já salientado anteriormente, os mastócitos secretam mediadores importantes na RIA. Na resposta alérgica os mastócitos são ativados por ligação de IgE antígeno específica nos receptores de IgE de alta afinidade ($Fc\epsilon RI$). Mastócitos sensibilizados secretam em poucos minutos mediadores inflamatórios que incluem: histamina, serotonina, citocinas, proteases, eicosanóides e interleucinas (GALLI et al., 2005; RIVERA e GILFILLAN, 2006). Como consequência, estes mediadores induzem uma contração muscular inicial das vias aéreas, estímulo de terminações nervosas e secreção de muco. Adicionalmente, eles contribuem para o desenvolvimento da resposta alérgica por ativação de células residentes e células vasculares para

secretar mediadores adicionais e induzem o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório (de LIMA e da SILVA, 1998; NEMMAR et al., 1999; DAMAZO et al., 2001; WYSS et al., 2005; LUKACS et al., 2005; LINO DOS SANTOS FRANCO et al., 2006). Neste estudo foi observado que a exposição a 5, 10 ou 50 mg/kg de HQ, 5 ou 10 mg/kg de FE isolado ou associado (5 mg/kg de cada) reduz a contração traqueal induzida por OA. Certamente por inibir a desgranulação de mastócitos, uma vez que mastócito perivascular no mesentério de ratos alérgicos expostos a 50 mg/kg de HQ apresentaram menor desgranulação em resposta a OA. Contudo, a menor desgranulação de mastócitos observada em animais expostos à HQ, FE ou ambos agentes fenólicos não reflete mudanças no número de células ou na habilidade de desgranulação. Estas evidências foram obtidas pelas seguintes observações: 1) as traquéias de todos os animais responderam de maneira similar ao composto 48/80, um agente secretagogo de mastócito que produz ativação de fosfolipase D e G por receptores independentes de proteína (PALOMAKI e LAITINEN, 2006); 2) o número de mastócitos no mesentério e sua habilidade de desgranular após aplicação do composto 48/80 foram equivalentes.

Títulos reduzidos de anticorpos anafiláticos foram encontrados no soro de animais alérgicos expostos a todos os esquemas estudados reforçando a sugestão que os compostos fenólicos podem interferir com os mecanismos imunológicos associados com a fase de sensibilização. Sendo assim, formulou-se a hipótese que os níveis reduzidos de anticorpos anafiláticos IgE e IgG, reconhecidos mediadores inflamatórios alérgicos, pode ser um dos fatores envolvidos no prejuízo da resposta alérgica observada em ratos submetidos as

exposições químicas, provavelmente por decréscimo da desgranulação de mastócitos em resposta ao desafio antigênico.

A produção de anticorpos anafiláticos específicos por linfócitos B acontece durante a sensibilização, primeiro encontro com o antígeno, quando este é apresentado por APCs. Consequentemente, linfócitos Th2 são ativados e proliferam por ação de IL-4, IL-5 e IL-13. Subsequentemente estes linfócitos T ativados secretam citocinas, IL-4 e IL-13, as quais direcionam os linfócitos B a produzir específicos anticorpos (MURPHY e REINER, 2002; CAREAU et al., 2002; ANSEL et al., 2003). Como os níveis de anticorpos anafiláticos estavam reduzidos, foi avaliada a capacidade de proliferação e diferenciação de linfócitos que poderia ocasionar reduzida atividade humoral. Apesar de ensaios *in vitro* mostrar a habilidade de altas doses de HQ em inibir a proliferação de linfócitos T e B (LI et al., 1996; DOEKER et al., 2000; MCCUE et al., 2000; POIRIER et al., 2002), esta evidência não é conclusiva em exposições *in vivo* à HQ. Inversamente, tem-se mostrado que HQ em camundongos sensibilizados aumenta o número de linfócitos B em linfonodo poplíteo (EWENS et al., 1999) e aumenta níveis de IgE circulante em camundongos sensibilizados a uma proteína de molusco (LEE et al., 2002). Os resultados aqui observados não coincidem com estes estudos prévios, já que o protocolo de exposição a 50 mg/kg de HQ empregado não altera o número de linfócitos circulantes, no baço ou sua proliferação *in vitro* induzido por estímulo antigênico ou por ConA. Estes resultados divergentes podem ser devido a diferenças nos protocolos de exposição. No modelo deste estudo os animais foram submetidos a longo tratamento com o agente químico antes da

sensibilização com o antígeno enquanto Lee et al. (2002) injetou HQ nos ratos diariamente durante a semana posterior ao primeiro contato com o antígeno.

A interação do complexo TCR com o peptídeo do antígeno apresentado pelo MHC na APC é o evento central na ativação de linfócitos T. Contudo, para subsidiar a ativação de linfócitos T é requerida amplificação de sinal por moléculas acessórias (GIMFERRER et al., 2004). A amplificação e modificação de sinal do TCR por moléculas co-estimulatórias habilita linfócitos T antígeno específico pré-ativados a proliferar, secretar citocinas e expressar em sua superfície moléculas para adicional interação célula-célula envolvida no desenvolvimento da resposta imunológica (MUELLER et al., 1989; KALLINICH et al., 2005). Então, foi investigado o papel da exposição a 50 mg/kg de HQ na expressão de moléculas co-estimulatórias envolvidas na proliferação de linfócitos T e ativação de linfócitos B. Os resultados obtidos mostram que a exposição a 50 mg/kg de HQ prejudica a expressão de receptor de CD45 e CD6 em linfócitos de baço ativados por OA. CD6 atua como molécula co-estimulatória sinergicamente com TCR ou CD28 para estimular a proliferação de linfócitos T (GIMFERRER et al., 2004). A proliferação de linfócitos não foi alterada pela exposição à HQ, é possível que outras moléculas, como CD28, tenham maior influência no processo. Esta hipótese pode ser reforçada pela expressão normal de ligantes de CD28: CD80 e CD86. CD45 é uma importante proteína da superfície de células hematopoiéticas nucleadas, compreendendo cerca de 10% da área de superfície de linfócitos T e B envolvida na proliferação, diferenciação e função dos linfócitos (THOMAS, 1989). Anticorpos anti-CD45 alteram a sinalização em linfócitos T e B (MORIKAWA et al., 1991; HASEGAWA et al., 1990; FARIS et al., 1994; MITTLER et al., 1994) e inibidor do

receptor de CD45 regula negativamente as reações de hipersensibilidade de contato e anafilaxia dependente de IgE *in vivo* e *in vitro* (HAMAGUCHI et al., 2001). Estes resultados suportam a hipótese que a exposição aos compostos fenólicos pode alterar a interação entre linfócitos T e B, com subsequente prejuízo da resposta humoral detectada neste estudo.

Em conjunto os dados mostram, até aqui, que a inibição da inflamação alérgica pulmonar depois da exposição prolongada aos agentes químicos está associada com a expressão deficiente de moléculas co-estimulatórias em linfócitos T e B, que parece levar a produção reduzida de anticorpos e à falha na ativação de mastócitos (MACEDO et al., 2007).

Macrófagos e CDs estão envolvidos na apresentação do antígeno ao sistema imunológico, fornecendo dois sinais específicos para alcançar ótima ativação de linfócitos T. O primeiro sinal é desencadeado pela ligação no TCR do complexo peptídeo-MHC na superfície da APC apresentando o antígeno. O segundo e co-estimulatório sinal é emitido por algumas proteínas integradas na superfície da APC ligando a distintos receptores na superfície do linfócito T. Receptores CD28 e CD40L de linfócitos T interagem, respectivamente, com CD80/CD86 e CD40 nas APCs (PLANELLES et al., 2003). Investigando a influência das exposições à HQ, FE ou ambos associados nesta sinalização na fase de sensibilização este estudo demonstra que a expressão de moléculas co-estimulatórias CD40, CD80, CD86 e de moléculas de adesão β_2 integrina e ICAM-1 por macrófagos peritoniais estimulados por OA não foi alterada, indicando que a habilidade de interação celular dos macrófagos aos linfócitos possivelmente não está alterada. Interessantemente, o número e tipos de células peritoniais não

foram alterados pelas exposições. Este dado descarta uma ação tóxica local dos agentes fenólicos, já que foram administrados por via intraperitoneal.

Por outro lado, as exposições determinam diminuída secreção de INF- γ quando as células peritoneais foram estimuladas *in vitro* com OA. Porém, a secreção de IL-4 e IL-10 não foram alteradas pelas exposições químicas. Macrófagos ativados liberam IL-1 β , TNF- α e IL-12. Estas citocinas pró-inflamatórias ativam linfócitos T e células NK para secretarem IL-2 e INF- γ , as quais ativam os macrófagos para a atividade microbicida (AKIRA et al., 1990; HSIEH et al., 1993; YIN et al., 2007). Por outro lado, IL-10 exerce atividade contrária, inibe a atividade microbicida de macrófagos (FLEMING et al., 1999). Portanto, os reduzidos títulos de anticorpos anafiláticos observados nos animais expostos aos agentes químicos podem ser devido à falha na ativação da atividade microbicida de macrófago, fase preliminar a apresentação do antígeno.

Então as células peritoneais foram desafiadas com *Candida albicans*. Os resultados obtidos demonstram que a atividade fungicida *in vitro* foi inibida pela exposição aos agentes químicos. Capacidade reduzida de fagocitose e de digestão de patógenos pode comprometer a defesa do organismo a microorganismos patogênicos, uma vez que afeta a exposição de epítomos antigênicos a linfócitos T por macrófagos durante a interação célula-célula. A destruição de patógenos por macrófagos é associada com produção de vários mediadores, incluindo EROS e nitrogênio, quimiocinas e citocinas (SIBILLE e REYNOLDS, 1990; LASKIN e PENDINO, 1995; ZHANG et al., 2000).

Estas observações na fase de sensibilização demonstram que as observações que culminam na migração celular reduzida para o pulmão alérgico

inflamado em ratos expostos aos compostos fenólicos podem ser decorrentes, também, de efeitos imunossupressores na fase de sensibilização. Similarmente, ensaios *in vitro* têm demonstrado que HQ bloqueia a produção de linfócitos e prejudica sua proliferação (LI et al., 1996, 1997; POIRIER et al., 2002; MCCUE et al., 2000, 2003). Gong e Chen (2003) observaram que extrato de polifenóis da fumaça de tabaco inibe a apresentação de antígeno, sem perda da viabilidade de APCs e níveis de MHCII, CD40 e B7 de APC.

Em conjunto, os dados obtidos mostram que a exposição aos agentes fenólicos, especialmente à HQ, compromete a resposta imunológica do hospedeiro. Alguns mecanismos aqui identificados sugerem a ação dos mesmos sobre diversas etapas responsáveis pela migração de leucócitos para o foco da lesão.

Interessantemente, uma parte destes resultados foi obtida com doses menores que as preconizadas pela literatura e os dados adicionais descritos a seguir mostram, ainda, que as doses estudadas não apresentaram alterações funcionais nos órgãos de metabolismo e excreção.

O exame histopatológico do fígado dos animais expostos a 50 mg/kg de HQ revelou hipercromatismo nuclear, quando comparado aos tecidos dos animais expostos ao veículo e a 50 mg/kg de FE. Os animais expostos ao FE apresentaram maior congestão vascular, em relação aos animais expostos ao veículo e à HQ. Ainda, apresentaram megalocitose quando comparado aos animais expostos ao veículo. A tumefação celular se estabelece por acúmulo de água por desequilíbrio no controle do gradiente osmótico na membrana citoplasmática e nos mecanismos de absorção e eliminação de água e eletrólitos

intracelulares. Esta tumefação leva a vacuolização celular (turvação dos vacúolos), ocasionando ruptura celular caracterizando necrose celular (BULL, 1961). A tumefação celular é seguida por congestão vascular e megalocitose observada na exposição ao FE (50 mg/kg - 0,53 mmol/kg). A megalocitose é característica de agentes antimitóticos ou por deficiência de vitaminas do complexo B. Conforme Kelly (1993), o efeito antimitótico não significa apenas inibição da síntese de DNA, também indica síntese continuada de nucleoproteínas associadas a uma inibição da mitose.

O exame histopatológico do rim somente mostrou alteração na exposição à HQ (50 mg/kg) com aumento do espaço de filtração glomerular, quando comparado aos animais expostos ao veículo e ao FE (50 mg/kg). Por esta observação microscópica pode-se presumir inicialmente que HQ esteja interferindo na barreira de filtração glomerular, aumentando a permeabilidade do filtrado para o espaço de filtração e conseqüentemente pode provocar lesões dos túbulos intersticiais (RIYUZO et al., 2004).

As alterações histológicas observadas não refletem maiores prejuízos funcionais dos órgãos analisados, pois os marcadores sorológicos de função dos animais expostos (em todas as doses estudadas) se mantiveram nos níveis dos animais expostos somente ao veículo. A ALT e AST estão predominantemente presentes no fígado e sua relação é um excelente marcador para lesão ou necrose hepática. Os níveis se tornam elevados sempre que o processo da doença afete a integridade hepática, elevações da ALT são raramente observadas no soro em condições em que não há doença hepática parenquimatosa. Além disso, a elevação da atividade da ALT persiste por mais tempo que a atividade da

AST. Tem sido utilizada principalmente para conferir a origem hepática de um aumento de AST e em certas ocasiões no diagnóstico diferencial de hepatopatia através da relação ALT/AST, que é menor que 1 (DEVLIN, 2000; MOTTA, 2000; MURRAY et al., 2002).

Hipercreatinina é decorrente de qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular, promove uma menor excreção urinária e, conseqüentemente, um aumento da concentração plasmática de creatinina. Os níveis muitas vezes não ultrapassam os valores normais até que 50 a 70% da função renal esteja comprometida (DEVLIN, 2000; MURRAY et al., 2002). Nefropatia foi observada em ratos Fischer 344 que receberam 50 mg/kg de HQ via oral por 103 semanas. Machos são mais sensíveis a nefropatia em relação a fêmeas. A nefropatia progressiva crônica exacerbada está envolvida com adenoma de célula tubular renal. A incidência é baixa em ratos machos expostos a 50 mg/kg de HQ (8/55) em comparação aos ratos do grupo controle (0/55) (KARI et al., 1992).

Em conjunto, os dados aqui obtidos mostram que a exposição a compostos fenólicos obtidos da metabolização do benzeno, onde a HQ possui papel importante, interfere com várias etapas da reação inflamatória adquirida ou inata e que, nas condições experimentais aqui empregadas, estas só são perceptíveis na vigência de resposta do organismo ao trauma. Esta afirmação é baseada nos efeitos biológicos mensuráveis durante a exposição ocupacional e ambiental a agentes fenólicos em humanos, preconizados pelas agências regulamentadoras. Neste caso, o efeito mensurável é o hemograma e marcadores de função hepática e renal. Assim, os dados obtidos neste trabalho poderão contribuir para a

implementação de novos marcadores biológicos/exposição, que facilite a avaliação do risco.

6. RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS E CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1) Após exposição de ratos Wistar a 50 mg/kg de HQ (13 doses, uma vez ao dia, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) e indução de resposta inflamatória inata aguda foram observados os seguintes eventos:

- Maior interação leucócito–endotélio;
- Ativação de neutrófilos, evidenciada pela maior expressão da molécula de adesão β_2 integrina;
- Nenhuma alteração na reatividade microvascular em resposta a NA e Ach;
- Nenhuma alteração do número ou a habilidade de desgranulação de mastócitos no mesentério;
- Nenhuma alteração na expressão de moléculas de adesão do endotélio vascular (ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1).

O que permite concluir que o maior número de neutrófilos no exsudato inflamatório destes animais pode ser dependente da maior ativação destas células na circulação e sua maior interação ao endotélio microvascular.

A exposição ao FE, nas mesmas condições, não modificou a resposta inflamatória.

2) Após exposição de 5 ou 10 mg/kg de HQ ou FE ou de ambos simultaneamente (13 doses, uma vez ao dia, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) e indução de resposta inflamatória inata pulmonar foram observados que as exposições não alteraram as expressões de moléculas de adesão (L-selectina e β_2 integrina) na membrana de neutrófilos circulantes ou de seus contra-ligantes no endotélio vascular pulmonar (ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1).

O que permite concluir que o prejuízo no influxo leucocitário para o exsudato inflamatório observado nestes animais não depende de modificações nas interações leucócito-endotélio.

3) Após exposição de 50 mg/kg de HQ, 5 ou 10 mg/kg de HQ ou FE e após exposição de 5 mg/kg de ambos os agentes fenólicos simultaneamente (16 doses, uma vez ao dia, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) e indução de resposta inflamatória alérgica pulmonar foram observados os seguintes eventos:

- Nenhuma alteração na expressão de moléculas de adesão (L-selectina e β_2 integrina) na membrana de neutrófilos circulantes ou de seus contra-ligantes no endotélio vascular pulmonar (ICAM-1, PECAM-1 ou VCAM-1);
- Menor desgranulação de mastócitos do mesentério em resposta a OA;
- Menores títulos de anticorpos anafiláticos circulantes;

- Nenhuma alteração na capacidade de proliferação de linfócitos de baço em resposta a OA e ConA *in vitro*;
- Menor expressão de moléculas co-estimulatórias CD45R e CD6 na membrana de linfócitos de baço, mas sem alteração no número destas células;
- Nenhuma alteração na expressão de moléculas co-estimulatórias CD80, CD40 e CD86 e moléculas de adesão β_2 integrina e ICAM-1 e dos tipos celulares das células peritoniais na fase de sensibilização imunogênica;
- Concentração diminuída de INF- γ no sobrenadante de cultura células peritoneais na fase de sensibilização imunogênica, em resposta a OA;
- Menor da atividade fungicida de macrófagos peritoniais na fase de sensibilização imunogênica.

O que permite concluir que a exposição à HQ, FE ou de ambos simultaneamente modifica eventos na fase de sensibilização e de produção de anticorpos anafiláticos, gerando menor concentração destes na circulação, e subsequente redução na resposta inflamatória alérgica.

- 4) As exposições aos compostos fenólicos em todas as doses estudadas não determinam alterações hepáticas ou renais, evidenciadas por nenhuma alteração nas atividades enzimáticas das transaminases hepáticas e nível sérico de creatinina.

REFERÊNCIAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. *Imunologia celular e molecular*. 2.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. *TLVS and BEIS based on the documentation for threshold limit values for Chemical Substances and Physical Agents and biological exposure indices*. Cincinnati: ACGIH, 2003. 219p.

Akira, S.; Hirano, T.; Taga, T.; Kishimoto, T. Biology of multifunctional cytokines: IL-6 related molecules (IL-1 and TNF). *FASEB J.*, 4: 2860-2867, 1990.

Alanko, J.; Riutta, A.; Holm, P.; Mucha, I.; Vappatalo, H.; Metsä-Ketela, T. Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties. *Free Rad. Biol. Med.*, 26(1-2): 193-201, 1999.

Alanko, J.; Riutta, A.; Vappatalo, H. Phenols inhibits prostaglandin E2 synthesis in A23187-stimulated human whole blood and modify the ratio of arachidonic acid metabolites. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 52: 299-301, 1995.

Ali, H.; Richardson, R.M.; Haribabu, B.; Snyderman, R. Chemoattractant receptor cross-desensitization. *J. Biol. Chem.* 274(10):6027-6030, 1999.

Ansel, K.M.; Lee, D.U.; Rao, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.*, 4(7): 616-623, 2003.

Bironaite, D.; Siegel, D.; Moran, J.L.; Weksler, B.B.; and Ross, D. Stimulation of endothelial IL-8 (eIL-8) production and apoptosis by phenolic metabolites of benzene in HL-60 cells and human bone marrow endothelial cells. *Chemico-Biol. Interac.*, 149: 37-49, 2004.

Bois, F.Y.; Smith, M.T.; Spear, R.C. Mechanisms of benzene carcinogenesis: application of a physiological model of benzene pharmacokinetics and metabolism. *Toxicology Letters*. 56, 283-298, 1991.

Bull L.B. Liver diseases in livestock from intake of hepatotoxic substances. *Aust. Vet. J.*, 37: 126-130, 1961.

Burns, J.A.; Issekutz, T.B; Yagita, H.; Issekutz, A.C. The alpha-4-beta-1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha-5-beta-1 (VLA-5, CD49e/CD29)

integrins mediate beta-2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. *J. Immunol.* 166: 4644-4649, 2001.

Caimi, G.; Montana, M.; Carollo, C.; Porretto, F.; Vaccaro, F.; Canino, B.; Lo Presti, R. Polymorphonuclear leukocyte integrins in chronic renal failure. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 32(1): 43–49, 2005.

Calich, V.; Vaz, C. *Imunologia*. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. 260p.

Careau, E.; Sirois, J.; Bissonnette, E.Y. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 26(5): 579-586, 2002.

Chen, L.; Lin, S.X.; Overbergh, L.; Mathieu, C.; Chan, L.S. The disease progression in the keratin 14 IL-4-transgenic mouse model of atopic dermatitis parallels the up-regulation of B cell activation molecules, proliferation and surface and serum IgE. *Clin Exp Immunol.* , 142(1):21-30, 2005.

Coleman, J.W.; Layton, G.T.; Stanworth, D.R. The kinetics of *in vivo* sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur. J. Immunol.*, 13(12): 994-998, 1983.

Dahlen, S.E.; Bjork, J.; Hedquist, P.; Arfors, K.E.; Hammarstrom, S.; Lindgren, J.A.; Samuelsson, B.. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: *in vivo* effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78(6): 3887–3891, 1981.

Dal Secco, D.; Paron, J.A.; Oliveira, S.H.P.; Ferreira, S.H.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide*, 9: 153-164, 2004.

Damazo, A.S.; Tavares de Lima, W.; Perretti, M.; Oliani, S.M. Pharmacological modulation of allergic inflammation in the rat airways and association with mast cell heterogeneity. *Eur. J. Pharmacol.*, 426(1-2): 123-130, 2001.

Davis, .M.; Carpenter, D.C.; Stahl, J.M.; Zhang, W.; Hynicka, W.P.; Griswold, D.E.; Human granulocyte CD11b expression as a pharmacodynamic biomarker of inflammation. *J. Immunol. Methods*, 240: 125-132, 2000.

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

de Lima, W.T.; da Silva, Z.L. Contractile responses of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. *Gen. Pharmac.* 30(5): 689-95, 1998.

Devlin T.M. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas*. 4 ed. São Paulo: Edgar Bliincher, 2000.

Doepker, C.L.; Dumont, K.W.; O'Donoghue, J.; English, J.C. Lack of induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with hydroquinone. *Mutagenesis*, 15(6): 479-487, 2000.

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

Edwards, J.C.; Sedwick, A.D.; Willoughby, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J. Pathol.*, 134(2): 147–156, 1981.

Ehrhardt, C.; Kneuer, C.; Bakowsky, U. Selectins—an emerging target for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56: 527–549, 2004.

Ewens, S.; Wulferink, M.; Goebel, C.; Gleichmann, E. T cell dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Arch. Toxicol.*, 73(3): 159–167, 1999.

Faris, M.; Gaskin, F.; Parsons, J.T.; Fu, S.M. CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein. *J. Exp. Med.*, 179(6): 1923–1931, 1994.

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

Farsky, S.H.P.; Borelli, P.; Fock, R.A.; Proto, S.Z.; Ferreira Jr, J.M.; Mello, S.B.. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm. Res.* 53(9): 442–452, 2004.

Farsky, S.H.P.; Sannomiya, P.; Garcia-Leme, J. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte–endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc. Biol.*, 57(3): 379–386, 1995.

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

Feitshans, I.L. Law and regulation of benzene. *Environ. Health Perspect.*, 82: 299-307, 1989.

Fernandez-Segura, E.; Garcia, J.M.; Campos, A. Topographic distribution of CD18 integrin on human neutrophils as related to shape changes and movement induced by chemotactic peptide and phorbol esters. *Cell Immunol.*, 171(1): 120–125, 1996.

Ferreira, A. *Efeitos da exposição a baixas doses de hidroquinona e fenol sobre a mobilização e função leucocitária*. 2006 [Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo]. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. 114pp.

Ferreira, A.; Macedo, S.M.D.; Ligeiro-Oliveira, A.P.; Tavares de Lima, W.; Farsky, S.H.P. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, 43(3): 455-464, 2007.

Fleming, S.D.; Leenen, P.J.; Freed, J.H.; Campbell, P.A. Surface interleukin-10 inhibits listericidal activity by primary macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 66(6): 961-967, 1999.

Foley, S.C.; Hamid, Q. Images in allergy and immunology: neutrophils and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 119(5): 1282–1286, 2007.

Fortes, Z.B.; Farsky, S.P.; Oliveira, M.A.; Garcia-Leme, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes*, 40(10): 1267–1273, 1991.

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

Galli, S.J.; Kalesnikoff, J.; Grimdeston, M.A.; Piliponsky, A.M.; Williams, C.M.; Tsai, M. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23(7): 49–86, 2005.

Gillis, B.; Gavin, I. M.; Arbieva, Z.; King, S.T.; Jayaraman, S.; Prabhakar, B.S. Identification of human cell responses to benzene and benzene metabolites. *Genomics*, 90(3): 324-333, 2007.

Gimferrer, I.; Calvo, M.; Mittelbrunn, M.; Farnós, M.; Sarrias, M.R.; Enrich, C.; Vives, J.; Sánchez-Madrid, F.; Lozano, F. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J. Immunol.*, 173(4): 2262-2270, 2004.

Gong, J.; Chen, S.S. Polyphenolic antioxidants inhibit peptide presentation by antigen-presenting cells. *Int. Immunopharmacol.*, 3(13-14): 1841-1852, 2003.

González-Amaro, R.; Sánchez-Madrid, F. Cell Adhesion Molecules: selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.*, 19:389-429, 1999.

Hamaguchi, T.; Takahashi, A.; Manaka, A.; Sato, M.; Osada, H. TU-572, a potent and selective CD45 inhibitor, suppresses IgE-mediated anaphylaxis and murine contact hypersensitivity reactions. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 126(4): 318–324, 2001.

Hasegawa, K.; Nishimura, H.; Ogawa, S.; Hirose, S.; Sato, H.; Shirai, T. Monoclonal antibodies to epitope of CD45R (B220) inhibit interleukin 4-mediated B cell proliferation and differentiation. *Int. Immunol.*, 2(4): 367–375, 1990.

Hazel, B.A.; Baum, C.; Kalf, G.F. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblasts. *Stem Cells*. 14(6):730-42, 1996.

Henderson, R.F. Species differences in the metabolism of benzene. *Environ. Health Persp.*, 104(6): 1173-1175, 1996.

Henderson, R.F.; Sabourin, P.J.; Bechtold, W.E.; Griffith, W.C.; Medinsky, M.A.; Birnbaum, L.S.; Lucier, G.W. The effect of dose, dose rate, route of administration, and species on tissue and blood levels of benzene metabolites. *Environ. Health Perspect.*, 82: 9-17, 1989.

Henschler, R.; Glatt, H.R.; Heyworth, C.M. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6): 1271–1274, 1996.

Hickey, M.J. Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of leukocyte recruitment. *Clin. Science*, 100: 1-12, 2001.

Hiraku, Y.; Kawanishi, S. Oxidative DNA damage and apoptosis induced by benzene metabolites. *Cancer Res.*, 56(22): 5172-5178, 1996.

Hong, S.H.; Jeong, H.J.; Kim, H.M. Inhibitory effects of *Xanthii fructus* extract on mast cell-mediated allergic reaction in murine model. *J. Ethnopharmacol.* 88(2-3), 229-234, 2003.

Hsieh, C.S.; Macatonia, S.E.; Tripp, C.S.; Wolf, S.F.; O'Garra, A.; Murphy, K.M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, 260(5107): 547-549, 1993.

