UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Caracterização dos efeitos da exposição à hidroquinona sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado

André Luiz Teroso Ribeiro

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:
Profª. Drª. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Caracterização dos efeitos da exposição à hidroquinona sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado

André Luiz Teroso Ribeiro

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:
Profª. Drª. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo
2011

ANDRÉ LUIZ TEROSO RIBEIRO

Caracterização dos efeitos da exposição à hidroquinona sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado

Comissão julgadora da dissertação para a obtenção do titulo de mestre

_____Profª. Drª. Sandra Helena Poliselli Farsky_____
Orientador/ Presidente

_____
1° Examinador

_____
2° Examinador

São Paulo, de de 2011.

Dedicatória

Dedico...

...A Yeshua,
Pelo amor, Pela salvação,
Pela vida, Por iluminar meu caminho e
Por me fazer transpor todos os obstáculos.
Obrigado.

...A minha mãe, Clarisse,
Pelo amor, Pelo carinho, Pelo suporte,
Pelas orações, Pelas conversas, Pelas preocupações e
Pela amizade, se fazendo presente mesmo estando longe.
Por ser minha mãe,
Obrigado

...A minha namorada Laís,
Pela presença, Pelo amor, carinho e dedicação,
Pelas conversas, Por “pôr a mão na massa” junto comigo,
Por ouvir, Por compreender,
Por fazer parte da minha vida.
Obrigado

Agradecimentos

Agradeço...

...a ***Profª. Drª. Sandra Helena Poliselli Farsky***, pela orientação, por dividir seus extensos conhecimentos, pela ajuda na escrita dos resumos, banners, pela ajuda nos experimentos e por sempre estar presente nos momentos de discussão, me guiando até o esclarecimento de minhas dúvidas e por estar sempre presente nos momentos de descontração...Obrigado !!!

...aos ***amigos do laboratório***, Ana Lúcia (Anóca), Carine, José (Zeca), Isabel, Gabriela (Gabi), Camila Lima (Camilinha), Camila Araujo (Camilão), Marcela, Rodrigo, Cristina (Alemoa), Simone (Simoninha), André (Andrezinho), André (Shimo), por toda a amizade compartilhada no período do mestrado, dentro e fora do laboratório, pela ajuda técnica e intelectual em todos os momentos, pelos momentos do *"coffee"*, por prestarem atenção e rirem das minhas piadas, pela companhia nos momentos de nervosismo e pela confidencialidade.... Obrigado !!!

...aos ***amigos agregados do laboratório*** Tiago (Sistemático) pela ajuda intelectual e técnica, principalmente na "analítica", pela amizade, pela companhia, pelos "papos", por dividir-se; Lara (meio intelectual, meio de esquerda), pela ajuda, companhia, pela amizade, por confiar e pelos momentos de suporte prestados a mim... Obrigado !!!

...aos ***amigos do Solar***, Daniel (Erechim), Thaisa (Erechéia), Thiago Barcelos (Pelotas), Tiago (Peixe), Talita (Pexa), Fabriciano (Bri), Carla (Bria), Helder (Negão), João (Pintinho), Alex (Japagirl), Rodrigo (Monstro), Ricardo (Janjão), Enio (Mineiro), Sidnei (Nóia), Rafael (Fiuk), Rafael (Menk) Virgilio (Cuesta), pela amizade, pelas conversas no final do dia, pelos almoços em "família", por serem minha família fora de casa, pela ajuda, pelos conselhos, por me "apadrinharem", pelas festas, pelas estórias, por ouvirem meus desabafos, por confiarem a mim os seus desabafos e por fazerem dos meus dias mais agradáveis... Obrigado !!!

...aos ***funcionários do bloco 13B***, Luzia e Dalva por sempre estarem disposta a conversar, pelo preparo daquele café perfumado todas as manhas e pela amizade... ao Ângelo, pela amizade, pelas conversas, pela ajuda com qualquer coisa, pela ajuda nas festinhas no solar.... Obrigado !!!

Aos Colaboradores deste trabalho agradeço...

...a FUNDACENTRO, em nome de ***Walter dos Reis Pereira Filho e Alcinéa Meigikos dos Anjos Santos***, pelo auxílio na execução do protocolo experimental escolhido para quantificação de HQ no ar utilizado neste trabalho....Obrigado !!!

...a ***Profª Drª Ana Paula de Melo Loureiro*** pelo auxilio na execução do protocolo de extração de DNA e quantificação de adutos e por sempre estar presente para o esclarecimento de duvidas... Obrigado !!!

...a ***TODOS*** que de uma forma ou de outra me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.... MUITO OBRIGADO !!!!

“... e peço isto: que o vosso amor cresça
mais e mais em ciência e em todo conhecimento...”
Filipenses cap. 4 v.19

“... A ciência nunca resolve um problema,
sem criar pelo menos outros dez ...”
Bernard Shaw

Resumo

A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico encontrado em grandes quantidades no cigarro, em medicamentos e alimentos, além de ser um dos mais importantes metabólitos tóxicos do benzeno (BZ). Temos mostrado que a exposição sistêmica à HQ compromete a resposta inflamatória *in vivo*. Complementando estas investigações, o objetivo do presente projeto foi investigar o efeito da exposição ambiental à HQ sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão induzido pelo lipopolisacarídeo *de E.coli* (LPS) e sobre os eventos celulares envolvidos neste processo, bem como sobre a formação de adutos de DNA no tecido pulmonar. Para tanto, 12,5, 25 ou 50 ppm de HQ ou veículo (solução salina 5% de etanol) foram nebulizadas em caixa de exposição (60 mL/1h; 5 dias) onde 5 camundongos Swiss machos estavam alocados. Uma hora após as últimas exposições, a inflamação pulmonar foi induzida pela inalação de LPS (0,1 mg/mL; 10 min). Os animais expostos à HQ e na vigência ou ausência de inflamação foram empregados para: 1) coleta do lavado broncoalveolar (LBA) três horas após a inalação de LPS para quantificação do número de leucócitos (câmara de Neubauer e esfregaços corados por Panótico®); 2) coleta de sangue para quantificação do número de leucócitos circulantes antes e 3 horas após a inalação de LPS (câmara de Neubauer e esfregaços corados por Panótico®); para a quantificação da expressão de moléculas de adesão em leucócitos de animais não inflamados induzida ou não pelo formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP) *in vitro* (citometria de fluxo); para obtenção de plasma para quantificação de malonaldeído (HPLC) e de neutrófilos para quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs; citometria de fluxo) de animais não inflamados pelo LPS; 3) coleta de tecido pulmonar para quantificação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e para quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) 3 horas após a inalação de LPS e para quantificação de adutos de DNA em tecido de animais não inflamados. Adicionalmente, a concentração de HQ na caixa de exposição foi quantificada por HPLC. Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ não afetou os números de leucócitos circulantes, mas reduziu o número de leucócitos polimorfonucleares (PMN) e mononucleares (MN) no LBA; aumentou a atividade de MPO no tecido pulmonar; reduziu a expressão de L-selectina em PMN estimulados *in vitro* pelo fMLP; aumentou a expressão de β_2 integrinas em PMN na vigência ou ausência (basal) de estimulação pelo fMLP; aumentou a expressão de β_3 integrinas e PECAM-1 em condições basais; aumentou a formação de EROs por PMN; não alterou a expressão das moléculas de adesão endoteliais PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, JAM-C, P e E-selectinas e VE-Caderina; não aumentou significantemente a formação de adutos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina e 1,N^2-propano-2'-deoxiguanosina no tecido pulmonar; aumentou a concentração de malonaldeído plasmático. A saturação da concentração de HQ na caixa de exposição foi 10 vezes menor que as preconizadas para a exposição ocupacional pelas agências

regulamentadoras, indicando que mesmo a baixas concentrações de exposição, a HQ prejudica a resposta do hospedeiro a um agente infeccioso. O mecanismo tóxico pode estar relacionado à ativação das células na circulação, dependente da produção de espécies reativas de oxigênio, e que a toxicidade pode não ser detectada na ausência de resposta do organismo ao trauma.

Palavras-Chave: Pulmão inflamado, Adutos de DNA, contaminação ambiental e ocupacional, LPS

Abstract

Hydroquinone (HQ) is a phenolic compound found in large quantities in cigarettes, medicines and food, besides it is one of the most important toxic metabolites of benzene (BZ). We have shown that systemic exposure impairs *in vivo* inflammatory response. Following these investigations, this work aimed to study the effects of environmental exposure to HQ on leukocyte recruitment to the inflamed lung induced by *lipolissacarideo of E. coli* (LPS), the cell events involved in this process, and adducts formation on DNA of pulmonary tissue cells . For that 12.5, 25, or 50 ppm of HQ or vehicle (saline solution with 5% of ethanol) we aerosolized into an exposure box (60 mL/1h; 5 days) containing 5 male Swiss mice. One hour after the last exposures, the pulmonary inflammation was induced by LPS inhalation (0.1 mg/mL; 10 min). Animals exposed to HQ in presence or absence of inflammation were used for: 1) BAL collection three hours after LPS inhalation to quantify the leukocytes in BAL (Neubauer chamber and Panótico® stained smears); 2) blood collection to quantify the circulating leukocytes before and three hours after LPS inhalation (Neubauer chamber and Panótico® stained smears); to quantify the expression of adhesion moleculas in leukocytes from non-inflamed animals induced or not for formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) *in vitro* (flow citometry); to obtain blood plasma and quantify the formation of malondialdehyde (MDA; HPLC) and neutrophils to quantify the intracellular generation of reactive oxygen spices (ROS; flow citometry) from non-inflamed animals; 3) pulmonary tissue collection to quantify the expression oh adhesion molecules on endothelial cells and quantify the mieloperoxydase (MPO) activity, three hours after LPS inhalation and to quantify the DNA adducts on pulmonary tissue obtained from non-inflamed animals. Additionally, the concentration of HQ in the exposure box was quantified by HPLC. The results showed that exposure to HQ did not affect the numbers of circulating leukocytes, but reduced the number of polymorphonuclear leukocytes (PMN) and mononuclear (MN) in BAL, increased the activity of MPO in lung tissue; reduced the expression of L-selectin in PMN stimulated by fMLP *in vitro*, increased the expression of β_2 integrins in PMN in the presence or absence (basal) stimulation by fMLP, increased the expression of β_3 integrin and PECAM-1 in basal conditions; increased ROS formation by PMN, did not alter the expression of endothelial adhesion molecules PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, JAM-C, P and E-selectin and VE-Cadherin; not significantly increased the formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine e 1,N^2-propano-2'-deoxyguanosine adducts in lung tissue; increased the concentration of plasma malondialdehyde. The concentration of HQ into the exposure box was 10 times lower than those recommended for occupational exposure from regulatory agencies, indicating that even at low exposure concentrations, HQ affect the host response to an infectious agent. The toxic mechanism may be related to activation of circulating cells, dependent on

the generation of reactive oxygen species, and toxicity can not be detected in the absence of body response to trauma.

Key words: Inflamed lung, DNA adducts, environmental and occupational contamination, LPS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da hidroquinona. 19
Figura 2 - Metabolização do benzeno. 23
Figura 3 - Transmigração de leucócitos por entre as junções interendoteliais. 32
Figura 4 – Peroxidação lipídica e formação de malonaldeído 35
Figura 5 – Esquema do delineamento experimental 39
Figura 6 - Esquema de exposição à HQ ou veículo 40
Figura 7 - Esquema de coleta de ar no interior da caixa de exposição 41
Figura 8 – Modelo esquemático da conversão de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato acetometil ($DCFH_2$-DA-AM) para 2'-7' diclorofluoresceína. 49
Figura 9 - Curva obtida através da analise da HQ 53
Figura 10 - Cromatograma de HQ em 290nm. 54
Figura 11 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 12,5 ppm sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante. 55
Figura 12 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante. 56
Figura 13 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 50 ppm sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante 56
Figura 14 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 12,5 ppm sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória 57
Figura 15 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória. 58
Figura 16 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 50 ppm sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória 58
Figura 17 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido pulmonar. 59
Figura 18 – Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN e MN. 61

Figura 19 – Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão de β_2-integrina em leucócitos PMN e MN 61
Figura 20 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão de β_3-integrina em leucócitos PMN e MN 61
Figura 21 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão de PECAM-1 em leucócitos PMN e MN 62
Figura 22 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas PECA-1, VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio vascular pulmonar 63
Figura 23 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão das moléculas de adesão da família das selectinas P- e E-selectina no endotélio vascular pulmonar 64
Figura 24 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a expressão das moléculas de adesão de manutenção das junções interendoteliais E- e VE-caderina e JAM-C no endotélio vascular pulmonar. 65
Figura 25 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a produção de EROs intracelular por leucócitos circulantes. 66
Figura 26 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a formação de malonaldeído (MDA) 67
Figura 27 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre o ciclo celular de leucócitos 68
Figura 28 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a integridade do DNA celular 69
Figura 29 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em tecido pulmonar 70
Figura 30 - Efeito da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a formação de 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina em tecido pulmonar 70

Lista de tabelas

Tabela 1 – Teste de saturação de Hidroquinona no interior da caixa de exposição. 55

Sumário

Resumo 8
Abstract 10
Lista de tabelas 14
1 Introdução 17
1.1 Compostos Fenólicos 18
1.2 Hidroquinona 19
1.3 Genotoxicidade da HQ 24
1.4 Resposta Inflamatória Pulmonar pelo LPS 26
1.5 Recrutamento Leucocitário Pulmonar 28
1.6 Estresse Oxidativo 33
1.7 Efeitos deletérios da exposição ocupacional e ambiental à HQ 35
2 Objetivo 37
3 Metodologia 38
3.1 Delineamento Experimental 39
3.2 Animais 39
3.3 Exposição à Hidroquinona 39
3.4 Saturação de HQ no Interior da Caixa de Exposição 40
3.5 Indução da Resposta Inflamatória Pulmonar 42
3.6 Lavado Broncoalveolar 42
3.7 Leucograma 43
3.8 Atividade da Mieloperoxidase 43
3.9 Citometria de Fluxo 44
3.10 Extração de DNA Tecido Pulmonar 44
3.11 Hidrólise Enzimática do DNA 45
3.12 Análises Cromatográficas dos Níveis de 8-oxodGuo, e 1,N^2-propanodGuo por HPLC/ESI-MS/MS-MRM 46
3.13 Quantificação dos Níveis de Malonaldeído em Plasma 47
3.14 Quantificação do *burst* oxidativo em neutrófilos por citometria de fluxo 48
3.15 Imunohistoquímica 50
3.16 Análise Estatística 51
4 Resultados 52
4.1 Determinação das Concentrações de HQ no Interior da Caixa de Exposição 53

4.1.1Confecção da Curva de Calibração 53
4.1.2 Determinação das Concentrações de HQ 54
4.2 Efeito das Exposições com 12,5, 25 ou 50 ppm de HQ Sobre Número de Células no Sangue Circulante 55
4.3 Efeito das Exposições com 12,5, 25 ou 50 ppm HQ Sobre a Migração de Leucócitos para o Pulmão Induzida pelo LPS 57
4.4 Efeito da Exposição a 25 ppm Sobre a Atividade de MPO no Tecido Pulmonar 59
4.5 Efeito da Exposição a 25 ppm de HQ Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão por Leucócitos Circulantes 59
4.6 Efeito da Exposição a 25 ppm de HQ Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão no Endotélio Vascular Pulmonar 63
4.7 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular 66
4.8 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Formação de MDA 67
4.9 Efeito da Exposição à HQ Sobre o Ciclo Celular. 68
4.10 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Integridade do DNA 68
4.11 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Formação de Adutos de DNA em Tecido Pulmonar 70
5 Discussão 71
6 Conclusão 79
7 Referências 81
8 Anexos 95
8.1 Ficha do Aluno 96
8.2 Currículo lattes 98
8.3 Certificado do comitê de ética 103
8.4 Artigo submetido para publicação n.1 104
8.5 Draft do artigo para publicação n. 2 129

Introdução

1.1 Compostos Fenólicos

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

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

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

Os efeitos benéficos destas moléculas relacionados à sua atividade antioxidante são particularmente devido à sua habilidade de eliminar radicais livres, de doar átomos de hidrogênio ou elétrons e de quelar cátions metálicos, responsáveis pelo estresse oxidativo (RAHMAN *et al.*, 2006; FERNANDEZ-PANCHON *et al.*, 2008; BEN FARHAT *et al.*, 2009). Ademais, alguns compostos fenólicos, em especial os flavonóides, são capazes de reduzir as atividades das óxido nítrico sintases (NOS) e ciclooxigenases (COX), a adesão leucocitária, a desgranulação de mastócitos, além de diminuírem os níveis de interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral-α (TNF-α) e interferon-γ (IFN-γ). Desta forma, são assim considerados estratégias novas e seguras para modulação da inflamação dependente da via do fator de transcrição nuclear NF-κB (SVARCOVA *et al.*, 2007).

Os produtos de transformação dos compostos fenólicos também estão presentes em alimentos processados e bebidas, como no chá preto e verde, vinho tinto e café, além de ser encontrado no cacau, alho, kiwi, ameixa, cereja, uva, maçã,

pêra, frutas *berries*, frutas cítricas, brócolis, couve, cidra, chicória, espinafre, soja, entre outros (CROZIER *et al.*, 2009; NICHOLS & KATIYAR, 2010).

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

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

1.2 Hidroquinona

O produto de hidrólise da arbutina é a hidroquinona (HQ, Figura 1: 1,4-dihidroxibenzeno), o objeto de estudo deste trabalho. Adicionalmente, a HQ livre também está presente naturalmente em alguns alimentos e bebidas, tais como em brócolis (0,1 ppm), vinho tinto (0,5 ppm) e café (40 mg/Kg no grão seco; 100 µg/200 mL no produto pronto para o consumo) (IARC, 1987; DEISINGER, *et al.,* 1996; DARRALL *et al.*, 1998; JIN & SATO, 2003; DIMITROVA *et al.*, 2005; THAVARAJAH & LOW, 2006).

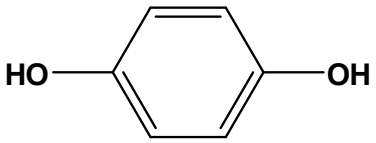

Figura 1 - Estrutura química da hidroquinona.

A HQ é utilizada na indústria cosmética, sendo um dos tratamentos mais indicados por dermatologistas para o clareamento da pele com finalidades estéticas ou terapêuticas. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estipula a comercialização de cremes com concentração de até 2% de HQ, mas podemos encontrar de 4 a 10% de HQ em formulações manipuladas (RDC nº79/2000; DECAPRIO, 1999; WESTERHOF & KOOYERS, 2005).

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

Há registros que a HQ dispersa no ar pode estar conjugada a poeira nas concentrações de 0,1 a 6,0 mg/m^3 em indústrias que manipulam a mesma ou seus precursores, um número muito elevado visto que as agências de regulamentação como a *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH), *National Institute of Occupational Safety & Health* (NIOSH) e a *Occupational safety and Health Administration* (OSHA) preconizam um limite de 2,0 mg/m^3 onde o trabalhador pode permanecer em contato com a HQ por um período limitado de 8 horas por dia. (NIOSH, 1994; PIFER *et al.*, 1995). No Brasil não ha uma legislação ou norma regulativa com relação a limites de exposição à HQ, porém as fichas de segurança de produtos químicos utilizam os valores determinados pela NIOSH.

A HQ também é produto de metabolização do benzeno (BZ), utilizado na indústria petroquímica e na produção que requer solventes aromáticos, como a fabricação de borracha e sapatos. Os motores a gasolina são as principais fontes de emissão móvel, gerando assim, pela queima do combustível, o benzeno que é liberado no ar, contribuindo para a contaminação ambiental. Além disso, os riscos de vazamentos podem ocasionar contaminação de aqüíferos e lençóis freáticos (TIBURTIUS *et al.,* 2004; LIANG *et al.*, 2008; WEISEL, 2010).

Entre 1972 e 1991 a média de concentração de benzeno na gasolina americana foi de 0,8 a 3,18%, enquanto que atualmente a gasolina americana contém cerca de 1%. Já na comunidade européia, a concentração de benzeno na gasolina geralmente está acima de 2% (KEENAN *et al.,* 2010). No Brasil, a Agência

Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) preconiza a concentração máxima de 1% de BZ na gasolina comum. Mas, infelizmente, a literatura e a própria mídia brasileira mostram valores que alcançaram a marca de 8% de BZ, decorrentes de adulteração da gasolina (ANP, 2001; AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTICIAS, 2005).

Outra fonte de ocorrência importante de HQ e BZ é o cigarro, um dos maiores responsáveis por doenças do trato respiratório (DOMAGALA-KULAWIK, 2008; PATEL *et al*, 2008). Monografias da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) descrevem que um cigarro pode conter até 100 µg de HQ e 72,2 µg de BZ em sua composição. Já as quantidades liberadas pela fumaça de um cigarro podem variar de 72,2 µg a 183,5 µg de HQ e 46,3 µg a 272 µg de BZ pela corrente primária e secundária, respectivamente. Desta forma tanto fumantes ativos quanto passivos são expostos a concentrações significativas destas substâncias. Dados da Organização Mundial da Saúde mostram que 600.000 mortes por ano no mundo estão relacionadas as doenças causadas pelo cigarro (IARC, 1987; RDC n°05/2001; KIM, Y. J., 2005).

O BZ absorvido pela pele ou pelas vias aéreas sofre epoxidação no fígado ou nos pulmões, mediada pela CYP2E1 gerando o óxido de BZ. Este estabelece equilíbrio entre sua forma oxepina ou pode sofrer metabolização por duas vias distintas: 1) O óxido de BZ via epóxido hidrolase origina o BZ dihidrodiol que pela ação da CYP forma o BZ diolepóxido ou pela ação da dihidrodiol desidrogenase origina o catecol; 2) o óxido de BZ pela ação da CYP origina o fenol que novamente pela ação da CYP é convertido a HQ. O óxido de BZ a partir da sua forma oxepina pode gerar o ácido trans, trans-mucônico ou o óxido de BZ pode ser diretamente conjugado a glutationa resultando no ácido fenilmercaptúrico. Estes ácidos podem ser encontrados na urina e são utilizados como marcadores de exposição ao BZ. Os demais compostos fenólicos gerados podem ser transportados pelo sangue para a medula óssea, onde são metabolizados pela mieloperoxidase (MPO) e prostaglandina H sintetase gerando 1,4 e 1,2-benzoquinonas que são compostos extremamente eletrofilicos, e contribuem para a mielotoxicidade (GANOUSIS *et al.*, 1992; para revisões ver DE CAPRIO, 1999; SNYDER, 2004; JOHNSON *et al.*, 2007; HARTWIG, 2010). A comprovação da importância da metabolização do BZ para sua toxicidade é bastante evidenciada em estudos com animais geneticamente modificados para as enzimas CYP2E1 e MPO, uma vez que a mielotoxicidade é

bastante reduzida nestes animais (KETTLE & WINTERBOURN, 1992; MEDINSKY *et al.*, 1995; SNYDER 2002;2004). Ademais, os estudos, na maioria *in vitro*, mostram que a exposição à HQ compromete a função de células do sistema imune (TAYSSE *et al.,* 1995; LEE *et al.*, 2007; CHO *et al.,* 2008; CHOI *et al.*, 2008).