Hylkema, M.N.; Hoekstra, M.O.; Luinge, M.; Timens, W. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent. *Clin. Exp. Immunol.*, 129: 390-396, 2002.

IARC, *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs*. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 1987.

Kaba, N.K.; Knauf, P.A. Hypotonicity induces L-selectin shedding in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 281(4): 1403–1407, 2001.

Kadono, T.; Venturi, G.M.; Steeber, D.A.; Tedder, T.F. Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions. *J. Immunol.*, 169: 4542-4550, 2002.

Kalf, G.F.; Renz, J.F.; Niculescu, R. *p*-Benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1 alpha and -1 beta to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, and interleukin-1 beta converting enzyme. *Environ. Health Perspect.*, 104(Suppl. 6): 1251–1256, 1996.

Kallinich, T.; Beier, K.C.; Gelfand, E.W.; Kroczeck, R.A.; Hamelmann, E. Co-stimulatory molecules as potential targets for therapeutic intervention in allergic airway disease. *Clin. Exp. Allergy*, 35(12): 1521–1534, 2005.

Kari, F.W.; Bucher, J.; Eustis, S.L.; Haseman, J.K.; Huff, J.E. Toxicity and carcinogenicity of hydroquinone in F344/N rats and B6C3F₁ mice. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 737-747, 1992.

Kelly W. R. *The liver and biliary system*, 319-404. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (ed.) *Pathology of Domestic Animals*. V. 2. 4th ed. San Diego: Academic Press, 1993.

Kerzic, P.J.; Pyatt, D.W.; Zheng J.H.; Gross, A.S.; Le, A.; Irons, R.D. Inhibition of NF-kappa B by hydroquinone sensitizes human bone marrow progenitor cells to TNF-alpha-induced apoptosis. *Toxicology*, 187:127-37, 2003.

Kim, S.; Vermeulen, R.; Waidyanatha, S.; Johnson, B.A.; Lan, Q.; Rothman, N.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Li, G.; Shen, M.; Yin, S.; Rappaport, S.M. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis*. 27(4): 772-781, 2006a.

Kim, S.; Vermeulen, R.; Waidyanatha, S.; Johnson, B.A.; Lan, Q.; Smith, M.T.; Zhang, L.; Li, G.; Shen, M.; Yin, S.; Rothman, N.; Rappaport, S.M. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 15(11): 2246-2252, 2006b.

King, A.G.; Landreth, K.S.; Wierda, D. Hydroquinone inhibits bone marrow pre-B cell maturation in vitro. *Mol. Pharmacol.*, 32(6): 807–812, 1987.

King, A.G.; Landreth, K.S.; Wierda, D. Bone marrow stromal cell regulation of B-lymphopoiesis. II. Mechanisms of hydroquinone inhibition of pre-B cell maturation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 250(2): 582–590, 1989.

Kolachana, P.; Subrahmanyam, VV.; Meyer, K.B.; Zhang, L.; Smith, M.T. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells *in vitro* and in the bone marrow *in vivo*. *Cancer Res.* 53: 1023-1026, 1993.

Kubes, P.; Granger, D.N. Leukocyte-endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc. Res.*, 32: 699–708, 1996.

Kubes, P. Introduction: The Complexities of leukocyte recruitment. *Immunology*, 14: 65-72, 2002.

Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. *Acute and chronic inflammation*. In: Kumar, V.; Abbas, A.K.; Fausto, N. (ed.) *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. 7th. Elsevier. 47-86, 2005.

Laskin, D.; Pendino, K.J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 35: 655-677, 1995.

Lebedeva, T.; Dustin, M.L.; Sykulev, Y. ICAM-1 co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.*, 17(3): 251-258, 2005.

Lee, J.Y.; Kim, J.Y.; Lee, Y.G.; Shin, W.C.; Chum, T.; Rhee, M.H.; Cho, J.Y. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. *Mol. Cells*, 23(2): 198-206, 2007.

Lee, M.H.; Chung, S.W.; Kang, B.Y.; Kim, K.M.; Kim, T.S. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4⁺ T cells and increases immunoglobulin E levels in antigen-primed mice. *Immunol.*, 106(4): 496-502, 2002.

Ley, K. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophil. *Immunol. Rev.*, 186(1): 8-18, 2002.

Ley, K.; Kansas, G.S. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Rev.*, 4:1-11, 2004.

Li, Q.; Aubrey, M.T.; Christian, T.; Freed, B.M. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 38(2):158-165, 1997.

Li, Q.; Geiselhart, L.; Mittler, J.N.; Mudzinski, S.P.; Lawrence, D.A.; Freed, B.M. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139(2):317-23, 1996.

Li, Q.; Kasten-Jolly, J.; Yen, Y.; Freed, B.M. Reversal of hydroquinone-mediated suppression of T cell proliferation by transfection of the M2 subunit of ribonucleotide reductase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 150: 154-157, 1998.

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

Lourenço, E.L.B. *Efeitos dos tratamentos crônicos com produtos de biotransformação do benzeno sobre a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares na vigência de resposta inflamatória*, 2005 [Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo]. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. 82pp.

Lubbe, A.S.; Garrison, R.N.; Harris, P.D. Endothelium dependent microvascular responses to activated complement. *J.Surg. Res.*, 57(6): 654–660, 1994.

Lukacs, N.W.; Hogaboam, C.M.; Kunkel, S.L. Chemokines and their receptors in chronic pulmonary disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy*, 4(3): 313–317, 2005.

Macedo, S.M.D.; Lourenço, E.L.B.; Borelli, P.; Fock, R.A.; Ferreira Jr., J.M.; Farsky, S.H.P. Effect of *in vivo* phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicol.*, 220: 126–135, 2006.

Macedo, S.M.D.; Vaz, S.C.M.; Lourenço, E.L.B.; da Glória de Sousa, M.; Ligeiro-Oliveira, A.P.; Ferreira Jr, J.M.F.; Almeida, S.R.; Tavares de Lima, W.; Farsky, S.H.P. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicol.*, 241: 47-57, 2007.

Martin, T.R.; Frevert, C.W. Innate immunity in the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, 2(5): 403-411, 2005.

Mattes, J.; Yang, M.; Mahalingam, S.; Kuehr, J.; Webb, D.; Simson, L.; Hogan, S.P.; Koskinen, A.; McKenzie, N.J.; Dent, L.A.; Rothenberg, M.E.; Matthaei, K.I.; Young I.G.; Foster, P.S. Intrinsic defect in Tcell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma. *J. Exp. Med.*, 11(3): 1433-1444, 2002.

McDonald, T.A.; Holland, N.T.; Skibola, C.; Duramad, P.; Smith, M.T. Hypothesis: Phenol and Hidroquinone derived mainly from diet and gastrintestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*, 15: 10-20, 2001.

McCue, J.M.; Lazis, S.; John Cohen, J.; Modiano, J.F.; Freed, B.M. Hydroquinone and catechol interfere with T-cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.* 39 (16), 995–1001, 2003.

McCue, J.M.; Link, K.L.; Eaton, S.S.; Freed, B.M. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, 165(12): 6771-6775, 2000.

Medinsky, M.A.; Kenyon, E.M.; Seaton, M.J.; Schlosser, P.M. Mechanistic considerations in benzene physiological model development. *Environ. Health Perspect.*, 104 (Suppl 6): 1399-1404, 1996.

Medinsky, M.A.; Kenyon, E.M.; Schlosser, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. *Toxicology*, 105(2-3): 225-233, 1995.

Medinsky, M.A.; Sabourin, P.J. Lucier, G.; Birnbaum, L.S.; Henderson, R.F. A physiological model for simulation of benzene metabolism by rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99(2): 193-206, 1989.

Meredith, J.E.; Schwartz, M.A. Integrins, adhesion and apoptosis. *Cell Biology*. 7: 146-150, 1997.

Mittler, R.S.; Schieven, G.L.; Dubois, P.M.; Klussman, K.; O'Connell, M.P.; Kiener, P.A.; Herndon, V. CD45-mediated regulation of extracellular calcium influx in a CD4-transfected human T cell line. *J. Immunol.*, 153(1): 84–96, 1994.

Moore, W.C. Update in asthma 2007. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 177(10): 1068-1073, 2008.

Moran, J.L.; Siegel, D.; Ross, D. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96: 8150-8155, 1999.

Moran, J.L.; Siegel, D.; Sun, X.M.; Ross, D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol. Pharmacol.*, 50(3):610-615, 1996.

Morikawa, K.; Oseko, F.; Morikawa, S. The role of CD45 in the activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. *Int. J. Hematol.*, 54(6): 495–504, 1991.

Mota, I., Wong, D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 8, 813-820, 1969.

Motta V.T. *Bioquímica Clínica-Princípios e Interpretações*. 3 ed. Porto Alegre: Missau, 2000.

Mueller, D.L.; Jenkins, M.K.; Schwartz, R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signaling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 445–480, 1989.

Muller, M.; Sung, K.L.; Muller, W.A.; Cho, J.Y.; Roman, M.; Castaneda, D.; Nayar, J.; Condon, T.; Kim, J.; Sriramaraio, P.; Broide, D.H. Eosinophil tissue recruitment to sites of allergic inflammation in the lung is platelet endothelial cell adhesion molecule independent. *J Immunol.* 167(4):2292-7, 2001.

Muller, W.A. Leukocyte-endothelial cell interaction in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24(6):326-333, 2003.

Murphy, K.M.; Reiner, S.L. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2(12): 933–944, 2002.

Murray R.K.; Graner D.K.; Mayes P.A.; Rodwell V.W. *Harper: Bioquímica*. 9 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

Nemmar, A.; Delaunois, A.; Nemery, B.; Dessy-Doize, C.; Beckers, J.F.; Sulon, J.; Gustin, P. Inflammatory effect of intratracheal instillation of ultrafine particles in the rabbit: role of C-fiber and mast cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 160(3): 250–261, 1999.

Noguera, A.; Sala, E.; Pons, A.R.; Iglesias, J.; MacNee, W.; Agusti, A.G. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *Chest*, 125(5): 1837–1842, 2004.

Orzechowski, A.; Schwarz, L.R.; Schwegler, U.; Bock, K.W.; Snyder, R.; Schrenk, D. Benzene metabolism in rodent hepatocytes: role of sulphate conjugation. *Xenobiotica*, 25(10): 1093–1102, 1995.

Palomaki, V.A.; Laitinen, J.T. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase d-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT_{1A} receptors in rat brain sections. *Br. J. Pharmacol.*, 147(6), 596–606, 2006.

Parke, V. Personal reflections on 50 years of study of benzene toxicology. *Environ. Health Perspect.*, 104(Suppl 6): 1123-1128, 1996.

Parke, D.V.; Williams, R.T. Studies in detoxication. 30. The metabolism of benzene. (a) The determination of benzene. (b) The elimination of unchanged benzene by rabbits. *Biochem. J.*, 46(2): 236-243, 1950.

Parke, D.V.; Williams, R.T. Studies in detoxication. XLIX. The metabolism of benzene containing ¹⁴C-benzene. *Biochem. J.*, 54(2): 231-238, 1953.

Pasquini, R.; Villarini, M.; Scassellati Sforzolini, G.; Fatigoni, C.; Moretti, M. Micronucleus induction in cells co-exposed in vitro to 50 Hz magnetic field and benzene, 1,4-benzenediol (hydroquinone) or 1,2,4-benzenetriol. *Toxicol. In vitro*, 17: 581-586, 2003.

Peden, D.B. The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 115: 213-219, 2005.

Planelles, L.; Thomas, M.C.; Maranon, C.; Morell, M.; Lopez, M.C. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 131: 41-47, 2003.

Poirier, M.; Fournier, M.; Brousseau, P.; Morin, A. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 65(19): 1437–1451, 2002.

Popper, H.H.; Pailer, S.; Wurzinger, G. Expression of adhesion molecules in allergic lung disease. *Virchows Arch.* 440: 172-180, 2002.

Pyatt, D.W.; Stillman, W.S.; Irons, R.D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149 (2), 178–184, 1998.

Pyatt, D.W.; Yang, Y.; Stillman, W.S.; Cano, L.L.; Irons, R.D. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NFkappaB in primary human CD19+ B lymphocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 16 (1), 41–51. 155–210, 2000.

Rapoport, R.M.; Draznin, M.B.; Murad, F. Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation. *Nature* 306(5939):174-176, 1983.

Ridger, V.C.; Wagner, B.E.; Wallace, W.A.H.; Hellewell, P.G. Differential effects of CD18, CD29, and CD49 integrin subunit inhibition on neutrophil migration in pulmonary inflammation. *J. Immunol.* 166: 3484-3490, 2001.

Rivera, J.; Gilfillan, A.M. Molecular regulation of mast cell activation. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117: 1214-1225, 2006.

Riyuzo M.C., Viero R.M., Macedo C.S., Bastos H.D. Padrões morfológicos de lesão glomerular e correlação com achados clinicolaboratoriais de 43 crianças com síndrome nefrótica. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, 40: 333-341, 2004.

Robinson, S.N.; Shah, R.; Wong, B.A.; Wong, V.A.; Farris, G.M. Immunotoxicological effects of benzene inhalation in male Sprague-Dawley rats. *Toxicology.* 119:227-37, 1997.

Roessler, S.; Grosschedl, R. Role of transcription factors in commitment and differentiation of early B lymphoid cells. *Semin. Immunol.*, 18(1):12-19, 2006.

Ross, D.; Siegel, D.; Schattenberg, D.G.; Sun, X.M.; Moran, J.L. Cell-specific activation and detoxification of benzene metabolites in mouse and human bone marrow: identification of target cells and a potential role for modulation of apoptosis in benzene toxicity. *Environ. Health Perspect.*, 104(Suppl. 6): 1177–1182, 1996.

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

Sabourin, P.J.; Bechtold, W.E.; Griffith, W.C.; Birnbaum, L.S.; Lucier, G.; Henderson, R.F. Effect of exposure concentration, exposure rate, and route of administration on metabolism of benzene by F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99(3): 421-444, 1989.

Sammett, D.; Lee, E.W.; Kocsis, J.J.; Snyder, R. Partial hepatectomy reduces both metabolism and toxicity of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health*, 5(5): 785–792, 1979.

Schlosser, P.M.; Bond, J.A.; Medinsky, M.A. Benzene and phenol metabolism by mouse and rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 14(12): 2477-2486, 1993.

Schrenk, D.; Orzechowski, A.; Schwarz, L.R.; Snyder, R.; Burchell, B.; Ingelman-Sundberg, M.; Bock, K. W. Phase II Metabolism of benzene. *Environ. Health Perspec.*, 104(Suppl 6): 1183-1188, 1996.

Seaton, M.J. Schlosser, P.M.; Medinsky, M.A. In vitro conjugation of benzene metabolites by human liver: potential influence of interindividual variability on benzene toxicity. *Carcinogenesis*, 16: 1519-1527, 1995.

Shibaki, A.; Katz, S.I. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp. Dermatol.*, 11(2): 126-134, 2002.

Shin, H.Y., Lee, C.S., Chae, H.J., Kim, H.R., Baek, S.H., An, N.H., Kim, H.M. Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int. J. Immunopharmacol.* 22(6), 411-418, 2000.

Sibille, Y.; Reynolds, H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 141: 471-501, 1990.

Smalley, D.M.; Ley, K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J. Cell. Mol. Med.* 9(2): 255-266, 2005.

Smith, M.T., Zhang, L., Jeng, M., Wang, Y., Guo, W., Duramad, P., Hubbard, A.E., Hofstadler, G., Holland, N.T. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of Chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis* 21 (8), 1485–1490, 2000.

Snyder, R. Benzene and Leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.*, 32(3): 155-210, 2002.

Snyder, R. Benzene's toxicity: a consolidated short review of human and animal studies by HA Khan. *Hum. Exp. Toxicol.*, 26: 687-696, 2007.

Snyder, R.; Hedli, C.C. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect*, 104 Suppl 6, 1165-71, 1996.

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

Souza, M.C.; Corrêa, M.; Almeida, S.R.; Lopes, J.D.; Camargo, Z.P. Immunostimulatory DNA from *Paracoccidioides brasiliensis* Acts as T-Helper 1 Promoter in Susceptible Mice. *Scand. J. Immunol.*, 54: 348-356, 2001.

Subrahmanyam, V.V.; Kolachana, P.; Smith, M.T, Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene myelotoxicity. *Free Rad. Res. Commun*, 15: 285-296, 1991.

Suzuki, Y.; Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Ruperez, M.; Esteban, V.; Egido, J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol*, 35, 881-900, 2003.

Tan, P.; Luscinskas, F.W.; Homer-Vanniasinkam, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, v. 17 p. 373-389, 1999.

Thomas, M.D.; Srivastava, B.; Allman, D. Regulation of peripheral B cell maturation. *Cell Immunol.* 239(2):92-102, 2006.

Thomas, M.L. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.*, 7: 339-369, 1989.

Tomioka, M.; Ida, S.; Shindoh, Y.; Ishihara, T.; Takishima, T. Mast cell in bronchoalveolar lumen of patients with bronchial asthma. *Am. Rev. Respir. Dis.* 129: 1000-1005, 1984.

Tracey, K.J. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J. Clin. Invest.*, 117: 289-296, 2007.

Tracey, K.J. The inflammatory reflex. *Nature*. 420: 853-59, 2002.

Vassallo, R.; Tamada, K.; Lau, J.S.; Kroening, P.R.; Chen, L. Cigarette smoke extract suppress human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming. *J. Immunol.*, 175: 2684-2691, 2005.

Walcheck, B.; Kahn, J.; Fisher, J.M.; Wang, B.B.; Fisk, R.S.; Payan, D.G.; Feehan, C.; Betageri, R.; Darlak, K.; Spatola, A.F.; Kishimoto, T.K. Neutrophil rolling altered by inhibition of Iselectin shedding in vitro. *Nature*, 380(6576): 720–723, 1996.

Wan, J.; Badham, H.J.; Winn, L. The role of c-MYB in benzene-initiated toxicity. *Chemico-Biological Interactions*. 153–154: 171–78, 2005.

Wiedle, G.; Dunon, D.; Imhof, B.A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 38(1):1-31, 2001.

Williams, M.A.; Solomkin, J.S. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.*, 65(6): 725–736, 1999.

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

Wyss, D.; Bonneau, O.; Trifilieff, A. Mast cell involvement in the adenosine mediated airway hyper-reactivity in a murine model of ovalbumin-induced lung inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, 145(7): 845–852, 2005.

Worthylake, R.A.; Burridge, K. Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13(5): 569-77, 2001.

Yamaki, K.; Thorlacius, H.; Xie, X.; Lindbom, L.; Hedqvist, P.; Raud, J. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.*, 123: 390–399, 1998.

Yin, X.J.; Dong, C.C.; Ma, J.Y.C.; Roberts, J.R.; Antonini, J.M.; Ma, J.K.H. Suppression of phagocytic and bactericidal functions of rat alveolar macrophages by the organic component of diesel exhaust particules. *J. Toxicol. Environm. Health*, 70: 820-828, 2007.

Zhang, P.; Summer, W.R.; Bagby, G.J.; Nelson, S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol. Rev.*, 173: 39-51, 2000.

Zhao, H.; Joshua, I.G. Release of endogenous nitric oxide mediates arteriolar dilation to endothelin in rat striated muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31(3): 331-335, 1998.

Apêndice A – Artigos Publicados do Estudo

Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response

S.M.D. Macedo^{a,b}, E.L.B. Lourenço^{a,c}, P. Borelli^a, R.A. Fock^a,
J.M. Ferreira Jr.^d, S.H.P. Farsky^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl 13 B, São Paulo 05503-900, Brazil

^b Department of Health Sciences, Regional Integrated University of Alto Uruguai and Missões, Erechim, Brazil

^c Paranaense University, Umuarama, Brazil

^d Immunochemistry Lab, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

Received 22 September 2005; received in revised form 8 December 2005; accepted 15 December 2005

Available online 19 January 2006

Abstract

Phenol (PHE) and hydroquinone (HQ) are metabolites of benzene that affect leukocytes after solvent intoxication. Hence, we investigated the effects of PHE or HQ exposure on neutrophil mobilization during an inflammatory response. Male Wistar rats received intraperitoneal injections of PHE, HQ or vehicle only and assays were performed 24 h after the last dose. Quantifications of bone marrow or circulating leukocytes showed that only HQ exposure induced neutrophilia, probably due to the accelerated mobilization from the bone marrow compartment, since reduced numbers of segmented cells in the last phase of maturation were detected there. Intravital microscopy showed that circulating leukocytes of HQ-exposed rats increased their rolling behavior and adherence to the mesenteric postcapillary venule wall in vivo. The enhanced leukocyte–endothelium interaction was not dependent on microvascular reactivity or perivascular mast cell degranulation. Instead, it was the result of neutrophil activation, demonstrated by a decrease in L-selectin and an increase in β_2 integrin expression on neutrophil membranes. This pattern of neutrophil activation may have contributed to the higher number of neutrophils in the subcutaneous inflammatory response of HQ-exposed rats after oyster glycogen injection. Taken together, our results indicate that HQ exposure alters neutrophil mobilization, which results in an exacerbated response after an injury. Although PHE is endogenously metabolized to HQ, PHE exposure only induced an increment in rolling behavior, which was not sufficient to alter the inflammatory response.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Phenol; Hydroquinone; Inflammation; Leukocyte–endothelial interaction; Adhesion molecules

1. Introduction

Human exposure to phenolic compounds can occur in the environment, occupationally, through diet, cosmetics, medicines and cigarette-smoke (Ong et al., 1994; Duarte-Davidson et al., 2001; Cheynier, 2005). These highly reactive compounds are substrates for various enzymes, including polyphenoloxidases, peroxidases,

* Corresponding author. Tel.: +55 11 3091 2197;

fax: +55 11 3815 6593.

E-mail address: sfarsky@usp.br (S.H.P. Farsky).

glycosidases and esterases (Cheynier, 2005). For this reason, their pharmacological and toxic effects are varied and complex.

Two such compounds, phenol (PHE) and hydroquinone (HQ), are reactive metabolites from benzene biotransformation and are responsible for serious effects of solvent intoxication (Schrenk et al., 1996; Snyder, 2000, 2002, 2004). After pulmonary or dermal absorption, benzene is oxidized in the liver by cytochrome P450 2E1 to form benzene epoxide, which can be either conjugated to ring-opened metabolites or transformed into PHE and catechol. Moreover, CYP450 enzymes convert PHE and catechol to HQ and 1,2,4-benzenetriol, respectively (Goldstein et al., 1982; Snyder, 2002, 2004). The ability of these circulating phenolic compounds to easily penetrate into the bone marrow compartment and be locally metabolized and accumulated contributes in an important way to the myelotoxicity in benzene intoxication (Henderson, 1996; Snyder, 2002, 2004). In the bone marrow, these compounds are auto-oxidized or further oxidized via reactions mediated by peroxidases, such as myeloperoxidase, to their highly active quinone and semiquinone derivatives (Schlosser and Kalf, 1989; Schlosser et al., 1990).

The effects of PHE or HQ administration on mononuclear leukocytes are detected even in stem cells in the bone marrow microenvironment and in distinct phases of maturation and proliferation (Li et al., 1996; Pyatt et al., 1998, 2000; Stillman et al., 2000; Smith et al., 2000; Doepker et al., 2000; Kalf, 2000; Poirier et al., 2002; McCue et al., 2003). The consequent reduced number and activity of B and T lymphocytes contribute to leukemia and immunosuppressive effects (Snyder, 2002, 2004). Conversely, PHE and HQ may stimulate granulocyte production. Previous studies demonstrated an increase in the number of granulocyte-macrophage progenitor cells in the bone marrow of mice pre-treated with HQ and an increased proliferation of murine multipotent hematopoietic progenitor cells in vitro. Addition of PHE to HQ generated even larger effects (Hazel et al., 1996a; Henschler et al., 1996). Furthermore, it has been shown in vitro that low concentrations of HQ induce terminal granulocytic differentiation in murine myeloblasts and inhibit apoptosis at the myeloblasts/myelocyte stage of differentiation (Hazel and Kalf, 1996; Hazel et al., 1996b). Although the mechanisms involved are not totally understood, influence on growth-stimulating factors, such as granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IL-3, and leukotriene D4 receptor has been suggested (Hazel et al., 1996a, 1996b; Hazel and Kalf, 1996; Wiemels and Smith, 1999).

Effective mobilization of leukocytes to the site of injury is crucial for the host defense against infections. At the early stages of an acute inflammatory response, neutrophils are mobilized from the bone marrow or peripheral compartments to the blood and to the site of lesion, respectively. Circulating cells initially roll and adhere to the endothelium from postcapillary venules of the microcirculatory network and subsequently transigrate into the extravascular space and move directly to the site of inflammation. The rolling and adherence of leukocytes on endothelium of postcapillary venules is influenced by events that alter hemodynamic parameters, such as vascular reactivity, which can modify the blood flow at the site of inflammation, and by endogenous mediators, which trigger cellular interactions. In this context, constitutive mast cells neighboring postcapillary venules release starter chemicals that induce the rolling behavior (Salazar-Mather and Hokeness, 2003; Sallusto and Mackay, 2004). A coordinated interplay involving a spectrum of adhesion molecules successively expressed on cellular membranes mediates the interactions in the microvasculature and the extravascular tissue (Granger and Kubes, 1994; Steeber and Tedder, 2000; Bochner, 2004; Steeber et al., 2005).

It has been extensively demonstrated that the adhesion molecule L-selectin, constitutively expressed in leukocytes, mediates the rolling behavior through the interaction with sialylated carbohydrate determinants on the endothelial membrane (Cambi and Figdor, 2003; Rosen, 2004). After activation, L-selectin undergoes ectodomain cleavage, resulting in its intermittent expression. The significance of L-selectin endoproteolytic shedding was experimentally verified by an increased recruitment of neutrophils to the inflamed area (Venturi et al., 2003). The stronger cellular interaction during subsequent adhesion is mediated by β_2 integrin molecules on activated leukocytes, which bind to molecules of the immunoglobulin superfamily on the endothelium (Hubbard and Rothlein, 2000; Hogg et al., 2002). The sequential expression of adhesion molecules on leukocyte trafficking is linked to the ability of rolling leukocytes and endothelial cells to sense signals, which stimulate cellular events responsible for firm adherence to the vessel wall surface. Such signals can be given by endogenous mediators, which are secreted by immune competent cells on the vessel wall or on the adjacent tissue of the microcirculatory network of an inflamed area (Ebnet and Vestweber, 1999; Kim et al., 2004; Kuldo et al., 2005). Recent studies have suggested that adhesion molecule interactions induce a bidirectional signaling between leukocytes and the endothelium, which mediate events that facilitate the onward migration of

leukocytes through venule walls, as well as their responsiveness, behavior, differentiation state and survival at inflammation sites (Hubbard and Rothlein, 2000; Wang and Doerschuk, 2002; Kluger, 2004; Nourshargh and Marelli-Berg, 2005).

Despite abundant descriptions of the effect of PHE and/or HQ on neutrophil production or maturation *in vivo*, the effect of these substances on neutrophil recruitment to different compartments has not yet been reported. Therefore, in this study we evaluated the consequence of a 17-day exposure to PHE or HQ *in vivo* on cellular events involved in the phases of neutrophil mobilization. In addition, the outcome of the altered mechanisms detected in neutrophils was investigated after an acute inflammatory response. Our data also indicate that although PHE is endogenously transformed into HQ, PHE exposure did not alter the mechanisms involved in neutrophil distribution and the inflammatory process.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

PHE (Merck, Darmstadt, Germany), pentobarbital sodium (Cristália, São Paulo, Brazil), cellulose ester filter 0.25 μm (Millipore, São Paulo, Brazil), FITC-labeled monoclonal anti-rat CD62L (L-selectin, LECAM-1) and FITC-labeled monoclonal anti-rat CD18 (β_2 integrin; BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), heparin (Liquemine®, Roche), oyster glycogen (Type II), EDTA, HQ, noradrenaline (NA), acetylcholine (Ach), compound 48/80 and McCoy's 5A medium (Sigma, St. Louis, MO, USA).