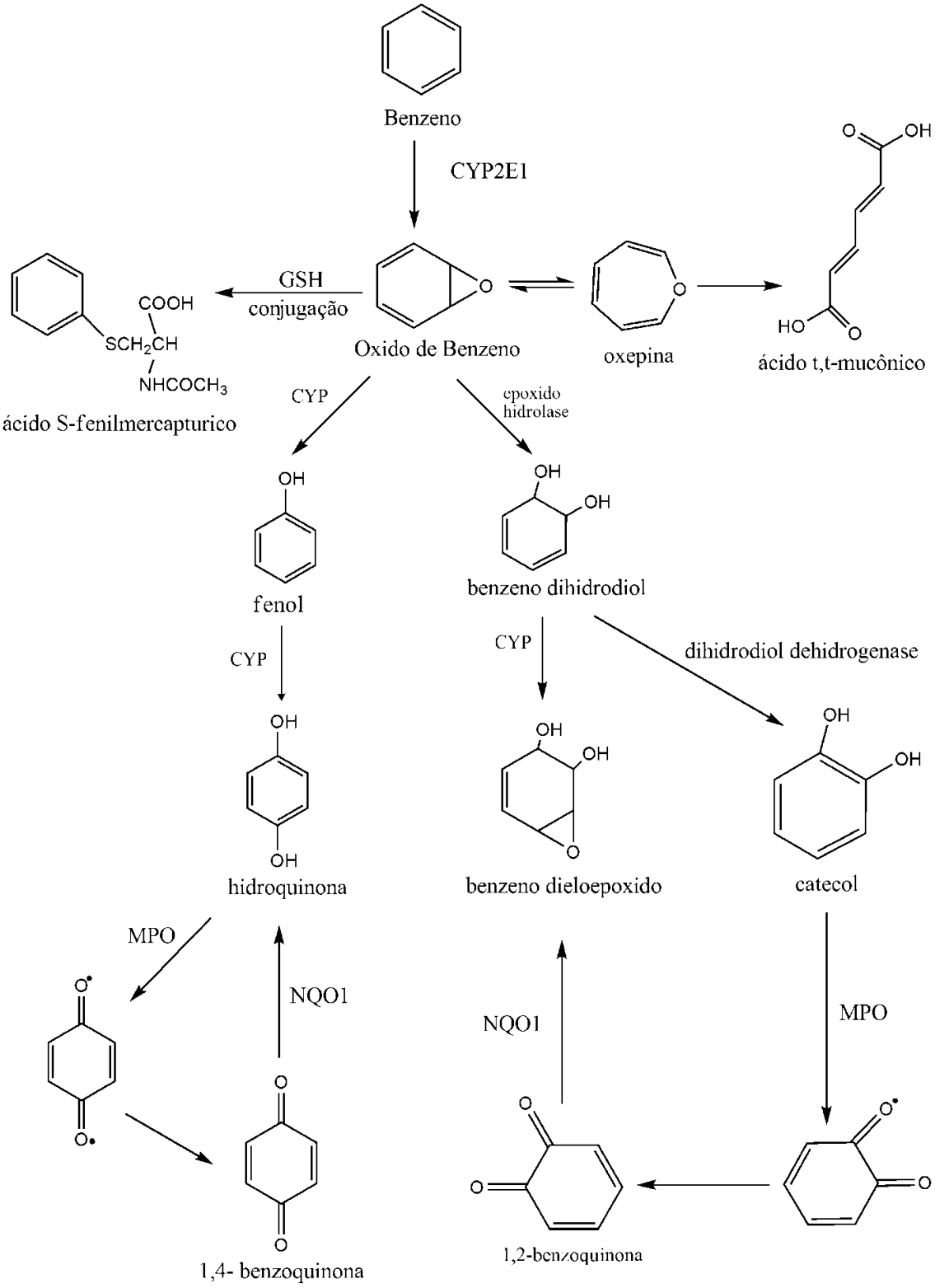

Figura 2 - Metabolização do benzeno. Figura de JOHNSON *et al.*, 2007.

Segundo os protocolos da OECD, a HQ apresenta os seguintes parâmetros fisioquímicos: Peso molecular de 110.11 g/mol; ponto de fusão de 169 °C; ponto de ebulição de 286 °C; pressão de vapor de 2,3 x 10^{-3} Pa a 25 °C e solubilidade em água de 73000 mg/L a 25 °C. Também, com base nos protocolos de toxicidade da OECD, os seguintes parâmetros são apresentados: toxicidade oral aguda para camundongos da espécie Swiss com dose letal (LD_{50}) de 390 mg/Kg; *No Observed Efect Level* (NOEL) de 25 mg/Kg para toxicidade de doses orais repetidas para camundongos (B6C3F1). Embora a IARC classifique a HQ como agente químico do grupo 3, ou seja, não carcinogênica para humanos, McGregor (2007) questiona esta classificação, propondo que talvez os modelos de avaliação aplicados aos animais sejam limitados e inadequados para a indicação da toxicidade à HQ. Desta forma, estudos experimentais que elucidem os mecanismos de ação tóxica da HQ e que identifiquem indicadores biológicos de efeitos mais precoces e sensíveis podem contribuir efetivamente para avaliação do risco.

1.3 Genotoxicidade da HQ

Os agentes genotóxicos são compostos químicos extremamente eletrofílicos e, funcionalmente, são classificados como substâncias que tem afinidade pelo DNA e capacidade de alterar a replicação e a transcrição gênica (COMBES, 1992). Essas substâncias são atraídas por moléculas com alta densidade eletrônica, como é o caso das bases do DNA (molécula nucleofílica), levando a formação de adutos. A base do DNA com maior afinidade de ligação é a guanina, porém já existem dados da formação de adutos nas demais bases do DNA. As formações de adutos podem levar a mutações em proto-oncogenes ou, ainda, em genes que são supressores de tumor causando a iniciação de um processo de carcionogênese, além de impedir a perfeita replicação do material genético (LOUREIRO *et al*., 2002).

Inúmeras mutações ocorrem em todos os seres vivos continuamente, sendo considerado um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Contudo, estas mutações, se não devidamente corrigidas, podem acarretar uma série de problemas incluindo má formação fetal, envelhecimento celular causado pelo estresse oxidativo e câncer. (DA SILVA *et. al*., 2003).

Basicamente, as mutações são classificadas como estruturais e funcionais. Mutações estruturais estão ligadas a modificações na estrutura do DNA como

inserção, deleção, ampliação, inversão e translocação de bases, estas podem ser pontuais ou se repetirem em varias regiões na fita de DNA. As mutações funcionais são aquelas nas quais genes mutados apresentam perda de função ou ganho de nova função diferente daquela apresentada por um gene não mutado (DA SILVA, 2003).

Os erros decorrentes da adição de grupos químicos à estrutura do DNA podem ocorrer tanto em células germinativas, quanto em células somáticas. Se o erro ocorrer em células da linhagem germinativa, este pode ser transmitido às gerações futuras e se perpetuar causando as doenças hereditárias. Mutações em células somáticas são transmitidas durante a divisão celular e apresentam caráter cumulativo. Estas mutações estão relacionadas a doenças degenerativas e câncer, por exemplo. Felizmente, a grande maioria destas mutações são detectadas por uma série de sistemas de reparo capazes de corrigir/eliminar a mutação. Alguns destes sistemas incluem reparo por fotorreativação enzimática, por excisão de base, por excisão de nucleotídeo, reparo de bases mal pareadas, por recombinação, por união de extremidades homologas e não homologas, entre outros. De uma maneira muito simplificada o reparo da mutação consiste na remoção de bases com defeito ou oxidadas, pela clivagem das ligações base nitrogenadas-desoxirribose e inserção de uma nova base sem defeito (ZAHA, *et al*., 2003). Entretanto, quando estes sistemas falham e mutações no DNA são transmitidas as células-filhas e perpetuadas, ocorre a manifestação das doenças (LOUREIRO *et al*., 2002).

É importante salientar que uma grande variedade de substâncias exógenas a qual o homem está exposto constantemente, como é o caso de poluentes ambientais, causam mutações. Neste contexto, a literatura tem mostrado o papel do BZ e dos seus metabólitos nas formações de adutos de DNA em diferentes tipos celulares (BODELL, *et al*., 1999; VÁRKONYI, *et al*., 2006; JI, *et al*., 2009). Os mecanismos estão relacionados ao metabolismo do BZ, gerando compostos altamente eletrofílicos que induzem a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e formação de produtos de peroxidação lipídica. Estes últimos interagem covalentemente com o DNA, formando os adutos (KASTAM & BARTEK, 2004; LOUREIRO *et. al*., 2002).

A HQ e a benzoquinona (BZQ) são descritas como causadoras de alguns efeitos lesivos ao DNA observados tanto *in vivo* como *in vitro.* Estas *ações* estão relacionadas à troca de cromátides irmãs, falhas na montagem do citoesqueleto e

formação de micronúcleos observados em linfócitos humanos e eritrócitos de camundongos, além da inibição da replicação e a habilidade de induzir a quebra de umas das fitas de DNA (GASKELL *et. al*., 2004; SOMMERS *et. al*., 2006; BARRETO *et al*.,2009; JI, *et al*. 2009). Tanto a HQ quanto a BZQ formam adutos exocíclicos de benzoeteno, com as bases guanina, adenina e citosina (RODRIGUEZ *et. al*., 2010). Adicionalmente, a HQ e a BZQ causam oxidação de bases nitrogenadas, originando 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) que tem sido bem descrito como indicador de oxidação da base da guanina em presença de HQ (LEANDERSON & TAGESSON, 1990; LEANDERSON & TAGESSON, 1992; LI *et al*., 2002; ZHONG *et al*., 2008).

Os efeitos genotóxicos podem ser quantificados diretamente pela mensuração da interação de um agente químico ao DNA ou, de forma indireta, pela mensuração do reparo do DNA, da produção de genes mutados ou da produção de cromossomos alterados (CASARETT, 1996). Neste sentido, os testes de genotoxicidade e toxicidade são empregados para a avaliação da toxicidade de um agente químico, os quais podem ser conduzidos *in vitro* ou *in vivo,* e contribuem para a indicação de biomarcadores de exposição e para a descoberta de novos *endpoints* para produtos específicos (HAYASHI & HONMA, 2007).

1.4 Resposta Inflamatória Pulmonar pelo LPS

Os pulmões são órgãos esponjosos, com aproximadamente 25 cm de comprimento, sendo envolvido por uma membrana serosa denominada pleura. Anatomicamente, os pulmões são constituídos por, brônquios, que ramificam-se profusamente, dando origem a tubos cada vez mais finos denominados bronquíolos. Cada bronquíolo termina em pequenas bolsas formadas por células epiteliais achatadas recobertas por capilares sangüíneos, denominadas alvéolos pulmonares, os quais constituem a maior superfície epitelial do organismo (BÁRTHOLO & BÁRTHOLO, 2009).

Por constituir a principal porta de entrada de poluentes e microrganismos inalados, a interação entre o ar atmosférico e as células do trato respiratório credencia o pulmão como órgão-alvo no desenvolvimento de eventos inflamatórios. Entretanto, o trato respiratório apresenta um sistema altamente integrado no

combate de substâncias inaladas constituído pelo aparato mucociliar, pelo sistema fagocítico inflamatório agudo (macrófagos e neutrófilos) e pelos mecanismos imunes celular e humoral. Se estes sistemas de defesa não forem eficazes na eliminação dos patógenos, uma resposta inflamatória altamente complexa é inicializada, que é caracterizada por modificações na reatividade das vias aéreas, migração leucocitária do sangue para o tecido pulmonar e lavado broncoalveolar (LBA), aumento de permeabilidade vascular e ativação de células residentes (DOMAGALA-KULAWIK, 2008).

Os microorganismos inalados apresentam estruturas altamente conservadas em suas membranas conhecidas como padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP), que no organismo são reconhecidos por proteínas de membrana denominadas de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs). Estes receptores são expressos em células residentes do sistema respiratório como macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos (TAKEUCHI & AKIRA, 2010).

Os receptores tipo *Toll* (TLRs) compreendem uma das famílias mais bem caracterizadas de PRR. Estes receptores são caracterizados por apresentarem um domínio N-terminal com repetidas regiões ricas em leucina, uma região transmembrana e um domínio citoplasmático tipo *Toll* com homologia com receptor de interleucina-1 (IL-1). A grande variedade de receptores tipo *Toll* reconhece distintos padrões moleculares de microorganismos. Especificamente, o TLR4 reconhece o LPS presente na membrana de bactérias gram-negativas (AKIRA *et al*., 2001; TAKEUCHI & AKIRA, 2010). O LPS é um composto glicolipídico composto por um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico, conhecido como lipídio A, o principal responsável pela atividade biológica do LPS (TRIANTAFILOU & TRIANTAFILOU, 2005). No organismo, o LPS se liga a uma proteína ligadora de LPS (LBP) presente no plasma e o complexo LPS-LBP é reconhecido pela proteína CD14 presente em células mielóides. O CD14 atua como um co-receptor e permite que todo o complexo LPS-LBP-CD14 seja reconhecido pelo TLR4. O CD14 também pode ser encontrado na sua forma solúvel (sCD14) no plasma e a interação do complexo LPS-LBP com sCD14 permite que células endoteliais, que não expressam CD14 em suas membranas, mas expressam TLR4, possam ser ativadas pelo LPS (AKIRA *et al*., 2001; DAUPHINEE & KARSAN, 2005). A interação deste complexo com o TLR4 ativa diferentes vias de sinalização intracelular dependente ou

independente da proteína adaptadora MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88)*. A via dependente de MyD88 está envolvida no controle da expressão de citocinas e moléculas de adesão através da ativação do fator de transcrição nuclear NF-κB. A via independente de MyD88 induz, principalmente, a expressão de genes dependentes da ativação do fator regulatório de interferon 3. Porém, esta via também pode culminar na ativação de NF-κB (AKIRA *et al*., 2001).

1.5 Recrutamento Leucocitário Pulmonar

Como já salientado, a resposta inflamatória pulmonar é caracterizada pelo influxo de células brancas. Este recrutamento leucocitário a partir dos compartimentos de reserva e da corrente sanguínea é dependente da perfeita interação dos leucócitos circulantes com o endotélio da parede vascular. Inicialmente, os leucócitos circulam no centro do vaso e os eritrócitos na região periférica. O reconhecimento de patógenos por células residentes no pulmão desencadeia a ativação destas células e liberação de fatores quimiotáticos e mediadores químicos. Os neutrófilos que anteriormente estavam circulando na região central do vaso, agora começam a marginar e deslizar sobre as células endoteliais da microcirculação, num comportamento denominado *rolling*, para subseqüentemente, aderir firmemente à parede do vaso e migrar por entre as junções interendoteliais (para revisões ver HARLAN, 1985; RAMPART 1994; WIEDLE *et al.*, 2001). Estes fenômenos são altamente controlados e mediados pela expressão/ativação seqüencial de moléculas de adesão nas superfícies celulares e, em conjunto, são fundamentais para o recrutamento leucocitário para o local da lesão, recebendo a denominação de interação leucócito-endotélio (WIEDLE *et al*., 2001; RAO *et al.*, 2007).

O comportamento *rolling* de leucócitos no endotélio microvascular pulmonar é mediado primeiramente pela expressão de moléculas pertencentes à família das selectinas, expressas nos leucócitos (L-selectina) e na célula endotelial (E-selectina) e expressas nas plaquetas e no endotélio (P-selectina). Estas se ligam a carboidratos específicos presentes nas membranas celulares, especialmente carboidratos fucosilados e sialilados (para revisão ver SPERANDIO, 2006). A família das selectinas é composta por moléculas que de maneira geral são expressas constitutivamente e podem ter sua expressão aumentada após estímulo inflamatório.

A P-selectina que está presente nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais e grânulos-alfa das plaquetas é rapidamente mobilizada para a superfície da célula, após estímulo como histamina, leucotrieno B_4 (LTB_4), bradicinina ou radicais livres; a E-selectina (ELAM-1) é expressa somente em células endoteliais, onde é rapidamente sintetizada após estimulação por citocinas como TNF-α ou IL-1; a L-selectina (LECAM) que está presente na membrana de monócitos, linfócitos e neutrófilos após exercer sua função no processo *rolling* é clivada para que a adesão firme aconteça com a ação das integrinas (GRAILER *et al.*, 2009; SMALLEY & LEY, 2005; JYM & LEY, 1999; ALBELDA *et al.*, 1994).

Complementarmente, as integrinas favorecem a estabilização dos eventos mediados pelas selectinas. As integrinas pertencem a uma grande família de receptores heterodiméricos (subunidades α e β), que além de mediar a adesão entre células, emitem sinais bidirecionalmente para o interior da célula e para o ambiente extracelular. A subunidade α fornece informações sobre o ligante especifico e a subunidade β fornece um *link* para o citoesqueleto, e a perfeita interação entre as duas subunidades compreende o sítio de ligação do receptor. A associação de várias subunidades α com uma subunidade β comum subdividiu esta família. Assim, a subfamília das β_2-integrinas compreende *lymphocyte-function adhesion*-1 (LFA-1; CD11a); macrophage-associated antigen-1 (MAC-1, CD11b); Gp150,95 (CD11c) e CD11d. As três primeiras moléculas são expressas predominantemente em leucócitos e medeiam a adesão por ligarem-se a uma variedade de receptores na célula endotelial, que incluem as moléculas da superfamília das imunoglobulinas (SCHYMEINSKY *et al.*, 2007; TAKADA *et al.,* 2007).

A subfamília das β_1 (CD29) ou *very late activation* (VLA), medeiam, principalmente, a interação dos leucócitos à matriz vascular e extra vascular no processo de quimiotaxia (HONG-GELLER, 2009; KUWANO *et al.*, 2010). A subfamília das β_3 (CD61) ou integrina citoadesiva, possui função adesiva ao endotélio e as β_7 integrinas, medeiam a interação célula-célula (ELANGBAM *et al.*, 1997; SIXT *et al.*, 2006; ROSE *et al.*, 2007).

A célula endotelial expressa as moléculas da superfamília das imunoglobulinas *intercellular adhesion molecules* -1 e -2 (ICAM-1, ICAM-2), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1) e *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1) que atuam como ligantes para as integrinas e, desta forma, estão

envolvidas na firme adesão e na subseqüente transmigração. A ICAM-1 está constitutivamente expressa na membrana de várias células como fibroblastos, macrófagos, linfócitos e células endoteliais, mas assim como as integrinas essa molécula pode ter sua expressão aumentada após estímulo com IL-1, fator de necrose tumoral-α (TNF-α). Esta molécula está envolvida na transmigração paracelular, permitindo a migração dos leucócitos por entre as junções interendoteliais, e na migração transcelular, onde o leucócito transmigra passando por dentro da célula endotelial, utilizando basicamente as mesmas moléculas de adesão para que haja a transmigração. Este tipo de transmigração é mais comum no sistema nervoso central. A PECAM-1 faz ligações homotípicas ou interage com moléculas do tipo integrinas expressas pelos leucócitos como LFA-1 e MAC-1 (PETRI & BIXEL, 2006; YUSUF-MAKAGIANSAR *et al.*, 2002; para revisão ver VESTWEBER, 2007).

A VCAM-1 uma outra molécula de adesão da super família das imunoglobulinas que embora não esteja expressa em alta densidade em condições basais, pode ser induzida após a estimulação com citocinas (TNF-α). A VCAM-1 interage com as integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_4\beta_7$ presente em leucócitos, as quais estão relacionadas a transmigração de leucócitos por entre a junções interendoteliais (PETRI & BIXEL, 2006; VESTWEBER, 2007; MESTAS & LEY, 2008).

Outra molécula pertencente a super família das imunoglobulinas e de grande relevância para as interações leucócito-endotélio é a PECAM-1. É expressa na maioria das células da linhagem hematopoiéticas incluindo plaquetas, monócitos, neutrófilos e linfócitos (PRIVRATSKY *et al.*, 2010). A PECAM-1 é uma glicoproteína transmembrana, expressa em células endoteliais, monócitos, PMN, plaquetas e em algumas linhagens de linfócitos. A PECAM é estruturalmente composta por uma região extracelular composta por seis domínios de imunoglobulina (Ig), uma região que atravessa a membrana com 19 resíduos de Ig e apresenta uma calda citoplasmática com 118 resíduos de Ig. A porção intracelular é responsável por desencadear uma serie de sinalizações que resulta na mudança da conformação estrutural da célula endotelial aumentando sua superfície de contato, auxiliando na transmigração e direcionamento de neutrófilos para o foco da lesão (NEWMAN, 1997; FUJIWARA, K., 2006; WOODFIN *et al.*, 2007).

As células endoteliais apresentam junções do tipo *tight* ou ocludentes, formadas por interações homotípicas entre proteínas de adesão, presentes na

região apical da célula endotelial. Estas interações estabelecem uma barreira com permeabilidade seletiva.

Outro tipo de junção existente nas células endoteliais são as junções do tipo aderente, formadas logo abaixo das junções *tight*. Estas junções são formadas por proteínas de adesão que mantém a região basal das células endoteliais aderidas umas as outras. Os dois tipos de junções supracitadas são responsáveis por manter a integridade do endotélio, garantindo a justaposição e organização das células endoteliais.

As proteínas de adesão, citadas anteriormente, que medeiam a interação entre as células endoteliais são conhecidas como moléculas de adesão juncional. Dentre estas moléculas destacam-se as *junctional adhesion molecules* JAM-A e C, presente basicamente nas junções do tipo *tight* e as moléculas presentes nas junções aderentes, VE e N-caderinas (WORTHYLAKE & BURRIDGE, 2001; AURRAND-LIONS *et al.*, 2005; NOURSHARGH *et al.*, 2006; BRADFIELD *et al.*, 2007; LAUKOETTER *et al.*, 2007; WOODFIN *et al.*, 2007; AGHAJANIAN *et al.*, 2008; ALCAIDE *et al.*, 2008).

A molécula de adesão juncional A (JAM-A ou -1) é uma molécula pertencente a super família das imunoglobulinas, predominantemente expressa nas membranas de células epiteliais, endoteliais e de leucócitos (NAIK *et al.*, 2001; LAUKOETTER *et al.*, 2007; CERA *et al.*, 2009). Constitutivamente, a JAM-A se concentra na porção apical da célula endotelial. Após estimulação, a molécula é redistribuída no interior da célula, permitindo a abertura das junções interendoteliais e a passagem dos leucócitos por interação homotípica ou com a integrina LFA-1. Com isso a JAM-1 tem função de modular a migração, polaridade e proliferação de vários tipos celulares. (SEVERSON & PARKOS, 2009; WOJCIKIEWICZ *et al.*, 2009).

A molécula de adesão juncional C (JAM-C ou -3) é expressa em plaquetas, monócitos, linfócitos, células endoteliais e células dendríticas. Está relacionada com a transmigração de neutrófilos para o foco inflamatório por interações homotípicas ou com MAC-1. A JAM-C está localizada nos desmossomos e na região apical das junções interendoteliais, após estimulo inflamatório há a redistribuição desta molécula assim como todas as outras da família das JAMs (para revisões ver VESTWEBER *et al.*, 2007; WEBER *et al.*, 2007). A figura 3 ilustra as interações entre a JAMs e seus ligantes para a transmigração de leucócitos.

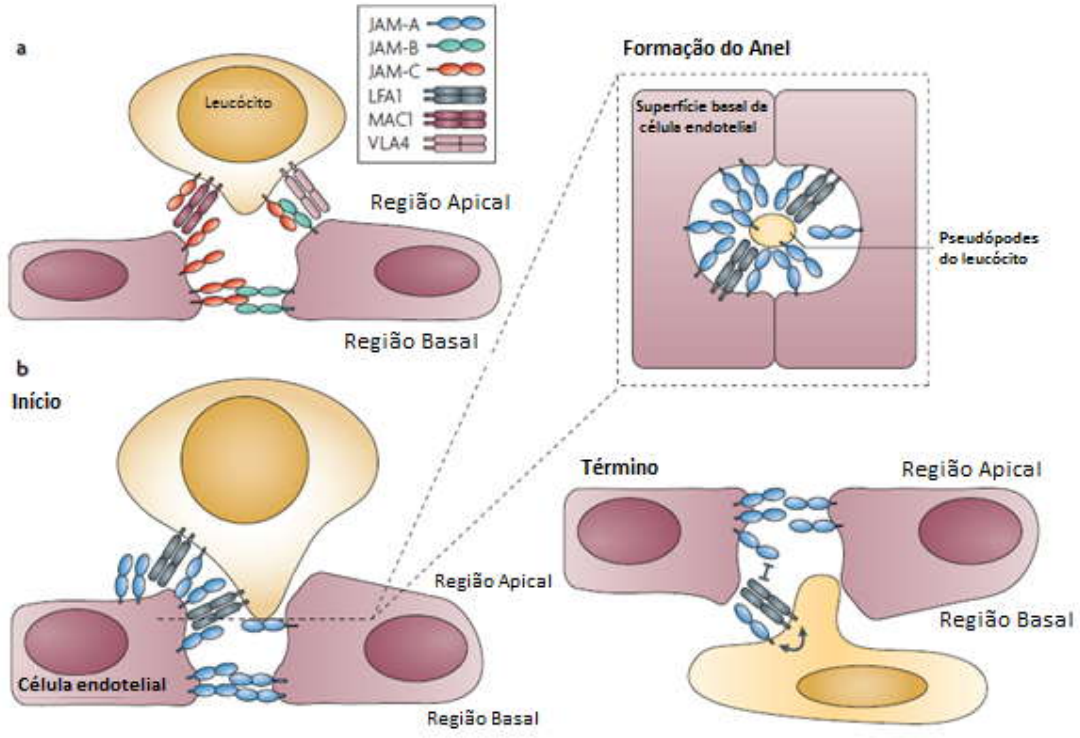

Figura 3 - Transmigração de leucócitos por entre as junções interendoteliais. Adaptado de WEBER *et al.*, 2007.