2.2. Animals

Adult male Wistar rats weighing 180–220 g were used. Animals were kept under a light/dark cycle (12 h on/12 h off), allowed a standard pellet diet and water *ad libitum*. All animal procedures were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals. At the time of the experimental assays, animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg; intraperitoneally).

2.3. Protocols of exposure

PHE or HQ (50 mg/kg in a final volume of 1 ml) was intraperitoneally injected into the rats once a day. The animals received 13 injections, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17. Assays were carried out on Day 18, 24 h after the last injection with each phenolic agent. Control rats received the same amount of vehicle through the same route. PHE or HQ was dissolved in absolute ethanol (5% of the final solution) and the volume was completed with sterile saline solution. Body weight was determined before and after the exposure

to assess tolerance. The gain of corporal mass was equivalent in the three groups of animals studied (PHE = 107.8 ± 4.89 ; HQ = 104.5 ± 10.14 and Vehicle = 105.6 ± 8.13 , $n = 36$ animals for each group).

2.4. Quantification of bone marrow and circulating leukocytes

Numbers of bone marrow and circulating leukocytes after chemical exposure were determined 24 h after the last injection. For circulating leukocytes, we obtained blood samples from the abdominal aorta using EDTA (100 mg/mL) as anti-coagulant. Bone marrow leukocytes were obtained by flushing the femoral cavity with McCoy's 5A medium and with EDTA (100 mg/mL). The total number of leukocytes was assessed using a Neubauer chamber. Differential counts were performed on the basis of 500 cells per slide in cytocentrifuge smears stained with May–Grünwald and Giemsa dyes.

2.5. Intravital microscopy assay

Rats were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital sodium (65 mg/kg) and the mesentery was exteriorized. After surgery, the animals were kept on a special board thermostatically controlled at 37 °C, which included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warmed by irrigating the tissue with a warmed Ringer-Locke solution (pH 7.2–7.4; NaCl 154 mM; KCl 5.6 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mM; NaHCO_3 6 mM and glucose 5 mM) containing 1% gelatine. The rate of out-flow of the solution onto the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of the liquid. Transilluminated images were obtained by optical microscopy (Axioplan II, Carl–Zeiss equipped with $\times 5.0/0.30$ plan-neofluar or $\times 10.0/0.25$ Achroplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and $\times 1.0$, 1.25 or 1.60 optovar). The images were captured by a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl–Zeiss) and were transmitted simultaneously to a TV monitor and a computer. Images obtained on the TV monitor were recorded on video-tape. Digitized images on the computer monitor were subsequently analyzed by an image-analyzing software (KS 300, Kontron).

2.5.1. Leukocyte–endothelial interaction

The interaction between leukocytes and vessel walls was evaluated by determining the number of rolling and adhered leukocytes on the postcapillary venule wall (20–30 μm diameter, 200 μm length) of the mesentery at 10-min intervals. Three fields from each animal were evaluated. Leukocytes moving in the peripheral of the axial stream, in contact with the endothelium, were considered to be rollers. These leukocytes moved sufficiently slowly to be individually visible and were counted as they rolled past a selected point on one side of the vessel. The number of leukocytes adhering to the endothelium (stopped at the vessel wall) was determined at the same vascular segment (Dahlen et al., 1981; Fortes et al., 1991; Farsky et al., 1995, 2004).

2.5.2. Microvascular reactivity

The constrictor response to NA (2.5 or 5 $\mu\text{g/mL}$) and the vasodilatation to Ach (300 $\mu\text{g/mL}$) were tested. Drugs dissolved in Hanks' balanced solution (HBSS) were topically applied to vessels (20–30 μm) of the mesentery in a standard volume of 10 μL and removed by washing with Ringer-Locke's solution. Rats from each group were tested for different stimuli. The latency time required for arteriole stasis in response to each dose of NA and the subsequent reflow in response to Ach were recorded. Results were obtained after evaluating five fields from each animal.

2.5.3. Mast cells: number and activity

Another set of experiments was designed to assess the influence of phenolic agents on the number and behavior of mast cells. The degranulation of mast cells under topical application of 10 μg of compound 48/80 was determined in the tissue adjacent to postcapillary venules of the mesentery. The number of constitutive degranulated mast cells in an area of 7200 μm^2 and the time of latency required to begin the process were recorded in 10 vessels from each animal. The number of constitutive mast cells was evaluated after 10 min of topical application of blue toluidin dye and 10 areas were evaluated.

2.6. Blood flow cytometry

In order to quantify L-selectin or β_2 integrin expression, we isolated leukocytes from blood collected from the abdominal aorta (EDTA, 100 mg/mL). Briefly, erythrocyte lysis was performed using an ammonium chloride solution (0.13 M) and leukocytes were recovered after washing with HBSS. Cells (1×10^6) were incubated with or without *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP; 10^{-8} M for 10 or 30 min). After washing, leukocytes were further incubated for 30 min at 4 °C in the dark with 10 μL of monoclonal antibody against L-selectin or β_2 integrin. Immediately after incubation, cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 cells were obtained and only morphologically viable leukocytes were considered for analysis. The cytometer separated leukocytes by size and granularity. As circulating leukocytes in rats are represented by lymphocytes (about 80–85%), neutrophils (about 10–15%), monocytes (about 4–5%), eosinophils (about 1%), gates were selected as mononuclear (lymphocytes and monocytes) and polymorphonuclear (neutrophils and eosinophils) (Farsky et al., 2004). Fluorescence intensity was obtained by median of gated cells and results express the mean of four assays, performed in duplicate.

2.7. In vivo neutrophil migration: Air Pouch model

Animals were anaesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg; intraperitoneally) and 20 mL of sterile air were subcutaneously injected on the 8th day of chemical treatment. After 7 days, the pouch was upheld with approximately 5 mL of air. This procedure was described by Edwards et al., 1981. On

the 10th day following the first injection of air, oyster glycogen (5% in saline solution, 1 mL) was injected into the pouch. Six hours later, the animals were again anesthetized and later sacrificed. The pouches were washed with 4 mL of PBS/heparin (5 UI/mL) and the total numbers of leukocytes in the collected exudate were determined in Neubauer chambers. Differential cell counts were performed using smears stained with Giemsa dye.

2.8. Statistical analysis

Means and standard errors of means (S.E.M.) of all data are presented and were compared using Student's *t*-test or ANOVA with a significance of less than 0.05. Individual comparisons were subsequently carried out with Bonferroni's *t*-test for unpaired values and with Tukey test.

3. Results

3.1. Numbers of circulating leukocytes

To investigate if chemical exposure resulted in altered leucogram, leukocyte numbers were quantified in blood collected from control, PHE- or HQ-exposed rats. As seen in Fig. 1, the total number of leukocytes in PHE- or HQ-exposed rats was equivalent to that from control animals. In addition, differential analysis demonstrated that HQ exposure did not modify the number of lymphocytes or monocytes, but resulted in an increase in the number of circulating neutrophils compared to control rats. PHE exposure did not modify the number of any type of peripheral white cells (Fig. 1).

3.2. Production and maturation of neutrophils in the bone marrow

The effects of chemical exposure on neutrophil production or maturation were evaluated by bone marrow cellularity 24 h after the last injection of HQ or PHE. Our data demonstrate that neither exposure altered leukocyte production, since the number of lineage precursor cells was equivalent in the three groups of animals studied (Fig. 2). HQ exposure did not modify the number of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the early phase of maturation, but induced a significant decrease in the number of segmented cells at the last stage of maturation (Fig. 2). PHE exposure did not alter any phase of neutrophil maturation (Fig. 2).

3.3. Leukocyte–endothelial interaction

The behavior of leukocytes in the peripheral blood was evaluated by direct observation of the microcir-

Fig. 1. Bar graphs demonstrate the number of circulating leukocytes in rats exposed to vehicle, PHE, or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Blood samples were obtained from the abdominal aorta 24 h after the last dose of exposures and quantifications were carried out in Neubauer chambers and cytocentrifuge smears stained with May–Grünwald and Giemsa dye. Results express mean $\pm$ S.E.M. of six animals in each group. * $P < 0.05$ in comparison with the respective value in vehicle-exposed animals.

culatory network. As shown in Fig. 3A, HQ or PHE exposure increased initial contact between white cells and endothelial membranes, as shown by the increased number of rolling leukocytes in postcapillary venules of the mesentery. In HQ-exposed rats, this early interaction progressed to firm leukocyte attachment to the vessel wall, given that the number of cells adhered to the endothelium was also higher in this group of animals than in the PHE- or vehicle-exposed groups (Fig. 3B).

3.4. Microvascular response to noradrenaline and acetylcholine

At resting conditions, the diameters of arterioles and venules used for the assays were equivalent and varied between 20 and 30 μ m. To investigate the vascular reactivity after chemical exposure, NA and Ach were topically applied to the microvascular network of the mesentery. Results presented in Fig. 4 show that chemical exposure did not modify the arteriolar reactivity

Fig. 2. Number of bone marrow leukocytes in rats exposed to vehicle, PHE or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Cells were obtained 24 h after the last injection by flushing the femoral cavity with McCoy's 5A medium with EDTA. The total number of cells was determined in Neubauer chambers and the differential number in cytocentrifuge smears stained with May–Grünwald and Giemsa dye. Results express mean $\pm$ S.E.M. of six animals in each group. * $P < 0.001$ in comparison with the respective value in vehicle-exposed animals.

Fig. 3. Number of rolling (Panel A) and adhered leukocytes (Panel B) in postcapillary venules (20–30 μm diameter) of the mesentery of rats exposed to vehicle, PHE or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Results were obtained by intravital microscopy 24 h after the last dose of exposures. Data express mean ± S.E.M. of six animals in each group. * $P < 0.01$ or ** $P < 0.001$ in comparison with the respective values in vehicle-exposed animals.

in response to NA or Ach. Constriction to NA and subsequent dilation to Ach were similar in the three groups of animals studied.

3.5. Mast cells: number and activity

In vivo images of the mesenteric network demonstrated that HQ or PHE exposure did not influence mast cell numbers or ability to degranulate. Topical application of compound 48/80 caused equivalent mast cell degranulation in the three groups of animals, as visualized by the number of cells adjacent to postcapillary venules (Fig. 5) and by the time required for degranulation (10–15 s for each animal).

3.6. Effects of PHE and HQ exposure on leukocyte expression of adhesion molecules

The expression of adhesion molecules on the membranes of circulating leukocytes was characterized by

Fig. 4. Microvascular reactivity after topical application of norepinephrine (NA) and acetylcholine (Ach) in rats exposed to vehicle, PHE or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Results were obtained by intravital microscopy of the mesentery microcirculatory network, 24 h after the last dose of exposures. Data represent the time required for the cessation of blood flow in response to NA and its recovery after Ach. Data are expressed as mean ± S.E.M. of six animals in each group.

blood flow cytometry. Data presented in Fig. 6A show that the expression of L-selectin on PMN cells collected from PHE- or HQ-exposed rats was lower than that found in cells from control rats. After fMLP in vitro stimulation, cells obtained from HQ-exposed rats lost their ability to increase L-selectin expression on the membrane (Fig. 6A). On the other hand, the increment on L-selectin expression on PMNs collected from PHE-exposed rats after fMLP stimulation was equivalent to that found in cells from control rats (Fig. 6A). Expressions of L-selectin on mononuclear cells (MN) were not altered by chemical exposures (data not shown).

Analysis of β_2 integrin expression on PMN cells showed that cells collected from PHE- or vehicle-exposed rats presented a similar pattern of molecule expression even before or after fMLP stimulation (Fig. 6B). In contrast, PMN cells obtained from HQ-exposed animals presented elevated levels of β_2 integrin in both before or after in vitro stimulated conditions (Fig. 6B). As detected to L-selectin expression, the

Fig. 5. Degranulated mast cell number in the mesentery of rats exposed to vehicle PHE or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Results were obtained by intravital microscopy, 24 h after the last injection and 10 min after topical application of 48/80 compound. Data are expressed as mean ± S.E.M. of six animals in each group.

Fig. 6. Leukocyte adhesion molecule expression on peripheral PMN cells obtained from vehicle-, PHE- or HQ-exposed rats (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Leukocytes were obtained from blood samples collected from the abdominal aorta. L-Selectin (Panel A) or β_2 integrin (Panel B) expression was quantified in quiescent (basal condition) neutrophils or after fMLP stimulation (10^{-8} M) by blood flow cytometry. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of samples collected from four animals in each group. Assays were performed in duplicate. * $P < 0.01$ vs. basal values from vehicle-exposed rats, ** $P < 0.05$ vs. respective basal values and *** $P < 0.05$ vs. values on fMLP stimulated cell from vehicle- or PHE-exposed rats.

chemical exposures did not modify the β_2 integrin expression on MN cells (data not shown).

3.7. Local leukocyte recruitment during an inflammatory response

The leukocyte influx into inflamed subcutaneous tissue was quantified 6 h after the injection of oyster glycogen into the air pouch. As shown in Fig. 7A, leukocyte migration into the site of lesion in PHE-exposed rats was equivalent to the migration to the inflamed cavity in control animals. However, the total number of leukocytes present in the inflamed pouch of HQ-exposed rats was higher than that found in PHE- or vehicle-exposed rats (Fig. 7A). Differential analysis demonstrated that the higher numbers of leukocytes in inflammatory exudates of HQ-exposed rats represented a significant increase in the number of neutrophils accumulated in the pouch (Fig. 7B).

4. Discussion

Neutrophils are among the first leukocytes recruited from reservoir compartments into an injured area, and their interaction with different cells during the migration process triggers intracellular events whose steps advance the inflammatory response. Alterations in this complex process of delivery may reduce or increase the accumulation of white cells at the site of lesion; in both cases, the host defense is impaired. In the current study we proposed an experimental protocol involving intoxication with PHE or HQ to investigate their role on mechanisms responsible for neutrophil mobilization, as well as their effect during an acute inflammatory response.

Our data showed that HQ exposure induced neutrophilia, probably because of a more intense mobilization of segmented cells from the bone marrow compart-

Fig. 7. Number of total (Panel A) or differential (B) leukocytes in inflammatory exudates of rats exposed to vehicle, PHE, or HQ (50 mg/kg; i.p. route; 13 doses, daily on Days 1–5, 8–12 and 15–17). Inflammation was induced in the subcutaneous cavity 24 h after the last dose of exposures (oyster glycogen; 1 mL 5% solution). Exudates were collected 6 h later. Total leukocytes were quantified in a Neubauer chamber and differential cells in cytocentrifuge smears stained with May–Grünwald and Giemsa dye. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of six animals in each group. MN, mononuclear cells; PMN, polymorphonuclear cells. * $P < 0.001$ in comparison with the respective values in vehicle-exposed animals.

ment. While it has been previously suggested that HQ impairs production and/or maturation of granulocytes (Snyder, 2002, 2004), our data show that HQ does not affect precursor cell numbers, but induces earlier maturation of neutrophils. In HQ-exposed rats we detected a significant reduction in the number of PMN cells at the last phase of maturation in the bone marrow compartment and increased neutrophil numbers at the peripheral compartment. In contrast, PHE exposure did not alter any phase of cell maturation in the bone marrow compartment and did not modify the circulating number of leukocytes. These effects might be expected since PHE seems to act synergistically with HQ or other phenolic compounds on granulocytic lineage alterations (Kolachana et al., 1993; Moran et al., 1996; Henschler et al., 1996).

In the circulation, leukocytes move in the mainstream of blood. However, during activation states, white cells interact with the microcirculatory vessel wall for subsequent migration into the site of injury. Modifications in microvascular wall reactivity and in the activation of leukocytes and the endothelium – both effects mediated by endogenous substances secreted at the site of injury – promote leukocyte–endothelial interactions. Data herein suggest that HQ and PHE exposure induced rolling of leukocytes to postcapillary venules of the mesentery. However, only leukocytes from HQ-exposed rats were able to advance and adhere to the vessel wall.

It has been reported that HQ is a potent constrictor of small arterioles, mainly by blocking microvessel dilation dependent on nitric oxide (NO) (Lubbe et al., 1994; Zhao and Joshua, 1998). It is well-known that NO production is increased in response to Ach, and that NO diffuses from endothelial cells into the cytosol of adjacent vascular smooth muscle cells to activate the enzyme guanylyl cyclase, increasing GMPc levels, which result in vascular smooth cell relaxation (Russo et al., 2002). Thus, the possibility that the enhancement of leukocyte–endothelial interactions detected in rats exposed to phenolic compounds could result from modifications in the microvascular reactivity was investigated by measurements of arteriolar constriction and its subsequent dilation after topical application of NA and Ach on the mesenteric tissue, respectively. Our data showed that the times required for pharmacological responses were similar in all groups of animals studied, suggesting that the leukocyte–endothelial interactions are not dependent on changes in microvascular reactivity. Additionally, the mesenteric tissue has postcapillary venules surrounding mast cells, which secrete mediators that clearly induce in vivo rolling behavior, such as histamine (Kubes and Granger, 1996; Yamaki et al., 1998). We have also shown that local injections of phenolic compounds for a long

period of time did not alter the numbers of mesentery mast cells or their ability to degranulate in response to compound 48/80, suggesting that the elevated number of rolling leukocytes in the postcapillary venules of animals exposed to phenolic compounds does not involve substances secreted from an elevated mast cell activity.

The expression of adhesion molecules on both leukocytes and the endothelium mediates leukocyte–endothelial interactions and also indicates the stage of cellular activation (Ley, 2002; Ehrhardt et al., 2004). Neutrophils rapidly express L-selectin and subsequently upregulate β_2 integrin under stimulation with chemotactic factors. This pattern of adhesion molecule expression during leukocyte priming in several inflammatory diseases has been fully demonstrated (Fernandez-Segura et al., 1996; Walcheck et al., 1996; Williams and Solomkin, 1999; Kaba and Knauf, 2001; Noguera et al., 2004; Caimi et al., 2005). Our data suggest that HQ exposure induces neutrophil activation, as indicated by a downregulation of L-selectin and an upregulation of β_2 integrin expression, which may lead to cellular activities during an inflammatory process. Then, the importance of adhesion molecule expression in neutrophils from HQ-exposed rats was demonstrated by the higher influx of neutrophils into subcutaneous inflamed areas compared to PHE- or vehicle-exposed rats.

Taken together, our data support the notion that the benzene metabolite quinone plays a role in the toxicity of granulocytes and influences the host defense against non-specific agents. This is the first report of neutrophil activation by HQ in vivo, resulting in an excessive inflammatory response. Additionally, our data demonstrate the differential role of phenolic compounds in cellular reactivity, since unlike exposure to HQ, PHE administration did not promote alterations on neutrophil maturation and activation. Although PHE is endogenously transformed into HQ, endogenous transformation of PHE into HQ may not be sufficient to generate the same level of neutrophil priming as direct HQ exposure. It is important to emphasize that rats are able to metabolize benzene, and that they have been used as a model for human exposure because of close similarities in the biotransformation of this solvent (Sammett et al., 1979; Orzechowski et al., 1995; Seaton et al., 1995; Henderson, 1996).

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Suéllen Cristine Moreira Vaz, Amanda R. Crisma and Karina Nakajima for technical assistance and FAPESP for financial support (grants #03/04013-8). S.H.P. Farsky is fellow of the Conselho

Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq) and S.M.D. Macedo and R.A. Fock are graduate fellows.

References

- Bochner, B.S., 2004. Adhesion molecules as therapeutic targets. *Immunol. Allergy Clin. North Am.* 24 (4), 615–630.
- Caimi, G., Montana, M., Carollo, C., Porretto, F., Vaccaro, F., Canino, B., Lo Presti, R., 2005. Polymorphonuclear leukocyte integrins in chronic renal failure. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 32 (1), 43–49.
- Cambi, A., Figdor, C.G., 2003. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 (5), 539–546.
- Cheyrier, V., 2005. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (Suppl.), 223S–229S.
- Dahlen, S.E., Bjork, J., Hedquist, P., Arfors, K.E., Hammarstrom, S., Lindgren, J.A., Samuelsson, B., 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (6), 3887–3891.
- Doepker, C.L., Dumont, K.W., O'Donoghue, J., English, J.C., 2000. Lack of induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with hydroquinone. *Mutagenesis* 15 (6), 479–487.
- Duarte-Davidson, R., Courage, C., Rushton, L., Levy, L., 2001. Benzene in the environment: an assessment of potential risks to the health of the population. *Occup. Environ. Med.* 58, 2–13.
- Edwards, J.C., Sedwick, A.D., Willoughby, D.A., 1981. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air: an in vivo tissue culture system. *J. Pathol.* 134 (2), 147–156.
- Ebnet, K., Vestweber, D., 1999. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell Biol.* 112 (1), 1–23.
- Ehrhardt, C., Kneuer, C., Bakowsky, U., 2004. Selectins—an emerging target for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 527–549.
- Farsky, S.H.P., Borelli, P., Fock, R.A., Proto, S.Z., Ferreira Jr, J.M., Mello, S.B., 2004. Chronic blockade of nitric oxide biosynthesis in rats: effect on leukocyte endothelial interaction and on leukocyte recruitment. *Inflamm. Res.* 53 (9), 442–452.
- Farsky, S.H.P., Sannomiya, P., Garcia-Leme, J., 1995. Secreted glucocorticoids regulate leukocyte–endothelial interactions in inflammation. A direct vital microscopic study. *J. Leukoc. Biol.* 57 (3), 379–386.
- Fernandez-Segura, E., Garcia, J.M., Campos, A., 1996. Topographic distribution of CD18 integrin on human neutrophils as related to shape changes and movement induced by chemotactic peptide and phorbol esters. *Cell Immunol.* 171 (1), 120–125.
- Fortes, Z.B., Farsky, S.P., Oliveira, M.A., Garcia-Leme, J., 1991. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interaction in diabetes mellitus. *Diabetes* 40 (10), 1267–1273.
- Goldstein, B.D., Snyder, C.A., Laskin, S., Bromberg, I., Albert, R.E., Nelson, N., 1982. Myelogenous leukemia in rodents inhaling benzene. *Toxicol. Lett.* 13 (3–4), 169–173.
- Granger, D.N., Kubes, P., 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte–endothelial cell adhesion. *J. Leukoc. Biol.* 55 (5), 662–675.
- Hazel, B.A., Kalf, G.F., 1996. Induction of granulocytic differentiation in myeloblast by hydroquinone, a metabolite of benzene, involves the leukotriene D4 receptor. *Recept. Signal Transduct.* 6 (1), 1–12.
- Hazel, B.A., O'Connor, A., Niculescu, R., Kalf, G.F., 1996a. Induction of granulocytic differentiation in a mouse model by benzene and hydroquinone. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1257–1264.
- Hazel, B.A., Baum, C., Kalf, G.F., 1996b. Hydroquinone, a bioreactive metabolite of benzene, inhibits apoptosis in myeloblast. *Stem Cells* 14 (6), 730–742.
- Henderson, R.F., 1996. Species differences in the metabolism of benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1173–1175.
- Henschler, R., Glatt, H.R., Heyworth, C.M., 1996. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro and in vivo. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1271–1274.
- Hogg, N., Henderson, R., Leitinger, B., McDowall, A., Porter, J., Stanley, P., 2002. Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol. Rev.* 186, 164–171.
- Hubbard, A.K., Rothlein, R., 2000. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (9), 1379–1386.
- Kaba, N.K., Knauf, P.A., 2001. Hypotonicity induces L-selectin shedding in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281 (4), 1403–1407.
- Kalf G.F., 2000. Utility of a mouse model for studying the effects of benzene on the myeloid lineage: effects of hydroquinone on a model myeloid system. *J. Toxicol. Environ. Health A* 61 (5–6), 399–411.
- Kim, M., Carman, C.V., Yang, W., Salas, A., Springer, T.A., 2004. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin $\{\alpha\}_L\{\beta\}_2$. *J. Cell Biol.* 167 (6), 1241–1253.
- Kluger, M.S., 2004. Vascular endothelial cell adhesion and signaling during leukocyte recruitment. *Adv. Dermatol.* 20, 163–201.
- Kolachana, P., Subrahmanyam, V.V., Meyer, K.B., Zhang, L., Smith, M.T., 1993. Benzene and its phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. *Cancer Res.* 53, 1023–1026.
- Kubes, P., Granger, D.N., 1996. Leukocyte–endothelial cell interactions evoked by mast cells. *Cardiovasc. Res.* 32, 699–708.
- Kuldo, J.M., Ogawara, K.I., Werner, N., Asgeirsdottir, S.A., Kamps, J.A., Kok, R.J., Molema, G., 2005. Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 3 (1), 11–39.
- Ley, K., 2002. Integration of inflammatory signals by rolling neutrophil. *Immunol. Rev.* 186 (1), 8–18.
- Li, Y., Kuppusamy, P., Zweir, J.L., Trush, M.A., 1996. Role of Cu/Zn-superoxide dismutase in xenobiotic activation. II. Biological effects resulting from the Cu/Zn-superoxide dismutase-accelerated oxidation of the benzene metabolite 1,4-hydroquinone. *Mol. Pharmacol.* 49 (3), 412–421.
- Lubbe, A.S., Garrison, R.N., Harris, P.D., 1994. Endothelium-dependent microvascular responses to activated complement. *J. Surg. Res.* 57 (6), 654–660.
- McCue, J.M., Lazis, S., John Cohen, J., Modiano, J.F., Freed, B.M., 2003. Hydroquinone and catechol interfere with T-cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.* 39 (16), 995–1001.
- Moran, J.L., Siegel, D., Sun, X.M., Ross, D., 1996. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol. Pharmacol.* 50 (3), 610–615.
- Noguera, A., Sala, E., Pons, A.R., Iglesias, J., MacNee, W., Agusti, A.G., 2004. Expression of adhesion molecules during apoptosis of circulating neutrophils in COPD. *Chest* 125 (5), 1837–1842.
- Nourshargh, S., Marelli-Berg, F.M., 2005. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. *Trends Immunol.* 26 (3), 157–165.

- Ong, C.N., Lee, B.L., Shi, C.Y., Ong, H.Y., Lee, H.P., 1994. Elevated levels of benzene-related compounds in the urine of cigarette smokers. *Int. J. Cancer* 59, 177–180.
- Orzechowski, A., Schwarz, L.R., Schwegler, U., Bock, K.W., Snyder, R., Schrenk, D., 1995. Benzene metabolism in rodent hepatocytes: role of sulphate conjugation. *Xenobiotica* 25 (10), 1093–1102.
- Poirier, M., Fournier, M., Brousseau, P., Morin, A., 2002. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65 (19), 1437–1451.
- Pyatt, D.W., Stillman, W.S., Irons, R.D., 1998. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 149 (2), 178–184.
- Pyatt, D.W., Yang, Y., Stillman, W.S., Cano, L.L., Irons, R.D., 2000. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NFkappaB in primary human CD19+ B lymphocytes. *Cell Biol. Toxicol.* 16 (1), 41–51.
- Rosen, S.D., 2004. Ligands for L-selectin: homing, inflammation, and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* 22 (1), 29–56.
- Russo, G., Leopold, J.A., Loscalzo, J., 2002. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunctions in atherosclerosis. *Vasc. Pharmacol.* 38, 259–269.
- Salazar-Mather, T.P., Hokeness, K.L., 2003. Calling in the troops: regulation of inflammatory cell trafficking through innate cytokine/chemokine networks. *Viral Immunol.* 16 (3), 291–306.
- Sallusto, F., Mackay, C.R., 2004. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr. Opin. Immunol.* 16 (6), 724–731.
- Sammett, D., Lee, E.W., Kocsis, J.J., Snyder, R., 1979. Partial hepatectomy reduces both metabolism and toxicity of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health* 5 (5), 785–792.
- Schlosser, M.J., Kalf, G.F., 1989. Metabolic activation of hydroquinone by macrophage peroxidase. *Chem. Biol. Interact.* 72 (1–2), 191–207.
- Schlosser, M.J., Shumira, R.D., Kalf, G.F., 1990. Prostaglandin H synthase catalyzed oxidation of hydroquinone to a sulfhydryl-binding and DNA-damaging metabolite. *Chem. Res. Toxicol.* 3 (4), 333–339.
- Schrenk, D., Orzechowski, A., Schwarz, L.R., Snyder, R., Burchell, B., Ingelman-Sundberg, M., Bock, K.W., 1996. Phase II metabolism of benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1183–1188.
- Seaton, M.J., Schlosser, P., Medinsky, M.A., 1995. In vitro conjugation of benzene metabolites by human liver: potential influence of interindividual variability on benzene toxicity. *Carcinogenesis* 16 (7), 1519–1527.
- Smith, M.T., Zhang, L., Jeng, M., Wang, Y., Guo, W., Duramad, P., Hubbard, A.E., Hofstadler, G., Holland, N.T., 2000. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneuploidy of Chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis* 21 (8), 1485–1490.
- Snyder, R., 2000. Overview of the toxicology of benzene. *J. Toxicol. Environ. Health A* 61 (5–6), 339–346.
- Snyder, R., 2002. Benzene and Leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.* 32 (3), 155–210.
- Snyder, R., 2004. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.* 36 (3–4), 531–547.
- Steeber, D.A., Tedder, T.F., 2000. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol. Res.* 22 (2–3), 299–317.
- Steeber, D.A., Venturini, G.M., Tedder, T.F., 2005. A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol.* 26 (1), 9–12.
- Stillman, W.S., Varella-Garcia, M., Irons, R.D., 2000. The benzene metabolite, hydroquinone, selectively induces 5q31– and –7 in human CD34+CD19– bone marrow cells. *Exp. Hematol.* 28 (2), 169–176.
- Venturi, G.M., Tu, L., Kadono, T., Khan, A.I., Fujimoto, Y., Oshel, P., Bock, C.B., Miller, A.S., Albrecht, R.M., Kubes, P., Steeber, D.A., Tedder, T.F., 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity* 19 (5), 713–724.
- Walcheck, B., Kahn, J., Fisher, J.M., Wang, B.B., Fisk, R.S., Payan, D.G., Feehan, C., Betageri, R., Darlak, K., Spatola, A.F., Kishimoto, T.K., 1996. Neutrophil rolling altered by inhibition of L-selectin shedding in vitro. *Nature* 380 (6576), 720–723.
- Wang, Q., Doerschuk, C.M., 2002. The signaling pathways induced by neutrophil-endothelial cell adhesion. *Antioxid. Redox Signal.* 4 (1), 39–47.
- Wiemels, J., Smith, M.T., 1999. Enhancement of myeloid cell growth by benzene metabolites via the production of active oxygen species. *Free Radic. Res.* 30 (2), 93–103.
- Williams, M.A., Solomkin, J.S., 1999. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.* 65 (6), 725–736.
- Yamaki, K., Thorlacius, H., Xie, X., Lindbom, L., Hedqvist, P., Raud, J., 1998. Characteristics of histamine-induced leukocyte rolling in the undisturbed microcirculation of the rat mesentery. *Br. J. Pharmacol.* 123, 390–399.
- Zhao, H., Joshua, I.G., 1998. Release of endogenous nitric oxide mediates arteriolar dilation to endothelin in rat striated muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31 (3), 331–335.

In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats

S.M.D. Macedo^{a,b}, S.C.M. Vaz^a, E.L.B. Lourenço^{a,c}, M. da Glória de Sousa^a,
A.P. Ligeiro-Oliveira^d, J.M.C. Ferreira Jr.^e, S.R. Almeida^a,
W. Tavares de Lima^d, S.H.P. Farsky^{a,*}

^a Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Health Science, Regional Integrated University of Alto Uruguai and Missões, Erechim, Brazil

^c Paranaense University, Umuarama, Brazil

^d Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Immunochimistry Laboratory, Butantan Institute, São Paulo, Brazil

Received 13 February 2007; received in revised form 25 July 2007; accepted 5 August 2007

Available online 19 August 2007

Abstract

Hydroquinone (HQ) is naturally found in the diet, drugs, as an environmental contaminant and endogenously generated after benzene exposure. Considering that HQ alters the immune system and its several source of exposures in the environment, we hypothesized that prolonged exposure of HQ could affect the course of an immune-mediated inflammatory response. For this purpose, male Wistar rats were intraperitoneally exposed to vehicle or HQ once a day, for 22 days with a 2-day interval every 5 days. On day 10 after exposure with vehicle or HQ, animals were ovalbumin (OA)-sensitized and OA-aerosolized challenged on day 23. HQ exposure did not alter the number of circulating leukocytes but impaired allergic inflammation, evidenced by lower number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid 24 h after OA-challenge. Reduced force contraction of *ex vivo* tracheal segments upon OA-challenge and impaired mesentery mast cell degranulation after *in situ* OA-challenge were also detected in tissues from HQ exposed animals. The OA-specificity on the decreased responses was corroborated by normal trachea contraction and mast cell degranulation in response to compound 48/80. In fact, lower levels of circulating OA-anaphylactic antibodies were found in HQ exposed rats, as assessed by passive cutaneous anaphylaxis assay. The reduced level of OA-anaphylactic antibody was not dependent on lower number or proliferation of lymphocytes. Nevertheless, lower expression of the co-stimulatory molecules CD6 and CD45R on OA-activated lymphocytes from HQ exposed rats indicate the interference of HQ exposure with signaling of the humoral response during allergic inflammation. Together, these data indicate specific effects of HQ exposure manifested during an immune host defense.

Published by Elsevier Ireland Ltd.

Keywords: Hydroquinone; Allergic inflammation; Ovalbumin; Anaphylactic antibodies; CD45R; CD6; Mast cell degranulation

1. Introduction

Hydroquinone (HQ) is a naturally occurring agent in plants or plant derived products (Deisinger et al., 1996), synthetically produced to be used in chemical industries, black and white photographic developers, and in cos-

* Corresponding author at: Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 13 B, São Paulo 05508-900, Brazil. Tel.: +55 11 3091 2197; fax: +55 11 3815 6593.

E-mail address: sfarsky@usp.br (S.H.P. Farsky).

metic products as a skin lightening agent (Stanfield et al., 2006). Moreover, the main portion of environmental contamination occurs through cigarette smoke or benzene exposure in petroleum refining, petrochemical and chemical industries (Dimitrova et al., 2005) or by traffic exhaust fumes (Darrall et al., 1998; Snyder, 2002, 2004). Experimental assays have proposed that the immunosuppressive effects of benzene intoxication are associated with its phenolic bio-products, of which HQ is a pivotal compound (Li et al., 1996, 1997; McCue et al., 2000; Snyder, 2002, 2004).

Accordingly, after benzene exposure, HQ is endogenously produced via oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes in the liver (Snyder, 2002, 2004). Once circulating, HQ passively reaches the bone marrow where it is metabolized and might account for the myelotoxicity in benzene intoxication (Henderson, 1996; Snyder, 2002, 2004). Taking this into consideration, HQ is potentially a toxic agent capable of affecting immune cell responses. In fact, *in vitro* assays have demonstrated that HQ blocks the production of lymphocytes and impairs their proliferation (Li et al., 1996, 1997; Poirier et al., 2002; McCue et al., 2000, 2003). The mechanisms involved are not completely understood and are related to inhibition of DNA synthesis or blastogenesis, alteration of cell cycle entry and progression through the G(1) phase (McCue et al., 2000, 2003), in addition to inhibition of cytokine production. Conversely, it was shown that HQ sensitizes mice by enhancing B cells in the popliteal lymph node (Ewens et al., 1999) and significantly increasing *in vitro* and *in vivo* IL-4 production by stimulated CD4⁺ T cells, accompanied by an increment in circulating immunoglobulin (Ig) E levels (Lee et al., 2002). Also, Kim et al. (2005) showed that HQ may enhance allergic immune responses by inhibiting *in vitro* IL-12 production by LPS-activated macrophage, in which the mechanism proposed is the suppression of NF κ B activity by inhibiting the degradation of the I κ B protein.

The allergic response is triggered by mast cell-derived mediators, released after the antigen cross-links the IgE on the mast cells surface. In the sensitization phase, antigen is presented by antigen-presenting cells (APC, dendritic cells, macrophages and Langerhans cells) to CD4 lymphocytes, which signal to the B lymphocytes to produce immunoglobulins (Murphy and Reiner, 2002; Careau et al., 2002; Ansel et al., 2003). Upon antigen challenge, the sensitized mast cell activates multiple signaling pathways causing its degranulation with a consequent release of a wide range of mediators accounting for leukocyte infiltration, plasma extravasation, airway smooth muscle contraction and mucus secretion (Galli

et al., 2005; Okayama and Kawakami, 2006). In this context, it is known that accessory surface receptors and adhesion molecules in APC, T and B cells are involved in mediating the highly regulated phosphorylation and dephosphorylation of tyrosine residues on target proteins, regulating antigen presentation, lymphocyte proliferation, cytotoxicity, humoral activities and apoptosis (Iezzi et al., 1998; Burastero and Rossi, 1999; Kiefer et al., 2002). Therefore, the successful immune response is dependent on a coordinated cascade of events mediated by complex membrane and intracellular events (Burastero and Rossi, 1999; Kiefer et al., 2002).

As HQ is an environmental contaminant and displays toxicity to immune system, here we investigated the role of prolonged HQ exposure on allergic lung inflammation triggered by unrelated antigen to HQ. Data obtained show that HQ exposure impairs the expression of CD45R and CD6 co-stimulatory molecules on activated spleen lymphocytes and diminishes the levels of OA-anaphylactic antibodies and the subsequent mast cell degranulation in sensitized rats challenged with OA. These effects might be important mechanisms to account for the impaired allergic inflammation, here characterized by decreased airway reactivity and leukocyte infiltration.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Pentobarbital sodium (Cristália, Brazil); FITC-labeled anti-rat CD86, CD40, CD6 and PE-labeled anti-rat CD45R and CD80 were purchased from BD Biosciences (USA); Heparin (Liquemine®, Roche, Brazil); Ovalbumin (chicken egg albumin crude, grade II), Concanavalin A from *Canavalia ensiformis* (type IV), RPMI 1640 medium, θ -dianisidine, hexadecyltrimethyl ammonium bromide, compound 48/80, EDTA and HQ were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA); Chloral hydrate (Quims, Brazil) ammonium chloride, aluminum hydroxide, blue toluidine, Evans blue, May-Grünwald and Giemsa dyes, H₂O₂ and ethanol were purchased from Merck (USA); [³H] thymidine (Amershan Pharmacia Biotech UK Limited, UK); Fetal calf serum (Gibco-BRL, MD, USA).

2.2. Animals

Adult male Wistar rats weighing 180–220 g were used. Animals were kept under a light/dark cycle (12 h on, 12 h off), allowed a standard pellet diet and water *ad libitum*. All animal procedures were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals.

2.3. Protocol of *in vivo* HQ exposure

HQ (50 mg/kg in a final volume of 1 mL) was intraperitoneally injected, once a day. Animals used as controls received the same volume of vehicle by the same route. HQ was dissolved in absolute ethanol (5% of the final solution) and the volume was completed with sterile saline solution. The animals received 16 daily doses of treatment, with 2-day intervals every 5 doses. Assays were carried out 24 h after the last dose of HQ or vehicle exposures.

2.4. Number of circulating leukocytes

Blood was collected from orbital plexus from animals before and after HQ or vehicle exposures. The total number of leukocytes was assessed using a Neubauer chamber. Differential counts were performed on the basis of 500 cells per slide in cytocentrifuge smears stained with May-Grünwald and Giemsa dyes.

2.5. Antigen sensitization

Rats were sensitized by a single intraperitoneal injection of ovalbumin (OA, 10 µg) mixed with aluminum hydroxide (10 mg) as adjuvant on the 10th day of HQ or vehicle exposure. Experiments were performed 13 days later. The time frame was chosen based on Coleman et al. (1983), who demonstrated that the levels of circulating IgE antibodies in rats increases rapidly 7–14 days after intraperitoneal OA injection.

2.6. *In vivo* antigen challenge

On day 13 after OA-sensitization and 24 h after the last injection of HQ or vehicle, rats were subjected to a single 15 min-exposure of aerosolized OA (1% in phosphate buffered saline, PBS) using an ultrasonic nebulizer device (Icel®, SP, Brazil) coupled to a plastic inhalation chamber (18.5 cm × 18.5 cm × 13.5 cm).

2.7. Number of leukocytes in bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

Twenty-four hours after OA challenge, animals were anesthetized with pentobarbital sodium (65 mg/kg, intraperitoneal injection) and exsanguinated by abdominal aorta. In brief, a plastic cannula coupled to syringe was inserted into the

trachea and 20 mL (2 × 10 mL) PBS was injected. Immediately following PBS injection, BALF was collected and the fluid was centrifuged at 500 × g for 10 min at 4 °C. The cell pellet was re-suspended in 1 mL of PBS. The number of cells was determined using a Neubauer chamber and stained cell suspensions (0.5% crystal violet dissolved in 30% acetic acid). Differential cell counts were performed from cytopspin preparations and then stained with May-Grünwald.

2.8. *In vitro* anaphylactic reaction

Twenty-four hours after the last injection of HQ or vehicle, rats were killed under deep chloral hydrate anesthesia (>400 mg/kg, i.p.) and exsanguinated via the abdominal aorta. The trachea was removed and dissected free of connective tissue. Tracheal rings corresponding to the last 3–5 cartilaginous rings closest to the carine, designated the distal trachea, were set up for the measurement of isometric contractions by suspending them with two steel hooks in 8 mL organ baths containing Krebs-Henseleit solution with the following composition (mM): 115.0 NaCl, 4.6 KCl, 2.5 CaCl₂·2H₂O, 1.2 KH₂PO₄, 2.5 MgSO₄·7H₂O, 25.0 NaHCO₃ and 11.0 glucose. The solution was gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ and maintained at 36 °C. The tissue was allowed to equilibrate for 60 min under an initial tension of 500 mg. During this period, the tension was adjusted to 1.0 g, and the contractile activity of the tissue was then assessed by the addition of iso-osmolar Krebs-bicarbonate solution containing 60 mM KCl. The tissue was subsequently challenged by the addition of OA at a final concentration of 100 µg/mL (Schultz, 1910; Dale, 1913; de Lima and da Silva, 1998). The force contraction elicited by the tracheal segment due to the OA addition in the organ bath system was recorded using an isometric transducer coupled to the PowerLab 4sp system; the data were analyzed using the Chart 3.4® software (Ad Instruments, Australia).

2.9. *In situ* mast cell degranulation

Twenty-four hours after the last injection of HQ or vehicle, rats were anesthetized intraperitoneally with pentobarbital sodium (65 mg/kg) and the mesentery was exteriorized and analyzed by intravital microscopy. After surgery, the ani-

mals were kept on a special board thermostatically controlled at 37 °C, which included a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warmed by irrigating the tissue with a warmed Ringer-Locke solution (pH 7.2–7.4; 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mM NaHCO_3 and 5 mM glucose) containing 1% gelatine. The rate of outflow of the solution onto the exposed tissue was controlled to keep the preparation in continuous contact with a film of the liquid. Transilluminated images were obtained by optical microscopy (Axioplan II, Carl-Zeiss equipped with 5.0/0.30 $\times$ plan-neofluar or 10.0/0.25 $\times$ Achroplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and 1.0 $\times$, 1.25 $\times$ or 1.60 $\times$ optovar). The images were captured by a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl-Zeiss) and were transmitted simultaneously to a TV monitor and to a computer. Images obtained on the TV monitor were recorded on video-tape. Digitized images on the computer monitor were subsequently analyzed by image-analyzing software (KS 300, Kontron).

The degranulation of mast cells under topical application of 10 μL of OA 1% saline solution or 10 μg of compound 48/80 was determined in the tissue adjacent to postcapillary venules of the mesentery. The images were recorded 5 min after stimulus application and degranulated mast cells were dyed by topical application of blue toluidine dye. Ten areas were evaluated in each animal.

2.10. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction

PCA reaction is a typical assay to indirectly measure anaphylactic antibodies levels (Mota and Wong, 1969; Shin et al., 2000; Hong et al., 2003). An IgE-dependent cutaneous reaction was generated by sensitizing the skin of non-manipulated rats with an intradermal injection of diluted sera from vehicle- or HQ-exposed and OA-sensitized rats. Twenty-four hours after the intradermal injections, animals received an intravenous injection of 1 mL of solution containing 500 μg of OA and 2.5 mg of Evans blue. After 30 min, the rats were sacrificed and the dorsal skin was removed for measurement of the pigmented area. Data are expressed by PCA titer, which represents the serum dilution capable of inducing a dyed area greater than 5 mm in diameter as described by Mota and Wong (1969).

2.11. Cell proliferation assay

Twenty-four hours after the last injection of HQ or vehicle, the spleen was harvested and 2×10^5 cells per well were cultured in 96-well flat bottom tissue culture plates with 25–125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of OA in complete RPMI with 5% fetal calf serum (FCS) or with concanavalin A (ConA; 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$). During the last 18 h of the 4-day culture period, [^3H]thymidine was added (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$). At the end of this period of incubation, cells were collected with an automated cell harvester, and incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry. Data are expressed as mean $\pm$ standard error of mean counts per minute of [^3H]thymidine incorporation.

2.12. Blood flow cytometry

Thirteen days after OA-sensitization or 24 h after OA-challenge, leukocytes were isolated from spleen to quantify the expression of CD45R, CD40, CD80, CD86 and CD6. Briefly, erythrocyte lysis was performed using ammonium chloride solution (0.13 M) and leukocytes were recovered after washing with Hanks's Balanced Salt Solution (HBSS). Leukocytes were incubated for 30 min at 4 °C in the dark with 10 μL of monoclonal antibodies. Immediately after incubation, cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton & Dickinson – San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable cells were considered for analysis. Median of the fluorescence intensity and percentage of labeled lymphocytes was obtained and results express the mean of 4 assays, performed in duplicate.

2.13. Statistical analysis

Means and standard errors of means (S.E.M.) of all data are presented and were compared by Student's *t*-test or ANOVA with a significance probability of less than 0.05. Individual comparisons were subsequently performed with Bonferroni's test for unpaired values and Tukey test.

3. Results

3.1. Effects of HQ exposure on leukocyte migration into the lungs of rats upon antigen challenge

There were significantly fewer leukocytes present in the BALF 24 h after OA challenge in HQ exposed rats when compared to number of leukocytes found in BALF of allergic rats exposed to vehicle. Differential analysis showed that HQ exposure reduced the influx of both polymorphonuclear (PMN) cells and mononuclear (MN) cells into the bronchoalveolar cavity (Fig. 1). The numbers of cells collected in BALF of naïve rats consisted of 5.04×10^5 MN and 0.17×10^5 PMN cells.

HQ exposure did not change the number of circulating leukocytes, as number of cells at the peripheral compartment was equivalent before and after HQ exposure and similar to those found in vehicle exposed rats (before HQ exposure = 7867 ± 322 cells/ mm^3 ; after HQ exposure = 8134 ± 497 cells/ mm^3 ; before vehicle exposure = 7833 ± 450 cells/ mm^3 ; after vehicle exposure = 8317 ± 473 cells/ mm^3 ; $n = 6$ for each group).

3.2. Influence of HQ exposure on the ex vivo OA-induced rat tracheal contraction

As shown in Fig. 2, the force of contraction after the ex vivo antigen challenge (OA) of tracheal segments

Fig. 1. Number of leukocytes in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from rats exposed to vehicle or HQ (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses). Animals were OA-sensitized (10 μ g of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposure and OA-challenged (1% solution, 15 min, i.n.) on day 23. BALF was obtained 24 h after OA challenge. MN=mononuclear; PMN=polymorphonuclear. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of samples collected from 6 animals in each group. * $p < 0.001$ values obtained for vehicle-exposed rats.

from HQ exposed rats was significantly lower than that observed in tracheal segments of vehicle exposed rats. In contrast, HQ exposure failed to modify the force of contraction caused by compound 48/80. Trachea of naïve rats did not respond to *ex vivo* OA addition (data not shown).

Fig. 2. *In vitro* anaphylactic response in isolated distal tracheal segments from rats exposed to vehicle or HQ (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses). Animals were OA-sensitized (10 μ g of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposure and tracheas removed 13 days later. The contractile activity of the tissue was assessed by the addition of iso-osmolar Krebs-bicarbonate solution containing 60 mM KCl and subsequently challenged by addition of OA at a final concentration of 100 μ g/mL or 48/80 compound (10 μ g). Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of tracheas collected from 4 animals in each group. Assays were performed in duplicate. * $p < 0.001$ values obtained in tracheas from vehicle-exposed rats.

3.3. Effects of HQ exposure on mesenteric mast cell degranulation

Mesentery tissue from HQ or vehicle and OA sensitized rats was exteriorized and the degranulation of mast cells adjacent to the microvascular network was observed using intravital microscopy. As demonstrated in Fig. 3A and B and represented in Fig. 3E, OA induced-degranulation of mesenteric mast cells was significantly reduced in HQ exposed rats as compared to that observed in mesenteric tissue of allergic rats upon vehicle exposure. In addition, the level of mast cells degranulation after topical application of compound 48/80 was similar in both HQ and vehicle exposed rats (Fig. 3C–E).

3.4. Effect of HQ exposure on the circulating levels of anaphylactic antibodies

Data presented in Fig. 4 show the ability of sera obtained from rats exposed to HQ or vehicle to induce increased cutaneous microvascular permeability in naïve rats. The amount of serum from HQ exposed rats required to induce the reaction was higher than the amount of serum from vehicle exposed rats, indicating lower levels of IgE and IgG OA-anaphylactic antibodies in HQ exposed rats.

Fig. 3. Mesentery mast cell degranulation from rats exposed to vehicle or HQ (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses) and sensitized with OA (10 μg of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposures. Degranulation was induced 13 days after OA sensitization by topical application of OA or 48/80 compound. Images were obtained by intravital microscopy 5 min after topical application of stimuli. Degranulated mast cells were dyed by blue toluidine dye. (A) and (C) represent mast cells from vehicle exposed rats stimulated by OA or compound 48/80, respectively; (B) and (D) represent mast cells from HQ exposed rats and stimulated with OA or compound 48/80, respectively. (E) Number of degranulated mast cells in perivascular tissue. Four animals were employed per group. * $p < 0.001$ values obtained for vehicle exposed rats.

3.5. Influence of HQ exposure on the lymphocyte proliferation

In vitro lymphocyte proliferation in response to OA or ConA challenge was not altered by HQ exposure, as demonstrated in Fig. 5. Lymphocyte proliferation was equivalent in spleen cells collected from HQ or vehicle exposed rats. HQ exposure also did not modify the total number of spleen leuko-

cytes (HQ = $18.6 \pm 1.7 \times 10^6$ cell/mL; vehicle = $18.6 \pm 1.1 \times 10^6$ cell/mL; $n = 4$ for each group).

3.6. Effect of HQ exposure on CD45R and CD6 expression on spleen leukocytes

Results depicted in Fig. 6 show that HQ exposure does not alter the expression of CD80, CD86 or CD40, but reduces the expressions of CD45R and CD6 co-

Fig. 4. Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) reaction on the skin of naïve animals sensitized with an intradermal injection of diluted serum obtained from rats exposed to vehicle or HQ (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses) and sensitized with OA (10 µg of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p., day 10 of exposure). Twenty-four hours after the i.d. injections, animals were intravenously challenged with OA solution. Evans blue intravenous injection was used as a dye. Thirty minutes later, the dorsal skin was removed for measurement of the pigment area. The PCA titer was expressed as the mean of the highest dilution resulting in a PCA reaction of 5 mm in diameter or greater. Results are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of samples collected from 4 animals in each group. * $p < 0.001$ values obtained for vehicle exposed rats.

stimulatory molecule on surface of spleen leukocytes after *in vivo* OA-challenge. Interestingly, the reduced expression of CD6 or CD45R detected in cells collected from HQ-exposed rats is not dependent on the number of lymphocytes in the spleen as presented in Table 1. The percentage of cells expressing the CD45R or CD6 is equivalent in HQ or vehicle exposed animals in both the basal state and after *in vivo* OA-challenge (Table 1).

4. Discussion

Benzene concentration in the environment, especially in industrial centers, has reached levels that raise public health concerns (Fustinoni et al., 2005). Determination of the effects of benzene exposure and its mechanisms of action on different tissues may improve risk assessment. Here we show that *in vivo* exposure of rats to HQ, an endogenous metabolite of benzene, results in changes of immune response mirrored by impairing allergic lung response to ovalbumin, an antigen unrelated to HQ.

It is of interest to note that the limits for benzene and HQ exposures are dependent on dose and duration of exposure, route of administration, and animal species (IPCS, 1994). A controlled study in humans volunteers using high doses and prolonged exposure of HQ (300–500 mg HQ daily for 3–5 months, oral route), did not show any observed pathological changes in blood or urine. On the other hand, intraperitoneal administration of lower doses of HQ to mice was cytotoxic as evidenced

Fig. 5. *In vitro* spleen lymphocyte proliferation from vehicle or HQ exposed rats (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses) sensitized with OA (10 µg of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposures. Cells were collected 13 days after sensitization and 2×10^5 cells were cultured per well with 25–125 µg/mL of OA or with Concanavalin A (ConA; 7 µg/mL). During the last 18 h of the 4-day culture period, [3 H]thymidine was added (1 µCi/well). At the end of this period of incubation, cells were collected with an automated cell harvester, and incorporated radioactivity was measured by liquid scintillation spectrometry. Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. counts per minute of [3 H]thymidine incorporation in cells obtained from 3 animals in each group. Assays were performed in triplicate. * $p < 0.001$ for basal values.

by bone marrow reduction and splenic hypocellularity (IPCS, 1994; Hazel et al., 1996; Ewens et al., 1999). Accordingly, this study employed a dosing schedule for HQ that did not cause any apparent toxicity, as reflected by unaltered animal body weights, the normal blood and spleen cellularity, and normal morphology and function of both liver and kidney (data not shown).