Em alguns casos, algumas moléculas de adesão podem suprir a deficiência de outra. Mas a deficiência de expressão/ativação de moléculas no decorrer do processo compromete a migração leucocitária e o progredir da reação inflamatória, uma vez que as interações moleculares funcionam como comunicação intercelular e induzem sinalizações intracelulares importantes para o desenvolvimento da inflamação, como por exemplo, a síntese de citocinas (LIEBNER *et al.*, 2006; LUO *et al.*, 2007).

A descrição dos mecanismos envolvidos no recrutamento leucocitário na vigência da resposta inflamatória mostra que eventos celulares e vasculares ocorrem

coordenadamente no sentido de mobilizar/eliminar o agente lesivo. Modificações nestes eventos podem acarretar inibição ou exacerbação do processo inflamatório, e em ambos os casos, há prejuízo ao hospedeiro.

1.6 Estresse Oxidativo

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas continuadamente pelas células como parte de seus processos metabólicos, como por exemplo a cadeia respiratória mitocondrial e durante o *burst* oxidativo. Estas espécies são originadas a partir de adição de elétrons, quebras de ligações duplas, ou ainda pela remoção de hidrogênios de moléculas por outros radicais. São espécies químicas altamente reativas e instáveis. Podem ser classificadas em espécies radicalares que contem um ou mais elétrons não pareados no seu orbital molecular na camada de valência mais externa ou não-radicalares, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxido nítrico ($NO\cdot$) e o radical hidroxila ($OH\cdot$) (DU *et al.*, 1998; MOSSMAN, 2003).

Como supracitado, outra fonte para a produção de EROs é o *burst* oxidativo produzido pela ativação das células do sistema imune, como por exemplo os fagócitos quando reconhecem um agente agressor são ativados e produzem EROs na tentativa de eliminá-lo. Os fagócitos apresentam a NADPH oxidase que é um complexo formado por algumas subunidades que permanecem ancoradas a membrana (p22) e outras citoplasmáticas (p40, p47, p67) No reconhecimento de um estímulo, ocorre a migração das subunidades citoplasmáticas para a membrana e o complexo é formado e se torna cataliticamente ativo. Este sistema é responsável pelo *burst* oxidativo, definido como uma cascata de eventos bioquímicos, rápida e extensa decorrente da ativação fagocítica, levando a formação e liberação maciça de EROs (BABIOR, 1999; BABIOR, 2004; LOPES *et al.*, 2004; SHEPPARD *et al.*, 2005).

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pode causar danos aos sistemas biológicos por promover um estado conhecido como estresse oxidativo. Esta definição refere-se ao estado em que há uma superprodução de agentes oxidantes alcançando níveis que ultrapassam as capacidades antioxidantes dos sistemas biológicos.

Os efeitos deletérios das EROs são causados pela interação destas espécies com componentes celulares como proteínas e lipídios, pode levar a destruição de células por necrose ou apoptose e, ainda, se complexarem com biomoléculas, como por exemplo, o DNA onde há a oxidação suas bases, pela ação do radical hidroxila, formando adutos (RUIZ-RAMOS *et al.*, 2005). Ainda, a interação de EROs com a membrana celular leva à oxidação desta estrutura, causando a peroxidação lipídica (HALLIWELL & CHIRICO, 1993), que leva a perda de fluidez da membrana, com conseqüente comprometimento da permeabilidade de íons como o cálcio, e morte celular (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

Os produtos eletrofílicos gerados pela peroxidação lipídica têm sido associados com a gênese de diversas doenças, como arteriosclerose, câncer e o envelhecimento precoce (ESTERBAUER *et al.*, 1991; DMITRIEV & TITOV, 2010). Dentre os produtos eletrofílicos gerados por este evento, se encontra o malonaldeído (MDA) que faz parte dos agentes alquilantes que, da mesma forma que as EROs, ligam-se a grupos nucleofílicos no DNA e outras biomoléculas, alterando suas funções biológicas (LOUREIRO *et al.*, 2000); AUGUSTO, 2006)

O evento da peroxidação lipídica e a conseqüente formação do MDA é iniciado, principalmente pelo OH·, que retira um átomo de hidrogênio dos ácidos poliinsaturados, com a conseqüente produção de um radical de lipídio (L·). O radical (L·) por sua vez, reage com o oxigênio molecular, formando LOO· (radical peroxila). O LOO· reage com outro acido graxo poliinsaturado qualquer retirando um hidrogênio. O radical LOO· inicia a fase de propagação, já que há formação de um hidroperóxido de lipídio (LOOH) e outro (L·), que reage com oxigênio reiniciando o processo de peroxidação. Na fase final ou terminação, dois radicais L· reagem entre si e formam um não radical (L-L). O LOOH pode sofrer outras reações, com conseqüente produção de alcanos e aldeídos de diferentes tamanhos como, por exemplo, o MDA, como ilustra a figura abaixo (AUGUSTO, 2006; BENTZ, A. B., 2009).

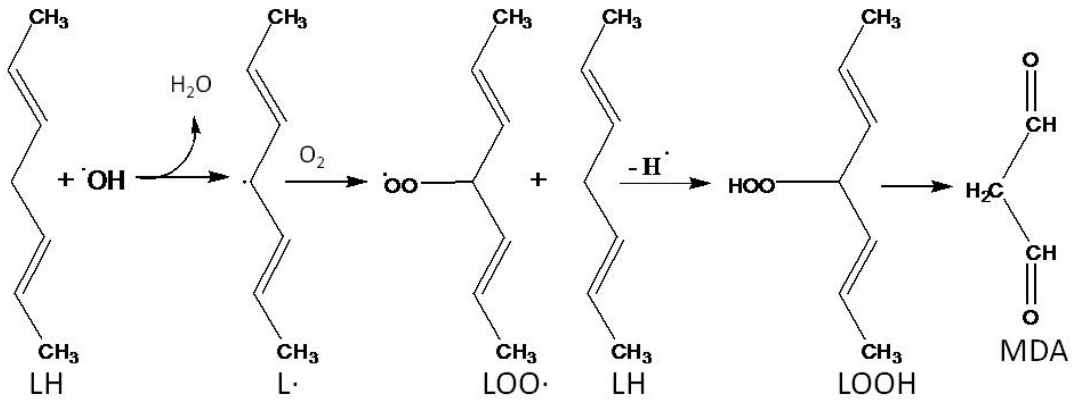

Figura 4 – Peroxidação lipídica e formação de malonaldeído. adaptado de BENTZ, A. B., 2009.

Uma vez que a medida direta de radicais livres *in vivo* é muito complexa, faz-se necessário a quantificação de produtos formados pela reação destas espécies reativas com os componentes celulares, tais como proteínas, DNA e lipídios. Como a peroxidação lipídica culmina com a formação de MDA, este tem sido utilizado como indicador de dano a membranas celulares (MICHEL *et al.*, 2008; DMITRIEV & TITOV, 2010).

Na literatura muitos métodos são descritos para determinação/quantificação de MDA em diferentes amostras biológicas. O método mais conhecido e conseqüentemente mais utilizado é o que leva o acido tiobarbitúrico (TBA) como derivatizante, o qual reage como o MDA formando um complexo facilmente quantificavel através de diversos métodos como espectrofotometria ou fluorimétrica, e ainda utilizando técnicas cromatográficas (MAULIK *et al.*, 1998; MOORE & ROBERTS, 1998; DEL RIO *et al.*, 2005; KUBALA *et al.*, 2009; MONIUSZKO *et al.*, 2011).

1.7 Efeitos deletérios da exposição ocupacional e ambiental à HQ

Como já citado anteriormente, as agências regulamentadoras internacionais como a NIOSH, OSHA, ACGIH, preconizam que um indivíduo pode estar exposto ocupacionalmente a HQ em uma concentração máxima de 2 mg/m^3 durante 8 horas por dia e 40 horas semanais. A literatura mostra que a poeira de indústrias que trabalham com a HQ ou seus precursores apresenta uma concentração elevada de HQ, que variavam de 0,1 a 6 mg/m^3, indicando um risco a saúde deste trabalhador

(PIFER *et al.*, 1995). Outro ponto somatório e agravante da exposição a HQ é a exposição ambiental, visto que este agente fenólico esta presente na composição de uma gama variada de alimentos e também presente no ar de grandes centros urbanos na forma de BZ, precursor da HQ (DECAPRIO, 1999; DUARTE *et al.*, 1999; KHALEQUZZAMAN *et al.*, 2010; WHITWORTH *et al.*, 2011). A união destas fontes de exposição pode traduzir-se em uma cronicidade da exposição, embora sejam a baixas concentrações e a literatura apresenta vários efeitos deletérios aos sistemas biológicos, como câncer e problemas respiratórios, advindos da exposição a este agente fenólico (JIANG, G. F. *et al.*, 2003; VARKONYI *et al.*, 2006; JIANG, G. *et al.*, 2008; MONKS *et al.*, 2011)

Como descrito anteriormente, um efeito bem caracterizado da exposição a HQ é o estresse oxidativo, pois a HQ ao ser metabolizado conjuga-se com a glutationa o que pode levar a HQ a entrar no ciclo redox, o que eleva a produção de EROs (DECAPRIO, 1999; BARRETO *et al.*, 2009; MONKS *et al.*, 2011).

Os efeitos deletérios causados na medula óssea e na produção de células já estão bem descritos pela literatura (DECAPRIO, 1999; MCGREGOR, 2007; HIRABAYASHI & INOUE, 2010), sobre o sistema imune a HQ comporta-se como um imunossupressor e como um agente inflamatório. Trabalhos onde neutrófilos foram incubados *in vitro* com concentrações baixas de HQ, causaram efeitos imunossupressivos. Ensaios *in vivo,* mostraram que a exposição a HQ via intraperitoneal a ratos wistar apresentou efeito, também, imunossupressor, pois quando estes animais foram desafiados com OVA por via respiratória, as células do sistema imune não alcançaram o foco de lesão

2 Objetivo

Dando continuidade aos trabalhos do nosso grupo de pesquisa que investiga o papel da HQ sobre a resposta inflamatória, o presente projeto teve como objetivo caracterizar a exposição subaguda à HQ em camundongos Swiss e investigar os efeitos desta sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado pelo LPS e os mecanismos relacionados.

Metodologia

3.1 Delineamento Experimental

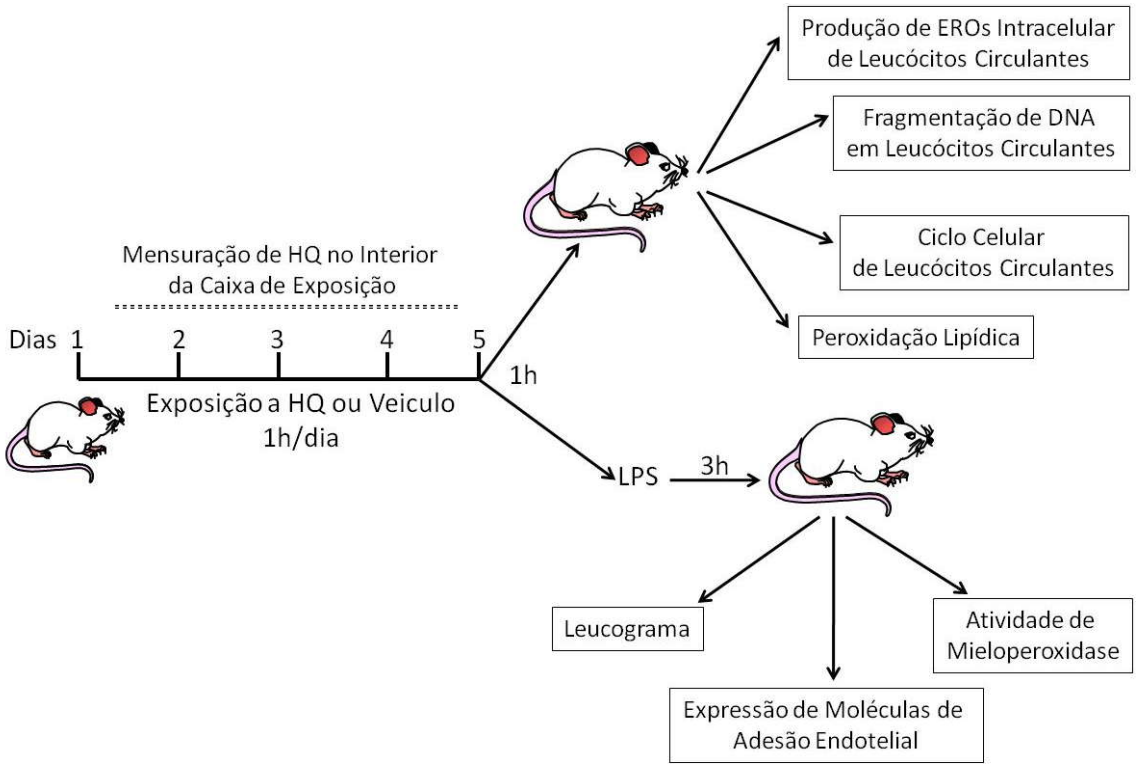

Figura 5 – Esquema do delineamento experimental utilizado durante o desenvolvimento da dissertação.

3.2 Animais

Camundongos Swiss, machos, com peso entre 20-25 g, foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais foram anestesiados pela injeção de cetamina (20 mg/kg; Vetbrands, Jacareí, SP) associada a xilazina (2 mg/kg, i.p.; Vetbrands, Jacareí, SP) antes dos ensaios.

3.3 Exposição à Hidroquinona

O esquema de exposição compreendeu inalação de solução de HQ (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) nas concentrações de 12,5, 25 ou 50 ppm (0,75, 1,5 ou 3,0

mg/ 60 mL), com freqüência de 1 mL/minuto. Animais controles receberam volumes equivalentes do veículo (solução salina a 5% de etanol) pela mesma via. Os grupos HQ e veículo foram expostos durante 5 dias, 1 hora por dia e realizando a indução da inflamação pulmonar 1 hora após a última exposição. Para tanto, 5 animais de cada vez foram acondicionados em caixas acrílicas diferentes (457 x 326 x 280 mm, volume total de 29 L), dotadas de 3 orifícios (Figura 6). Pelo primeiro orifício, as soluções de HQ ou veículo foram nebulizadas utilizando um inalador ultrassônico (marca NS), com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 e 10,0 μm^3 e os outros dois orifícios permitem a saída de gases da caixa de acondicionamento. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão.

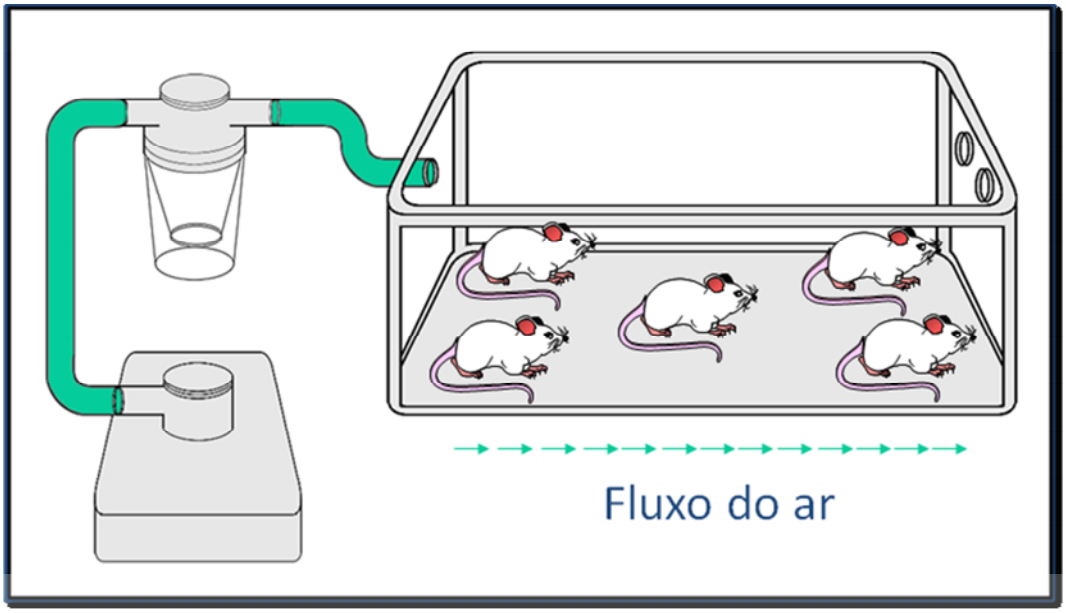

Figura 6 - Esquema de exposição à HQ ou veículo, contendo o nebulizador e a caixa de exposição.

3.4 Saturação de HQ no Interior da Caixa de Exposição

O teste de saturação foi aplicado para avaliar a quantidade de HQ dispersa no ar no interior da caixa de exposição. Para tanto foi utilizado um protocolo adaptado da NIOSH (NIOSH protocolo n° 5004).

O sistema para mensuração da concentração de HQ consistiu de um *cassette* (suporte plástico para o filtro) contendo um filtro de éster celulose (0,8 µm), que foi alocado na porção inferior da caixa. Este *cassette* foi acoplado a uma mangueira de

borracha ligada a uma bomba de amostragem (Figura 7; A. P. BUCK inc., modelo VSS5. Orlando, Fl., USA). O ar no interior da caixa de exposição foi capturado durante uma hora, equivalente ao período em que os animais permaneceram no interior da caixa. O procedimento foi repetido quatro vezes, sendo amostrados 4 filtros.

Após uma hora de captura de ar, o filtro foi removido e imediatamente colocado em um frasco contendo 10 mL de solução de ácido acético glacial (Synth, São Paulo, Brasil) a 1%, ao abrigo da luz, por 24h, como descrito pelo método da NIOSH. Todo procedimento foi executado em colaboração com a FUNDACENTRO. Após o período, os filtros foram retirados dos frascos e submetidos à lavagem por duas vezes com 5 mL de solução de ácido acético glacial 1%. Os volumes obtidos das lavagens dos filtros foram somados aos 10 mL iniciais e completados com acido acético glacial até o volume final de 25 mL. Uma alíquota de 500 µL foi injetada no sistema HPLC/DAD.

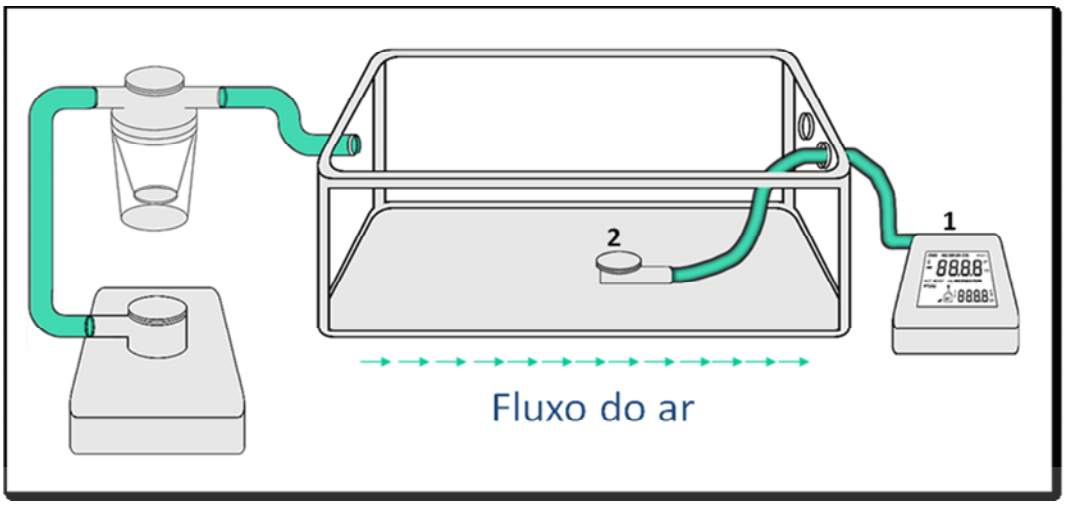

Figura 7 - Esquema de coleta de ar no interior da caixa onde 1 representa a bomba amostradora e 2 representa o *cassette* contendo o filtro de éster celulose.

A análise das amostras foi feita em um sistema de HPLC constituído por um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos DAD-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC), um forno para colunas (CTO-10AS/VP), controlados por um módulo comunicação CBM-20A e o software LC-Solution.

O sistema de eluição utilizado foi constituído de uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA). A eluição foi realizada com

fase móvel de ácido acético glacial 1%, pH 3,2 com 10% de acetonitrila em modo isocrático (tempo de corrida 10 minutos) com fluxo de 1 mL/min. O detector DAD foi fixado em 290 nm para a identificação da HQ.

As curvas de calibração foram construídas a partir de uma solução padrão de HQ obtida nos intervalos de 0,005 a 0,4 µg. As concentrações de HQ retidas em cada filtro foram determinadas a partir da equação da reta gerada pela curva de calibração.

3.5 Indução da Resposta Inflamatória Pulmonar

A indução da inflamação pulmonar foi realizada uma hora após a última inalação das soluções de HQ ou veículo, os animais foram novamente acondicionados em outra caixa, semelhante à utilizada para a inalação do agente fenólico, e uma solução de 100 µg/mL de lipopolissacarídeo de *E.coli* (LPS, sorotipo 026:B6, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) foi nebulizada durante 10 minutos, na freqüência de 1 mL/minuto. Cinco animais foram expostos de cada vez.

3.6 Lavado Broncoalveolar

A coleta do lavado broncoalveolar foi realizada três horas após a indução da resposta inflamatória de acordo com TAVARES DE LIMA *et al.* (1998) e BOZINOVSKI *et al*. (2004). A cavidade peritoneal foi exposta e a exsanguinação realizada pela aorta abdominal. Em seguida, a traquéia foi exposta e canulada com uma cânula de polietileno, onde então foi acoplada uma seringa de 1 mL contendo 500 µl de tampão fosfato salino (PBS). O volume de PBS foi injetado no pulmão, que recebeu uma suave massagem, e aspirado na mesma seringa. O procedimento foi repetido 4 vezes até que o volume final coletado completasse 2 mL.

O LBA então obtido foi centrifugado (10 min, 600 *g*, 4°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 1mL de PBS. A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer. Para a realização da contagem total de células, alíquotas de 10 µL foram diluídas em 190 µL de liquido de Türk (cristal violeta a 0,2% dissolvido em 30% de ácido acético, finalizando uma diluição de 1:20 (v/v)). Para a realização da contagem diferencial alíquotas de 100 µL da suspensão de células foram centrifugadas em uma centrifuga citológica Citospin® (Fanen, SP,

Brasil) a 1.000 rpm por 5 min. As laminas para a contagem diferencial (esfregaço sanguíneo e concentrado de células pelo citospin), foram coradas com o corante Panótico® (Laborclin, PR, Brasil) e a contagem foi realizada diferenciando células mononucleares (MN) e polimorfonucleares (PMN). As contagens foram feitas em microscópio óptico.

3.7 Leucograma

A contagem total e diferencial dos leucócitos circulantes foi realizada a partir do sangue arterial heparinizado, coletado pela aorta abdominal 3 horas após a inalação do LPS. A contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com corante Panótico® em microscópio óptico.

3.8 Atividade da Mieloperoxidase

Três horas após a inalação do LPS, os animais foram anestesiados e submetidos à laparotomia mediana e exsanguinados pela aorta abdominal. Subseqüentemente a traqueia foi exposta e canulada com cânula de polietileno e o pulmão foi imediatamente perfundido com PBS para a remoção de sangue. Após a lavagem o pulmão foi removido completamente. O tecido pulmonar livre de sangue foi submerso em hexano (Synth, São Paulo, Brasil) envolto em gelo seco para imediato congelamento e então armazenado a -80 ^{o}C até o momento de uso.

No momento do ensaio, as amostras foram pesadas e imersas em brometo de hexadeciltrimetilamonio (HTAB 0,5%, 1 mL/50mg de tecido) e em seguida homogeneizadas por período de 30 segundos em Polytron® (Brinckman). Os homogenatos resultantes foram levados a estufa a 60°C por 2 horas para inativação da catalase. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 2 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de MPO. Para tanto, foram acrescentados 10 µL do sobrenadante a 200 µL da solução reagente (o-dianisidina, H_2O_2 a 0,0005%, em tampão fosfato 5 mM, pH 6,0) em uma microplaca. As amostras foram levadas ao espectrofotômetro (Spectra Max Plus® – Molecular Devices, Chicago, IL, USA) para a monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina, através do registro do aumento da absorbância da mistura a 460 nm.

3.9 Citometria de Fluxo

Os leucócitos foram isolados do sangue coletado da aorta abdominal para quantificar a expressão de L-selectina, β_2-integrina, β_3-integrina e PECAM-1 por citometria de fluxo.

Inicialmente os eritrócitos foram lisados com solução de lise (NH_4Cl_2 0,13 M). A solução foi centrifugada (10 min, 4ºC, 600 *g*), o sobrenadante foi descartado e os leucócitos recuperados com solução salina balanceada de Hank's (HBSS). Os leucócitos (1 x 10^5) foram incubados na ausência ou presença de fMLP (*formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*) (10^{-8} M, 1 hora, 37 ^oC). Após este período, as células foram lavadas com HBSS e incubadas com os anticorpos monoclonais anti-L-selectina (anti-CD62L, BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-PECAM-1 (anti-CD31, BD Pharmingen, CA, USA) conjugados ao PE, e anti-β_2-integrina (anti-CD18, BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-β_3-integrina (anti-CD61, BD Pharmingen, CA, USA) conjugados ao FITC por 20 minutos a 4 ^oC na ausência de luz.

Em seguida, as células foram fixadas pela adição de p-formaldeído 2% e, em momento oportuno foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur, Beckton & Dickinson – San Jose, CA, USA). Aproximadamente 10.000 células foram obtidas e somente leucócitos mono e polimorfonucleares viáveis foram analisados.

3.10 Extração de DNA Tecido Pulmonar

Para a extração de DNA de tecido pulmonar foi empregado a metodologia fornecida pelo fabricante do kit de extração de DNA (QIAGEN, Maryland, USA).

Inicialmente, 10 mg do tecido pulmonar foram macerados com PBS para a obtenção de um homogenato. O homogenato obtido foi transferido para um tubo contendo 300 µL de solução de lise celular e levado a agitação em vórtex. Em seguida, 1,5 µL de proteinase K (2 mg/mL) foi adicionada ao homogenato e incubado *overnight* a temperatura ambiente. Após o período de incubação, 1,5 µL de RNAse A foi adicionado ao homogenato e o tudo foi invertido 25 vezes para homogeneizar a solução, que foi novamente incubada por uma hora a 37 °C.

Após a incubação, foram adicionados 100 µL da solução de precipitação de proteína e homogeneizada em vórtex, por 20 segundos. A amostra foi centrifugada

(16.000 *g*/10 min/37 °C) e o sobrenadante obtido foi dispensado sobre 300 µL de isopropanol a 4°C para precipitação do DNA. A amostra foi novamente centrifugada (16.000 *g*/5 min/37 °C), e o *pellet* de DNA foi lavado com 300 µL solução de etanol 70% gelada. As amostras de DNA foram mantidas em temperatura ambiente por 15 minutos para secagem. O *pellet* de DNA foi ressuspendido em 100 µL de desferroxamina (0,1mM), homogeneizado em vórtex e armazenado a -20°C até o momento da hidrólise enzimática.

3.11 Hidrólise Enzimática do DNA

A hidrólise enzimática do DNA foi empregada para o isolamento dos nucleosídeos e subseqüente análise por HPLC/ESI-MS/MS-MRM da formação dos adutos 8-hidroxi-2-deoxiguanosina, 1,N^2-eteno-2′-deoxiguanosina e 1,N^6-eteno-2′-deoxiadenosina fruto de suas oxidações.

Para a reação de hidrolise foram adicionados em um tubo 54 µL de desferroxamina (0,1mM), 5 µL de tampão Tris-HCl/$MgCl_2$ 200mM (pH 7,4), 2,5 µL de desoxirribonuclease A (DNAse 10 unidades, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), 1,7 µL de um mistura de padrões internos marcados [$^{15}N_5$]8-oxodGuo (1000 fmol, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) e [$^{15}N_5$]1,N^2-propanodGuo (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO) e 50 µg de DNA isolado, a amostra foi incubada durante uma hora a 37 °C, sob agitação de 1000 rpm.

Após a incubação a amostra recebeu 1,5 µL da enzima fosfotidilesterase (PDE1, 0,004 unidades, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), 1,7 µL da enzima fosfatase alcalina (10 unidades, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO), o volume final da amostra foi acertado para 75 µL com água deionizada e levada novamente a incubação sob as mesmas condições (1h, 37 °C, 1000 rpm).

Ao término da segunda incubação, o volume final foi transferido para um *vial* de vidro; 20 µL do DNA hidrolisado foram injetados no sistema analítico.

3.12 Análises Cromatográficas dos Níveis de 8-oxodGuo, e 1,N^2-propanodGuo por HPLC/ESI-MS/MS-MRM

Para determinação dos adutos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), e 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina (1,N^2-propanodGuo), que são descritos na literatura como indicativos de dano oxidativo ao DNA, foram conduzidas análises cromatográficas em colaboração com o grupo da profª. Dra Ana Paula de Melo Loureiro. Para tanto, amostras de DNA hidrolisado enzimaticamente foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance com ionização eletro-spray acoplado ao espectrômetro de massas com monitoramento de reações múltiplas (HPLC/ESI-MS/MS-MRM).

O sistema de análise foi constituído de um HPLC da Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com um injetor automático (SIL-10AD/VP), um injetor Rheodyne (Cotati, CA), uma válvula automática de comutação de fluxo (FCV-12AH), duas bombas (Class LC 10AD) e um detector de absorbância SPD-10AV/VP, controlados por um módulo de comunicação (SCL-10A/VP-CBM 10A), integrado a um espectrômetro de massas Quattro II (Micromass, Manchester, Reino Unido). Parâmetros de ESI-MS foram executados em modo positivo, a otimização dos parâmetros analíticos foi realizada conforme o descrito por LOUREIRO *et al.*, 2002. As análises foram conduzidas pela detecção por monitoramento de reação múltipla (MRM) utilizando-se as seguintes fragmentações: *m*/*z* 284 (MH^+) $\rightarrow$ *m*/*z* 168 (MH^+-2'-desoxirribose+H) para a detecção de 8-oxodGuo, e *m*/*z* 338 (MH^+) $\rightarrow$ *m*/*z* 222 (MH^+-2'-desoxirribose+H) 1,N^2-propanodGuo. O detector de arranjo de diodos foi fixado em 260 nm para a quantificação da 2'-desoxiguanosina (dGuo) e da 2'-desoxiadenosina (dAdo). Curvas de calibração foram feitas para a quantificação dos adutos nos intervalos de 0 a 125 fmol, corrigidas pelos padrões internos [$^{15}N_5$]8-oxodGuo (1000 fmol), e [$^{15}N_5$]1,N^2-propanodGuo. Para a quantificação dos desoxinucleósideos foram feitas curvas nos intervalos de 0 a 15 nmol de dGuo. A fração molar de adutos/ desoxinucleosídeos presente em cada amostra de DNA foi então determinada. Os dados foram processados utilizando o software MassLynx (Micromass). Foi utilizada a seguinte condição cromatográfica: Uma Coluna Kinetex C18 (2) (150 mm x 3.0 mm id, 2.6 µm, (Phenomenex, Torrance, CA) foi eluída com um gradiente de ácido fórmico 0,1% em água e acetonitrila (ACN), com um fluxo de 180 µL/min a 30ºC nas seguintes condições: 0 – 10 min 1% ACN; 10 - 11 min 1 - 3%

ACN; 11 – 16 min 3% ACN; 16 – 17 min 3 – 6% ACN, 17- 25 min 6% ACN, 25 – 35 min de 6 – 30% ACN; 35 – 45 min 30% ACN; 45 – 50 min 30 – 1% ACN e 50 – 65 min 1% ACN. A válvula automática de comutação de fluxo foi mantida aberta para a fonte de ESI nos seguintes intervalos: 13 – 15 min e 22 – 30 min. Todos os solventes utilizados foram previamente filtrados (membrana de acetato de celulose 0,2 µM - Millipore) e desgaseificados.

3.13 Quantificação dos Níveis de Malonaldeído em Plasma

Com o objetivo de verificar a capacidade da HQ em induzir a peroxidação lipídica, foi realizada a quantificação de malonaldeído (MDA) no plasma. Para tanto, 250 µL do plasma de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm ou ao veículo foram transferidos para um tubo de 2 mL. Subseqüentemente, foram adicionados 36 µL de solução de hidroxitolueno butilado (BHT) a 0,2% e 12,5 µL NaOH 10 M. A mistura foi incubada a 60 °C por 30 min. sob agitação. Após a incubação, foram adicionados 1500 µL de acido tricloroacético (TCA) a 7,2% e 1% de iodeto de potássio sobre a amostra que foi, posteriormente, levada a vórtex e ao banho de gelo por 10 min. Em seguida, a solução foi centrifugada (3300 rpm/ 10min.). O sobrenadante foi coletado e transferido para um tudo de 2 mL com rosca, e 500 µL de acido tiobarbitúrico (TBA) a 0,6% foram adicionados e, novamente, a amostra foi levada ao vórtex e à incubação a 90 °C por 45 min sob agitação. Após este período, a amostra recebeu 250 µL de *n*-butanol, sob agitação em vórtex e, posteriormente, à centrifugação (6000 rpm/5 min.). Ao fim da centrifugação, 60 µL da fase contendo o *n*-butanol foi transferida para um *vial* e injetada no HPLC/DAD.

A análise das amostras foi feita em um sistema de HPLC constituído por um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de diodos DAD-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC), um forno para colunas (CTO-10AS/VP) controlados por um módulo comunicação CBM-20A e o software LC-Solution. O sistema de eluição utilizado foi constituído de uma coluna Luna C18 (2) 250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm (Phenomenex, Torrance, CA). A eluição foi realizada com fase móvel de tampão fosfato de potássio 50 mM – pH 7,0; com 35% de metanol em modo isocrático (tempo de corrida 37 minutos) com fluxo de 1 mL/min. O detector DAD foi fixado em 532 nm para a identificação do MDA.

Curvas de calibração foram construídas a partir de uma solução padrão de 1,1,3,3-tetramethoxypropane (Sigma-Aldrich, MO, USA) obtida nos intervalos de 0,5 a 5 μM. As concentrações de MDA obtidas no plasma foram determinadas a partir da equação da reta gerada pela curva de calibração.

3.14 Quantificação do *burst* oxidativo em neutrófilos por citometria de fluxo

Com o objetivo de mensurar a produção intracelular de EROS em leucócito circulantes, foi utilizado o $DCFH_2$-DA um composto que ao ser oxidado por EROs intracelular gera o DCF um composto altamente fluorescente que pode ser detectado por citometria de fluxo.

A reação para a identificação da produção de EROs intracelular baseia-se na conversão de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato ($DCFH_2$-DA) para 2'-7'diclorofluoresceína (DCF), ocorrendo da seguinte maneira: a forma diacetato do $DCFH_2$-DA e seu acetometil éster $DCFH_2$DA-AM são absorvidos pelas células onde as esterases não específicas vão quebrá-los em grupos lipofílicos, resultando em um composto diferente do inicial que permanece aderido no interior da célula. A oxidação de DCFH pelo EROs converte a molécula inicial para 2', 7' diclorofluoresceina (DCF), que é altamente fluorescente, como ilustra a Figura 8. A nova molécula apresenta os comprimentos de onda de $\lambda_{exc.}$= 485 nm, $\lambda_{em.}$= 528 nm (HELD, P. 2010)

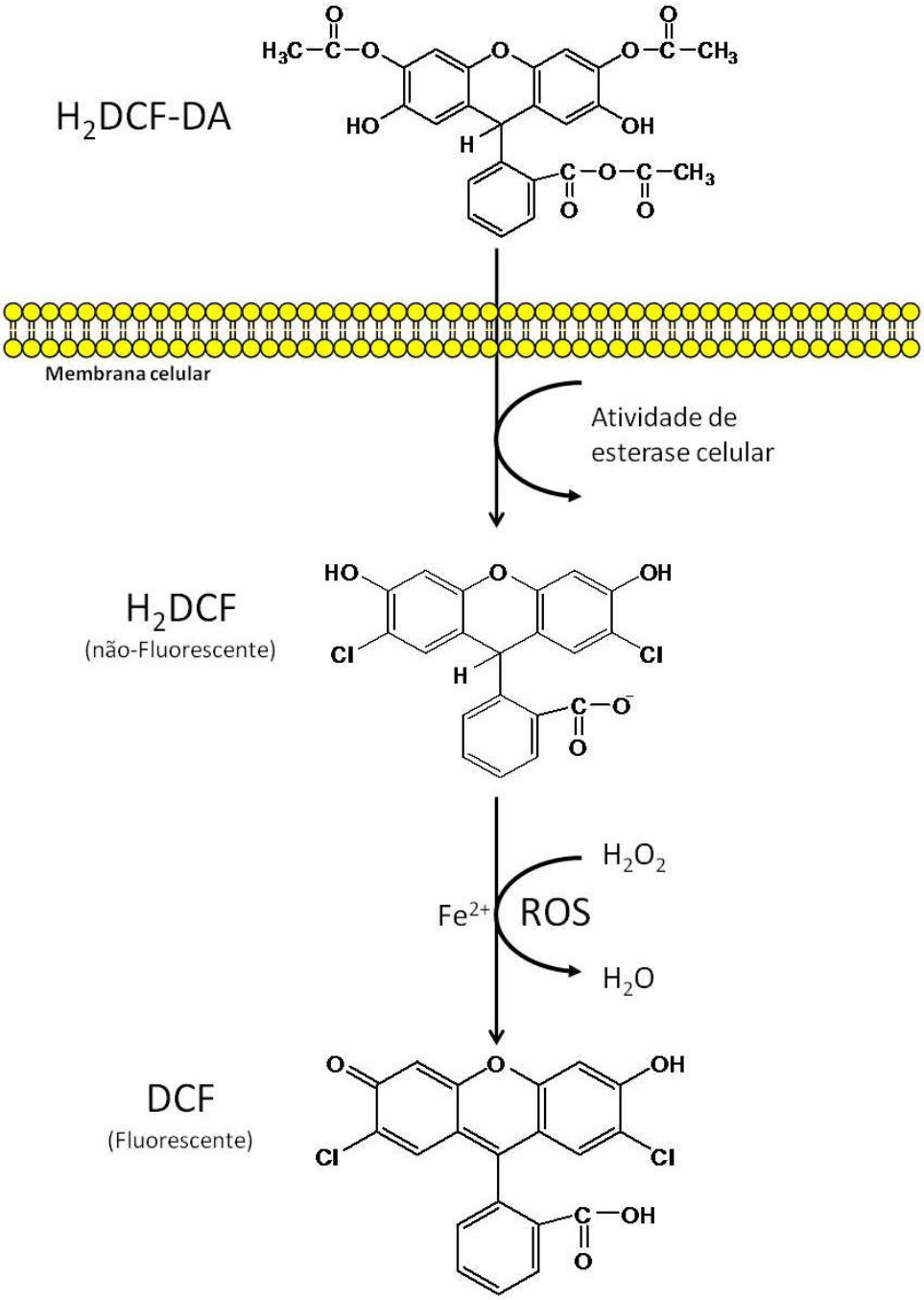

Figura 8 – Modelo esquemático da conversão de 2'-7' diclorodihidrofluoresceína-diacetato acetometil ($DCFH_2$-DA-AM), composto não fluorescente, para 2'-7' diclorofluoresceína, composto altamente fluorescente. Adaptado de HELD, P. 2010.

Para tanto, leucócitos obtidos do sangue coletado da artéria aorta abdominal de animais expostos à HQ ou ao veículo foram utilizados para a quantificação da geração de EROs intracelular. Inicialmente, os eritrócitos foram lisados com solução

de lise (NH_4Cl_2 0,13 M). A solução foi centrifugada (10 min, 4ºC, 600 *g*), o sobrenadante foi descartado e os leucócitos recuperados em PBS. Em um tubo de citometria foram transferidos 2 x 10^5 células e adicionados 300 µL com PBS. As amostras foram centrifugadas (600 g/ 10 min/ 4°C), o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 200 µL de 2',7'-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA, 3 mM). O volume final das amostras foi completado para 1100 µL com PBS. Os leucócitos foram incubados a 37 °C por 30 minutos e ao fim da incubação, 2 mL de EDTA (3 mM) a 4°C foram adicionados. As soluções foram centrifugadas (600 g/ 10 min/ 4°C), os sobrenadantes descartados e os *pellets* ressuspensos em 100 µL de PBS.

As amostras foram estimuladas ou não com fMLP (10^{-6}M) por 1 ou 5 minutos e analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur, Beckton & Dickinson – San Jose, CA, USA). Aproximadamente 10.000 células foram obtidas e somente leucócitos morfologicamente viáveis foram analisados

3.15 Imunohistoquímica

O ensaio de imunohistoquímica foi realizado para a avaliação da expressão das moléculas de adesão PECAM-1, ICAM-1, VCAM-1, E- e P-selectina, E e VE-caderina e JAM-C no endotélio vascular pulmonar. Para tanto, os animais foram anestesiados e três horas após a inalação do LPS, a cavidade peritoneal foi aberta para sangramento pela aorta abdominal. Os pulmões foram rapidamente removidos e insuflados com meio de suporte para congelamento de tecidos (meio de inclusão para tecidos OCT, Tissue Tek™; Miles, IN, USA) diluído em PBS na proporção de 2 para 1. Regiões dos lobos direito e esquerdo dos pulmões foram seccionadas e congeladas em hexano à baixa temperatura, envolto em gelo seco para imediato congelamento. Após o congelamento, os tecidos foram cortados em criostato a -25 ºC (Leica Microsystems, São Paulo, Brasil) na espessura de 10 µm e depositados em lâminas previamente silanizadas. As laminas contendo os tecidos foram imersas em acetona gelada para fixação por 10 min a -25 ºC. Em seguida, as laminas foram armazenadas em freezer (-20 ºC) até o momento do ensaio.

Para os ensaios de imunofluorescência, as laminas contendo os cortes foram incubadas com solução de bloqueio (Solução de Pierce) para sítios inespecíficos por

24 horas em atmosfera úmida a 4 ºC. Após este período, os tecidos foram incubados com anticorpos monoclonais anti-E-selectina (BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-PECAM-1(BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-ICAM-1 (BD Pharmingen, CA, USA) conjugados a PE ou anti-VCAM-1 (BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-P-selectina (BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-E-cadarina (BD Pharmingen, CA, USA) ou anti-VE-caderina (BD Pharmingen, CA, USA) ou JAM-C (RD Systems, MN, USA) conjugados ao FITC, "*overnight*" em câmara úmida, 4°C. A intensidade de fluorescência foi quantificada em Software analisador de imagens (Axio Vision versão 4.8, Carl Zeiss do Brasil) acoplado a microscópio de fluorescência (Axioplan2, Carl Zeiss do Brasil). Para eliminar o *background*, os mesmos procedimentos foram realizados em secções de pulmões na ausência de anticorpos.

3.16 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média ± e.p.m e foram analisados estatisticamente pelo Teste "t" de Student. Foi utilizado o programa de analises estatísticas *GraphPad Prisma (versão 5.00)* e os valores obtidos foram considerados significativos quando $P<0,05$.

Resultados

4.1 Determinação das Concentrações de HQ no Interior da Caixa de Exposição

4.1.1Confecção da Curva de Calibração

Para quantificar a concentração real de HQ presente no interior da caixa de exposição, amostras de ar foram coletadas conforme descrito no item 3.4 da metodologia e a concentração de HQ foi determinada por HPLC. Estes ensaios foram inicialmente padronizados no laboratório de Marcadores Moleculares de Exposições a Xenobióticos em colaboração com a Profª. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro (FCF-USP).

Para a obtenção dos dados analíticos, foi preparada uma curva de calibração a partir de concentrações conhecidas de HQ nos intervalos de 0,005 a 0,4 μg. Os dados referentes às concentrações e áreas obtidas para a curva de calibração estão descritos na figura abaixo.

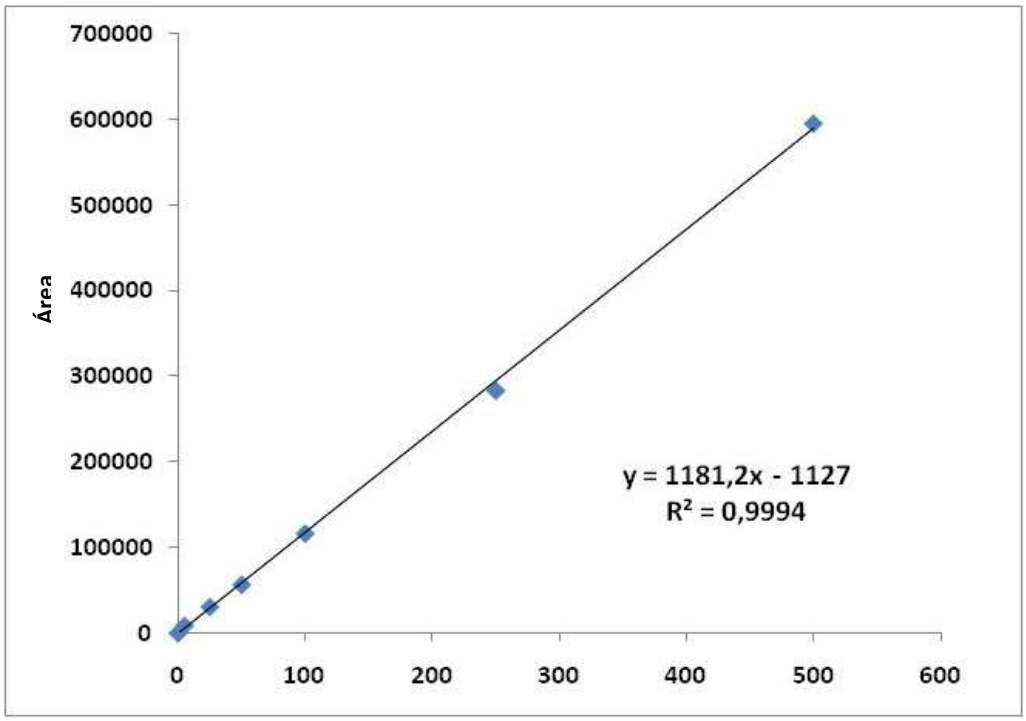

Figura 9 - Curva obtida através da analise da área dos picos do padrão de HQ injetado no HPLC na concentração de 0,005 a 0,4 μg

4.1.2 Determinação das Concentrações de HQ

Nos cromatogramas obtidos na análise por HPLC foram analisadas as áreas referentes ao pico que apresentou um espectro com o máximo de absorbância em 290 nm, correspondente à absorbância da HQ. A partir do valor resultante das áreas dos picos destas corridas, foi obtida a média de cada filtro. Tais valores foram então aplicados na equação da reta, gerada pela curva de calibração, para se obter a concentração de HQ em cada filtro. A Figura 10 ilustra uma corrida cromatográfica (1) e o espectro de absorção (2) de uma das amostras, na qual pode-se observar o tempo de retenção da HQ (6 min.). O pico com preenchimento representa a HQ no espectro de absorção de 290 nm

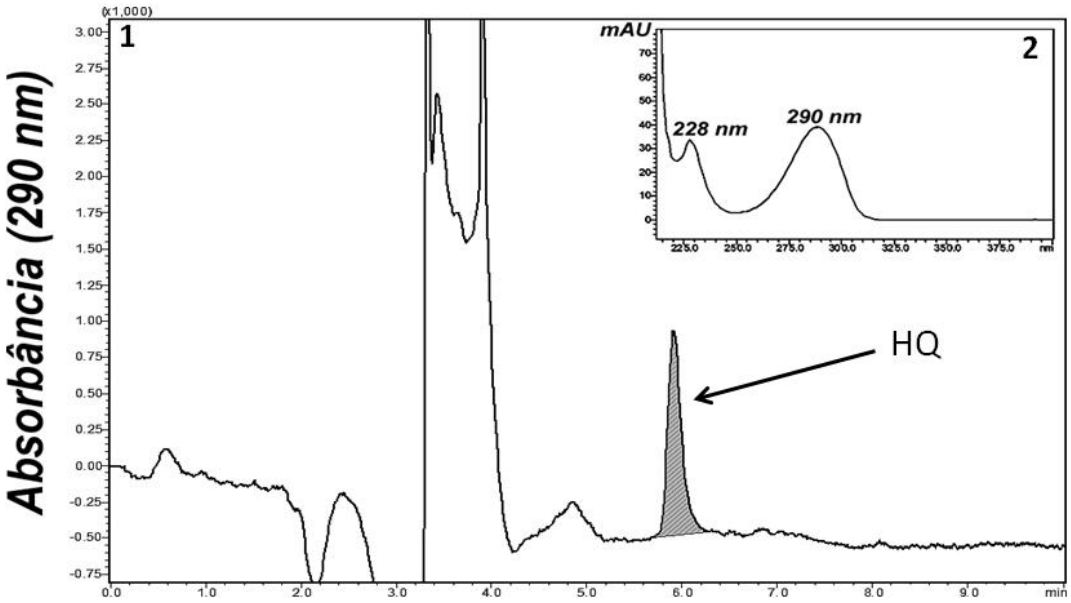

Figura 10 - (1) Cromatograma obtido por HPLC-DAD. O pico identificado é referente a detecção de HQ em 290nm, nas amostras de ar. (2) Espectro de máxima absorção de HQ em 290nm.