Allergic lung inflammation is characterized by onset airway constriction, increased vascular permeability, mucous secretion and recruitment of inflammatory cells (Galli et al., 2005), contributing to pulmonary dysfunction. In this context, we observed that HQ exposure reduced airway reactivity and pulmonary inflammation, as evidenced by decreased *ex vivo* tracheal force contraction and diminished inflammatory cells recovered in BALF after antigen challenge. Although eosinophils are linked to genesis of allergic inflammatory disease,

Fig. 6. Expression of co-stimulatory molecules on spleen leukocytes before and 24 h after *in vivo* OA challenge. Spleen cells were obtained from vehicle- and HQ-exposed rats (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses) and sensitized with OA (10 µg of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposures. OA-challenge (1% solution, 15 min, i.n.) was performed on day 23. Leukocytes were obtained from blood samples from the orbital plexus and co-stimulatory molecule expression was quantified by blood flow cytometry. Results are expressed as mean ± S.E.M. of samples collected from 4 animals in each group. Assays were performed in duplicate. **p* < 0.001 respective values obtained before OA-challenge and #*p* < 0.05 values obtained from vehicle exposed rats after OA-challenge.

in our model of acute allergic inflammation neutrophils are predominantly cells in the BALF, as they are one of the first inflammatory cells to be recruited into the airways after either allergen exposure or injury (Foley and Hamid, 2007). Our data, therefore, clearly revealed that HQ exposure modified the acute and late allergic lung response. Because, cellular recruitment during inflammatory process involves cellular traffic from bloodstream to the injured site, we decide to investigate if the HQ exposure could be associated with changes in leukocyte traffic. Interestingly, HQ exposure did not alter the profile of circulating leukocytes, a fact that ruled out the involvement of hematotoxicity of HQ (Ross et

al., 1996; Smith et al., 2000; Kalf et al., 1996; King et al., 1987, 1989; Snyder, 2002; Macedo et al., 2006). Moreover, HQ exposure did not change the expression of adhesion molecules L-selectin and β_2 integrin on the membrane of peripheral leukocytes (data not shown). Overall, the impaired lung leukocyte migration of allergic rats exposed to HQ appears not to depend on changes of peripheral mobilization of leukocytes from the bone marrow or their activation state in the blood compartment.

Therefore, we proposed a hypothesis that HQ exposure could modify the immunological activation of mast cells. Sensitized mast cells release a number of inflam-

Table 1

Percentage of spleen leukocytes expressing co-stimulatory molecules collected from HQ or vehicle exposed rats

	Vehicle		HQ	
	Before	After OA	Before	After OA
CD86	27.01 ± 3.24	73.21 ± 12.10*	27.28 ± 5.02	81.61 ± 2.66*
CD80	41.09 ± 2.55	78.93 ± 5.47**	30.63 ± 8.10	92.75 ± 1.64**
CD40	29.03 ± 3.91	77.74 ± 9.35**	21.42 ± 1.21	86.19 ± 8.10**
CD45R	60.11 ± 5.97	94.29 ± 2.10**	64.49 ± 3.60	97.44 ± 1.18**
CD6	52.95 ± 4.47	89.64 ± 1.79**	48.49 ± 3.89	90.34 ± 5.45**

Spleen cells were obtained from vehicle or HQ exposed rats (50 mg/kg; i.p. route; once a day; 16 doses with a 2-day interval after every 5 doses) and sensitized with OA (10 µg of OA plus 10 mg of aluminum hydroxide, i.p.) on day 10 of exposures. OA-challenge (1% solution, 15 min, i.n.) was performed on day 23. Cells were collected before and 24 h after OA-challenge. Percentage of leukocyte expressing each co-stimulatory molecule was determined by flow cytometer. Data represent mean ± S.E.M. of 4 animals in each group. **p* < 0.01 and ***p* < 0.001 in comparison to respective values before OA-challenge.

matory mediators within a few minutes after antigen challenge, including histamine, serotonin, cytokines, proteases, eicosanoids and interleukins (Galli et al., 2005). As consequence, these mediators induce an initial contraction of airway smooth muscles, stimulate nerve endings and cause mucus secretion. Additionally, they contribute to the development of the allergic response by activating resident and vascular cells to secrete additional mediators and to induce leukocyte recruitment to the inflammatory focus (de Lima and da Silva, 1998; Nemmar et al., 1999; Damaso et al., 2001; Wyss et al., 2005; Lukacs et al., 2005; Lino dos Santos Franco et al., 2006). In this study we observed that HQ exposure reduced the OA-induced tracheal contraction and the degranulation of mesentery perivascular mast cells. Overall, the relevance of the immunological response was supported by similar tracheal contraction and mesenteric mast cell degranulation in HQ or vehicle exposed rats after topical administration of compound 48/80, a mast cell secretagogue agent that evokes activation of phospholipase D and G protein-independent-receptors (Palomaki and Laitinen, 2006).

Reduced PCA titers were found in serum of HQ exposed allergic rats, reinforcing the suggestion that HQ might to interfere with the immune mechanisms associated with sensitization phase. Being so, we hypothesized that reduced levels of IgE and IgG anaphylactic antibodies, well established as mediators of allergic inflammation, might impaired the allergic response observed in rats subjected to HQ exposure, likely explained by the decreased mast cells degranulation in response to antigen challenge. Our data did not reveal the mechanisms triggered by HQ in order to cause impairment on levels of circulating OA-immunoglobulins. However, a putative mechanism proposed to the immunotoxicity of HQ is the inhibition of lymphocyte differentiation and proliferation, resulting in a reduced humoral activity. Despite *in vitro* assays showing the ability of high doses of HQ to inhibit T and B-lymphocyte proliferation (Li et al., 1996; Doepker et al., 2000; McCue et al., 2000; Poirier et al., 2002), there is no conclusive evidence about *in vivo* exposure of HQ. Conversely, it was shown that HQ sensitizes mice by enhancing B cells in popliteal lymph nodes (Ewens et al., 1999) and enhances the levels of IL-4 produced by CD4⁺ T cells and circulating levels of IgE in keyhole limpet haemocyanin-primed mice (Lee et al., 2002). Results herein do not corroborate these previous studies, since the schedule of HQ exposure employed did not alter the number of lymphocytes in circulation, in the spleen or their *in vitro* proliferation induced by

antigenic stimulus or by ConA. These divergent results may be accounted by different protocols of exposure. Indeed, in our model, the rats were subjected to extended treatment with phenolic compound prior to antigen sensitization whereas Lee et al. (2002) injected HQ in rats daily during a week after initial contact with the antigen.

Interaction of the T cell receptor (TCR) complex with the antigen peptide presented by the MHC on the APC is a pivotal event in the T cell activation. However, sustained T cell activation requires signal amplification by accessory molecules (Gimferrer et al., 2004). The amplification and modifications of the TCR signal by the co-stimulatory signals enable the antigen-specific pre-activated T lymphocyte to proliferate, secrete cytokines, and express cell-surface molecules for further cell–cell interactions involved in the development of the immune response (Mueller et al., 1989; Kallinich et al., 2005). Thus, we proposed to investigate the role of HQ exposure on expression of co-stimulatory molecules involved in T cell proliferation and B cell activation. We verified that *in vivo* HQ exposure impairs the expression of the CD45 receptor and CD6 molecules in OA activated spleen lymphocytes. CD6 acts as a co-stimulatory molecule synergizing with the TCR or CD28 to enhance T cell proliferation (Gimferrer et al., 2004). As lymphocyte proliferation is not altered by HQ exposure, it is possible to suggest that other molecules, such as CD28 may have a main role in the process. This hypothesis may be reinforced by normal expressions of CD28 ligands, CD80 and CD86. However, the importance of CD28 in our experimental model of HQ exposure will be further investigated. CD45 is an important surface protein on nucleated hematopoietic cells, comprising about 10% of T and B surface area involved in proliferation, differentiation and functions of lymphocytes (Thomas, 1989). Anti-CD45 antibodies alter signaling in B and T cells (Morikawa et al., 1991; Hasegawa et al., 1990; Faris et al., 1994; Mittler et al., 1994) and the CD45R inhibitor negatively regulates IgE-dependent anaphylaxis and contact hypersensitivity reactions *in vivo* and *in vitro* (Hamaguchi et al., 2001). These results provide a basis to support the hypothesis that HQ exposure may alter the interaction between T and B cells, with the subsequent impairment of the humoral response detected here.

Taken together the data show that the impairment of allergic lung inflammation after prolonged HQ exposure is associated with a deficiency in T and B lymphocyte co-stimulatory molecules expression, which perhaps reduces antibody production leading to failure of mast cell activation.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP grants #03/04013-8. S.C.M. Vaz is a FAPESP fellow undergraduate student (#05/55623-6) and S.M.D. Macedo is graduate fellow supported by Capes. S.H.P. Farsky and W. Tavares de Lima are fellows of the Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq).

References

- Ansel, K.M., Lee, D.U., Rao, A., 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 4 (7), 616–623.
- Burastero, S.E., Rossi, G.A., 1999. Immunomodulation by interference with co-stimulatory molecules: therapeutic perspectives in asthma. *Thorax* 54, 554–557.
- Careau, E., Sirois, J., Bissonnette, E.Y., 2002. Characterization of lung hyperresponsiveness, inflammation, and alveolar macrophage mediator production in allergy resistant and susceptible rats. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (5), 579–586.
- Coleman, J.W., Layton, G.T., Stanworth, D.R., 1983. The kinetics of *in vivo* sensitization of rat peritoneal and lung mast cells: temporal dissociation from circulating levels of IgE. *Eur. J. Immunol.* 13 (12), 994–998.
- Dale, H.H., 1913. The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig. *J. Pharm. Exp. Ther.* 4, 167–223.
- Damaso, A.S., Tavares de Lima, W., Perretti, M., Oliani, S.M., 2001. Pharmacological modulation of allergic inflammation in the rat airways and association with mast cell heterogeneity. *Eur. J. Pharmacol.* 426 (1/2), 123–130.
- Darrall, K.G., Figgins, J.A., Brown, R.D., Philips, G.F., 1998. Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* 123, 1095–1101.
- Deisinger, P.J., Hill, T.S., English, J.C., 1996. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J. Toxicol. Environ. Health* 47, 31–46.
- de Lima, W.T., da Silva, Z.L., 1998. Contractile response of proximal and distal trachea segments isolated from rats subjected to immunological stimulation: role of connective tissue mast cells. *Gen. Pharmacol.* 30 (5), 689–695.
- Dimitrova, N.D., Kostadinova, R.Y., Marinova, S.N., Popov, T.A., Panev, T.I., 2005. Specific immune response in workers exposed to benzene. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1554–1559.
- Doepker, C.L., Dumont, K.W., O'Donoghue, J., English, J.C., 2000. Lack of induction of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with hydroquinone. *Mutagenesis* 15 (6), 479–487.
- Ewens, S., Wulferink, M., Goebel, C., Gleichmann, E., 1999. T cell-dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Arch. Toxicol.* 73 (3), 159–167.
- Faris, M., Gaskin, F., Parsons, J.T., Fu, S.M., 1994. CD40 signaling pathway: anti-CD40 monoclonal antibody induces rapid dephosphorylation and phosphorylation of tyrosine-phosphorylated proteins including protein tyrosine kinase Lyn, Fyn, and Syk and the appearance of a 28-kD tyrosine phosphorylated protein. *J. Exp. Med.* 179 (6), 1923–1931.
- Foley, S.C., Hamid, Q., 2007. Images in allergy and immunology: neutrophils and asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 119 (5), 1282–1286.
- Fustinoni, S., Buratti, M., Campo, L., Colombi, A., Consonni, D., Pesatori, A.C., Bonzini, M., Farmer, P., Garte, S., Valerio, F., Merlo, D.F., Bertazzi, P.A., 2005. Urinary *t,t*-muconic acid, *S*-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem. Biol. Interact.* 153/154, 253–256.
- Galli, S.J., Kalesnikoff, J., Grimdeston, M.A., Piliponsky, A.M., Williams, C.M., Tsai, M., 2005. Mast cells as “tunable” effector and immunoregulatory cells: recent advances. *Annu. Rev. Immunol.* 23 (7), 49–86.
- Gimferrer, I., Calvo, M., Mittelbrunn, M., Farnós, M., Sarrias, M.R., Enrich, C., Vives, J., Sánchez-Madrid, F., Lozano, F., 2004. Relevance of CD6-mediated interactions in T cell activation and proliferation. *J. Immunol.* 173 (4), 2262–2270.
- Hamaguchi, T., Takahashi, A., Manaka, A., Sato, M., Osada, H., 2001. TU-572, a potent and selective CD45 inhibitor, suppresses IgE-mediated anaphylaxis and murine contact hypersensitivity reactions. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126 (4), 318–324.
- Hasegawa, K., Nishimura, H., Ogawa, S., Hirose, S., Sato, H., Shirai, T., 1990. Monoclonal antibodies to epitope of CD45R (B220) inhibit interleukin 4-mediated B cell proliferation and differentiation. *Int. Immunol.* 2 (4), 367–375.
- Hazel, B.A., O'Connor, A., Niculescu, R., Kalf, G.F., 1996. Induction of granulocytic differentiation in a mouse by benzene and hydroquinone. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1257–1264.
- Henderson, R.F., 1996. Species differences in the metabolism of benzene. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1173–1175.
- Hong, S.H., Jeong, H.J., Kim, H.M., 2003. Inhibitory effects of *Xanthii fructus* extract on mast cell-mediated allergic reaction in murine model. *J. Ethnopharmacol.* 88 (2/3), 229–234.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., Lanzavecchia, A., 1998. The duration of antigen stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 89 (1), 89–95.
- IPCS, 1994. International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 157. Hydroquinone (URL: <http://www.inchen.org/documents>).
- Kalf, G.F., Renz, J.F., Niculescu, R., 1996. *p*-Benzoquinone, a reactive metabolite of benzene, prevents the processing of pre-interleukins-1 alpha and -1 beta to active cytokines by inhibition of the processing enzymes, calpain, and interleukin-1 beta converting enzyme. *Environ. Health Perspect.* 104 (Suppl. 6), 1251–1256.
- Kallinich, T., Beier, K.C., Gelfand, E.W., Kroczeck, R.A., Hamelmann, E., 2005. Co-stimulatory molecules as potential targets for therapeutic intervention in allergic airway disease. *Clin. Exp. Allergy* 35 (12), 1521–1534.
- Kiefer, F., Vogel, W.F., Arnold, R., 2002. Signal transduction and co-stimulatory pathways. *Transpl. Immunol.* 9, 69–82.
- Kim, E., Kang, B.Y., Kim, T.S., 2005. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor- κ B binding activity. *Immunol. Lett.* 99, 24–29.
- King, A.G., Landreth, K.S., Wierda, D., 1987. Hydroquinone inhibits bone marrow pre-B cell maturation in vitro. *Mol. Pharmacol.* 32 (6), 807–812.
- King, A.G., Landreth, K.S., Wierda, D., 1989. Bone marrow stromal cell regulation of B-lymphopoiesis. II. Mechanisms of hydroquinone inhibition of pre-B cell maturation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250 (2), 582–590.
- Lee, M.H., Chung, S.W., Kang, B.Y., Kim, K.M., Kim, T.S., 2002. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4+ T cells and increases immunoglobulin E levels in antigen-primed mice. *Immunology* 106 (4), 496–502.
- Li, Q., Geiselhart, L., Mittler, J.N., Mudzinski, S.P., Lawrence, D.A., Freed, B.M., 1996. Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 139 (2), 317–323.

- Li, Q., Aubrey, M.T., Christian, T., Freed, B.M., 1997. Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundam. Appl. Toxicol.* 38 (2), 158–165.
- Lino dos Santos Franco, A., Damazo, A.S., Beraldo de Souza, H.R., Domingos, H.V., Oliveira-Filho, R.M., Oliani, S.M., Costa, S.K., Tavares de Lima, W., 2006. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 214 (1), 35–42.
- Lukacs, N.W., Hogaboam, C.M., Kunkel, S.L., 2005. Chemokines and their receptors in chronic pulmonary disease. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4 (3), 313–317.
- Macedo, S.M.D., Lourenço, E.L.B., Borelli, P., Fock, R.A., Ferreira Jr., J.M., Farsky, S.H.P., 2006. Effect of *in vivo* phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology* 220, 126–135.
- McCue, J.M., Link, K.L., Eaton, S.S., Freed, B.M., 2000. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* 165 (12), 6771–6775.
- McCue, J.M., Lazis, S., Cohen, J.J., Modiano, J.F., Freed, B.M., 2003. Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.* 39 (16), 995–1001.
- Mittler, R.S., Schieven, G.L., Dubois, P.M., Klussman, K., O'Connell, M.P., Kiener, P.A., Herndon, V., 1994. CD45-mediated regulation of extracellular calcium influx in a CD4-transfected human T cell line. *J. Immunol.* 153 (1), 84–96.
- Morikawa, K., Oseko, F., Morikawa, S., 1991. The role of CD45 in the activation, proliferation and differentiation of human B lymphocytes. *Int. J. Hematol.* 54 (6), 495–504.
- Mota, I., Wong, D., 1969. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 8, 813–820.
- Mueller, D.L., Jenkins, M.K., Schwartz, R.H., 1989. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 445–480.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L., 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2 (12), 933–944.
- Nemmar, A., Delaunois, A., Nemery, B., Dessy-Doize, C., Beckers, J.F., Sulon, J., Gustin, P., 1999. Inflammatory effect of intratracheal instillation of ultrafine particles in the rabbit: role of C-fiber and mast cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 160 (3), 250–261.
- Okayama, Y., Kawakami, T., 2006. Development, migration, and survival of mast cells. *Immunol. Res.* 34 (2), 97–115.
- Palomaki, V.A., Laitinen, J.T., 2006. The basic secretagogue compound 48/80 activates G proteins indirectly via stimulation of phospholipase D-lysophosphatidic acid receptor axis and 5-HT1A receptors in rat brain sections. *Br. J. Pharmacol.* 147 (6), 596–606.
- Poirier, M., Fournier, M., Brousseau, P., Morin, A., 2002. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A* 65 (19), 1437–1451.
- Ross, D., Siegel, D., Schattenberg, D.G., Sun, X.M., Moran, J.L., 1996. 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.* 104 (Suppl. 6), 1177–1182.
- Schultz, W.H., 1910. Physiological studies in anaphylaxis I: the reaction of smooth muscle of guinea-pig sensitized with horse serum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1, 549–567.
- Shin, H.Y., Lee, C.S., Chae, H.J., Kim, H.R., Baek, S.H., An, N.H., Kim, H.M., 2000. Inhibitory effect of anaphylactic shock by caffeine in rats. *Int. J. Immunopharmacol.* 22 (6), 411–418.
- Smith, M.T., Zhang, L., Jeng, M., Wang, Y., Guo, W., Duramad, P., Hubbard, A.E., Hofstadler, G., Holland, N.T., 2000. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis* 21 (8), 1485–1490.
- Snyder, R., 2002. Benzene and leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.* 32 (3), 155–210.
- Snyder, R., 2004. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.* 36 (3/4), 531–547.
- Stanfield, J.W., Feldman, S.R., Levitt, J., 2006. Sun protection strength of a hydroquinone 4%/retinol 0.3% preparation containing sunscreens. *J. Drugs Dermatol.* 5 (4), 321–324.
- Thomas, M.L., 1989. The leukocyte common antigen family. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 339–369.
- Wyss, D., Bonneau, O., Trifilieff, A., 2005. Mast cell involvement in the adenosine mediated airway hyper-reactivity in a murine model of ovalbumin-induced lung inflammation. *Br. J. Pharmacol.* 145 (7), 845–852.

Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria

A. Ferreira¹, S.M.D. Macedo^{1,2}, A.P. Ligeiro-Oliveira³, W. Tavares de Lima³, S.H.P. Farsky^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, ²Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus Erechim, ³Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo

A gravidade dos efeitos causados pela exposição ambiental e ocupacional ao benzeno determinou o controle de sua utilização. No entanto, mesmo nestas condições, toxicidade ao sistema imune e nervoso tem sido descrita. A toxicidade do benzeno é determinada pelos seus produtos de biotransformação, em que fenol (FE) e hidroquinona (HQ) têm papel relevante na imunotoxicidade. Neste contexto, o presente trabalho mostra que a exposição de ratos Wistar, machos, a doses de 5 ou 10 mg/kg de HQ (via i.p., uma vez ao dia, 13 doses consecutivas, com intervalos de 2 dias a cada 5 doses) provocou reduções acentuadas no influxo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) para o pulmão 24 horas após inalação de Lipopolissacarídeo (LPS) de Salmonella abortus. Diferentemente, a migração de leucócitos em animais expostos ao FE não foi alterada. A exposição a ambos os agentes químicos simultaneamente (dose de 5 mg/kg cada) manteve a redução na migração de MN detectada em animais expostos à HQ e potencializou o efeito inibitório da HQ sobre a migração de leucócitos PMN. Os prejuízos nas migrações de leucócitos não foram decorrentes de modificações no número destas células na circulação. É importante ressaltar que os efeitos foram induzidos por doses dos agentes químicos que não causaram prejuízo à função hepática ou renal, determinados pela atividade das transaminases hepáticas e a concentração de creatinina no soro. Em conjunto, os dados obtidos mostram a exposição a baixas doses de HQ não provoca alterações nos parâmetros empregados como indicadores de toxicidade. No entanto, os efeitos tóxicos são manifestados na vigência de uma agressão ao hospedeiro.

Unitermos

- Benzeno
- Hidroquinona
- Fenol
- Inflamação pulmonar
- Lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella abortus*

*Correspondência:

S. H. P. Farsky
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bl 13 B
05508-900, São Paulo, SP, Brasil
E-mail: sfarsky@usp.br

INTRODUÇÃO

Apesar de ter seu uso restrito, o benzeno é um solvente orgânico empregado em várias facções industriais, sendo que a petroquímica ocupa a liderança. Além da utilização industrial, a presença de benzeno na fumaça de veículos automotivos e do cigarro contribui para contaminação ambiental (Darrall *et al.*, 1998; Qu *et al.*, 2000; 2003; Turteltaub, Mani, 2003; Fustioni *et al.*, 2005). O controle da exposição em países em desenvolvimento nem sempre é satisfatório e, assim, relatos clínicos de intoxicação ocupacional e ambiental pelo benzeno ainda são encontrados na literatura (Waidyanatha *et al.*, 2001; Lan *et al.*, 2004; Stokstad, 2004; Qu *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2006).

Tem-se demonstrado experimentalmente que os produtos de biotransformação do benzeno, entre os quais os compostos fenólicos hidroquinona (HQ) e fenol (FE), são os responsáveis pela neurotoxicidade, hematotoxicidade e imunossupressão observada em casos de intoxicações (Rothman *et al.*, 1996; Mc Cue *et al.*, 2000; 2003; Poirier *et al.*, 2002; Snyder, 2002, 2004).

Em mamíferos, o benzeno é oxidado por enzimas do complexo citocromo P450 (CYP), principalmente pela atividade enzimática da CYP 2E1 hepática ou pela CYP 2F2 presente nos pulmões. O óxido de benzeno formado é espontaneamente convertido a FE por meio de rearranjo não-enzimático e, subsequentemente, a HQ e catecol pela ação da CYP2 E1 (Medinsky *et al.*, 1995; Ong *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2003; Gaskell *et al.*, 2004). Estes compostos oxidados são substratos para enzimas sulfotransferases e glicuroniltransferases hepáticas (Medinsky *et al.*, 1995) ou são transportados para a medula óssea, onde são oxidados a 1,4-benzoquinona (1,4-BQ) e 1,2-benzoquinona (1,2-BQ) pela ação de mieloperoxidases e prostaglandina H sintetase, respectivamente (Medinsky *et al.*, 1995; De Caprio, 1999; Snyder, 2004). Se não metabolizados eficientemente por sistemas enzimáticos competentes, como algumas redutases presentes na medula óssea, tais compostos causam prejuízo na produção, maturação e função de células hematológicas em humanos e em animais de experimentação (Sheets *et al.*, 2004; Sheets, Carlson, 2004; Snyder, 2004; Kim *et al.*, 2006). A despeito dos efeitos imunotóxicos estarem bem demonstrados em ensaios *in vitro* ou em condições tóxicas de exposição ao solvente, os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos tóxicos do benzeno ainda não estão completamente elucidados.

As doenças pulmonares são importantes causas de morbidade e mortalidade, sendo que as de origem inflamatória infecciosa ou alérgica representam parcela significativa e crescente na incidência das mesmas. Os hábitos de fumar, o estresse, a poluição dos centros urbanizados e as ativida-

des ocupacionais têm papel relevante para a epidemiologia destas doenças (Bernstein *et al.*, 2004; Peden, 2005).

A resposta inflamatória pulmonar é caracterizada por modificações na reatividade das vias aéreas e ativação de células residentes, como mastócitos, macrófagos e células epiteliais, que secretam mediadores químicos, responsáveis, entre outras ações, pela constrição das vias aéreas e pelo influxo acentuado de leucócitos para o foco de lesão. Para tanto, os leucócitos circulantes interagem com o endotélio da parede de vênulas pós-capilares próximas à área inflamada e migram, por entre as junções interendoteliais, em direção à área inflamada. Neste local, os leucócitos liberam substâncias armazenadas em grânulos intracelulares e secretam mediadores recém-sintetizados que, em conjunto, facilitarão a destruição do agente lesivo e a subsequente resolução do processo inflamatório. No entanto, modificações nestas atividades celulares acarretam prejuízos ao tecido inflamado, quer seja pela ineficácia da resposta e manutenção da lesão, ou por exacerbação do processo, com conseqüente prejuízo aos mecanismos de reparo e regeneração tecidual (Tracey, 2002; Kumar *et al.*, 2005; Martin, Frevert, 2005).

Levando-se em consideração a importância do benzeno na contaminação da atmosfera e seus efeitos deletérios sobre o sistema imune, os efeitos da exposição a produtos de biotransformação do benzeno sobre a capacidade de resposta inflamatória a um agente lesivo têm sido investigados experimentalmente. Neste contexto, os resultados obtidos anteriormente mostraram que a administração i.p. de HQ a ratos Wistar machos, na dose de 50 mg/kg/dia altera a cinética do influxo de leucócitos polimorfonucleares na vigência de reação inflamatória no tecido subcutâneo induzida pelo glicogênio de ostra (Macedo *et al.*, 2006). É interessante notar que a mesma exposição ao FE não compromete a capacidade migratória dos leucócitos. Este dado é bastante intrigante, uma vez que o FE é metabolizado à HQ endogenamente. No entanto, estes dados estão de acordo com os da literatura, que mostram que o FE, diferentemente da HQ, não causa efeitos tóxicos sobre a linhagem granulocítica (Moran *et al.*, 1996; Henschler *et al.*, 1996).

No presente trabalho investigaram-se os efeitos da exposição *in vivo* a HQ, FE e a ambos simultaneamente, em doses menores que a preconizada pela literatura, sobre a migração de leucócitos na vigência de inflamação pulmonar induzida pelo Lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella abortus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, pesando

entre 150-200 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso à ração e água durante todo o período de exposição química. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (Ofício CEEA n. 21/2004 – Protocolo 65).

Produtos de Biotransformação do Benzeno e Reagentes Utilizados

Hidroquinona (HQ), fenol (FE), LPS de *Salmonella abortus*, albumina sérica bovina (BSA, fração V), orto-dianisidina, EDTA, acetato de forbol miristato (PMA), brometo de hexadecil-trimetilamônio (BHMTA), Azida sódica (todos os reagentes acima foram obtidos da Sigma, St. Louis, MO, USA); etanol, acetona, corante May-Grünwald-Giemsa, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de potássio, bicarbonato de sódio, fosfato di-básico de potássio, sulfato de magnésio, glicose, água oxigenada (todos os reagentes acima foram obtidos da Merck & Co, NJ, USA); pentobarbital sódico (Cristália, Brasil); Heparina (Roche, Brasil). Kits ALT/GPT Liquiform, AST/GOT Liquiform, creatinina K e Analisador Bioquímico BIO Plus BIO-2000 (Labtest, Brasil).

Protocolo de Exposição aos Agentes Químicos

HQ e FE foram dissolvidos em etanol absoluto (5% da solução final) e o volume completado com solução salina estéril. O esquema de exposição compreendeu administrações intraperitoneais diárias de HQ ou FE (dose 5 ou 10 mg/kg/dia em um volume final de 1 mL) ou HQ e FE associados (HQ/FE; dose 5 mg/kg/dia em um volume final de 1 mL). Os animais receberam 13 doses, com intervalos de dois dias a cada cinco doses. Animais controles receberam volumes equivalentes dos veículos pela mesma via. Os ensaios foram realizados 24 horas após a administração da última dose.