As quantificações das concentrações de HQ no interior da caixa de exposição foram realizadas apenas para a caixa onde os animais foram expostos a 25 ppm de HQ. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de HQ dispersa no interior da caixa foi 10 vezes menor do que a concentração permitida por agencias regulamentadoras, uma vez que 0,20 mg/m^3 foi detectado disperso no interior da caixa e equivale a aproximadamente 0,04 ppm. O calculo da conversão de unidades mg/m^3 para ppm foi realizado no site da NIOSH. (http://www.cdc.gov/niosh/docs/2004-101/calc.htm).

Dispersa no ar	Retido no filtro
0,20 mg/m^3	1,59 µg
± 0,09	± 0,26

Tabela 1 – Teste de saturação de Hidroquinona no interior da caixa de exposição.

4.2 Efeito das Exposições com 12,5, 25 ou 50 ppm de HQ Sobre Número de Células no Sangue Circulante

Os resultados obtidos mostraram que animais expostos a 12,5, 25 ou 50 ppm de HQ não apresentaram alterações no número de leucócitos circulantes. As Figuras 11, 12 e 13 representam as contagens total e diferencial de leucócitos circulantes de animais expostos a 12,5, 25 ou 50 ppm 3 horas após a inalação do LPS, respectivamente. Vale ressaltar que somente a exposição à HQ em condições basais não afetou a celularidade na circulação (HQ 50 ppm = 3483±535,71/mm^3 (n=6); Controle=3560 ± 329,55/mm^3 (n=5)).

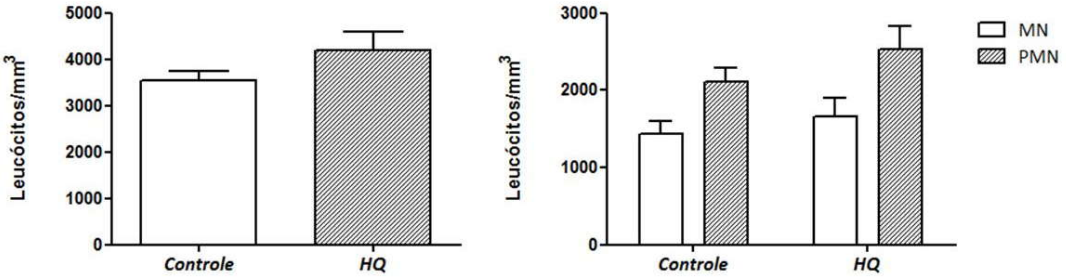

Figura 11 - Efeito da exposição à HQ sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante. Animais foram expostos a 12.5 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol) e no último dia, uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos no sangue circulante foi quantificado em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no sangue circulante de animais expostos à HQ na concentração de 12.5 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da media (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo.

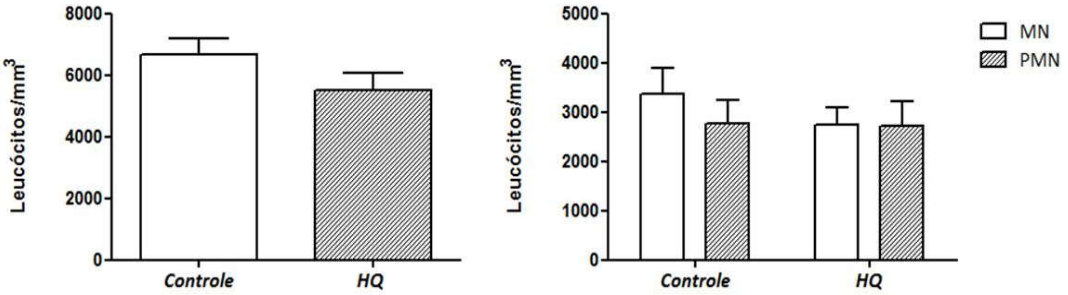

Figura 12 - Efeito da exposição à HQ sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante. Animais foram expostos a 25 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol) e no último dia, uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos no sangue circulante foi quantificado em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no sangue circulante de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da media (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo.

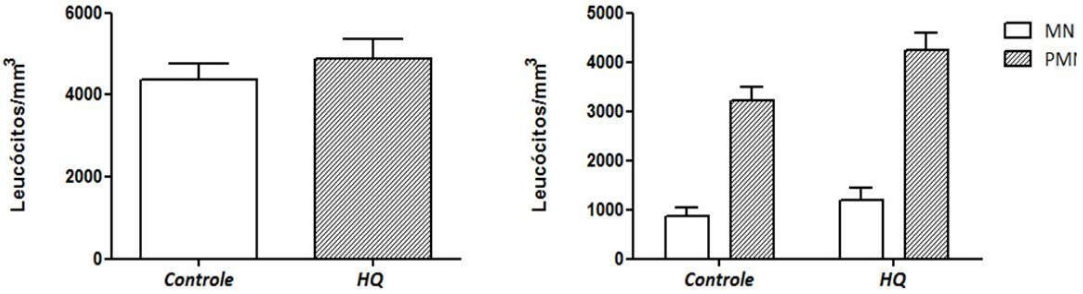

Figura 13 - Efeito da exposição à HQ sobre o número de leucócitos total e diferencial no sangue circulante. Animais foram expostos a 50 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol) e no último dia, uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos no sangue circulante foi quantificado em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no sangue circulante de animais expostos à HQ na concentração de 50 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da media (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo.

4.3 Efeito das Exposições com 12,5, 25 ou 50 ppm HQ Sobre a Migração de Leucócitos para o Pulmão Induzida pelo LPS

Os efeitos das exposições à HQ sobre a migração de leucócitos para o pulmão induzida pelo LPS foram investigados. Os resultados obtidos mostraram que animais expostos a 12,5, 25 ou 50 ppm de HQ apresentaram prejuízo na migração de leucócitos para o pulmão inflamado. O menor número de leucócitos no pulmão após a inalação do LPS foi decorrente da menor migração tanto de leucócitos PMN quanto de MN (Figuras 14, 15 e 16).

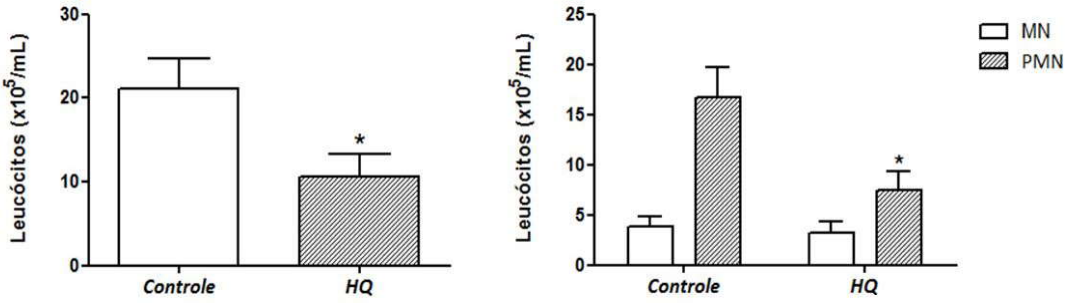

Figura 14 - Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória. Animais foram expostos a 12.5 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol), uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos migrados para pulmão foi quantificado no LBA em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no LBA de animais expostos à HQ na concentração de 12.5 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo. *P<0.05 vs. Respectivo controle.

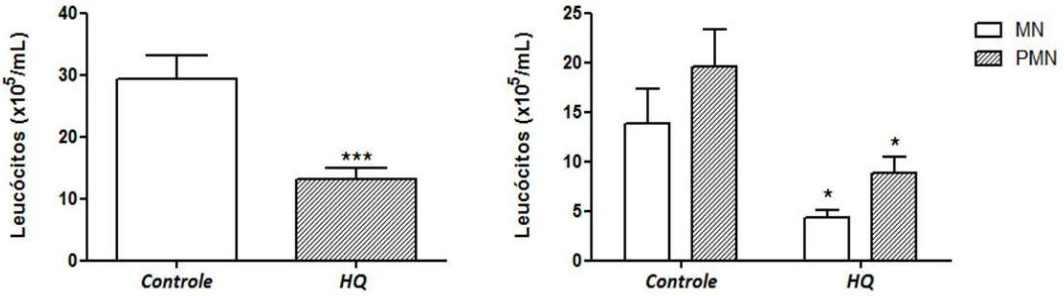

Figura 15 - Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória. Animais foram expostos a 25 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol), uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos migrados para pulmão foi quantificado no LBA em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no LBA de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo. *P<0.05 e *** P<0.0001 vs. Respectivo controle.

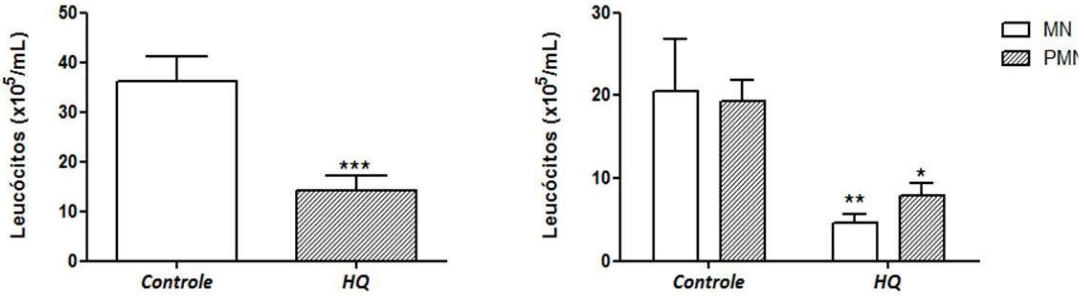

Figura 16 - Efeito da exposição à HQ sobre a mobilização de leucócitos para o pulmão 3 horas após a indução da resposta inflamatória. Animais foram expostos a 50 ppm de HQ (1h/dia; 5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol), uma hora após a última a exposição os animais foram expostos ao LPS (0,1 mg/mL; 10 min). O número de leucócitos migrados para pulmão foi quantificado no LBA em câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada em esfregaços corados com Panótico®. As figuras acima representam as contagens total e diferencial dos leucócitos no LBA de animais expostos à HQ na concentração de 50 ppm, respectivamente. Os resultados expressam a média ± erro padrão da média (e.p.m.) de células obtidas de 10 - 15 animais por grupo. *P<0.05; **P<0.01; *** P<0.0001 vs. Respectivo controle.

4.4 Efeito da Exposição a 25 ppm Sobre a Atividade de MPO no Tecido Pulmonar

A atividade da MPO foi mensurada para a avaliação da presença de neutrófilos no tecido pulmonar. Animais expostos a 25 ppm de HQ apresentaram atividade de MPO maior que animais tratados com o veículo 3 horas após a administração de LPS por via inalatória (Figura 17).

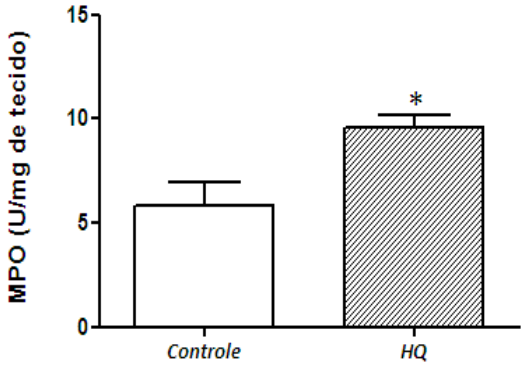

Figura 17 - Efeito da exposição à HQ sobre a atividade da mieloperoxidase em tecido pulmonar. Atividade a MPO mensurada em sobrenadante de homogenatos pulmonar obtido de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm ou veículo (salina com 5% de etanol) (1h/dia durante 5 dias) e ao LPS (0,1 mg/mL por 10 minutos).O tecido pulmonar foi homogeneizado em *Politron*® e sobrenadante foi utilizado para mensurar a absorbância para verificar a velocidade de formação dos produtos de oxidação da o-dianisidina. Os ensaios foram realizados em duplicatas.*P<0.05.

4.5 Efeito da Exposição a 25 ppm de HQ Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão por Leucócitos Circulantes

Os efeitos da exposição à HQ sobre as expressões de L-Selectina, β_2-Integrina, β_3-integrina e PECAM-1 na membrana de leucócitos estimulados ou não pelo fMLP foram investigados por ensaios de citometria de fluxo.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ não modificou a expressão basal de L-selectina em leucócitos PMN. Na vigência de estimulação pelo fMLP, in *vitro*, PMN provenientes de animais normais apresentaram níveis maiores de L-selectina na membrana, o que não foi observado em PMN de animais obtidos de animais expostos à HQ. As expressões de L-selectina em condições basais ou

após a estimulação pelo fMLP foram equivalentes em ambos os grupos de animais estudados (Figura 18).

A análise da expressão de β_2-integrina nos leucócitos PMN mostrou que células de animais expostos à HQ apresentaram aumento na expressão da molécula em condições basais ou estimuladas pelo fMLP. O fMLP *per se* não foi capaz de induzir a expressão de β_2-integrina na membrana de PMN obtidos de animais controles. Leucócitos MN obtidos de animais expostos à HQ, estimulados ou não com fMLP, não apresentaram alterações na expressão de β_2-integrina em relação ao seu controle (Figura 19).

A determinação da expressão de β_3-integrina na membrana de leucócitos circulantes mostrou que células PMN obtidas de animais expostos à HQ apresentaram maiores concentrações da molécula em condições basais em relação às células obtidas de animais controles. A incubação de PMN de animais controles com fMLP aumentou a expressão da molécula, o que não foi detectado em células provenientes de animais expostos à HQ. A expressão de β_3-integrina foi equivalente na membrana de leucócitos MN obtidos de animais controles ou expostos à HQ e estimulados ou não pelo fMLP (Figura 20).

Os dados apresentados na Figura 21 mostram que PMN obtidos de animais expostos à HQ apresentaram aumento na expressão basal de PECAM-1. No entanto, na vigência de incubação *in vitro* com fMLP a expressão não foi aumentada. Diferentemente, em PMN de animais controles observou-se aumento na expressão de PECAM-1 após a incubação com fMLP. As expressões de PECAM-1 em MN não diferiram entre os grupos de animais estudados (Figura 21).

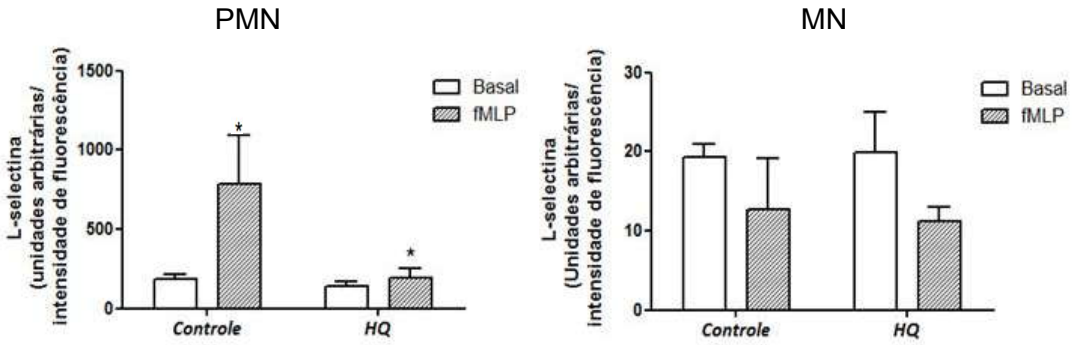

Figura 18 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão de L-selectina em leucócitos PMN e MN. Expressão da molécula de adesão L-selectina em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ 25 ppm (1h/dia por 5 dias) ou veículo (salina 5% de etanol). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado da artéria aorta abdominal e estimulados *in vitro* ou não com fMLP. A expressão de L-selectina foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas.*P<0.05 vs. respectivo controle.

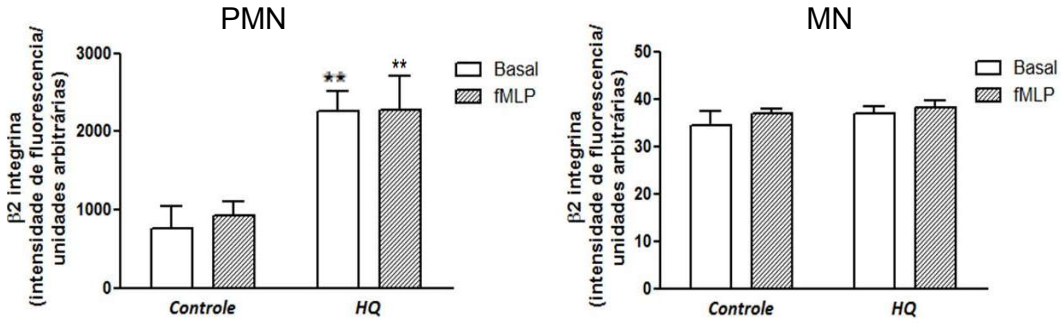

Figura 19 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão de β_2-integrina em leucócitos PMN e MN. Expressão da molécula de adesão β_2-integrina em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ 25 ppm (1h/dia por 5 dias) ou veículo (salina 5% de etanol). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado da artéria aorta abdominal e estimulados *in vitro* ou não com fMLP. A expressão de β_2-integrina foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. **P<0.01 vs. respectivo controle.

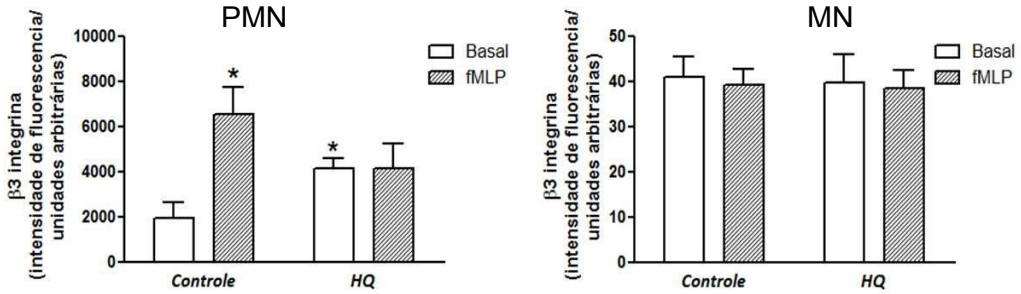

Figura 20 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão de β_3-integrina em leucócitos PMN e MN. Expressão da molécula de adesão β_3-integrina em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ 25 ppm (1h/dia por 5 dias) ou veículo (salina 5% de etanol). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado da artéria aorta abdominal e estimulados *in vitro* ou não com fMLP. A expressão de β_3-integrina foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *P<0.05 vs. respectivo controle.

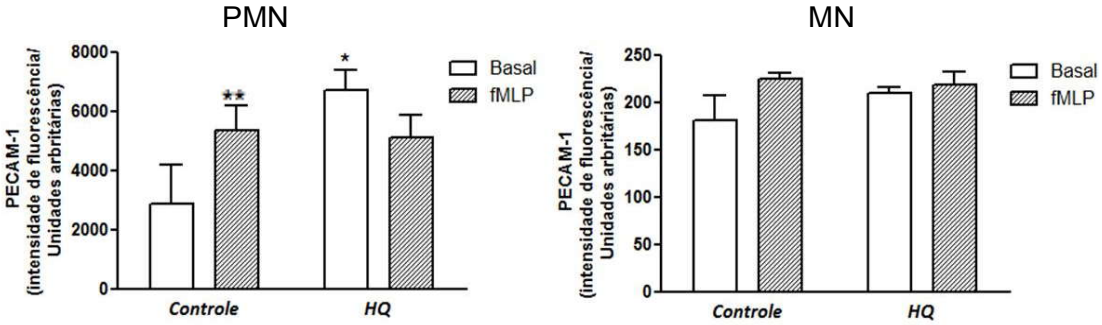

Figura 21 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão de PECAM-1 em leucócitos PMN e MN. Expressão da molécula de adesão PECAM-1 em leucócitos circulantes de animais expostos à HQ 25 ppm (1h/dia por 5 dias) ou veículo (salina 5% de etanol). Os leucócitos foram obtidos de amostras de sangue coletado da artéria aorta abdominal e estimulados *in vitro* ou não com fMLP. A expressão de PECAM-1 foi quantificada por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 6 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *P<0.05; **P<0.01 vs. respectivo controle.

4.6 Efeito da Exposição a 25 ppm de HQ Sobre a Expressão de Moléculas de Adesão no Endotélio Vascular Pulmonar

Os efeitos da exposição *in vivo* a HQ sobre a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas PECAM-1, VCAM-1, ICAM-1, das selectinas E- e P-selectina e das moléculas de manutenção juncional E e VE-caderina e JAM-c pelo endotélio da microcirculação pulmonar na vigência de estimulação *in vivo* pelo LPS foram investigados por ensaios de imunofluorescência.

Os resultados obtidos mostraram que animais controles ou expostos à HQ apresentaram expressões similares das moléculas de adesão aqui investigadas (Figuras 22, 23 e 24).

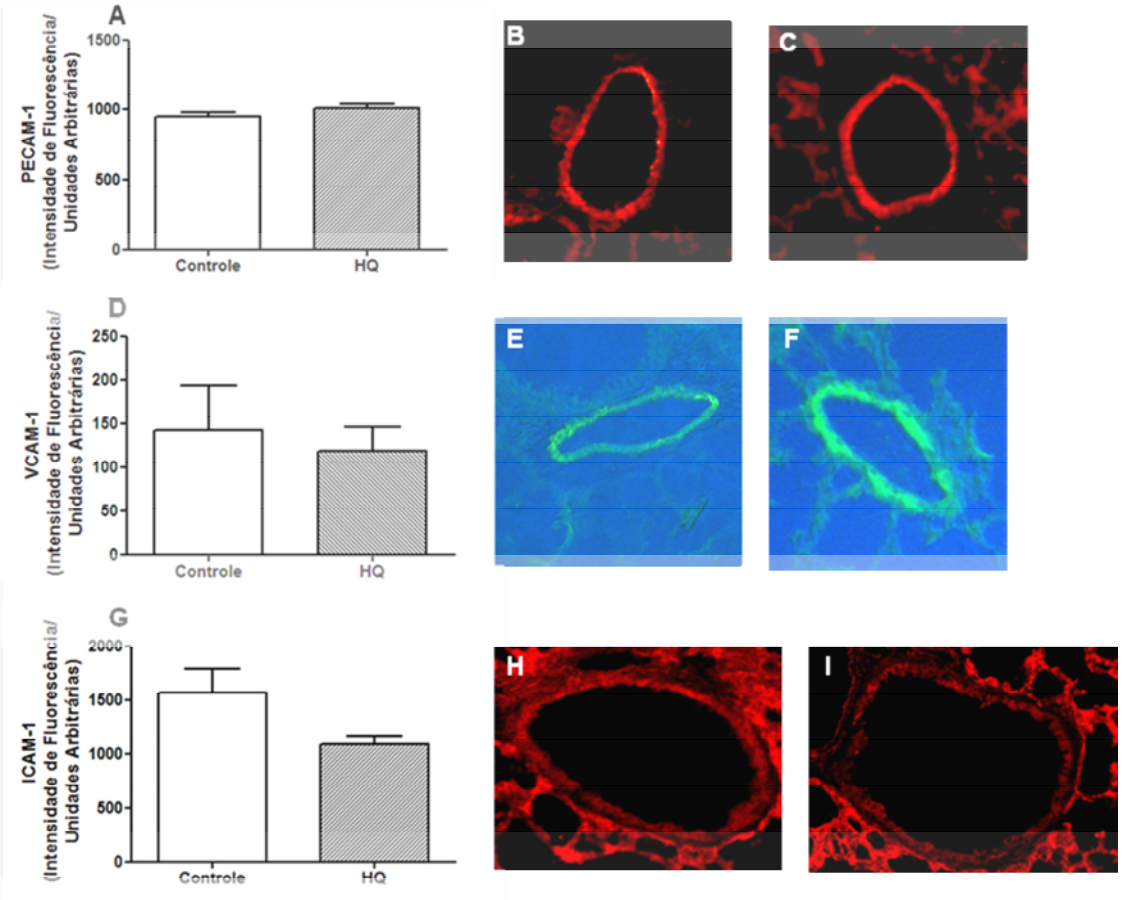

Figura 22 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão das moléculas de adesão da superfamília das imunoglobulinas PECA-1, VCAM-1 e ICAM-1 no endotélio vascular pulmonar. Expressão das moléculas de adesão PECAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 em cortes histológicos pulmonar obtidos de animais exposto a HQ na concentração de 25 ppm ou ao veículo (salina com 5% de etanol) três horas após a indução a inflamação pulmonar (Fig. A, D e G). As figuras B e C são fotos representativas da expressão de PECAM-1, E e F representam a expressão de VCAM-1 e as fotos He I representam a expressão de ICAM-1 em animais exposto ao veículo e a HQ respectivamente.

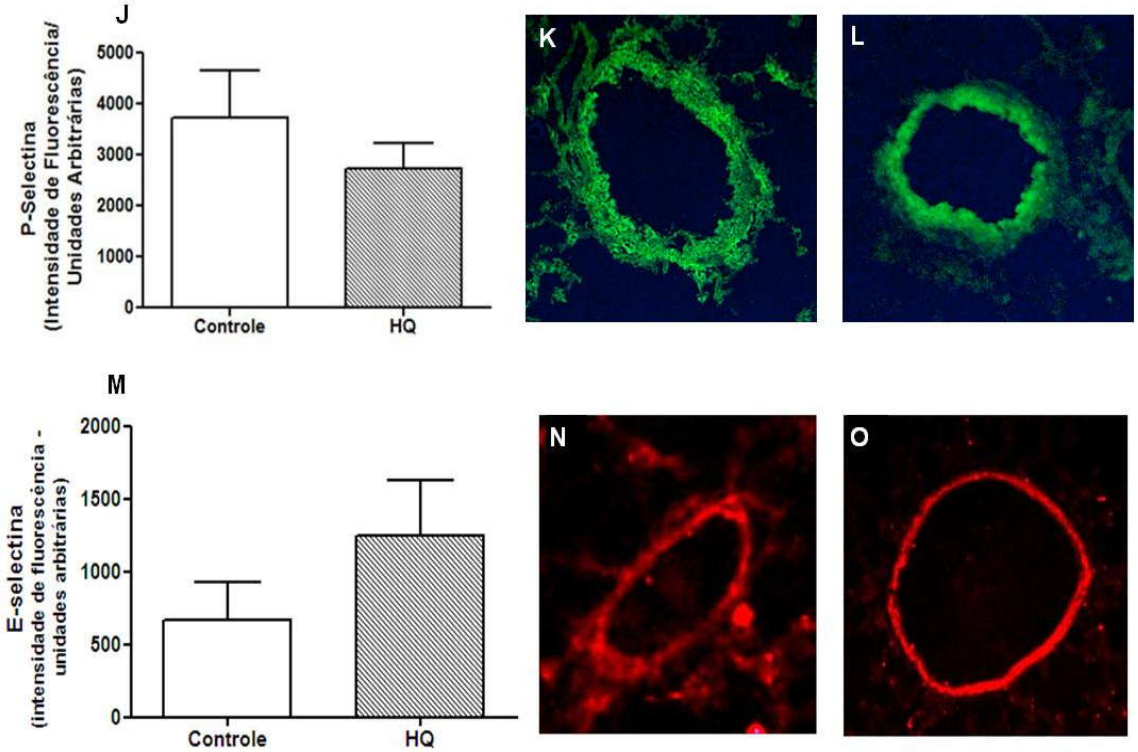

Figura 23 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão das moléculas de adesão da família das selectinas P- e E-selectina no endotélio vascular pulmonar. Expressão das moléculas de adesão P- e E-selectina em cortes histológicos pulmonar obtidos de animais exposto a HQ na concentração de 25 ppm ou ao veículo (salina com 5% de etanol) três horas após a indução a inflamação pulmonar (Fig. J e M). As figuras K e L são fotos representativas da expressão de P-selectina e as figuras N e O representam a expressão de E-selectina em animais exposto ao veículo e a HQ respectivamente.

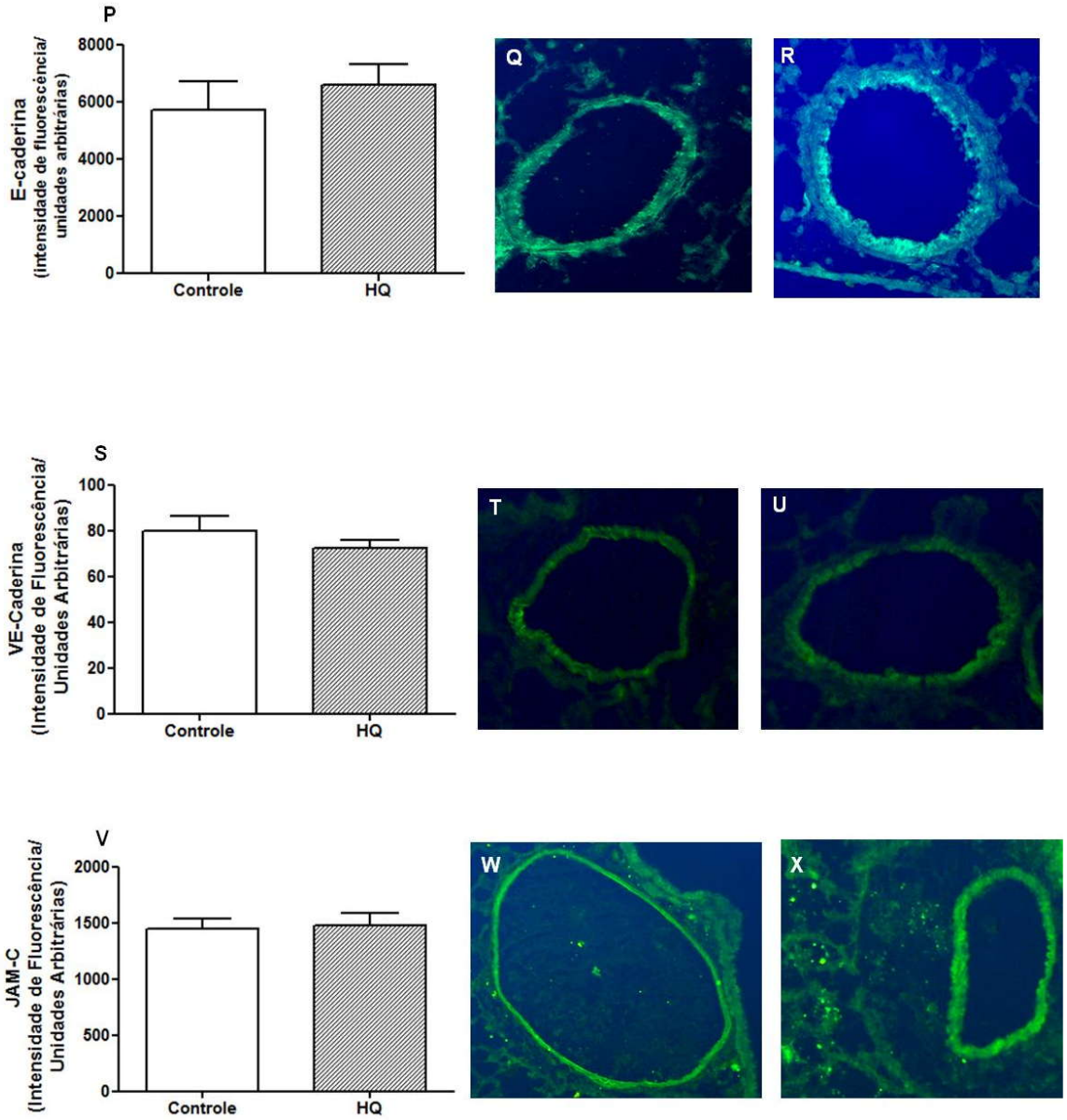

Figura 24 - Efeito da exposição à HQ sobre a expressão das moléculas de adesão de manutenção das junções interendoteliais E- e VE-caderina e JAM-C no endotélio vascular pulmonar. Expressão das moléculas de adesão E- e VE-caderina e JAM-C em cortes histológicos pulmonar obtidos de animais exposto a HQ na concentração de 25 ppm ou ao veículo (salina com 5% de etanol) três horas após a indução a inflamação pulmonar (Fig.P, S e V). As figuras Q e R são fotos representativas da expressão de E-Caderina, as figuras T e U representam a expressão de VE-Caderina e as figuras W e X representam a expressão de JAM-C em animais exposto ao veículo e a HQ respectivamente.

4.7 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Produção de Espécies Reativas de Oxigênio Intracelular

Os efeitos da exposição à HQ sobre a produção de EROs intracelular por leucócitos circulantes foi verificado por citometria de fluxo, através da oxidação de DCFH. Os resultados obtidos mostraram que PMN de animais expostos à HQ apresentaram concentrações maiores de EROS intracelular que células de animais controle (Figura 25).

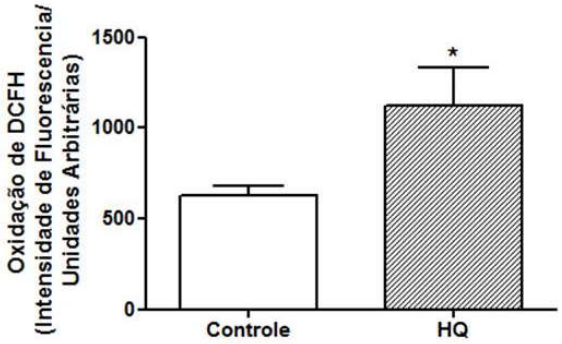

Figura 25 - Efeito da exposição à HQ sobre a produção de EROs intracelular por leucócitos circulantes. Leucócitos foram coletados de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). A análise foi feita através da oxidação do corante DCFH por meio de citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 7 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. *P<0.05 vs. respectivo controle.

4.8 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Formação de MDA.

Os efeitos da exposição à HQ sobre a peroxidação lipídica e conseqüente formação de MDA foram investigados por HPLC-DAD em plasma obtido de animais expostos à HQ ou ao veículo. Os dados obtidos mostraram que a HQ induziu a formação de MDA, uma vez que as concentrações plasmáticas obtidas do MDA foram maiores em amostras de animais expostos à HQ que em amostras de animais expostos ao veículo (Figura 26).

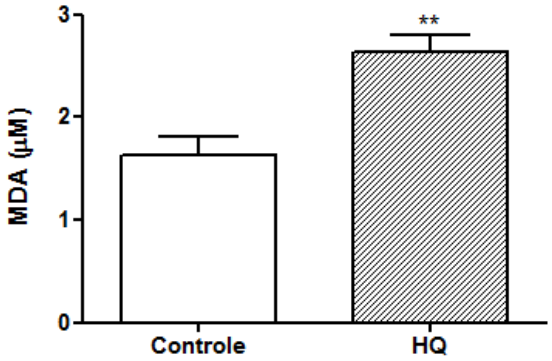

Figura 26 - Efeito da exposição à HQ sobre a formação de malonaldeído (MDA). Amostras coletadas de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). As amostras foram submetidas a analise por HPLC-DAD. Os resultados expressam a média ±EPM de células obtidas de 4 animais/grupo. Os ensaios foram realizados em duplicatas. **P<0.01 vs. respectivo controle.

4.9 Efeito da Exposição à HQ Sobre o Ciclo Celular.

Os efeitos da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre o ciclo celular de leucócitos totais foi investigado por ensaio de citometria de fluxo. Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ não causou alteração no ciclo celular de leucócitos, quando comparados com os leucócitos de animais expostos ao veículo (Figura 27).

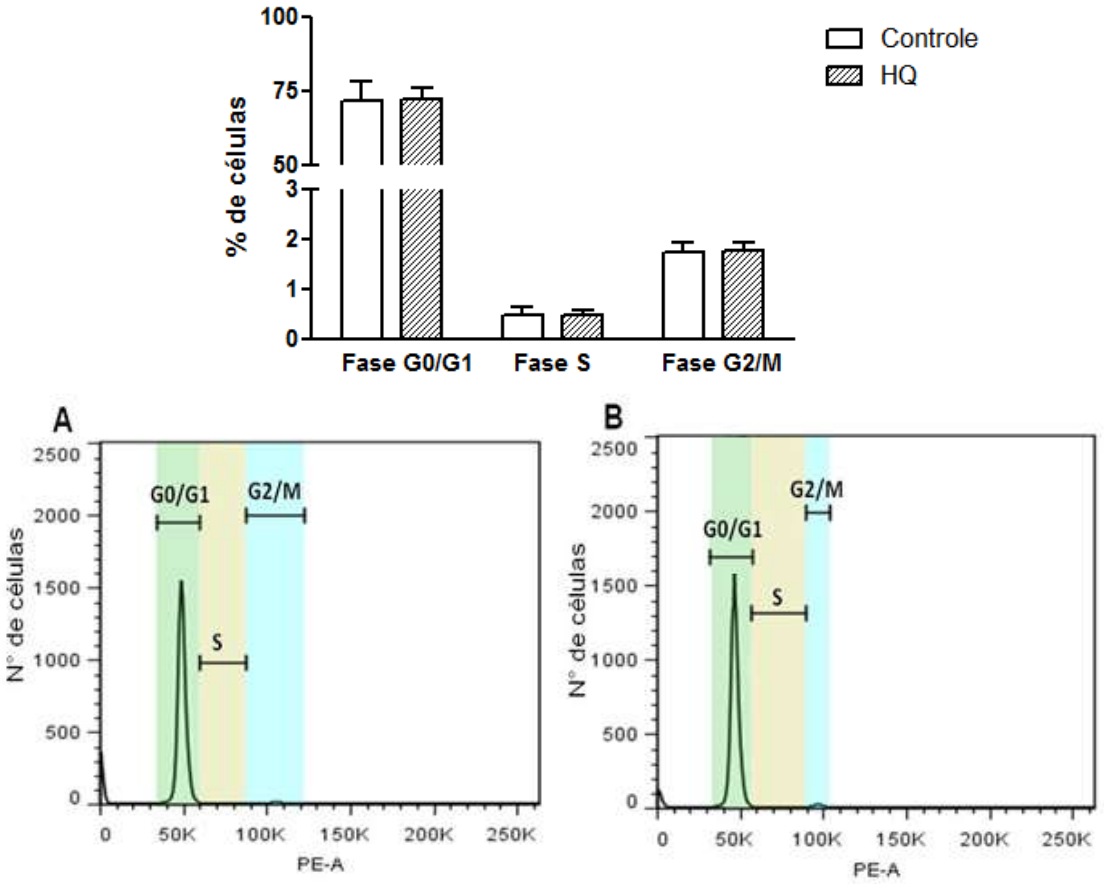

Figura 27 - Efeito da exposição à HQ sobre o ciclo celular de leucócitos. O ciclo divisão celular foi estudado em amostras de leucócitos coletados de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo e através do histograma gerado pelo citômetro foi possível verificar a numero de células em casa fase do ciclo, onde A e B apresentam os histogramas das células obtidas dos animais exposto ao controle e a HQ, respectivamente, em cada fase da divisão celular. Os resultados expressam a porcentagem de células em cada fase da divisão celular. As amostras foram obtidas de 8 animais/grupo.

4.10 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Integridade do DNA

Os efeitos da exposição à HQ na concentração de 25 ppm sobre a integridade do DNA de leucócitos totais foi investigado por ensaio de citometria de fluxo. Os

resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ apresentou uma tendência à fragmentação de DNA nos leucócitos, quando comparados com os leucócitos de animais expostos ao veículo (Figura 28). Os resultados obtidos não apresentaram diferença estatisticamente significante.

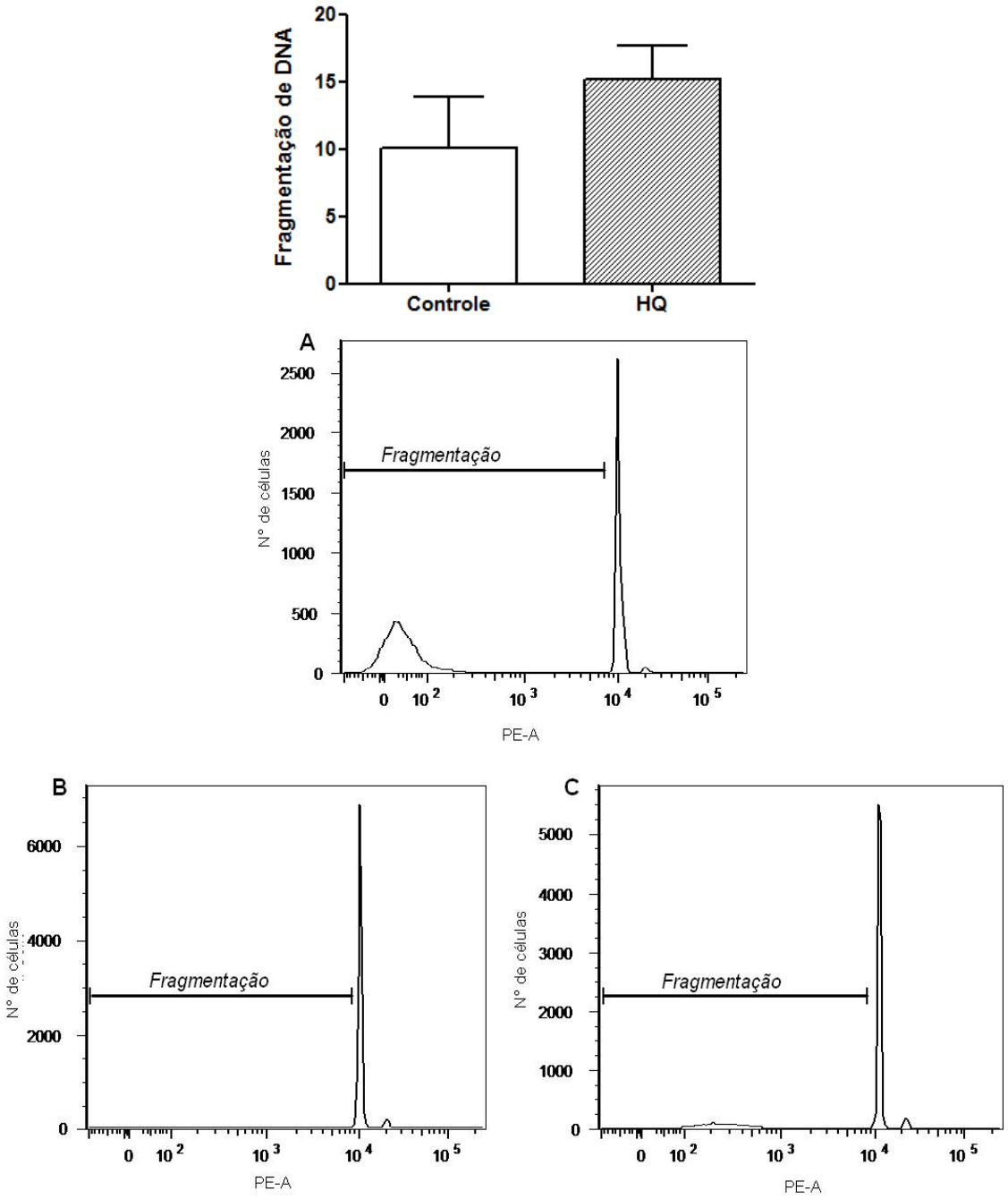

Figura 28 - Efeito da exposição à HQ sobre a integridade do DNA celular. A integridade do DNA de leucócitos foi investigada em amostras coletadas de animais expostos à HQ na concentração de 25 ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). As amostras foram analisadas por citômetro de fluxo e através do histograma gerado pelo citômetro foi possível verificar a fragmentação do DNA celular, onde A representa o controle positivo (células com 10% de etanol 70%), B representa células de animais controle e C representa células de animais tratados com HQ. Os resultados expressos no gráfico representam a mediana da fragmentação celular. As amostras foram obtidas de 8 animais/grupo.

4.11 Efeito da Exposição à HQ Sobre a Formação de Adutos de DNA em Tecido Pulmonar

Os efeitos da exposição à HQ sobre a formação dos adutos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo), e 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina (1,N^2-propanodGuo) foram investigados por HPLC/ESI-MS/MS-MRM em homogenatos de tecido pulmonar obtidos de animais controles ou expostos à HQ. Os dados obtidos mostraram que não foram detectadas diferenças na formação de 8-oxodGuo e de 1,N^2-propanodGuo no tecido pulmonar obtido de ambos os grupos (Figura 29 e 30).

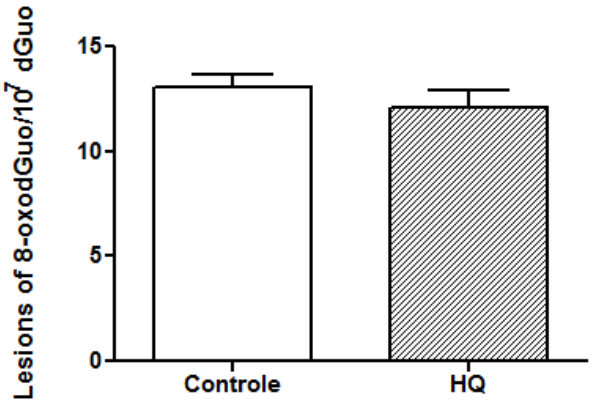

Figura 29 - Efeito da exposição à HQ sobre a formação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina em tecido pulmonar. Amostras de DNA extraídos do tecido pulmonar de animais expostos à HQ na concentração de 25ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). As amostras foram submetidas a analise em HLP/ESI-MS/MS-MRM. O número de amostras representam 6 amostras de cada grupo

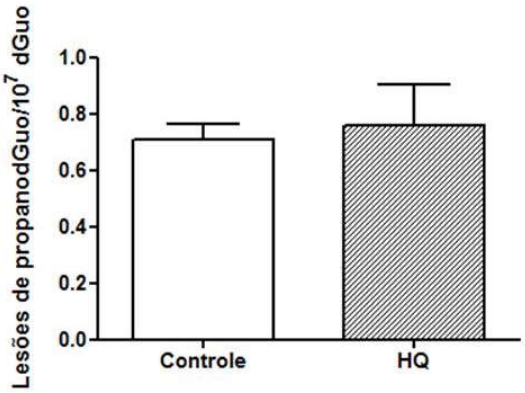

Figura 30 - Efeito da exposição à HQ sobre a formação de 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina em tecido pulmonar. Amostras de DNA extraídos do tecido pulmonar de animais expostos à HQ na concentração de 25ppm (1h/dia/5 dias) ou ao veículo (salina com 5% de etanol). As amostras foram submetidas a analise em HLP/ESI-MS/MS-MRM. O número de amostras representam 3 amostras.