Resposta Inflamatória Induzida pelo LPS

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/kg, i.p.) e 100 µg/mL de LPS de *Salmonella abortus* em salina estéril foram instilados na cavidade nasal dos animais com auxílio de uma micropipeta. Vinte e quatro horas mais tarde, os animais foram anestesiados e os lavados broncoalveolares (LBA) ou os tecidos pulmonares foram coletados.

Coleta do LBA e quantificação celular

A coleta do LBA foi realizada de acordo com Tavares de Lima *et al.* (1998) e Bozinovski *et al.* (2004). Para tanto, os animais foram anestesiados pelo pentobarbital sódico (65 mg/kg, i.p.), a cavidade peritoneal foi exposta e a exsanguinação foi realizada pela aorta abdominal. Após manipulação cirúrgica, a traquéia foi exposta e canulada utilizando uma válvula reguladora com três entradas. Na primeira entrada foi acoplada uma cânula de polietileno; à segunda, uma seringa de plástico contendo 20 mL de solução tampão de fosfatos (PBS) e, à terceira, uma seringa vazia (para aspiração do exsudato inflamatório). A cânula foi inserida na traquéia para lavagem do espaço broncoalveolar.

O LBA obtido foi centrifugado por 10 min a 500 × g, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer e em esfregaço sangüíneo corado com solução de May-Grünwald e Giemsa por microscopia óptica.

Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

Vinte e quatro horas após a instilação do LPS, os animais foram sacrificados pela administração de dose excessiva de anestésico (pentobarbital sódico, i.p.), a cavidade torácica foi aberta e o leito vascular do pulmão imediatamente perfundido com PBS contendo heparina (5 UI/mL), utilizando-se uma cânula inserida na artéria pulmonar.

O tecido pulmonar livre de sangue foi pesado e perfundido com 3 mL/g de tampão fosfato (pH 6,2 contendo 0,5% de BHMTA e 5 mM EDTA). A seguir, o pulmão foi homogeneizado 2 × 30 s em homogeneizador de tecido, centrifugado e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de MPO. Assim, 680 mL de PBS contendo 0,25% de BSA, 500 mL de tampão fosfato pH 6.2, 100 mL de água oxigenada (0,0005%), 40 mL da amostra e 100 mL de orto-dianisidina (1,25 mg/mL) foram adicionados em tubos de ensaio para a reação. Após 15 min, a reação foi paralisada pela adição de 100 mL de azida sódica (1%). A quantificação da absorbância foi feita por espectrofotometria (450 nm) em leitor (Spectra Max Plus^a – Molecular Devices).

Determinação do número de leucócitos circulantes

A contagem total e diferencial de leucócitos circulantes foi realizada a partir de amostras de sangue heparinizado, coletadas do plexo orbital dos animais com

auxílio de um tubo capilar de vidro. A contagem global de células foi realizada em câmara de Neubauer, após a diluição das amostras de sangue na proporção de 1:20 (v:v) com líquido de Türk. A contagem diferencial foi realizada em extensão de sangue fixado e corado, pancromicamente pela solução de May-Grünwald e Giemsa.

Determinação da atividade das transaminases hepáticas e concentração de creatinina sérica

Os animais foram anestesiados pelo pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) 24 horas após a última dose dos agentes químicos ou ao veículo. Sangue foi coletado da artéria abdominal e o soro foi separado por centrifugação ($800 \times g$ por 10 min). Amostras do soro de cada animal foram utilizadas para determinar a atividade das transaminases hepáticas, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), além da concentração de creatinina.

A atividade enzimática das transaminases (ALT e AST) foi determinada pela metodologia Liquiform. Nesta metodologia a ALT catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e piruvato. Este é reduzido a lactato por ação da lactato desidrogenase (LDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A AST catalisa a transferência de grupos amina da alanina para o cetoglutarato, com formação de glutamato e oxalacetato. Este é reduzido a malato por ação da malato desidrogenase (MDH), enquanto que a coenzima NADH é oxidada a NAD. A consequente redução da absorbância em 340 ou 365 nm, monitorizada espectrofotometricamente, é diretamente proporcional à atividade das enzimas na amostra.

A determinação da concentração de creatinina foi baseada na reação de Jaffé, de acordo com a metodologia Liquiform, na qual a creatinina reage com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido colorimetricamente.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados com média $\pm$ erro padrão da média e analisados estatisticamente pelo teste “t” de “Student” ou ANOVA, seguida de testes complementares apropriados (Bonferroni e Tukey).

RESULTADOS

HQ, mas não FE, inibiu a migração de leucócitos para o pulmão induzida pelo LPS

Os resultados obtidos na análise diferencial das cé-

lulas no LBA mostram que a exposição de HQ, nas doses de 5 ou 10 mg/kg, inibiu significativamente o recrutamento de leucócitos MN e PMN para o espaço broncoalveolar em relação ao recrutamento observado em animais controles, que receberam o veículo pela mesma via (Figura 1A). Os valores encontrados, especialmente com a dose de 10 mg/kg, foram próximos aos números de leucócitos residentes, uma vez que os valores basais de MN e PMN no BAL são $5,08 \times 10^5$ e $0,17 \times 10^5$, respectivamente.

A enzima mieloperoxidase é expressa em neutrófilos e a mensuração de sua atividade é proporcional à quantidade de leucócitos no tecido inflamado. Os dados encontrados mostram que a exposição à HQ reduziu a atividade enzimática de MPO no tecido pulmonar. Os valores obtidos após exposição a ambas as doses de HQ foram menores que os encontrados em animais controles (Figura 1B). É importante salientar que o valor basal de MPO em animais naïve é $0,04 \pm 0,001$ (n=4).

Diferentemente do mostrado para animais expostos à HQ, em animais expostos ao FE, independentemente da dose utilizada, o influxo de leucócitos para o espaço broncoalveolar e a atividade de MPO foram equivalentes às observadas em animais expostos ao veículo (Figura 1C e D).

A exposição associada de FE e HQ potencializou a inibição da migração de PMN induzida pela HQ

Os resultados obtidos mostram que a associação de FE à HQ não alterou a reduzida migração de MN para o pulmão inflamado evidenciado em animais expostos à HQ (HQ = redução de 51,13% vs controle; HQ + FE = redução de 41,28% vs controle) (Figura 1E). No entanto, a exposição associada dos agentes químicos potencializou o efeito inibitório da HQ sobre a mobilização de PMN, demonstrados pelo decréscimo significativo no número destas células no LBA (HQ = redução de 50,8% vs controle; HQ + FE = redução de 85% vs controle) (Figura 1E) e pela atividade de MPO no tecido pulmonar (HQ = redução de 36,84% vs controle; HQ + FE = redução de 68,85% vs controle) (Figura 1F).

A exposição aos agentes químicos não comprometeu a mobilização de leucócitos para o sangue circulante

Prejuízos na produção de leucócitos e a consequente redução no número de leucócitos circulantes têm sido descritos a baixas doses de exposição ao benzeno (Lan *et al.*, 2004; Stokstad, 2004), sendo que os metabólitos fenólicos exercem papel relevante no processo (Poirier *et al.*, 2002; Mc Cue *et al.*, 2003; Macedo *et al.*, 2006). Para

FIGURA 1 - Número de leucócitos no lavado broncolaveolar (A, C e E) e atividade de mieloperoxidase (B, D e F) no tecido pulmonar 24 horas após inalação de LPS em animais previamente expostos à HQ, FE, HQ e FE simultaneamente ou ao veículo. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. HQ= hidroquinona; FE= fenol; PMN= leucócitos polimorfonucleares; MN= leucócitos mononucleares, MPO= mieloperoxidase. * $P < 0,001$ em relação ao respectivo valor obtido no grupo de animal controle.

investigar se as inibições nas migrações de leucócitos para o foco de inflamação em animais expostos à HQ ou à HQ e FE simultaneamente refletiam alterações na mobilização destas células da medula óssea para o compartimento periférico, o número de leucócitos circulantes foi quantificado antes das exposições químicas, imediatamente antes e 24 horas após a inalação do LPS. Os dados obtidos mostram que nenhum dos protocolos de exposição aos agentes químicos modificou o número de leucócitos circulantes, nem o recrutamento destas células para o compartimento periférico após administração do LPS (Figura 2).

A exposição aos agentes químicos não alterou a função hepática ou renal

Uma vez que os agentes químicos foram administrados por via intraperitoneal e a metabolização e excreção dos mesmos é feita, primordialmente, pelas vias hepática e renal, respectivamente, quantificamos a atividade sérica das enzimas transaminases ALT e AST, marcadoras de função hepática, e a concentração sérica de creatinina, marcadora de função renal, para avaliar o possível comprometimento funcional destes órgãos. Os dados apresentados

FIGURA 2 - Número de leucócitos no sangue periférico de animais expostos a HQ, FE, HQ e FE simultaneamente ou ao veículo. As quantificações foram realizadas antes do início das exposições, imediatamente antes e 24 horas após instilação de LPS. O sangue foi coletado do plexo orbital. Os resultados expressam a média $\pm$ e.p.m. de 6 animais em cada grupo. HQ= hidroquinona; FE= fenol; PMN= leucócitos polimorfonucleares; MN= leucócitos mononucleares. * $P < 0,01$ em relação ao respectivo valor obtido antes da instilação de LPS.

TABELA I - Atividade das transaminases hepáticas (AST e ALT) e concentração de creatinina no soro de animais expostos à hidroquinona (HQ), fenol (FE), hidroquinona + fenol (HQ + FE) ou ao veículo

	Veículo	HQ	FE	HQ + FE
ALT (U/L)	41,2 $\pm$ 10,6	31,0 $\pm$ 8,8	31,0 $\pm$ 3,5	44,0 $\pm$ 6,2
AST (U/L)	149,7 $\pm$ 27,2	130,6 $\pm$ 14,5	121,2 $\pm$ 1,2	149,0 $\pm$ 18,2
Creatinina (mg/dL)	0,45 $\pm$ 0,02	0,44 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,02	0,50 $\pm$ 0,00

Os resultados estão expressos como média $\pm$ e.p.m. de soro coletado de 4 animais em cada grupo. As dosagens foram realizadas em duplicatas.

na Tabela I mostram que a atividade das enzimas ALT e AST e a concentração de creatinina presentes no soro não foram alteradas pela exposição a HQ, FE ou HQ e FE as-

sociados, uma vez que os valores encontrados foram similares aos obtidos em animais controles.

DISCUSSÃO

Infecções bacterianas são causas relevantes de morbidade e mortalidade no mundo. As respostas às infecções envolvem uma interação complexa entre os componentes bacterianos e o sistema imune. Endotoxinas liberadas de bactérias gram-negativas são estímulos potentes para o sistema imune e a resposta competente do organismo a estes agentes determina a evolução do processo. Usando o lipopolissacarídeo de *S. abortus* como indutor de processo inflamatório infeccioso pulmonar mostramos experimentalmente que a exposição a metabólitos do benzeno, agente relevante na exposição ocupacional e ambiental, em doses consideradas seguras pela literatura e pelos órgãos regulamentadores, comprometem a resposta do organismo a infecções.

A relação entre dose, tempo de exposição e toxicidade do benzeno não é linear, por conta dos diferentes efeitos desencadeados pelos seus metabólitos (Savitz, Andrew, 1997; Lan *et al.*, 2004). Tem sido proposto que o NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) em animais de experimentação para HQ ou FE é 15 e 12 mg/kg/dia, respectivamente (Ryan *et al.*, 2001). Os dados aqui obtidos, demonstrados pela marcada redução no número de leucócitos no pulmão inflamado em animais expostos à HQ e a ausência de efeitos em animais expostos ao FE, confirmam a complexidade desta relação e mostram que a toxicidade pode ocorrer pela exposição a doses menores que as consideradas seguras. É importante salientar que os animais expostos aos agentes químicos não apresentaram alterações no número de leucócitos circulantes, parâmetro usado clinicamente na avaliação da toxicidade. Ademais, as funções hepática e renal não foram afetadas pela exposição química.

Diferentemente da exposição a HQ, a exposição ao FE não inibiu o recrutamento celular para o foco de lesão e somente potencializou a intensa diminuição no recrutamento de leucócitos PMN, demonstrados pela quantificação destas células no LBA e pela atividade de MPO. Apesar da ausência de efeitos do FE ser instigante, uma vez que o FE é endogenamente metabolizado a HQ, corrobora dados prévios descritos por Moran *et al.*, (1996) e Henschler *et al.* (1996), que mostraram efeito potencializador do FE sobre a produção e maturação de granulócitos causados pela HQ. Uma explicação plausível é a capacidade de o FE aumentar o metabolismo da HQ na medula óssea aos seus subprodutos altamente tóxicos, com conseqüente efeito prejudicial na produção e mobilização de leucócitos para o compartimento periférico (Eastmond *et al.*, 1987; Ruiz-Ramos *et al.*, 2005). No entanto, este pode não ser o mecanismo tóxico desencadeado no protocolo de exposição por nós preconizado, já que o número de

leucócitos circulantes não está alterado e que a mobilização destas células para o compartimento periférico na vigência de estímulo infeccioso não está comprometida em animais expostos à HQ e a HQ e FE simultaneamente.

Os mecanismos envolvidos no recrutamento leucocitário são complexos e dependem da ação de substâncias químicas geradas ou secretadas no decorrer do processo, que modificam a hemodinâmica dos vasos da microcirculação próximas à área lesada e induzem alterações morfológicas, bioquímicas e funcionais nos leucócitos circulantes e em células que compõem a parede vascular e o interstício (Esche *et al.*, 2005; Petri, Bixel, 2006). Neste contexto, a expressão sequencial de moléculas de adesão nos diferentes tipos celulares envolvidos no processo medeia às interações célula-célula, responsáveis pela migração celular. Apesar do mecanismo envolvido na inibição do recrutamento celular induzido pela exposição à HQ ainda não estar estabelecido, é possível que a HQ altere a secreção de mediadores ou funções celulares responsáveis pela migração do leucócito no interstício, uma vez que a expressão de moléculas envolvidas na interação leucócito-endotélio não foi alterada pela exposição à HQ. As expressões de L-selectina e β_2 integrina nos leucócitos circulantes, bem como das imunoglobulinas (ICAM-1, VCAM-1 e PECAM-1) na célula endotelial da microcirculação pulmonar foram equivalentes em todos os grupos de animais estudados (dados não mostrados).

Em conjunto, os dados aqui apresentados mostram a complexidade dos mecanismos tóxicos dos metabólitos do benzeno e que suas exposições *in vivo*, abaixo dos limites recomendados, não garantem a segurança de exposição. Alterações celulares provocadas pelas exposições podem somente ser detectadas na vigência de estresse, como aqui evidenciadas na resposta inflamatória de origem infecciosa.

ABSTRACT

Hydroquinone and phenol exposure on pulmonary inflammatory response induced by bacteria

The high toxicity induced by occupational and environmental benzene exposure lead to its use restriction. However, at these conditions, neuronal and immune toxicity has been described. It is well known that benzene metabolites, such as hydroxyl compounds phenol (PHE) and hydroquinone (HQ), are responsible for immunotoxicity. In this context, it has shown herein that male Wistar rats exposed to HQ (doses of 5 or 10 mg/kg/day; 13 days with 2-day intervals every 5 doses) presented marked reduction in the number of mononuclear (MN) and polymorphonuclear (PMN) leukocytes in the

bronchoalveolar fluid 24 hours after inhalation of Lipopolysaccharide of *Salmonella abortus* (LPS; 100 µg/mL). On the other hand, leukocyte migration into inflamed lungs was not altered in FE exposed rats, since values obtained were similar to those detected in control animals. Simultaneous exposure to HQ and PHE (5 mg/kg each compound) maintained the decreased number of MN cells observed in HQ exposed rats and potentiated the reduction of PMN cells induced by HQ exposure. The impaired leukocyte migration into inflamed lung did not reflect alterations on number of circulating cells. Moreover, it is important to emphasize that schedule of intoxication did not alter the functional ability of liver and kidney, as detected by normal activity of transaminases and creatinine concentration in the serum. Therefore, it is shown herein that in vivo exposures to lower doses of HQ do not alter end points used as biological indicators of toxicity, nevertheless toxic effects are evident after a host defense.

UNITERMS: Benzene. Hydroquinone. Phenol. Lung inflammation. Lipopolysaccharide of *Salmonella abortus*.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado ao aluno Alexandre Ferreira (Processo 04/11412-9) e pelo Auxílio à Pesquisa (Processo 03/04013-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERNSTEIN, J.A.; ALEXIS, N.; BARNES, C.; BERNSTEIN, I.L.; BERNSTEIN, J.A.; NEL, A.; PEDEN, D.; DIAZ-SANCHEZ, D.; TARLO, S.M.; WILLIAMS, P.B. Health effects of air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.114, n.5, p.1116-1123, 2004.
- BOZINOVSKI, S.; JONES, J.; BEAVITT, S.J.; COOK, A.D.; HAMILTON, J.A.; ANDERSON, G.P. Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, v.286, n.4, p.L877-885, 2004.
- DARRALL, K.G.; FIGGINS, J.A.; BROWN, R.D.; PHILIPS, G.F. Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst.*, v.123, n.5, p.1095-1001, 1998.
- DeCAPRIO, A.P. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.29, n.3, p.283-330, 1999.
- EASTMOND, D.A.; SMITH, M.T.; IRONS, R.D. An interaction of benzene metabolites reproduces the myelotoxicity observed with benzene exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.91, n.1, p.85-95, 1987.
- ESCHE, C.; STELATTO, C.; BECK, L.A. Chemokines: Key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.*, v.125, p.615-628, 2005.
- FUSTINONI, S.; BURATTI, M.; CAMPO, L.; COLOMBI, A.; CONSONNI, D.; PESATORI, A.C.; BONZINI, M.; FARMER, P.; GARTE, S.; VALERIO, F.; MERLO, D.F.; BERTAZZI, P.A. Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem. Biol. Interact.*, v.153-154, p.253-256, 2005.
- GASKELL, M.; MCLUCKIE, K.I.E.; FARMER, P.B. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone in the *supF* forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity. *Mutat. Res.*, v.554, p.387-398, 2004.
- HENSCHLER, R.; GLATT, H.R.; HEYWORTH, C.M. Hydroquinone stimulates granulocyte-macrophage progenitor cells *in vitro* and *in vivo*. *Environ. Health Perspect.*, v.14, Suppl 6, p.1271-1274, 1996.
- KIM, S.; VERMEULEN, R.; WAIDYANATHA, S.; JOHNSON, B.A.; LAN, Q.; ROTHMAN, N.; SMITH, M.T.; ZHANG, L.; LI, G.; SHEN, M.; YIN, S.; RAPPAPORT, S.M. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis*, v.27, n.4, p.772-781, 2006.
- KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. *Acute and chronic inflammation*. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. (ed.) *Robbins and cotran pathologic basis of disease*. 7th. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.47-86.
- LAN, Q.; ZHANG, L.; LI, G.; VERMEULEN, R.; WEINBERG, R.S.; DOSEMECI, M.; RAPPAPORT, S.M.; SHEN, M.; ALTER, B.P.; WU, Y.; KOPP, W.; WAIDYANATHA, S.; RABKIN, C.; GUO, W.; CHANOCK, S.; HAYES, R.B.; LINET, M.; KIM, S.; YIN, S.; ROTHMAN, N.; SMITH, M.T. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*, v.306, n.5702, p.1774-1776, 2004.

- MCCUE, J.M.; LINK, K.L.; EATON, S.S.; FREED, B.M. Exposure to cigarette tar inhibits ribonucleotide reductase and blocks lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, v.165, n.12, p.6771-6775, 2000.
- MCCUE, J.M.; LAZIS, S.; JOHN COHEN, J.; MODIANO, J.F.; FREED, B.M. Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G1 phase. *Mol. Immunol.*, v.39, n.16, p.995-1001, 2003.
- MACEDO, S.M.D.; LOURENÇO, E.L.B.; BORELLI, P.; FOCK, R.A.; FERREIRA JR, J.M.; FARSKY, S.H.P. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology*, v.220, p.126-135, 2006.
- MARTIN, T.R.; FREVERT, C.W. Innate immunity in the lungs. *Proc. Am. Thorac. Soc.*, v.2, n.5, p.403-411, 2005.
- MEDINSKY, M.A.; KENYON, E.M.; SCHLOSSER, P.M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. *Toxicology*, v.105, n.2-3, p.225-233, 1995.
- MORAN, J.L.; SIEGEL, D.; SUN, X.M.; ROSS, D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol. Pharmacol.*, v.50, n.3, p.610-615, 1996.
- ONG, C.N.; KOK, P.W.; ONG, H.Y.; SHI, C.Y.; LEE, B.L.; PHOON, W.H.; TAN, K.T. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. *Occup. Environ. Med.*, v.53, n.5, p.328-333, 1996.
- PEDEN, D.B. The epidemiology and genetics of asthma risk associated with air pollution. *J. Allergy Clin. Immunol.*, v.115, n.2, p.213-219, 2005.
- PETRI, B.; BIXEL, M.G. Molecular events during leukocyte diapedesis. *FEBS J.*, v.273, p.4399-4407, 2006.
- POIRIER, M.; FOURNIER, M.; BROUSSEAU, P.; MORIN, A. Effects of volatile aromatics, aldehydes, and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, v.65, n.19, p.1437-1451, 2002.
- QU, Q.; MELIKIAN, A.A.; LI, G.; SHORE, R.; CHEN, L.; COHEN, B.; YIN, S.; KAGAN, M.R.; LI, H.; MENG, M.; JIN, X.; WINNIK, W.; LI, Y.; MU, R.; LI, K. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites. *Am. J. Ind. Med.*, v.37, n.5, p.522-531, 2000.
- QU Q.; COHEN, B.S.; SHORE, R.; CHEN, L.C.; LI, G.; JIN, X.; MELIKIAN, A.A.; YIN, S.; YAN, H.; XU, B.; LI, Y.; MU, R.; ZHANG, X.; LI, K. Benzene exposure measurement in shoe and glue manufacturing: a study to validate biomarkers. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, v.18, n.12, p.988-998, 2003.
- QU, Q.; SHORE, R.; LI, G.; SU, L.; JIN, X.; MELIKIAN, A.A.; ROY, N.; CHEN, L.C.; WIRGIN, I.; COHEN, B.; YIN, S.; LI, Y.; MU, R. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem. Biol. Interact.*, v.153-154, p.85-95, 2005.
- ROTHMAN, N.; LI, G.L.; DOSEMECI, M.; BECHTOLD, W.E.; MARTI, G.E.; WANG, Y.Z.; LINET, M.; XI, L.Q.; LU, W.; SMITH, M.T.; TITENKO-HOLLAND, N.; ZHANG, L.P.; BLOT, W.; YIN, S.N.; HAYES, R.B. Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am. J. Ind. Med.*, v.29, n.3, p.236-246, 1996.
- RUIZ-RAMOS, R.; CEBRIAN, M.E.; GARRIDO, E. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology*, v.209, n.3, p.279-287, 2005.
- RYAN, B.M.; SELBY, R.; GINGELL, R.; WAECHTER, J.M. JR; BUTALA, J.H.; DIMOND, S. S.; DUNN, B. J.; HOUSE, R.; MORRISSEY, R. Two-generation reproduction study and immunotoxicity screen in rats dosed with phenol via the drinking water. *Int. J. Toxicol.*, v.20, n.3, p.121-142, 2001.
- SAVITZ, D.A.; ANDREWS, K.W. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am. J. Ind. Med.*, v.31, n.3, p.287-295, 1997.
- SHEETS, P.L.; CARLSON, G.P. Kinetic factors involved in the metabolism of benzene in mouse lung and liver. *J. Toxicol. Environ. Health A.*, v.67, n.5, p.421-430, 2004.
- SHEETS, P.L.; YOST, G.L.; CARLSON, G.P. Benzene metabolism in human lung cell lines BEAS-2B and A549 and cells overexpressing CYP2F1. *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, v.18, n.2, p.92-99, 2004.
- SILVA, M.C.; GASPAR, J.; SILVA, I. D.; LEÃO, D.; RUEFF, J. Mechanisms of induction of chromosomal aberrations by hydroquinone in V79 cells. *Mutagenesis*, v.18, n.6, p.491-496, 2003.

- SNYDER, R. Benzene and leukemia. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.32, n.3, p.155-210, 2002.
- SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab. Rev.*, v.36, n.3-4, p.531-547, 2004.
- STOKSTAD, E. Factory study shows low levels of benzene reduce blood cell counts. *Science*, v.306, n.5702, p.1665, 2004.
- TAVARES DE LIMA, W.; STEIL, A.A.; RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; TEIXEIRA, C.F.; JANCAR, S. Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury. *Eur. J. Pharmacol.*, v.358, n.1, p.69-75, 1998.
- TRACEY, K.J. The inflammatory reflex. *Nature*, v.420, n.6917, p.853-859, 2002.
- TURTELTAUB, K.W.; MANI, C. Benzene metabolism in rodents at doses relevant to human exposure from urban air. *Resp. Rep. Health Eff Inst.*, v.113, p.1-26, 2003.
- WAIDYANATHA, S.; ROTHMAN, N.; FUSTINONI, S.; SMITH, M.T.; HAYES, R.B.; BECHTOLD, W.; DOSEMECI, M.; GUILAN, L.; YIN, S.; RAPPAPORT, S.M. Urinary benzene as a biomarkers of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis*, v.22, n.2, p.279-286, 2001.
- Recebido para publicação em 27 de fevereiro de 2007.
Aceito para publicação em 27 de junho de 2007.

Anexo A – Pareceres da Comissão de Ética em Experimentação Animal

OLCEEA n° 25

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto “Efeitos do tratamento crônico com produtos de biotransformação do benzeno sobre a mobilização e função de leucócitos polimorfonucleares na vigência da resposta inflamatória” (Protocolo n°21), sob a responsabilidade do(a) Sr(a). Emerson Luiz Botelho Lourenço e do orientador(a) 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 01/09/2003.

São Paulo, 02 de setembro de 2003.

Elfriede Bacchi

Prof. Assoc. Elfriede Marianne Bacchi
Coordenadora da CEEA

CCCEA, n.º 53/2005

CÓPIA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

CERTIFICADO

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

São Paulo, 10 de outubro de 2005.

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

Anexo B - Participação em Artigo Publicado

RESEARCH PAPER

Melatonin inhibits nitric oxide production by microvascular endothelial cells *in vivo* and *in vitro*

CLM Silva^{1,3,4}, EK Tamura^{1,3}, SMD Macedo², E Cecon¹, L Bueno-Alves¹, SHP Farsky², ZS Ferreira¹ and RP Markus¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil and ²Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Background and purpose: We have previously shown that melatonin inhibits bradykinin-induced NO production by endothelial cells *in vitro*. The purpose of this investigation was to extend this observation to an *in vivo* condition and to explore the mechanism of action of melatonin.

Experimental approach: RT-PCR assays were performed with rat cultured endothelial cells. The putative effect of melatonin upon arteriolar tone was investigated by intravital microscopy while NO production by endothelial cells *in vitro* was assayed by fluorimetry, and intracellular Ca²⁺ measurements were assayed by confocal microscopy.

Key results: No expression of the mRNA for the melatonin synthesizing enzymes, arylalkylamine N-acetyltransferase and hydroxyindole-O-methyltransferase, or for the melatonin MT₂ receptor was detected in microvascular endothelial cells. Melatonin fully inhibited L-NAME-sensitive bradykinin-induced vasodilation and also inhibited NO production induced by histamine, carbachol and 2-methylthio ATP, but did not inhibit NO production induced by ATP or α , β -methylene ATP. None of its inhibitory effects was prevented by the melatonin receptor antagonist, luzindole. In nominally Ca²⁺-free solution, melatonin reduced intracellular Ca²⁺ mobilization induced by bradykinin (40%) and 2-methylthio ATP (62%) but not Ca²⁺ mobilization induced by ATP.