Discussão

Como já citado na introdução, a literatura recente tem questionado o potencial tóxico da exposição à HQ, e que este conceito pode estar sendo subestimado, principalmente com relação a sua ação genotóxica (McGregor, 2007). O nosso grupo de pesquisa tem investigado o efeito tóxico da exposição *in vivo* à HQ sobre funções das células brancas ligadas à resposta inflamatória e tem obtido e resultados que vão ao encontro a esta observação, mostrando que exposições com tempo/dose/freqüência menores que as empregadas pela literatura causam toxicidade ao sistema imune (Macedo et al., 2006; 2007; Ferreira et al., 2007). O presente trabalho, objetivou investigar os efeitos tóxicos decorrentes da exposição à HQ, em baixas concentrações, revelando que a exposição ao agente fenólico causa efeitos tóxicos que podem ser detectados somente na vigência de uma resposta do organismo a um agente agressor.

Os principais dados apresentados pela literatura sobre a toxicidade da HQ estão ligados a intoxicação pelo benzeno, uma vez que a HQ é um produto intermediário do metabolismo deste solvente, com efeito tóxico reconhecido, principalmente pela sua ação deletéria sobre a medula óssea, resultando em prejuízos na produção, maturação e mobilização de leucócitos para circulação (RODRIGUEZ *et al.*, 2010; ZHIYING *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2000; WESTER *et al.*, 2006). Um dos mecanismos envolvidos neste efeito é a formação de adutos nas bases nitrogenadas do DNA, particularmente a oxidação das bases guanina e adenina em células da medula óssea, causando fragmentação do DNA celular, alterações nas fases de maturação e diferenciação, além de morte prematura destas células (RODRIGUEZ *et al.*, 2010; NGUYEN *et al.*, 2005; GASKELL *et al.*, 2004; SAMMERS *et al.*, 2006; WHYSNER et al., 2004).

Desta forma, o leucograma e a verificação da fragmentação do DNA de células circulantes têm sido empregados na literatura como efeitos importantes para a intoxicação ao benzeno e à HQ (GASKELL *et al.*, 2005; VÁRKONYI *et al.*, 2006; TOZLOVANU *et al.*, 2006; TERASAKA *et al.*, 2005; CHUANG et. al., 2009). Com base nestas observações, inicialmente investigamos estes parâmetros nas condições experimentais aqui empregadas. Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ, por via sistêmica, não causou alteração no número de leucócitos circulantes, sugerindo que a produção de células brancas bem como os processos envolvidos na mobilização destas células da medula óssea para a circulação não tenham sido alterados.

Adicionalmente, a exposição à HQ contribuiu para o aumento da peroxidação lipídica, dado este que corrobora a literatura, onde estudos mostraram que a exposição de 100 mg/kg (≈ 2 mM) de HQ, intra estomacal, aumentou a concentração de MDA na urina de ratos (EKSTROM *et al.*, 1988). Este dado é importante visto que a peroxidação lipídica culmina na formação de MDA, um aldeído reativo, que pode ser ligar ao DNA causando sua oxidação, além de ser o principal marcador de danos a membranas celulares MARNETT 1999 (FOURNIER *et al.*, 1995). Nesta mesma linha de investigação, foi observado que a exposição à HQ aumentou a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio. Este efeito pode ser decorrente de dois mecanismos plausíveis, reforçados pela literatura, a saber: 1) difusão do agente fenólico para o interior das células, e uma vez nesta localização, a HQ pode sofrer metabolização por enzimas citoplasmáticas, levando a formação de EROs intracelular. 2) pela interação do agente fenólico na membrana celular, mais precisamente em sistemas redox, como NADPH oxidase, aumentando a produção de EROs ao nível plasmático (AUGUSTO, 2006; BENTZ, A. B., 2009). O aumento da produção de EROs e a peroxidação lipídica poderia indicar que a exposição à HQ tivesse causado dano oxidativo ao DNA, com subseqüente fragmentação do mesmo. Porém, os resultados aqui obtidos mostraram que o DNA dos leucócitos circulantes estavam íntegros e, portanto, o aumento da produção de EROs não teria sido suficiente para causar dano oxidativo e fragmentação do DNA em leucócitos.
Adicionalmente, a exposição à HQ não induziu a formação dos adutos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina (1,N^2-propanodGuo) em homogenatos de tecido pulmonar. Estes resultados, associados à ausência de alterações no leucograma, sugeriam que o protocolo de exposição à HQ aqui empregado poderia não ser suficientemente intenso para caracterizar intoxicação com base nestes parâmetros biológicos.

Estes resultados são discordantes da literatura e podem ser decorrentes, das condições de exposição, em especial da concentração de HQ empregada. Não há uma relação linear entre concentração de HQ ou benzeno no ar, absorção e o peso corporal, o que dificulta a extrapolação dos resultados obtidos para a exposição humana. No entanto, é possível inferir que os animais foram expostos a concentrações muito menores que as observadas na literatura e que as preconizadas pelas agências regulamentadoras para exposição humana (CETESB; IARC, 1987; NIOSH). No sentido de se aferir mais corretamente a concentração da

exposição à HQ, sua saturação no ambiente nas condições empregadas foi investigada. O modelo experimental utilizado compreendeu um filtro de éster celulose no interior de um *cassette* acoplado a uma bomba amostradora que concentra a HQ em um fluxo 2L/min. Vale ressaltar que o filtro foi posicionado na mesma localização dos animais dentro da caixa de exposição no sentido de aferir a concentração real de exposição dos animais à HQ. Os resultados obtidos mostraram que as concentrações de HQ no filtro foram extremamente inferiores a dose nebulizada na caixa de exposição, o que sugere, indiscutivelmente, que os animais absorveram concentração extremamente menor de HQ do que a nebulizada.

É importante ressaltar que espécies murinas, bem como culturas primárias de células destes animais, são amplamente empregadas para os estudos de toxicidade da HQ ou do benzeno, uma vez que estes manifestam sintomas de intoxicações equivalentes às humanas (GARCÍA-LESTÓN et al., 2010; KOLACHANA *et al.*, 1993). Assim, estas observações, associadas aos dados obtidos subseqüentemente neste trabalho, descartaram a possibilidade do modelo animal empregado não responder adequadamente à exposição à HQ.

Observamos que, embora, a exposição à HQ não causou modificações no número de células circulantes, na vigência de uma reação inflamatória, induzida por endotoxina, a mobilização de leucócitos, tanto de poli quanto de mononucleares, para o pulmão inflamado estava reduzida. Este resultado pode ter um impacto muito importante para toxicologia ocupacional/ambiental, uma vez que, aparentemente, os animais estão em condições adequadas de saúde com base nos indicadores biológicos de efeito mais empregados na literatura. No entanto, a capacidade dos animais responderem a um estímulo imunológico está prejudicada. O modelo do processo inflamatório aqui empregado teve o propósito de mimetizar as agressões freqüentes ao organismo, já que o pulmão é alvo de exposição a bactérias constantemente.

Os resultados obtidos mostraram que a exposição à HQ prejudica a migração leucocitária para o LBA na vigência de estimulação pelo LPS. Dados adicionais mostraram que os leucócitos, em especial os neutrófilos, permanecem no tecido pulmonar, uma vez que a atividade de MPO, uma enzima constitutiva presente em grânulos azurófilos de neutrófilos e que é utilizada como um indicador indireto da presença destas células, foi maior no tecido pulmonar de animais expostos à HQ que de animais controles. É importante ressaltar que o aumento na atividade de

MPO no pulmão não reflete a ação da HQ sobre a expressão e atividade da MPO, já que a atividade desta mesma enzima foi avaliada em outros tecidos considerados alvos de ação da HQ, como o fígado e a medula óssea e os resultados obtidos mostraram que a atividade da MPO era equivalente em animais expostos ou não à HQ (dados não mostrados).

Tem sido mostrado que a ligação de LPS ao TLR-4, especialmente em macrófagos alveolares, induz a ativação do fator de transcrição NF-κB, fator este associado à produção de citocinas e quimiocinas, neutrofilia, permeabilidade epitelial e peroxidação lipídica (Blackwell et al., 1996; Liu et al., 1999). Esta via de ativação está ligada à proteína tirosina quinase ou quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases), como JNK e p38MAP quinase, uma vez que a inibição destas viasreduziu a ativação do NF-κB e a reação aguda pulmonar (Lee et al., 2004; Kim et al., 2006; Lee et al., 2007). Desta forma, esta é uma via de ativação que está sendo investigada paralelamente a este trabalho em macrófagos coletados do pulmão de animais expostos à HQ por ensaios de western blot. Os efeitos decorrentes da sinalização induzida pelo LPS no tecido pulmonar envolvidos com a mobilização leucocitária são diversos e complexos, dependentes da participação de uma diversidade de mediadores químicos secretados/liberados ou produzidos por diferentes tipos celulares, além da expressão/ativação de receptores glicoprotéicos expressos nas membranas celulares. Obviamente que esta complexidade de mecanismos proporciona diferentes frentes de investigação e, neste projeto, escolhemos estudar as ações da exposição *in vivo* à HQ sobre eventos relacionados à expressão de moléculas de adesão, tanto em leucócitos circulantes como no endotélio da microcirculação pulmonar. Como já descrito na Introdução, alterações hemodinâmicas, bem como a ação de mediadores químicos induzem a expressão/ativação destas moléculas, em cascata, ou seja, existe uma cinética de expressão e de clivagem das moléculas nas membranas celulares, imprescindíveis para o perfeito recrutamento celular (WARD, P. A., 1997; LOWSON & WOLF, 2009; GRAILER *et al.*, 2009; KULIGOWSKY *et al.*, 2010). Neste sentido, as moléculas de adesão que até agora são consideradas as mais relevantes para o recrutamento leucocitário em uma resposta inflamatória aguda evocada pelo LPS foram investigadas. Os resultados obtidos mostraram que a exposição *in vivo* à HQ aumenta a expressão das β_2 integrinas em PMN, tanto em condições basais como após a estimulação pelo fMLP, e reduz a expressão de L-selectina neste mesmo tipo

celular sob estimulação pelo fMLP. Estes resultados, em conjunto, mostram que a exposição à HQ ativa os PMN circulantes e estes efeitos podem levar a ações que interfiram com a evolução do processo inflamatório, como descrito a seguir: 1) em estado quiescente, os neutrófilos não expressam ou ativam as β_2 integrinas. Suas ativações em células da circulação estão relacionadas à agregação homotípica, com conseqüente ativação da sinalização para produção de citocinas inflamatórias e prejuízos na manutenção das adesões focais dependentes de actina, o que pode acarretar prejuízo no influxo destas células para focos de lesão (CABODI *et al*., 2010). Este tipo de ativação dos leucócitos tem sido associado à gênese de doenças inflamatórias em pacientes diabéticos, que em última instância, apresentam respostas inflamatórias deficientes frente a estímulos infecciosos (ADVANI *et al.*, 2002;2004); 2) Os dados da literatura mostram que a clivagem da L-selectina é fundamental para expressão das β_2 integrinas *in vitro* (GREEN *et al.,* 2004; MATTILA *et al.,* 2005; ORR *et al.,* 2007) apesar da demonstração direta desta relação *in vivo* ainda ser controversa (GREEN *et al.,* 2004; ORR *et al.,* 2007). Desta forma, pode se supor que este equilíbrio seja interrompido pela exposição à HQ, o que pode interferir com a interação dos leucócitos circulantes ao endotélio microvascular.

Adicionalmente, a exposição à HQ aumentou a expressão basal de β_3 integrinas e PECAM-1 em PMN a valores semelhantes aos encontrados após estimulação pelo fMLP. O significado que este efeito pode ter no prejuízo da migração de neutrófilos para o foco de inflamação pode ser complexo e necessita de estudos adicionais. Tem sido mostrado, em especial para PECAM-1, que a interação de diferentes domínios da molécula com seus ligantes específicos desencadeiam ações pró ou antiinflamatórias (WOODFIN *et al.,* 2007; PRIVRATSKY *et al.,* 2010). Como já descrito, a PECAM-1 é uma molécula expressa na célula endotelial, plaquetas e células hematopoéticas (NOURSHARGH *et al.,* 2006). Seus efeitos pró-inflamatórios estão relacionados à sua ação adesiva direta que medeia a transmigração de leucócitos pela célula endotelial, além da indução de sinalizações intracelulares para a expressão de outras moléculas importantes para a progressão da migração neutrofílica, como as β_1 e β_3 integrinas que são expressas nos neutrófilos quando presentes na matriz extravascular, além da modulação do potencial de membrana. Por outro lado, seus efeitos antiinflamatórios estão relacionados à manutenção das junções interendoteliais, à alteração do limiar de

ativação de leucócitos e à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (PRIVRATSKY *et al.,* 2010).

A expressão de integrinas na membrana da célula depende de síntese gênica, via ativação de fatores transcricionais como o NF-κB e a proteína ativadora-1 (AP-1) (BORREGAARD, 2010). Diferentemente, a expressão de PECAM-1 é determinada pela clivagem na membrana, reinternalização e expressão gênica (PRIVRATSKY *et al.*, 2010). Considerando que camundongos possuem um número pequeno de neutrófilos no sangue circulante, não foi possível extrair o mRNA e proteínas nucleares para elucidar os mecanismos envolvidos na expressão destas moléculas frente a exposição *in vivo* a HQ.

Diferentemente do observado para a expressão das moléculas de adesão em leucócitos PMN, a exposição à HQ não alterou a expressão de moléculas de adesão da família das selectinas e da superfamília das imunoglobulinas induzidas pelo LPS no endotélio microvascular pulmonar. Este efeito sugere que nas condições experimentais empregadas, a célula endotelial não é alvo de ação da HQ. De fato, nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a exposição i.p. a HQ, nas concentrações de 5 ou 10mg/Kg/dia, 13 doses com intervalos de 2 dias a cada 5 dias, não modifica as expressões de ICAM-1, PECAM-1 e VCAM-1 no endotélio microvascular do pulmão (FERREIRA et al., 2007). As diferenças nos efeitos observados em PMN e células endoteliais parecem ser dependentes da capacidade de metabolização da HQ. Enquanto que fagócitos expressam MPO e PGHs, que convertem a HQ em quinonas ainda mais reativas, como as 1,2 e 1,4BZQ, a célula endotelial é deficiente destas enzimas. Dados do nosso grupo de pesquisa têm mostrado que a incubação *in vitro* com HQ não afeta as expressões destas moléculas pela célula endotelial, mas por outro lado a incubação com 1,2, BZ nas mesmas condições experimentais reduz a expressão de PECAM-1 e a translocação nuclear do NF-Kappa B (HEBEDA *et al.*, submetido para publicação).

É importante salientar que os dados da ação da HQ sobre a expressão de moléculas de adesão são escassos. Dados anteriores do nosso grupo, mostraram que a administração i.p. de HQ a ratos Wistar machos em concentrações e períodos de exposição superiores aos aqui empregados provocou redução da expressão de L-selectina e aumento da β_2 integrina em PMN circulantes (MACEDO *et al.*, 2006). Por outro lado, a incubação de neutrófilos obtidos de ratos naive com HQ não modificou a expressão de L-selectina e PECAM-1, mas inibiu a expressão induzida

pelo fMLP de β_2 integrina na membrana destas células (HEBEDA *et al.*, enviado para publicação). Estes dados claramente sugerem que diferentemente do observado *in vitro*, a exposição à HQ *in vivo* pode afetar a expressão das moléculas de adesão diretamente, ou indiretamente, via produção de EROs. Tem sido mostrado que a produção excessiva de EROs está diretamente relacionada à indução da expressão de moléculas de adesão em diversos tipos celulares (MORI *et al.*, 2004; WU, 2006; DWORAKOWSKI *et al.*, 2008; SADOK *et al.*, 2009). O peróxido de hidrogênio, por exemplo, tem a capacidade de induzir a expressão de β integrinas em células epiteliais, contribuindo para a modificação do seu fenótipo (MORI *et al.*, 2004).

Em conjunto, resultados obtidos neste trabalho mostraram que os animais estavam expostos a concentrações abaixo das inicialmente preparadas para nebulização, resultado este evidenciado pelos ensaios realizados em HPLC. Esta concentração real de HQ utilizada (0,04 ppm) parece não ter causado efeitos sobre a medula óssea, efeito evidenciado pelo inalteração do ciclo das células mobilizadas para a circulação, revelando o estado de maturação completo destas células, excluindo, desta forma, qualquer efeito pró-leucêmico, visto que a HQ altera o ciclo de precursores celulares na medula, favorecendo a mobilização de células imaturas para a circulação (CHANG *et al.*, 2009). Foi demonstrado, ainda, que a exposição a HQ *in vivo,* não foi capaz de induzir qualquer efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão no endotélio da microvasculatorua pulmonar e ,da mesma forma, não foi capaz de causar a oxidação das bases do DNA celular do tecido pulmonar, pois os níveis de formação dos 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodGuo) e 1,N^2-propano-2′-deoxiguanosina (1,N^2-propanodGuo) não foram alterados. Em conjunto, estes dados sugerem que, de fato, o tecido pulmonar não é alvo de ação direto da HQ. Por outro lado, esta exposição foi capaz de induziu a expressão de moléculas de adesão e a geração de EROs em neutrófilos circulantes, o que pode levar estas células à um estado ativado, impedindo a resposta a um segundo estimulo. Nossos resultados mostraram que o fMLP *in vitro* não induziu qualquer aumento na expressão de moléculas de adesão em células de animais que receberam HQ. Assim, podemos inferir que o mecanismo de ação da HQ pode ser relevante para a deficiência da reação inflamatória aguda induzida nos animais após a inalação de endotoxina. Contudo é difícil concluir claramente que a HQ está atuando diretamente na expressão de moléculas de adesão ou através de produção de EROs ou se os dois mecanismos ocorrem simultaneamente.

Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram inferir que:

1) Os animais estiveram expostos a concentrações menores que as nebulizadas inicialmente;

2) A HQ nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ppm não causou alteração na número de células circulantes quando comparados os grupos de animais controle e tratado frente a um estímulo inflamatório. Estes dados mostram que o hemograma não é um bom indicador de exposição;

3) A HQ nas concentrações de 50, 25 e 12,5 ppm acarretou prejuízo na migração de leucócitos para o pulmão inflamado;

4) A investigação da expressão de moléculas de adesão em leucócitos PMN mostrou que a HQ na concentração de 25 ppm inibiu a expressão de L-Selectina frente a um estímulo e *per se* aumentou a expressão de β_2, β_3-integrina e PECAM-1;

5) A expressão das moléculas de adesão VCAM-1, PECAM-1, ICAM-1, JAM-C, VE-caderina, E- e P-Selectina na células endoteliais da microvasculatura pulmonar não foi alterada pela exposição à HQ na concentração de 25 ppm;

6) A exposição à HQ na concentração de 25 ppm não alterou o ciclo celular de leucócitos circulantes e não causou fragmentação no DNA destes leucócitos;

7) A produção intracelular de EROs foi aumentada em animais que foram expostos à HQ na concentração de 25 ppm, quando comparado com animais controles;

8) A HQ concentração de 25 ppm aumentou a peroxidação lipídica quando comparada a animais que receberam somente o veiculo;

9) A exposição à HQ não induziu a formação de adutos de DNA no tecido pulmonar.

7 Referências

ADVANI, A; MARSHALL, S. M; THOMAS, T. H. (2002). "Impaired neutrophil actin assembly causes persistent CD11b expression and reduced primary granule exocytosis in Type II diabetes." Diabetologia. v.45, n.5, p.719-727.

ADVANI, A; MARSHALL, S. M; THOMAS, T. H. (2004). "Increasing neutrophil F-actin corrects CD11b exposure in Type 2 diabetes." Europian Jounal of Clinic Investigation. v.34, n.5, p.358-364.

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

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução nº105, 31 de maio de 2001, Brasil, DF, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Resolução nº79, 28 de agosto de 2000, Brasil, DF, 2000.

AGHAJANIAN, A.; WITTCHEN, E. S; ALLINGHAM, M. J; GARRETT, T. A; BURRIDGE, K. (2008). "Endothelial cell junctions and the regulation of vascular permeability and leukocyte transmigration." Journal of thrombosis and haemostasis. v.6, n.9, p.1453-1460.

AKIRA, S. (2001). "[Toll-like receptors and innate immune system]." Tanpakushitsu Kakusan Koso. v.46, n.4 Suppl, p.562-566.

AKIRA, S. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Advances in immunology. v.78, p.1-56.

ALBELDA, S. M; SMITH, C. W; WARD, P. A. (1994). "Adhesion molecules and inflammatory injury." The FASEB journal. v.8, n.8, p.504-512.

ALCAIDE, P; NEWTON, G; AUERBACH, S; SEHRAWAT, S; MAYADAS, T. N; GOLAN, D. E; YACONO, P; VINCENT, P; KOWALCZYK, A; LUSCINSKAS, F. W. (2008). "p120-Catenin regulates leukocyte transmigration through an effect on VE-cadherin phosphorylation." Blood. v.112, n.7, p. 2770-2779.

ANP. Portaria nº 309/2001. Regulamento Técnico ANP nº 05/2001.

AUGUSTO, O. Radicais livres: bons, maus e naturais. Oficinas de textos (SP), 35-70, 2006.

AURRAND-LIONS, M; LAMAGNA, C; DANGERFIELD, J. P; WANG, S. J; HERRERA, P; NOURSHARGH, S; IMHOF, B. A. (2005). "Junctional adhesion

molecule-C regulates the early influx of leukocytes into tissues during inflammation." Journal of Immunology v.174, n.10; p.6406-6415.

BABIOR, B. M. (2004). "NADPH oxidase." Current opinion in immunology v.16, n.1, p.42-47.

BABIOR, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood v.93, n.5, p.1464-1476.

BADHAM, H. J; WINN, L. M. (2007). "Investigating the role of the aryl hydrocarbon receptor in benzene-initiated toxicity in vitro." Toxicology v.229, n.3, p.177-185.

BANERJEE, E. R; JIANG, Y; HENDERSON, W. R., JR; SCOTT, L. M; PAPAYANNOPOULOU, T. (2007). "Alpha4 and beta2 integrins have nonredundant roles for asthma development, but for optimal allergen sensitization only alpha4 is critical." Experimental hematology v.35, n.4, p.605-617.

BARRETO, G; MADUREIRA, D; CAPANI, F; AON-BERTOLINO, L; SARACENO, E; ALVAREZ-GIRALDEZ, L. D. (2009). "The Role of Catechols and Free Radicals in Benzene Toxicity: An Oxidative DNA Damage Pathway." Environmental and Molecular Mutagenesis v.50, n.9, p.771-780.

BARTHOLO, RM; BARTHOLO, TP. (2009) Imunidade inata e a importância dos receptores Toll-similar. Pulmão. v.2, p.52-58.

BEN FARHAT, M; JORDAN, M. J; CHAOUECH-HAMADA, R; LANDOULSI, A; SOTOMAYOR, J. A. (2009). "Variations in essential oil, phenolic compounds, and antioxidant activity of tunisian cultivated Salvia officinalis L." Journal of agricultural and food chemistry v.57, n.21, p.10349-10356.

BENTZ, A. B. (2009). A Review of Quercetin: Chemistry, Antioxidant Properties, and Bioavailability, The Journal of Young Investigators, v.19, n.10, retrieved 3 February 2011 from http://www.jyi.org/research/re.php?id=3416

BLACKWELL, T. S; BLACKWELL, T. R; HOLDEN, E. P; CHRISTMAN, B. W; CHRISTMAN, J. W. (1996). "In vivo antioxidant treatment suppresses nuclear factor-kappa B activation and neutrophilic lung inflammation." Journal of Immunology v.157, n.4, p.1630-1637.