Conclusions and implications: We have confirmed that melatonin inhibited NO production both *in vivo* and *in vitro*. In addition, the melatonin effect was selective for some G protein-coupled receptors and most probably reflects an inhibition of Ca²⁺ mobilization from intracellular stores.

British Journal of Pharmacology (2007) 151, 195–205. doi:10.1038/sj.bjp.0707225; published online 20 March 2007

Keywords: endothelial cell; nitric oxide; melatonin; calcium; ATP; bradykinin; histamine; intravital microscopy; confocal microscopy

Abbreviations: 2-methylthio ATP, 2-methylthio-adenosine triphosphate; 4P-PDOT, 4-phenyl-2-propionamidotetralin; AA-NAT, arylalkylamine N-acetyltransferase; DAF-FM DA, 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate mix; EGTA, ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) tetraacetic acid; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; HIOMT, hydroxyindole-O-methyltransferase; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; luzindole, N-acetyl-2-benzyl-tryptamine; MT, melatonin; OD, optical density; PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule 1; RT, reverse transcriptase

Introduction

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), the hormone produced by the pineal gland, acts as an endocrine transducer of photoperiodic information, although extra-pineal sources

account for paracrine and/or autocrine actions (Pontes *et al.*, 2006). Endothelial cells were previously considered as a putative extra-pineal source of melatonin (Kvetnoy, 1999), although the key enzyme involved in its synthesis, namely arylalkylamine N-acetyltransferase (AA-NAT) and also hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT), have not yet been investigated. Melatonin modulates endothelial cell function *in vitro* by inhibiting bradykinin-induced nitric oxide (NO) production (Tamura *et al.*, 2006) and *in vivo* by inhibiting neutrophil rolling and adherence (Lotufo *et al.*, 2001).

In mammals, melatonin targets three distinct high-affinity melatonin receptors (MT₁, MT₂ and MT₃). MT₁ and MT₂

Correspondence: Professor RP Markus, Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, Rua do Matão, travessa 14, 321, sala 323, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail: rpmarkus@usp.br

³These authors have contributed equally to this work.

⁴Present address: Department of Basic and Clinical Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Received 13 December 2006; accepted 18 January 2007; published online 20 March 2007

melatonin receptors belong to the heptahelical G-protein coupled receptor family, whereas the MT_3 receptor is known as the enzyme quinone oxidoreductase 2 (Dubocovich and Markowska, 2005). Despite some controversy, melatonin has also been described as a ligand for cytoplasmic proteins (Benitez-King *et al.*, 1993) and for a family of orphan nuclear hormone receptors (retinoic acid receptor-related orphan receptor/retinoid Z receptor) (Boutin *et al.*, 2005).

Putative melatonin receptors in arteries were first identified in rat brain and tail by autoradiography using 2-[125 I]-iodomelatonin (Viswanathan *et al.*, 1990; Seltzer *et al.*, 1992; Capsoni *et al.*, 1994). More recently, functional assays *in vitro* suggested that melatonin is involved in the control of vasomotor tone and acts via receptors located in the myocytes (Masana *et al.*, 2002) and/or in the endothelium (Geary *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2001). In another experimental model, melatonin was shown to inhibit the rolling of leukocytes on the venular endothelial layer *in vivo* by stimulating MT_2 melatonin receptors (Lotufo *et al.*, 2001). Antisense [32 P]-labeled oligonucleotide probe specific for MT_2 melatonin receptors hybridized to the three layers of rat caudal artery (tunica adventitia, media and intima), suggesting that endothelial cells express MT_2 melatonin receptors (Masana *et al.*, 2002). A previous pharmacological analysis of the inhibitory effect of melatonin on bradykinin-induced NO production in cultured endothelial cells precludes mediation by MT_2 melatonin receptors, as it is not inhibited by the selective antagonist 4-phenyl-2-propionamidotetralin (4P-PDOT) (Tamura *et al.*, 2006).

In resting endothelial cells, the constitutive endothelial nitric oxide synthase (eNOS) is located in the plasmalemmal caveolae associated with the inhibitory protein caveolin. Elevation of intracellular Ca^{2+} disrupts the caveolin/eNOS complex, thereby favoring eNOS translocation from the plasma membrane and its subsequent activation, ultimately resulting in the conversion of its substrate L-arginine into L-citrulline and NO (Dudzinski *et al.*, 2006). In some vascular beds, the endothelium-dependent vascular relaxation induced by laminar shear stress or Ca^{2+} mobilization through G-protein coupled receptors is mediated by NO (Cocks, 1996). In addition, it was recently shown that eNOS also regulates vascular permeability, linking this enzyme to a key event of the inflammatory process (Hatakeyama *et al.*, 2006).

The purpose of this investigation was to determine if melatonin could inhibit endothelial production of NO *in vivo* and to explore the mechanism of action of the pineal hormone with regard to modulation of NO activity. Firstly, we determined whether endothelial cells express the mRNA for two enzymes involved in the biosynthesis of melatonin, AA-NAT and HIOMT and also for MT_2 melatonin receptors. Then, we evaluated the effect of melatonin on other agonists such as carbachol, histamine, adenosine triphosphate (ATP) and analogues, and finally we investigated the relevance of intracellular Ca^{2+} mobilization to the melatonin-induced decrease in NO production.

We report here that endothelial cells from rat microcirculation did not express the enzymes, AA-NAT and HIOMT or MT_2 melatonin receptors. In functional assays *in vivo*, melatonin inhibited N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)-sensitive mesenteric arteriolar vasodilation induced

by bradykinin. The NO production induced by histamine and carbachol *in vitro* was also inhibited by melatonin, as observed previously with bradykinin (Tamura *et al.*, 2006); however, melatonin did not inhibit the effect of ATP. Two other agonists that activate ligand-gated ion channel P2X receptors (α,β -methylene ATP) and metabotropic P2Y receptors (2-methylthio-adenosine triphosphate (2-methylthio ATP)) also elicited NO production by endothelial cells, but only the effect of the latter agonist was inhibited by melatonin. The inhibitory effect of melatonin on these agonists of G-protein coupled receptors seems to be partly related to an inhibition of Ca^{2+} mobilization from intracellular stores.

Methods

All animal procedures were performed according to approved institutional protocols and in accordance with recommendations for the proper use and care of laboratory animals. Animals were kept under a light/dark cycle of 12/12 h and had access to water and food *ad libitum*.

Endothelial cell culture

Primary cultures of microvascular endothelial cells were obtained from rat cremaster muscle according to a method described previously (Tamura *et al.*, 2006). Male Wistar rats weighing about 250 g were anesthetized by ether inhalation and killed by decapitation. The cremaster muscle was isolated, washed with phosphate saline solution (mm: NaCl 125, Na_2HPO_4 2, NaH_2PO_4 2 and KCl 5) and cut into pieces of approximately 2×2 mm. Two pieces were placed into a 24-well culture plate, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with gentamicin (40 mg l^{-1}) and 20% fetal bovine serum was added, and the cells were cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2 for 48 h. After this period, the explants were removed and the medium was changed every 48 h. Cultured cells were characterized using flow cytometry analysis as described by Lotufo *et al.* (2006), which showed only one population of cells positively labeled with the monoclonal antibody selective for platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), a classical marker of endothelial cells (data not shown).

Total RNA isolation and quantification

Total RNA was extracted from confluent primary cultured rat endothelial cells with TRIzol and chloroform-isopropanol – 75% ethanol (in diethyl pyrocarbonate-treated water) according to the manufacturer's instructions. Each endothelial sample consisted of two wells of a 24-well plate culture from different cultures. Rat pineal glands obtained from animals killed during the light phase of the day were used as controls (de Almeida-Paula *et al.*, 2005). The optical density (OD) of each sample was determined using an ultraviolet (UV)-visible spectrophotometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, UK) for quantification of RNA content.

The RNA samples used in the following steps had OD $\lambda_{260}/\lambda_{280}$ ratios ranging from 1.8 to 2.0.

Reverse transcription

Single-stranded complementary DNA (cDNA) was generated from 0.5 μg of total RNA using 1 μl (50 ng) of random primers and 1 μl of 10 mM deoxyribonucleotide triphosphate mix (dNTP) (65°C, 5 min), followed by the addition of 4 μl of 5 $\times$ polymerase chain reaction (PCR) buffer (supplied with transcriptase) and 2 μl of 0.1 M dithiothreitol (25°C for 2 min), and finally 1 μl of SuperScript II reverse transcriptase (RT) (200 U) in a final volume of 20 μl . The RT mixture was incubated (25°C, 10 min; 42°C, 50 min and 70°C, 15 min) to promote cDNA synthesis. cDNA samples were stored at -20°C for up to 1 week.

Real time RT-PCR for AA-NAT and HIOMT

Reactions were performed in a 25 μl final volume using 1 μl cDNA or water (negative control), 300 nM (*Aa-nat* and *hiomt*) or 50 nM (18S) of sense and antisense primers and 12.5 μl 2 $\times$ iQ SYBR Green Supermix (including iTaq DNA polymerase) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Real time-PCR amplification and quantification were performed with an i-Cycler thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) as follows: denaturation for 7 min at 95°C, followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 1 min at 60°C. Rat pineal glands were used as a positive control for *Aa-nat* and *hiomt* mRNA expression. Therefore, rat pineal glands were kept in BGJb medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U ml⁻¹ penicillin and 10 μg ml⁻¹ streptomycin for 48 h (37°C, 95% O₂/5% CO₂), and in the last 5 h glands were treated with noradrenaline (0.1 μM at 37°C and 95% O₂/5% CO₂) as described previously (Fernandes *et al.*, 2006).

Primers for rat *Aa-nat*, *hiomt* and 18S ribosomal RNA were synthesized by Biosource International Inc. (Camarillo, CA, USA). *Aa-nat*: forward: 5'-AGCGCGAAGCCTTATCTCA-3', reverse: 5'-AAGTGCCGATCTCATCAA-3'; *hiomt*: forward: 5'-AGCGCCTGCTGTTTCATGA-3', reverse: 5'-GGAAGCGTGA GAGGTCAA-3'; 18S: forward: 5'-CGTCTACCACATCCAAG GAA-3', reverse: 5'-GCTGGAATTTACCGCCGGCT-3'.

The cycle threshold (C_T) determination was performed considering the threshold as close as possible to the base of the exponential phase. The mean C_T value of the pineal gland was used as a calibrator, and the relative amount of RNA was calculated using the equation $2^{-\Delta\Delta C_T}$, where $\Delta\Delta C_T$ is the ΔC_T (pineal gland) - ΔC_T (noradrenaline-treated pineal gland or endothelial cells) and ΔC_T is C_T (test gene) - C_T (control gene; 18S RNA).

RT-PCR for MT melatonin receptors

Oligonucleotide primers specific for MT₂ melatonin receptors were designed as described previously (de Almeida-Paula *et al.*, 2005) and consisted of the sequence: 5'-CATC CACTTCCTCCTTCCAA-3' (forward) and 5'-TGCAAGGC CAATACAGTTGA-3' (reverse) (predicted size 201 bp, primer locations 123–142 bp and 323–304 bp). In the PCR, 1 μl of cDNA, 0.3 μl of Platinum Taq DNA polymerase (5 U μl^{-1}),

0.5 μl of 10 mM dNTP mix, 2 μl of each primer (10 pmol μl^{-1}), 2.5 μl of 10 $\times$ PCR buffer and 1.5 μl of 50 mM MgCl₂ (all Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used in a final volume of 25 μl . The PCR reaction started with 2 min denaturation at 95°C followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 95°C, 45 s annealing at 60°C and 1 min extension at 72°C, and ended with a final cycle of 10 min at 72°C. The PCR was performed with the Eppendorf Master Cycler gradient in duplicate. A 10 μl aliquot of each sample (from endothelial cells, pineal gland and negative control) was run on a 1.8% agarose gel stained with 1% ethidium bromide for approximately 25 min at 100 V. The gel was visualized with an UV transilluminator and photographed using a UV gel electrophoresis camera (de Almeida-Paula *et al.*, 2005).

High performance liquid chromatography measurements

To assess if endothelial cells produce melatonin, we incubated endothelial cells in culture, with the melatonin precursor, *N*-acetylserotonin (20 μM), for 5 h (37°C, 95% O₂/5% CO₂). Controls were performed by incubating rat pineal glands with 20 μM *N*-acetylserotonin for the same period (final volume 200 μl). Melatonin present in the supernatant was measured by high performance liquid chromatography according to Ferreira *et al.* (1994). Briefly, the indoleamine was separated on a Resolve C₁₈ reversed-phase column (5 μm , 150 $\times$ 3.9 mm internal diameter from Waters, Milford, MA, USA). The chromatographic system (Shimadzu, Kyoto, Japan) was isocratically operated with the following mobile phase: 0.1 M citric acid, 0.15 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 25% methanol, pH 3.7 at a flow rate of 0.7 ml min⁻¹. The detector potential was adjusted to +0.90 V (vs Ag/AgCl reference electrode). The supernatant (20 μl) was injected into the chromatographic system. Using a calibration curve with melatonin, the lower limit of detection of melatonin with our system was 0.25 ng μl^{-1} .

Intravital microscopy

Intravital microscopy assays were performed according to methods described previously (Lotufo *et al.*, 2001). Briefly, male Wistar rats (about 200 g) were anesthetized with sodium pentobarbital (65 mg/kg intraperitoneal), the abdomen was carefully opened with a small midline incision and the rat was placed on its right side. Thereafter, a segment of the mid-jejunum was removed and placed over an optically clear viewing platform to be transilluminated. The animals were kept on a special board thermostatically controlled at 37°C. The exposed mesentery was kept moist and warm by irrigating the tissue with warmed Ringer-Locke solution (mM: NaCl 154, KCl 5.6, CaCl₂ 2, NaHCO₃ 6 and glucose 5; pH 7.2–7.4) containing 1% gelatin. Transilluminated images were obtained with an Axioplan optical microscopy (Carl Zeiss, New York, NY, USA) equipped with 5.0/0.30 $\times$ plan-neofluar or 10.0/0.25 $\times$ Achromplan longitudinal distance objectives/numeric aperture and 1.0 $\times$, 1.25 $\times$ or 1.60 $\times$ optovar. The images were captured by a video camera (ZVS, 3C75DE, Carl Zeiss), transmitted simultaneously to a TV monitor and a computer and recorded on videotape. Analysis of digital images on the computer monitor was

performed with KS 300 software (Kontron Elektronik, Hallbergmoos, Germany).

After choosing a field with a continuous blood flow, the inner diameter of a third-order arteriole (mean value $19.2\ \mu\text{m}$) was measured and defined as a basal diameter. Changes in the arteriole diameter induced by pharmacological treatment were determined and expressed as percent variation from basal diameter. All drugs were topically added to the vessel in a standard volume of $10\ \mu\text{l}$. Bradykinin ($1\ \mu\text{M}$) was added in the absence or in the continuous presence of either L-NAME ($500\ \mu\text{M}$) or melatonin ($1\ \text{nM}$) added 2 min previously.

Fluorescence measurements

Nitric oxide measurements. Endothelial NO production was determined by spectrofluorimetry as described previously (Tamura *et al.*, 2006). Briefly, NO released by endothelial cells for a 30-min period was measured using fluorimetric assays according to methods described elsewhere (Nakatsubo *et al.*, 1998). Cultured endothelial cells were incubated with $2\ \mu\text{M}$ 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM DA, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA), which is very selective for NO (Balcerzyk *et al.*, 2005) and reacts with NO to yield fluorescent triazolofluorescein (Kojima *et al.*, 1999). Primary endothelial cells were seeded onto 96-well culture plates, grown to confluence and then washed with a physiological solution (mm: NaCl 140, KCl 5, MgCl_2 1, CaCl_2 2, glucose 5 and 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 5; pH 7.4) supplemented with L-arginine ($1\ \text{mM}$) (Kimura *et al.*, 2004). Cells were then incubated at 37°C for 30 min with DAF-FM in the absence (basal) or presence of histamine ($10\ \mu\text{M}$), carbachol ($100\ \mu\text{M}$), ATP ($100\ \mu\text{M}$), α,β -methylene ATP ($100\ \mu\text{M}$) or 2-methylthio ATP ($30\ \mu\text{M}$). Alternatively, these drugs were added in the presence of melatonin ($1\ \text{nM}$) for 30 min. Experiments using the nonselective MT receptor antagonist, luzindole (*N*-acetyl-2-benzyltryptamine) ($10\ \mu\text{M}$), were preceded by a preincubation period of 60 min at 37°C followed by the addition of melatonin and the agonists for another 30 min in the continued presence of the antagonist. The cellular supernatants ($300\ \mu\text{l}$) were collected, added to a white microplate and the fluorescence was measured with a fluorimeter (Victor, Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA) using filters at 488 and 514 nm for excitation and emission, respectively. Because melatonin, DAF-FM and luzindole are all photosensitive, these experiments were performed in the dark.

Intracellular Ca^{2+} measurements

Relative changes in endothelial cytosolic Ca^{2+} were determined with a confocal laser-scanning microscope (LSM 500, Carl Zeiss) using the fluo-3 AM fluorescent probe (Molecular Probes) (Tamura *et al.*, 2006). Briefly, endothelial cells subcultured for up to two passages were seeded onto glass coverslips and allowed to grow for 48 h. The coverslip was mounted on the stage of an inverted microscope equipped with a $40\times$ oil-immersion objective (Plan-Neofluar, NA = 1.3; Carl Zeiss). Typically, a field with 5–7 cells was randomly chosen and imaged. Cells were incubated in the

dark with $5\ \mu\text{M}$ fluo-3 AM diluted in a physiological solution (mm: NaCl 145, KCl 5, MgCl_2 1, CaCl_2 2, glucose 10 and HEPES 10) adjusted to pH 7.4 with NaOH, for 50 min at room temperature.

Following this period, the cells were washed four times with a Ca^{2+} -free solution in which CaCl_2 was omitted and $0.1\ \text{mM}$ ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether) tetraacetic acid (EGTA) was added. The absence of residual extracellular calcium was confirmed by stimulating the cells with α,β -methylene ATP ($100\ \mu\text{M}$), a selective agonist of ionotropic P2X receptors. Cells were then incubated with nominally Ca^{2+} -free solution (no EGTA added) in which bradykinin ($0.1\ \mu\text{M}$), ATP ($100\ \mu\text{M}$) or 2-methylthio ATP ($30\ \mu\text{M}$) was added in the absence or presence of melatonin ($1\ \text{nM}$) preincubated for 1 min (Tamura *et al.*, 2006). The dye was excited at 488 nm with an argon laser and the emitted fluorescence was measured at 515–530 nm. Fluorescent images were obtained every 0.2 s as a 512×512 -pixel frame, and all other settings including pinhole, scanning speed and laser power remained the same for all experiments.

Data analysis and statistical procedures

Data from intravital microscopy are expressed as percent variation from basal arteriolar diameter. The variation of intracellular Ca^{2+} induced by agonists was measured for 3 min. Afterward, the fluorescence of each cell in the plate was measured and a mean value of the plate was determined. This value, expressed as arbitrary units, was used to calculate the amplitude (peak) of the response for each plate (GraphPad Prism 4.0 software; San Diego, CA, USA). Different cell cultures (4–7) were used in this protocol. NO measurements were also expressed as arbitrary units and each experimental condition was evaluated in at least three different cell cultures. Data are presented as mean $\pm$ s.e.m. Unpaired Student's *t*-test or one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Newman–Keuls *post hoc* test were performed for determining the significance of the differences between experimental conditions, with $P < 0.05$ considered significant.

Drugs, chemicals, reagents and other materials

The PECAM-1 monoclonal antibody conjugated with R-phycoerythrin (anti-rat CD31) was purchased from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ, USA).

Melatonin, bradykinin, histamine, ATP, 2-methylthio ATP, α,β -methylene ATP, EGTA and HEPES were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA); luzindole (*N*-acetyl-2-benzyltryptamine), L-NAME and carbachol were acquired from Tocris (Ballwin, MO, USA). DMEM, fetal bovine serum and gentamicin reagent solution were purchased from GIBCO BRL Products (Grand Island, NY, USA). DAF-FM DA and fluo-3 AM were obtained from Molecular Probes (Eugene). Sodium pentobarbital was purchased from Cristália (São Paulo, Brazil).

Stock solutions were prepared in 5% acetic acid ($10^{-2}\ \text{M}$, bradykinin), deionized water ($10^{-2}\ \text{M}$, histamine, L-NAME and carbachol), 100% dimethylsulphoxide (DMSO) ($10^{-3}\ \text{M}$, DAF-FM, fluo-3 AM), 100% ethanol ($10^{-2}\ \text{M}$, luzindole) or 20% ethanol ($10^{-2}\ \text{M}$, melatonin) and stored at -20°C . The

subsequent dilutions were made with one of the described buffered physiological solutions depending on the protocol used. ATP, 2-methylthio ATP and α,β -methylene ATP solutions (10^{-2} M) were prepared daily using the respective buffered physiological solutions. The final concentration of the solvent was $\leq 0.1\%$ (v/v) (except for DAF-FM, 0.2% DMSO) and had no effect on the experiments.

Results

RT-PCR studies

Real time RT-PCR assays revealed, as expected, the presence of mRNA for the enzyme AA-NAT in rat pineal gland, which was used as a relative calibrator in this study (Fernandes *et al.*, 2006). The analysis of the data using the C_T method revealed a ΔC_T value of 20.27 ± 0.87 ($n=3$), 13.63 ± 0.48 ($n=3$) and 25.2 ± 0.73 ($n=5$) for pineal gland (calibrator), pineal gland stimulated with $0.1 \mu\text{M}$ noradrenaline (positive control) and endothelial cells, respectively. The calculated $\Delta\Delta C_T$ values for these samples were -6.64 ± 0.48 ($n=3$) and 4.93 ± 0.73 ($n=5$) for pineal glands stimulated with noradrenaline and endothelial cells, respectively, yielding according to the equation $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ a 99.7-fold relative *Aa-nat* mRNA expression in treated pineal gland (range 71.5–139.1) and 0.033-fold in endothelial cells (range 0.019–0.054). A similar assessment of *hiomt* mRNA expression disclosed a 0.015-fold expression in endothelial cells (range 0.0078–0.0301; $n=5$) in relation to the calibrator. Therefore, endothelial cells from three different cultures did not express the enzymes involved in the biosynthetic pathway for melatonin. Furthermore, no PCR product was detectable when the RT-PCR steps were carried out with no added template, indicating that all reagents were free of target sequence contamination. The production of melatonin by endothelial cells or pineal glands incubated with *N*-acetylserotonin ($20 \mu\text{M}$) for 5 h was used as a test of HIOMT activity. Pineal glands produced 113 ± 6 ng per well ($n=5$) of melatonin after 5 h of incubation, whereas no detectable melatonin was produced by endothelial cells. Taking into account the determination of *hiomt* gene expression and HIOMT enzyme activity, we concluded that in this experimental model endothelial cells did not synthesize melatonin.

In another experimental protocol, RT-PCR failed to detect MT_2 receptor mRNA transcript in cultured rat endothelial cells (samples consisting of two different cultures obtained from two animals), whereas a transcript of the expected product size (202 bp) was detected in the positive control (non-treated pineal glands) (Figure 1) (de Almeida-Paula *et al.*, 2005). The identity of the amplified fragment from the pineal gland using the primers mentioned above was confirmed previously by DNA sequence analysis (de Almeida-Paula *et al.*, 2005). As stated previously, no PCR product was detected when the PCR steps were carried out without cDNA.

Intravital microscopy

Addition of bradykinin ($1 \mu\text{M}$ for 2 and 5 min) induced a significant increase, over basal values, in the arteriolar diameter of third-order arterioles of rat mesentery, as measured by intravital microscopy (Figure 2). The addition of vehicle (phosphate buffered saline) caused no alteration in

Figure 1 RT-PCR analysis of MT_2 melatonin receptor mRNA expression in pineal gland (*P*; positive control) and two separate cultures of endothelial cells (E_1 , E_2). *N*=negative control (no template added); MW=molecular weight standards. RT-PCR transcripts were obtained in two independent PCR steps and separated by electrophoresis in agarose gel (see Methods).

Figure 2 Effects of melatonin on L-NAME-sensitive, bradykinin-induced, rat arteriolar vasodilation. Arteriolar diameter (mean basal diameter: $19.2 \mu\text{m}$) was measured 2 (clear bars) and 5 min (grey bars) after vehicle, bradykinin (BK, $1 \mu\text{M}$), L-NAME ($500 \mu\text{M}$) or melatonin (Mel, 1 nM). The effect of BK was determined in the absence or presence of L-NAME or Mel which were added 2 min before and maintained throughout the exposure to BK. Data are expressed as mean $\pm$ s.e.m. of the individual measurements indicated in the columns. Different letters indicate significant differences between the experimental conditions ($P < 0.05$; ANOVA, followed by Newman-Keuls test). The number of rats per group was vehicle (7), BK (8); L-NAME (2) and Mel/BK (6).

relation to basal diameter ($P=0.36$). Bradykinin-induced vasodilation observed 2 or 5 min after addition was inhibited by prior treatment with L-NAME ($500 \mu\text{M}$ for 2 min), which indicates that the agonist effect relies upon NO production. Furthermore, pre-incubation of the tissue with melatonin (1 nM) for 2 min completely abolished the vasodilator effect of bradykinin, at both time points measured (Figure 2).

Nitric oxide measurements

Stimulation of cultured endothelial cells for 30 min with histamine ($10 \mu\text{M}$) resulted in a significant increase of NO production that was inhibited by co-incubation with 1 nM

melatonin (Figure 3a). To investigate if this effect of melatonin was mediated by a G-protein coupled MT melatonin receptor, we preincubated cells for 1 h with the nonselective MT receptor antagonist, luzindole (10 μ M) and then added histamine (10 μ M) and melatonin (1 nM) in the continued presence of luzindole (10 μ M) for another 30 min. As shown in Figure 3a, luzindole did not prevent the melatonin effect, suggesting that it is not a receptor-mediated action. Using a protocol similar to the one just described, we found that the muscarinic agonist carbachol (100 μ M) also induced NO production by endothelial cells that was sensitive to inhibition by 1 nM melatonin (Figure 3b) but was not altered by luzindole (10 μ M; data not shown). However, when we used the P2 receptor agonist ATP (100 μ M), we found that neither melatonin (1 nM) nor its analogue *N*-acetylserotonin (0.1 nM; data not shown) inhibited agonist-induced NO production (Figure 3c), even though this production was sensitive to the P2 receptor antagonist, suramin (300 μ M; Figure 3c). As ATP at this concentration activates both the ionotropic P2X and the metabotropic P2Y receptors and suramin is a nonselective antagonist, we performed other experiments using α,β -methylene ATP (100 μ M), an agonist selective for P2X receptors, and 2-methylthio ATP (30 μ M), an agonist of P2Y receptors (Burnstock, 2006). The addition of each of these agonists for 30 min also induced NO production by endothelial cells, to an extent similar to that induced by 100 μ M ATP (Figure 4). However, only the effect of 2-methylthio ATP was inhibited by 1 nM melatonin; in this case 10 μ M luzindole also did not alter the effect of melatonin, as observed for histamine and carbachol and, as observed previously, for bradykinin (Tamura *et al.*, 2006). Therefore, we can assume that the lack of effect of melatonin on ATP-mediated NO production reflects the activation of P2X receptors.

Intracellular Ca^{2+} measurements

Since eNOS activation depends on the Ca^{2+} -calmodulin complex and rat endothelial cell NO production induced by agonists of G-protein coupled receptors was inhibited by 1 nM melatonin, we investigated the possibility that melatonin could be interfering with intracellular Ca^{2+} mobilization. For this purpose, we performed another set of experiments in a nominally Ca^{2+} -free solution (see Methods), using confocal laser-scanning microscopy.

Because, in our system, bradykinin and ATP are agonists sensitive and insensitive to the action of melatonin, respectively, we stimulated cells with bradykinin (0.1 μ M) or ATP (100 μ M) to induce a maximal increase in Ca^{2+} (Moccia *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2006) in the absence or presence of melatonin (1 nM), added 1 min before the agonist. The addition of melatonin or vehicle alone did not cause any alteration of resting intracellular Ca^{2+} levels. As illustrated in Figure 5a, we measured the fluorescence for 30 s and then added bradykinin, which induced a rapid (within 30 s) and transient increase of intracellular Ca^{2+} concentration (peak: 1398 ± 188 arbitrary units, $n = 7$), which declined completely to the pre-stimulatory level. However, the amplitude of this Ca^{2+} transient was reduced by melatonin (853 ± 109 arbitrary units, $n = 8$; $P = 0.022$, Student's *t*-test). No significant

Figure 3 Effects of melatonin on agonist-induced nitric oxide production by endothelial cells. Data are expressed as mean and s.e.m. (a) histamine 10 μ M (His, $n = 18$), melatonin 1 nM (Mel, $n = 18$), luzindole (Luz, $n = 15$). * $P < 0.01$ vs basal ($n = 18$); ** $P < 0.01$ vs histamine (one-way ANOVA), from four different cultures. (b) carbachol 100 μ M (CCh, $n = 10$), melatonin 1 nM (Mel, $n = 13$). * $P < 0.01$ vs basal ($n = 11$); ** $P < 0.01$ vs carbachol (one-way ANOVA), from three different cultures. (c) ATP 100 μ M ($n = 14$), melatonin 1 nM (Mel, $n = 13$), suramin 300 μ M (Sur, $n = 6$). * $P < 0.01$ vs basal ($n = 12$) and ** $P < 0.05$ vs ATP alone (one-way ANOVA), from three different cultures (except for Sur; two cultures).

alteration in the one phase exponential decay rate of this Ca^{2+} transient was observed (52 ± 8 and 40 ± 5 s in the absence or presence of melatonin, respectively). The ATP-induced increase in Ca^{2+} was also transient with a peak value of 1091 ± 135 arbitrary units ($n = 8$) but it was not altered by melatonin (894 ± 101 , $n = 8$) (Figure 5b). In these experimental conditions, the P2X agonist α,β -methylene ATP

Figure 4 Investigation of the effects of melatonin on endothelial cell nitric oxide production induced by agonists of P2 receptors. Data are expressed as mean and s.e.m. 2-Methylthio ATP 30 μ M (2MeSATP, $n=10$), 2-methylthio ATP/melatonin 1 nM (Mel, $n=11$), 2-methylthio ATP/melatonin/luzindole 10 μ M (Luz, $n=8$), α,β -methylene ATP 100 μ M (α,β MeATP, $n=9$), α,β -methylene ATP/melatonin ($n=9$). * $P<0.01$ vs basal; ** $P<0.01$ vs 2-methylthio ATP (one-way ANOVA).

(100 μ M) did not increase fluorescence ($n=20$ cells), demonstrating the absence of any residual extracellular Ca^{2+} (Figure 5b). Considering the functional identification of P2X and P2Y receptors in these cultured endothelial cells and that only the effect of 2-methylthio ATP upon NO production was inhibited by melatonin, we repeated the protocol using this agonist. As expected, in nominally Ca^{2+} -free solution, the activation of the P2Y receptor with 2-methylthio ATP (30 μ M) induced an increase in the cytosolic concentration of Ca^{2+} consistent with Ca^{2+} mobilization. The amplitude of the response (496 ± 53 , $n=17$ cells) was reduced by pretreatment with melatonin (1 nM) (191 ± 33 , $n=16$ cells; $P=0.001$ Student's t -test). Furthermore, the peak value in this condition was delayed in relation to the control condition (51 ± 5 s vs 101 ± 15 s, respectively, $P=0.001$ Student's t -test) (Figure 5c).

As both bradykinin and ATP have each been shown to mobilize Ca^{2+} from intracellular pools, we assessed the effects of successive addition of these agonists in a nominally Ca^{2+} -free medium on their capacity to mobilize Ca^{2+} (Moccia *et al.*, 2001). As depicted in Figure 6a, the first addition of bradykinin (0.1 μ M) induced a transient increase in intracellular Ca^{2+} . However, the subsequent application of ATP (100 μ M), 6 min later, caused only a small transient increase in Ca^{2+} . The same pattern was observed when we first added ATP and then bradykinin (Figure 6b), suggesting that part of the Ca^{2+} mobilized by these agonists comes from different intracellular stores.

Discussion

In the present study, we report that melatonin inhibited NO production triggered by increasing intracellular Ca^{2+} through stimulation of some G-protein coupled receptors, but not through the opening of receptor-operated ion channels. This effect, characterized in cultured rat endothelial cells, was also relevant for the control of arteriolar tone.

Figure 5 Melatonin effect upon 0.1 μ M bradykinin- (a), 100 μ M ATP- (b) and (c) 30 μ M 2-methylthio ATP-induced increase of Ca^{2+} in cultured endothelial cells in nominally Ca^{2+} -free solution. The agonists were added at 30 s. In (a) and (c), the upper and lower traces represent data obtained in the absence and presence of melatonin, respectively. In (b), the upper trace represents data obtained in the absence of melatonin, the middle trace represents data obtained in the presence of melatonin and the lower trace represents the stimulation of endothelial cells with 100 μ M α,β -methylene ATP ($n=20$ cells). Data are expressed as mean (c; $n=16$ –17 cells) or mean and s.e.m. (a; $n=7$ –8 cultures, b; $n=8$ cultures). See Methods for details.

We have previously shown that melatonin acting on endothelial cells can partially inhibit the rolling and adherence of neutrophils (Lotufo *et al.*, 2001). These effects are mediated by MT_2 and MT_3 receptors, respectively, since rolling was inhibited by the partial agonist of melatonin MT_2 receptor, 4P-PDOT, whereas adherence was inhibited by *N*-acetylserotonin and 5-methoxy-carbonylamino-*N*-acetyltryptamine (5-MCA-NAT), agonists for the putative melatonin MT_3 receptor. However, the pharmacological profile for

Figure 6 Effect of sequential stimulation of endothelial cells with Ca^{2+} mobilizing agonists in nominally Ca^{2+} -free solution. (a) $0.1 \mu\text{M}$ bradykinin (upper trace) was added at 30 s and, after 6 min, $100 \mu\text{M}$ ATP was added and the increase in fluorescence recorded (lower trace). (b) $100 \mu\text{M}$ ATP (upper trace) was added at 30 s. Then 6 min later, $0.1 \mu\text{M}$ bradykinin was added and the increase in fluorescence recorded (lower trace). Data are expressed as means from 35 and 33 cells for (a) and (b), respectively, from three experiments performed with two different cultures. The s.e.m. value was omitted for clarity from upper traces.

inhibition of bradykinin-induced eNOS activation is quite different, since it is not modified by 4P-PDOT or 5-MCA-NAT and is not prevented by the competitive antagonist luzindole, suggesting that melatonin could modulate eNOS activity by a mechanism independent of activation of membrane receptors (Tamura *et al.*, 2006).

As endothelial cells have been considered a putative extrapineal source of melatonin (Kvetnoy, 1999), and such an endogenous production of melatonin could interfere with the pharmacological profile of melatonin analogues, we decided to evaluate if these cells could produce melatonin *in vitro*. Our experiments ruled out this possibility because we did not detect expression of the genes for the enzymes involved in the melatonin biosynthetic pathway (AA-NAT and HIOMT, Simmonneaux and Ribelayga, 2003) and the endothelial cells were not able to convert *N*-acetylserotonin to melatonin, the reaction catalysed by HIOMT.

The pharmacological profile of melatonin analogues suggested that the *in vivo* effect on leukocyte rolling, but not the *in vitro* effect on NO production, was mediated by MT_2 receptors (Lotufo *et al.*, 2001; Tamura *et al.*, 2006). Data concerning the expression of MT_2 melatonin receptors in

endothelial cells are scarce (Masana *et al.*, 2002). Although the MT_2 melatonin receptor was reported in the intima layer of the rat tail artery (Masana *et al.*, 2002), in our experiments, no transcription of the gene for this receptor was detected in cultured endothelial cells, in spite of the positive transcription observed in rat pineal gland. This discrepancy between *in vivo* and *in vitro* models could be related to a change in phenotype (Lang *et al.*, 1999). In addition, the vascular endothelium, which plays an integral role in the regional specialization of vascular structures, is a highly heterogeneous tissue (Stevens *et al.*, 2001; Frid *et al.*, 2004; Kimura *et al.*, 2004). Therefore, although we have used primary cultured endothelial cells to minimize any phenotypic alteration, we cannot rule out the possibility that the lack of expression of MT_2 melatonin receptors is a particular feature of these cultured microvascular endothelial cells. Furthermore, both the functional and biochemical data in cultured endothelial cells indicate that melatonin acts independently of melatonin membrane receptor activation (Tamura *et al.*, 2006; present paper). Since melatonin is a lipid-soluble molecule, it could easily enter the cell and be converted by the enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase, expressed in endothelial cells (Beutelspacher *et al.*, 2006), to an active metabolite (*N*-acetyl-5-methoxykynurenine; Ximenes *et al.*, 2001), which was recently shown to inhibit striatal neuronal NOS (Léon *et al.*, 2006).

Our *in vivo* data reinforce the importance of melatonin in regulating arteriolar vasodilation induced by NO, as melatonin inhibits both bradykinin (present work) and shear stress-induced vasodilation (Geary *et al.*, 1998). Interestingly, a day-night variation of endothelium-dependent vasodilation induced by acetylcholine, accompanied by changes in plasma levels of NO (15.53 ± 8.42 and $10.87 \pm 4.70 \mu\text{mol l}^{-1}$, at 16 and 4 h, respectively), has been described in humans (Elherik *et al.*, 2002). Whether these vascular alterations correlate with daily variation of serum melatonin or not remains to be established.

We also evaluated whether the inhibitory effect of melatonin on NO production by endothelial cells, induced by bradykinin occurred with other known activators of endothelial NO production. We found that melatonin (1 nM) also inhibited NO production induced by carbachol and histamine, and in both cases luzindole ($10 \mu\text{M}$) did not prevent the effect of melatonin. This lack of effect of luzindole corroborated RT-PCR data in which no MT_2 melatonin receptor was detected in rat endothelial cells and also discarded a MT_1 -mediated effect of melatonin. By contrast with agonists such as bradykinin, histamine and carbachol, ATP-induced NO production was not modified by melatonin, indicating that its inhibitory effect was not due to a general, nonspecific mechanism, such as a putative scavenger effect of melatonin upon NO (Noda *et al.*, 1999).

Considering that ATP activates P2X ligand-gated ion channels and G-protein coupled P2Y receptors, and that several subtypes of each family are present in endothelial cells (Marrelli, 2001; Buvinic *et al.*, 2002; Ramirez and Kunze, 2002; Volonte *et al.*, 2006), we tested the possibility that melatonin would discriminate between them. The agonists used, 2-methylthio ATP and α,β -methylene ATP, have been shown to stimulate NO-production in endothelial cells

through P2Y₁ (Marrelli, 2001; Buvinic *et al.*, 2002) and P2X₄ receptors (Burnstock, 2006; Yamamoto *et al.*, 2006), respectively. In the present study, melatonin inhibited 2-methylthio ATP-, but not α,β -methylene ATP-induced production, suggesting that only the production of NO induced by stimulation of P2Y₁ receptors was blocked by melatonin.

Endothelial NOS activation depends on Ca²⁺-calmodulin binding, although post-translational modifications may further stimulate the enzyme (Govers and Rabelink, 2001; Venema, 2002; Bauer *et al.*, 2003; Fleming and Busse, 2003; Kone *et al.*, 2003). Melatonin binding to calmodulin (Benitez-King *et al.*, 1993; Romero *et al.*, 1998) has been proposed to be responsible for the reduction in rat cerebellum NOS activity induced by this indoleamine, in a non-saturable manner (Pozo *et al.*, 1997). However, this was not confirmed in cultured endothelial cells, as melatonin did not mimic the effect of calmidazolium (Tamura *et al.*, 2006).

We further explored the role of melatonin in calcium mobilization in these cells. In endothelial cells, the increase in intracellular Ca²⁺ is the sum of intracellular Ca²⁺ mobilization from thapsigargin-sensitive stores and Ca²⁺ influx (Oike and Ito, 1997; Cioffi *et al.*, 2003). The disruption of Ca²⁺ mobilization from intracellular stores reduces bradykinin-induced cGMP production, emphasizing the relevance of the mobilization of internal stores (Gosink and Forsberg, 1993). Since bradykinin, carbachol, histamine and 2-methylthio ATP activate G-protein coupled receptors, inducing intracellular Ca²⁺ mobilization, and all have their effect inhibited by melatonin, we investigated if melatonin could somehow impair Ca²⁺ mobilization. We found that in nominally Ca²⁺-free solution, the maximally effective concentrations of bradykinin, ATP and 2-methylthio ATP induced a transient elevation of intracellular Ca²⁺. In addition, ATP, a non-selective agonist for P2Y receptors, elicited a higher signal than 2-methylthio ATP, whose effects are probably mediated by P2Y₁ receptors, as described previously by Moccia *et al.* (2001).

Melatonin had a similar effect on bradykinin and 2-methylthio ATP-induced Ca²⁺ responses in reducing the peak response; however, with 2-methylthio ATP, the onset of the Ca²⁺ response was delayed. Melatonin did not significantly reduce the amplitude of the response to ATP. In these cells, Ca²⁺ pools sensitive to bradykinin and ATP do not seem to overlap completely. We observed that two sequential stimulations with bradykinin resulted in the loss of an intracellular Ca²⁺ increase (data not shown), whereas a second stimulus with bradykinin after ATP or vice versa, still elicited a signal. Therefore, ATP and bradykinin seem to mobilize partially overlapping pools of Ca²⁺.

Although bradykinin and ATP share the capacity of mobilizing intracellular Ca²⁺ stores, they differ in activation of eNOS in other regulatory aspects. For instance, treatment of cultured aortic endothelial cells with inhibitors of PKC abolished L-NAME-sensitive cGMP production induced by ATP, but not that induced by bradykinin (Castro *et al.*, 1998). In addition, phosphorylation of the Ser⁶¹⁷ and Ser⁶³⁵ residues of eNOS mediated by PKA in response to bradykinin and ATP in bovine aortic endothelial cells are quantitatively different (Michell *et al.*, 2002). Finally, it was also proposed that bradykinin and ATP activate different pools of eNOS

(Wagner *et al.*, 2002). We have shown that in the presence of high extracellular Ca²⁺, melatonin did not alter the intracellular Ca²⁺ increase induced by bradykinin, thereby discarding an effect of melatonin on Ca²⁺ influx (Tamura *et al.*, 2006). Therefore, we propose that the reduced Ca²⁺ mobilization induced by bradykinin (and 2-methylthio ATP) observed in the presence of melatonin may impair NO production *in vitro* and also *in vivo* by a not yet defined mechanism. Melatonin is known to inhibit Ca²⁺ mobilization from intracellular stores, albeit in another cell type (rat gonadotrophs) and without a fully defined mechanism of action (Vanecek, 1998; Dubocovich and Markowska, 2005).

Bradykinin, ATP and histamine are involved in mechanisms such as immune responses, inflammation and endothelial-mediated vasodilatation, with some of these actions being mediated by NO (Hill *et al.*, 1997; Kunapuli and Daniel, 1998; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005; Burnstock, 2006). In addition, an immunomodulatory role of melatonin has been proposed (Lopes *et al.*, 1997; Pontes *et al.*, 2006). Thus, bearing in mind that (a) endothelial-derived NO mediates neutrophil adherence (Schaefer *et al.*, 1998); (b) L-NAME inhibits vascular permeability induced by vascular endothelial growth factor (Murohara *et al.*, 1998); (c) caveolin-1 knockout mice exhibit an increased vascular permeability (Schubert *et al.*, 2002); and (d) mesenteric and cremaster microvascular hypermeability is blunted in eNOS knockout mice (Hatakeyama *et al.*, 2006), we could propose that eNOS-derived NO is linked to the early steps of the inflammatory response and that melatonin would also regulate this function. We have already shown that low doses of melatonin inhibit paw oedema in a model of chronic inflammation in mice (Lopes *et al.*, 1997) and vascular permeability induced by leukotriene B₄ (Lotufo *et al.*, 2006).

In conclusion, we have shown that melatonin inhibited NO production triggered by increasing intracellular Ca²⁺ through stimulation of some G-protein coupled receptors, but not through the opening of receptor-operated ion channels. In addition, this effect was shown to be relevant to modulation of arteriolar vasodilation *in vivo* and could be a mechanism underlying circadian variation of vascular tone.

Acknowledgements

The technical assistance of Débora Aparecida Moura is gratefully acknowledged. We thank Dr Eny Iochet Segal Floh, Dr Maria Aparecida Visconti and Dr Lucile Maria Floeter-Winter who kindly allowed the use of the spectrofluorimeter, i-Cycler thermal cycler and Eppendorf Master Cycler gradient, respectively (IB, University of São Paulo).

Eduardo K Tamura is a CAPES graduate Fellow and Cláudia Lúcia Martins da Silva is a FAPESP visiting Professorial Fellow. Regina P Markus and Sandra H Farsky are CNPq Senior Fellows. FAPESP (02/02957-6) and CNPq (Brazil) supported this work.

Conflict of interest

The authors state no conflict of interest.

References

- Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G (2005). On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 39: 327–335.
- Bauer PM, Fulton D, Boo YC, Sorescu GP, Kemp BE, Jo H et al. (2003). Compensatory phosphorylation and protein–protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 278: 14841–14849.
- Benitez-King G, Huerto-Delgadillo L, Anton-Tay F (1993). Binding of ³H-melatonin to calmodulin. *Life Sci* 53: 201–207.
- Beutelspacher SC, Tan PH, McClure MO, Larkin DF, Lechler RI, George AJ (2006). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by endothelial cells: implications for the control of alloresponses. *Am J Transplant* 6: 1320–1330.
- Boutin JA, Audinot V, Ferry G, Delagrèze P (2005). Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *Trends Pharmacol Sci* 26: 412–419.
- Burnstock G (2006). Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27: 166–176.
- Buvinic S, Briones R, Huidobro-Toro P (2002). P2Y₁ and P2Y₂ receptors are coupled to the NO/cGMP pathway to vasodilate the rat arterial mesenteric bed. *Br J Pharmacol* 136: 847–856.
- Capsoni S, Viswanathan M, Oliveira AM, Saavedra JM (1994). Characterization of melatonin receptors and signal transduction system in rat arteries forming the Circle of Willis. *Endocrinology* 135: 373–378.
- Castro AF, Amorena C, Muller A, Ottaviano G, Tellez-Inon MT, Taquini AC (1998). Extracellular ATP and bradykinin increase cGMP in vascular endothelial cells via activation of PKC. *Am J Physiol* 275: C113–C119.
- Cioffi DL, Wu S, Stevens T (2003). On the endothelial cell I_{SOc}. *Cell Calcium* 33: 323–336.
- Cocks TM (1996). Endothelium-dependent vasodilator mechanisms. In: Garland CJ and Angus JA (eds). *Pharmacology of Vascular Smooth Muscle*. Oxford University Press: Oxford, pp 233–251.
- de Almeida-Paula LD, Costa-Lotuf LV, Silva Ferreira Z, Monteiro AE, Isoldi MC, Godinho RO et al. (2005). Melatonin modulates rat myotube–acetylcholine receptors by inhibiting calmodulin. *Eur J Pharmacol* 525: 24–31.
- Dubocovich ML, Markowska M (2005). Functional MT₁ and MT₂ melatonin receptors in mammals. *Endocrine* 27: 101–110.
- Dudzinski DM, Igarashi J, Greif D, Michel T (2006). The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46: 235–276.
- Elherik K, Khan F, McLaren M, Kennedy G, Belch JJ (2002). Circadian variation in vascular tone and endothelial function in normal males. *Clin Sci (London)* 102: 547–552.
- Ferreira ZS, Cipolla-Neto J, Markus RP (1994). Presence of P2-purinoceptors in the rat pineal gland. *Br J Pharmacol* 112: 107–110.
- Fernandes PACM, Cecon E, Markus RP, Ferreira ZS (2006). Effect of TNF- α on the melatonin synthetic pathway in the rat pineal gland: basis for a 'feedback' of the immune response on circadian timing. *J Pineal Res* 41: 344–350.
- Fleming I, Busse R (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 284: R1–R12.
- Frid MG, Aldashev AA, Crossno JT, Jorgensen JM, Kale VA, Stenmark KR (2004). Yin and Yang of an endothelial cell: from normal to the extreme in growth, secretion, and transdifferentiation capabilities. *Paediatric Resp Rev* 5: S253–S257.
- Geary GG, Duckles SP, Krause DN (1998). Effect of melatonin in rat tail artery: role of K⁺ channels and endothelial factors. *Br J Pharmacol* 123: 1533–1543.
- Gosink EC, Forsberg EL (1993). Effects of ATP and bradykinin on endothelial cell Ca²⁺ homeostasis and formation of cGMP and prostacyclin. *Am J Physiol* 265: C1620–C1629.
- Govers R, Rabelink TJ (2001). Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 280: F193–F206.
- Hatakeyama T, Pappas PJ, Hobson II RW, Boric MP, Sessa WC, Duran WN (2006). Endothelial nitric oxide synthase regulates microvascular hypermeability in vivo. *J Physiol* 574: 275–281.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM et al. (1997). International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 49: 253–278.
- Kimura C, Oike M, Ohnaka K, Nose Y, Ito Y (2004). Constitutive nitric oxide production in bovine aortic and brain microvascular endothelial cell: a comparative study. *J Physiol* 554: 721–730.
- Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T (1999). Fluorescent indicators for imaging nitric oxide production. *Angew Chem Int Ed Engl* 38: 3209–3212.
- Kone BC, Kunciewicz T, Zhang W, Yu ZY (2003). Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *Am J Physiol* 285: F178–F190.
- Kunapuli SP, Daniel JL (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336: 513–523.
- Kvetnoy IM (1999). Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *Histochem J* 31: 1–12.
- Lang D, Bell JP, Bayraktutan U, Small GR, Shah AM, Lewis MJ (1999). Phenotypic changes in rat and guinea pig coronary microvascular endothelium after culture: loss of nitric oxide synthase activity. *Cardiovasc Res* 42: 794–804.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005). International union of pharmacology. XIV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27–77.
- Léon J, Escames G, Rodriguez MI, Lopez LC, Tapias V, Entrena A et al. (2006). Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity by N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a brain metabolite of melatonin. *J Neurochem* 98: 2023–2033.
- Lopes C, de Lyra JL, Markus RP, Mariano M (1997). Circadian rhythm in experimental granulomatous inflammation is modulated by melatonin. *J Pineal Res* 23: 72–78.
- Lotufo CMC, Lopes C, Dubocovich ML, Farsky SHP, Markus RP (2001). Melatonin and N-acetylserotonin inhibit leukocyte rolling and adherence to rat microcirculation. *Eur J Pharmacol* 430: 351–357.
- Lotufo CMC, Yamashita CE, Farsky SHP, Markus RP (2006). Melatonin effect on endothelial cells reduces vascular permeability increase induced by leukotriene B₄. *Eur J Pharmacol* 534: 258–263.
- Marrelli SP (2001). Mechanisms of endothelial P2Y₁- and P2Y₂-mediated vasodilatation involve differential [Ca²⁺]_i responses. *Am J Physiol* 281: H1759–H1766.
- Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML et al. (2002). MT₂ melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 1295–1302.
- Michell BJ, Harris MB, Chen ZP, Ju H, Venema VJ, Blackstone MA et al. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem* 277: 42344–42351.
- Moccia F, Baruffi S, Spaggiari S, Coltrini D, Berra-Romani R, Signorelli S et al. (2001). P2Y₁ and P2Y₂ receptor-operated Ca²⁺ signals in primary cultures of cardiac microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 61: 240–252.
- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A et al. (1998). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation* 97: 99–107.
- Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D et al. (1998). Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett* 427: 263–266.
- Noda Y, Mori A, Liburdy R, Packer L (1999). Melatonin and its precursor scavenger nitric oxide. *J Pineal Res* 27: 159–163.
- Oike M, Ito Y (1997). Dynamic regulation of intracellular Ca²⁺ concentration in aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 319: 291–298.
- Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MM, Markus RP (2006). Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) – melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res* 41: 136–141.
- Pozo D, Reiter RJ, Calvo JR, Guerrero JM (1997). Inhibition of cerebellar nitric oxide synthase and cGMP production by melatonin via complex formation with calmodulin. *J Cell Biochem* 65: 430–442.

- Ramirez AN, Kunze DL (2002). P2X purinergic receptor channel expression and functional in bovine aortic endothelium. *Am J Physiol* **282**: H2106–H2116.
- Romero MP, Garcia-Perganeda A, Guerrero JM, Osuna C (1998). Membrane-bound calmodulin in *Xenopus laevis* oocytes as a novel binding site for melatonin. *FASEB J* **12**: 1401–1408.
- Schaefer U, Schneider A, Rixen D, Neugebauer E (1998). Neutrophil adhesion to histamine stimulated cultured endothelial cells is primarily mediated via activation of phospholipase C and nitric oxide synthase isozymes. *Inflamm Res* **47**: 256–264.
- Schubert W, Frank PG, Woodman SE, Hyogo H, Cohen DE, Chow CW *et al.* (2002). Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (–/–) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J Biol Chem* **277**: 40091–40098.
- Seltzer A, Viswanathan M, Saavedra JM (1992). Melatonin-binding sites in brain and caudal arteries of the female rat during the estrous cycle and after estrogen administration. *Endocrinology* **130**: 1896–1902.
- Simmonneaux V, Ribelayga C (2003). Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. *Pharmacol Rev* **55**: 325–395.
- Stevens T, Rosenberg R, Aird W, Quertermous T, Johnson FL, Garcia JG *et al.* (2001). NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am J Physiol* **281**: C1422–C1433.
- Tamura EK, Silva CLM, Markus RP (2006). Melatonin inhibits endothelial nitric oxide production *in vitro*. *J Pineal Res* **41**: 267–274.
- Vanecek J (1998). Cellular mechanisms of melatonin action. *Physiol Rev* **78**: 687–721.
- Venema RC (2002). Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin. *Int Immunopharmacol* **2**: 1755–1762.
- Viswanathan M, Laitinen JT, Saavedra JM (1990). Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6200–6203.
- Volonte C, Amadio S, D'Ambrosi N, Colpi M, Burnstock G (2006). P2 receptor web: complexity and fine-tuning. *Pharmacol Ther* **112**: 264–280.
- Wagner S, Groschner K, Mayer B, Schmidt K (2002). Desensitization of endothelial nitric oxide synthase by receptor agonists. *Biochem J* **364**: 863–868.
- Ximenes VF, Catalani LH, Campa A (2001). Oxidation of melatonin and tryptofan by an HRP cycle involving compound III. *Biochem Biophys Res Commun* **287**: 130–134.
- Yamamoto K, Sokabe T, Matsumoto T, Yoshimura K, Shibata M, Ohura N *et al.* (2006). Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X₄-deficient mice. *Nat Med* **12**: 133–137.
- Yang Q, Scalbert E, Delagrangre P, Vanhoutte PM, O'Rourke ST (2001). Melatonin potentiates contractile responses to serotonin in isolated coronary arteries. *Am J Physiol* **280**: H76–H82.