BODELL, W. J; PATHAK, D. N; LEVAY, G; YE, Q. P; PONGRACZ, K. (1996). "Investigation of the DNA adducts formed in B6C3F1 mice treated with benzene: Implications for molecular dosimetry." Environmental Health Perspectives v.104, p.1189-1193.

BOHNE, J; CATHOMEN, T. (2008). "Genotoxicity in gene therapy: an account of vector integration and designer nucleases." Current opinion in molecular therapeutics v.10, n.3, p.214-223.

BORREGAARD, N. (2010). "Neutrophils, from marrow to microbes." Immunity v.33, n.5, p.657-670.

BOZINOVSKI, S; JONES, J; BEAVITT, S. J; COOK, A. D; HAMILTON, J. A; ANDERSON, G. P. (2004). "Innate immune responses to LPS in mouse lung are suppressed and reversed by neutralization of GM-CSF via repression of TLR-4." American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology v.286, n.4, p.877-885.

BRADFIELD, P. F; SCHEIERMANN, C; NOURSHARGH, S; ODY, C; LUSCINSKAS, F. W; RAINGER, G. E; NASH, G. B; MILJKOVIC-LICINA, M; AURRAND-LIONS, M; IMHOF, B. A. (2007). "JAM-C regulates unidirectional monocyte transendothelial migration in inflammation." Blood v.110, n.7, p.2545-2555.

CABODI, S; DI STEFANO, P; LEAL MDEL, P; TINNIRELLO, A; BISARO, B; MORELLO, V; DAMIANO, L; ARAMU, S; REPETTO, D; TORNILLO, G; DEFILIPPI, P. (2010). "Integrins and signal transduction." Advances in experimental medicine and biology v.674, p.43-54.

Casarett, L.J., Amdur, M.O., Klaassen, C.D., Doull, J., Klaasen, C.D. (1996) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5ª Ed. New York: McGraw-Hill, p.1110

CERA, M. R; FABBRI, M; MOLENDINI, C; CORADA, M; ORSENIGO, F; REHBERG, M; REICHEL, C. A; KROMBACH, F; PARDI, R; DEJANA, E. (2009). "JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling." Journal of cell science v.122, pt.2, p.268-277.

CERLETTI, C; EVANGELISTA, V; DE GAETANO, G. (1999). "P-selectin-beta-integrin cross-talk: A molecular mechanism for polymorphonuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage." Thrombosis and Haemostasis v.82, n.2, p.787-793.

CETESB. Ficha de Informação de Produto Químico: Hidroquinona. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=HIDROQUINONA&cod=2662>. Acesso em: 04 de agosto de 2010.

CHANG, C. S; CHUANG, K. H; ALTUWAIJRI, S; LI, G. H; LAI, J. J; CHU, C. Y; LAI, K. P; LIN, H. Y; HSU, J. W; KENG, P; WU, M. C. (2009). "Neutropenia with impaired host defense against microbial infection in mice lacking androgen receptor." Journal of Experimental Medicine v.206, n.5, p.1181-1199.

CHO, J. Y. (2008). "Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes." Mediators of inflammation v.2008, p.298010.

CHOI, J. M; CHO, Y. C; CHO, W. J; KIM, T. S; KANG, B. Y. (2008). "Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces IFN-gamma production in antigen-primed lymphocytes." Archives of pharmacal research v.31, n.3, p.337-341.

COMBES, R. D. (1992). "Genotoxicity Testing - Recent Advances and Future-Trends." Chemistry & Industry n.24, p.950-954.

CROZIER, A. (2009). "Dietary phenolics, absorption, mammalian and microbial metabolism and colonic health." Molecular nutrition & food research v.53, n.1, p. S5-6.

DA SILVA, J; ERDTMANN, B; HENRIQUES, J.A.P. 2003. Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, v.1, p.424.

DAUPHINEE, S. M; KARSAN, A. (2006). "Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells." Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology v.86, n.1, p.9-22.

DE LIMA, W. T; STEIL, A. A; RUSSO, M; STAROBINAS, N; TEIXEIRA, C. F. P; JANCAR, S. (1998). "Lipid mediators, tumor necrosis factor and nitric oxide and their interactions in immune-complex-induced lung injury." European Journal of Pharmacology v.358, n.1, p.69-75.

DECAPRIO, A. P. (1999). "The toxicology of hydroquinone--relevance to occupational and environmental exposure." Critical reviews in toxicology v.29, n.3, p.283-330.

DEJANA, E; BREVIARIO, F; CAVEDA, L. (1994). "Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors." Clinical and Experimental Rheumatology, v.12, n.10, p.25-28.

DEL RIO, D; STEWART, A. J; PELLEGRINI, N. (2005). "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress." Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, v.15, n.4, p.316-328.

DMITRIEV, L. F; TITOV, V. N. (2010). "Lipid peroxidation in relation to ageing and the role of endogenous aldehydes in diabetes and other age-related diseases." Ageing Research Reviews, v.9, n.2. p.200-210.

DOMAGALA-KULAWIK, J. (2008). "Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society v.59, n.6, p.19-34.

DOMAGALA-KULAWIK, J. (2008). "BAL in the diagnosis of smoking-related interstitial lung diseases: review of literature and analysis of our experience." Diagn Cytopathol, v.36, n.12, p.909-915.

DU, X. L; SUI, G. Z; STOCKKLAUSER-FARBER, K; WEISS, J; ZINK, S; SCHWIPPERT, B; WU, Q. X; TSCHOPE, D; ROSEN, P. (1998). "Introduction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species." Diabetologia, v.41, n.3, p.249-256.

DUARTE, M. P; LAIRES, A; GASPAR, J; LEAO, D; OLIVEIRA, J. S; RUEFF, J. (1999). "Genotoxicity of instant coffee: possible involvement of phenolic compounds." Mutation research, v.442, n1, p.43-51.

DWORAKOWSKI, R; ALOM-RUIZ, S. P; SHAH, A. M. (2008). "NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of endothelial phenotype." Pharmacological reports, v.60, n.1, p.21-28.

EKSTROM, T; GARBERG, P; EGESTAD, B; HOGBERG, J. (1988). "Recovery of malondialdehyde in urine as a 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative analyzed with high-performance liquid chromatography." Chemico-biological interactions, v.66, n.3-4, p.177-187.

ELANGBAM, C. S; QUALLS, C. W. JR; Dahlgren, R. R. (1997). "Cell adhesion molecules--update." Veterinary Pathology, v.34, n.1, p.61-73.

EPSTEIN, H. (2009). "Cosmeceuticals and polyphenols." Clin Dermatol 27(5): 475-478.

ESTERBAUER, H; SCHAUR, R. J; ZOLLNER, H. (1991). "Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes." Free radical biology & medicine, v.11, n.1, p.81-128.

FERNANDEZ-PANCHON, M. S; VILLANO, D; TRONCOSO, A. M; GARCIA-PARRILLA, M. C. (2008). "Antioxidant activity of phenolic compounds: from in vitro results to in vivo evidence." Critical reviews in food science and nutrition, v.48, n.7, p.649-671.

FERREIRA, A.; MACEDO, S.M.D.; OLIVEIRA, A.P.L.; LIMA, W.T.; FARSKY, S.H.P.; COELHO, F.R. (2007) Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactérias. Rev. Brás. Ciên. Farma., São Paulo, v. 43, n. 3, p. 455-464.

FOURNIER, J; COPIN, E; CHOUCHANE, S; DZWIGAJ, S; GUIGNARD, J. (1995). "[Lipid peroxidation in the presence of inorganic compounds. Relation to oxidative stress mechanisms]." Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales, v.189, n.3, p.429-442.

FUJIWARA, K. (2006). "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cells." Journal of International Medice v.259, n.4, p.373-380.

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

GARCIA-LESTON, J; MENDEZ, J; PASARO, E; LAFFON, B. (2010). "Genotoxic effects of lead: an updated review." Environment international, v.36, n.6, p.623-636.

GASKELL, M; MCLUCKIE, K. I; FARMER, P. B (2004). "Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone

in the supF forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity." Mutation Research, v.554, n.1-2, p.387-398.

GASKELL, M., MCLUCKIE, K. I.,. (2005). "Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and p-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity." Carcinogenesis, v.26, n.3, p.673-680.

GRAILER, J. J; KODERA, M; STEEBER, D. A. (2009). "L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation." Journal of dermatological science, v.56, n.3, p.41-147.

GREEN, C. E., PEARSON, D. N., et al. (2004). "Shear-dependent capping of L-selectin and P-selectin glycoprotein ligand 1 by E-selectin signals activation of high-avidity beta2-integrin on neutrophils." Journal of Immunology 172(12): 7780-7790.

HALLIWELL, B; CHIRICO, S. (1993). "Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance." Am J Clin Nutr, v.57, n.5, p.715S-724S; discussion 724S-725S.

HARLAN, J. M. (1985). "Leukocyte-endothelial interactions." Blood, v.65, n.3, p.513-525.

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

HAYASHI, M; HONMA, M. (2007). "[Evaluation of in vivo genotoxicity of chemicals--development and application of rodent micronucleus assay]." Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku, n.125, p.17-34.

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

HIRABAYASHI, Y; INOUE, T. (2010). "Benzene-induced bone-marrow toxicity: a hematopoietic stem-cell-specific, aryl hydrocarbon receptor-mediated adverse effect." Chemico-Biological Interactions, v.184, n.1-2, p.252-258.

HONG-GELLER, E. (2009). "A role for cell adhesion in beryllium-mediated lung disease." Journal of Occupational and Environmental Hygiene, v.6, n.12, p.727-731; quiz D102-723.

HSU, C. L; YEN, G. C. (2008). "Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms." Molecular nutrition & food research, v.52, n.1, p.53-61.

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

JAGANATHAN, S. K; MANDAL, M. (2009). "Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review." Journal of biomedicine & biotechnology, v.2009, p.830616.

JI, Z; ZHANG, L; GUO, W; MCHALE, C. M; SMITH, M. T. (2009). "The benzene metabolite, hydroquinone and etoposide both induce endoreduplication in human lymphoblastoid TK6 cells." Mutagenesis, v.24, n.4, p.367-372.

JIANG, G; XU, L; SONG, S; ZHU, C; WU, Q; ZHANG, L; WU, L. (2008). "Effects of long-term low-dose cadmium exposure on genomic DNA methylation in human embryo lung fibroblast cells." Toxicology, v.244, n.1, p.49-55.

JIANG, G. F; ZHUANG, Z. X; LIU, Q. Z; HE, Y; DU, L. T. (2003). "[Effects of hydroquinone on DNA and nucleus damage in human embryo lung fibroblasts]." Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, v.37, n.3, p.183-185.

JIN, S; SATO, N. (2003). "Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear Pyrus spp." Phytochemistry, v.62, n.1, p.101-107.

JOHNSON, E. S; LANGARD, S; LIN, Y. S. (2007). "A critique of benzene exposure in the general population." The Science of the total environment, v.374, n.2-3, p.183-198.

KASTAN, M. B; BARTEK, J. (2004). "Cell-cycle checkpoints and cancer." Nature v.432, n.7015, p.316-323.

KEENAN, J. J; GAFFNEY, S. H; GALBRAITH, D. A; BEATTY, P; PAUSTENBACH, D. J. (2010). "Gasoline: a complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure?" Chemico-biological interactions, v.184, n.1-2, p.293-295.

KETTLE, A. J; WINTERBOURN, C. C. (1992). "Oxidation of Hydroquinone by Myeloperoxidase - Mechanism of Stimulation by Benzoquinone." Journal of Biological Chemistry, v.267, n.12, p.8319-8324.

KHALEQUZZAMAN, M; KAMIJIMA, M; SAKAI, K; HOQUE, B. A; NAKAJIMA, T. (2010). "Indoor air pollution and the health of children in biomass- and fossil-fuel users of Bangladesh: situation in two different seasons." Environmental health and preventive medicine, v.15, n.4, p.236-243.

KIM, B. Y; KIM, K. A; KWON, O; KIM, S. O; KIM, M. S; KIM, B. S; OH, W. K; KIM, G. D; JUNG, M; AHN, J. S. (2005). "NF-kappaB inhibition radiosensitizes Ki-Ras-transformed cells to ionizing radiation." Carcinogenesis, v.26, n.8, p.1395-1403.

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-kappaB binding activity." Immunology Letters, v.99, n.1, p.24-29.

KIM, H. J; LEE, H. S; CHONG, Y. H; KANG, J. L. (2006). "p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates LPS-induced NF-kappa B activation in the development of lung injury and RAW 264.7 macrophages." Toxicology, v.225, n.1, p.36-47.

KIM, Y. J; WOO, H. D; KIM, B. M; LEE, Y. J; KANG, S. J; CHO, Y. H; CHUNG, H. W. (2009). "Risk assessment of hydroquinone: differential responses of cell growth and lethality correlated to hydroquinone concentration." Journal of toxicology and environmental health. Part A, v.72, n.21-22, p.1272-1278.

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 Research, v.53, n.5, p.1023-1026.

KUBALA, L; PODBORSKA, M; SEVCIKOVA, A; TRNA, J; DITE, P; LOJEK, A. (2009). "Increased markers of oxidative stress in plasma of patients with chronic pancreatitis." Neuroendocrinology Letters, v.30, p.116-120.

KULIGOWSKI, M. P; KWAN, R. Y; LO, C; WONG, C; JAMES, W. G; BOURGES, D; OOI, J; D; ABEYNAIKE, L. D; HALL, P; KITCHING, A. R; HICKEY, M. J. (2009). "Antimyeloperoxidase antibodies rapidly induce alpha-4-integrin-dependent glomerular neutrophil adhesion." Blood, v.113, n.25, p.6485-6494.

KUWANO, Y; SPELTEN, O; ZHANG, H; LEY, K; ZARBOCK, A. (2010). "Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils." Blood, v.116, n.4, p.617-624.

LAUKOETTER, M. G; NAVA, P; LEE, W. Y; SEVERSON, E. A; CAPALDO, C. T; BABBIN, B. A; WILLIAMS, I. R; KOVAL, M; PEATMAN, E; CAMPBELL, J. A; DERMODY, T. S; NUSRAT, A; PARKOS, C. A. (2007). "JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo." The Journal of experimental medicine, v.204, n.13, p.3067-3076.

LEANDERSON, P. and TAGESSON, C. (1990). "Cigarette smoke-induced DNA-damage: role of hydroquinone and catechol in the formation of the oxidative DNA-adduct, 8-hydroxydeoxyguanosine." Chemico-Biological Interactions, v.75, n.1, p.71-81.

LEANDERSON, P; TAGESSON, C. (1992). "Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals and endonuclease activation." Chemico-Biological Interactions, v.81, n.1-2, p.197-208.

LEE, H. S; KIM, H. J; MOON, C. S; CHONG, Y. H; KANG, J. L. (2004). "Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase or extracellular signal-regulated kinase improves lung injury." Respiratory Research, v.5, n.23.

LEE, H. S; KIM, H. J; MOON, C. S; CHONG, Y. H; KANG, J. L. (2007). "Src tyrosine kinases mediate activations of NF-kappaB and integrin signal during lipopolysaccharide-induced acute lung injury." Journal of Immunology, v.179, n.10, p.7001-7011.

LEE, J. Y; KIM, J. Y; LEE, Y. G; SHIN, W. C; CHUN, T; RHEE, M. H; CHO, J. Y. (2007). "Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses." Molecules and cells, v.23, n.2, p.198-206.

LI, Y; SEACAT, A; KUPPUSAMY, P; ZWEIER, J. L; YAGER, J. D; TRUSH, M. A. (2002). "Copper redox-dependent activation of 2-tert-butyl(1,4)hydroquinone: formation of reactive oxygen species and induction of oxidative DNA damage in isolated DNA and cultured rat hepatocytes." Mutation Research, v.**518, n.**2, p.123-133.

LIANG, C; HUANG, C. F; CHEN, Y. J. (2008). "Potential for activated persulfate degradation of BTEX contamination." Water Research, v,42, n.15, p.4091-4100.

LIEBNER, S; CAVALLARO, U; DEJANA, E. (2006). "The multiple languages of endothelial cell-to-cell communication." Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, v.26, n.7, p.1431-1438.

LIU, S. F; YE, X. B; MALIK, A. B. (1999). "Inhibition of NF-kappa B activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents in vivo expression of proinflammatory genes." Circulation, v.100, n.12, p.1330-1337.

LOPES, L. R; DAGHER, M. C; GUTIERREZ, A; YOUNG, B; BOUIN, A. P; FUCHS, A; BABIOR, B. M. (2004). "Phosphorylated p40PHOX as a negative regulator of NADPH oxidase." Biochemistry, v.43, n.12, p.3723-3730.

LOUREIRO, A. P. M., DI MASCIO, P., et al. (2002). "Exocyclic DNA adducts: Implications in mutagenesis and carcinogenesis." Quimica Nova, v.25, n.5, p.777-793.

LOUREIRO, A. P; MARQUES, S. A; GARCIA, C. C; DI MASCIO, P; MEDEIROS, M. H. (2002). "Development of an on-line liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay to quantitatively determine 1,N-2-etheno-2'-deoxyguanosine in DNA." Chemical Research in Toxicology, v.15, n.10, p.1302-1308.

LUO, B. H; CARMAN, C. V; SPRINGER, T. A. (2007). "Structural basis of integrin regulation and signaling." Annual Review of Immunology, v.25, p.619-647.

MACEDO, S. M; LOURENCO, E. L; BORELLI, P; FOCK, R. A; FERREIRA, J. M., JR; FARSKY, S. H. (2006). "Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response." Toxicology, v.220, n.2-3, p.126-135.

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

MATTILA, P. E; GREEN, C. E; SCHAFF, U; SIMON, S. I; WALCHECK, B. (2005). "Cytoskeletal interactions regulate inducible L-selectin clustering." American journal of physiology. Cell physiology, v.289, n.2, p.C323-332.

MCGREGOR, D. (2007). "Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties." Crit Rev Toxicol 37(10): 887-914.

MEDINSKY, M. A., KENYON, E. M., et al. (1995). "Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions." Toxicology 105(2-3): 225-233.

MESTAS, J; LEY, K. (2008). "Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis." Trends Cardiovasc Med 18(6): 228-232.

MICHALOWICZ, J. and MAJSTEREK, I. (2010). "Chlorophenols, chlorocatechols and chloroguaiacols induce DNA base oxidation in human lymphocytes (in vitro)." Toxicology 268(3): 171-175.

MICHEL, F., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., et al. (2008). "[Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]." Ann Biol Clin (Paris) **66**(6): 605-620.

MIEAN, K. H; MOHAMED, S. (2001). "Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants." J Agric Food Chem 49(6): 3106-3112.

MIZEJEWSKI, G. J. (1999). "Role of integrins in cancer: survey of expression patterns." Proc Soc Exp Biol Med 222(2): 124-138.

MONIUSZKO, A., LUCZAJ, W., et al. (2011). "Lipid peroxidation products as potential bioindicators of Lyme arthritis." European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases **30**(3): 415-422.

MONKS, T. J., ZHANG, F. J., et al. (2011). "The Cytoprotective Effect of N-acetyl-L-cysteine against ROS-Induced Cytotoxicity Is Independent of Its Ability to Enhance Glutathione Synthesis." Toxicological Sciences **120**(1): 87-97.

MOORE, K. and ROBERTS, L. J., 2ND (1998). "Measurement of lipid peroxidation." Free Radic Res **28**(6): 659-671.

MORI, K., SHIBANUMA, M., et al. (2004). "Invasive potential induced under long-term oxidative stress in mammary epithelial cells." Cancer Res **64**(20): 7464-7472.

MOSSMAN, B. T. (2003). "Introduction to serial reviews on the role of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) in lung injury and diseases." Free Radic Biol Med **34**(9): 1115-1116.

NAIK, U. P., NAIK, M. U., et al. (2001). "Characterization and chromosomal localization of JAM-1, a platelet receptor for a stimulatory monoclonal antibody." J Cell Sci 114(Pt 3): 539-547.

NEWMAN, P. J. (1997). "The biology of PECAM-1." J Clin Invest 100(11 Suppl): S25-29.

NGUYEN, T. N., BERTAGNOLLI, A. D., et al. (2005). "Characterization of a deoxyguanosine adduct of tetrachlorobenzoquinone: dichlorobenzoquinone-1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine." Chem Res Toxicol 18(11): 1770-1776.

NICHOLS, J. A. and KATIYAR, S. K. (2010). "Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms." Arch Dermatol Res 302(2): 71-83.

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

NOURSHARGH, S., KROMBACH, F., et al. (2006). "The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues." J Leukoc Biol 80(4): 714-718.

O'NEILL, I. and RIBOLI, E. (1987). "IARC approaches to monitoring exposure of passive smoking." Toxicol Lett 35(1): 29-33.

ORR, Y., TAYLOR, J. M., et al. (2007). "Conformational. activation of CD11b without shedding of L-selectin on circulating human neutrophils." Journal of Leukocyte Biology 82(5): 1115-1125.

PAREDES-LOPEZ, O., CERVANTES-CEJA, M. L., et al. (2010). "Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life--a review." Plant Foods Hum Nutr 65(3): 299-308.

PATEL, R. R., RYU, J. H., et al. (2008). "Cigarette smoking and diffuse lung disease." Drugs 68(11): 1511-1527.

PETRI, B. and BIXEL, M. G. (2006). "Molecular events during leukocyte diapedesis." FEBS J 273(19): 4399-4407.

PIFER, J. W., HEARNE, F. T., et al. (1995). "Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone." Int Arch Occup Environ Health 67(4): 267-280.

PRIVRATSKY, J. R., NEWMAN, D. K., et al. (2010). "PECAM-1: conflicts of interest in inflammation." Life Sci 87(3-4): 69-82.

Rampart, M. (1994) Neutrophil-endothelial cell interactions. In: Brain, S.D. (ed) The Handbook of Immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation. Ed., San Diego, Academic Press: 77-107.

RAHMAN, I., BISWAS, S. K., et al. (2006). "Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols." Biochem Pharmacol 72(11): 1439-1452.

RAO, R. M., YANG, L., et al. (2007). "Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall." Circ Res 101(3): 234-247.

RODRIGUEZ, B., YANG, Y., et al. (2010). "Benzene-derived N2-(4-hydroxyphenyl)-deoxyguanosine adduct: UvrABC incision and its conformation in DNA." Toxicol Lett 193(1): 26-32.

ROSE, D. M., ALON, R., et al. (2007). "Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration." Immunol Rev 218: 126-134.

RUIZ-RAMOS, R., CEBRIAN, M. E., et al. (2005). "Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells." Toxicology **209**(3): 279-287.

SADOK, A., PIERRES, A., et al. (2009). "NADPH oxidase 1 controls the persistence of directed cell migration by a Rho-dependent switch of alpha2/alpha3 integrins." Mol Cell Biol **29**(14): 3915-3928.

SCHYMEINSKY, J., MOCSAI, A., et al. (2007). "Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications." Thromb Haemost 98(2): 262-273.

SEVERSON, E. A. and PARKOS, C. A. (2009). "Structural determinants of Junctional Adhesion Molecule A (JAM-A) function and mechanisms of intracellular signaling." Curr Opin Cell Biol 21(5): 701-707.

SHEPPARD, F. R., KELHER, M. R., et al. (2005). "Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation." J Leukoc Biol **78**(5): 1025-1042.

SIXT, M., BAUER, M., et al. (2006). "Beta1 integrins: zip codes and signaling relay for blood cells." Curr Opin Cell Biol 18(5): 482-490.

SMALLEY, D. M. and LEY, K. (2005). "L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage." J Cell Mol Med 9(2): 255-266.

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.

SOMMERS, C. H. and SCHIESTL, R. H. (2006). "Effect of benzene and its closed ring metabolites on intrachromosomal recombination in Saccharomyces cerevisiae." Mutat Res 593(1-2): 1-8.

SPERANDIO, M. (2006). "Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo." FEBS J 273(19): 4377-4389.

SPERTINI, O. (1996). "[Regulation of leukocyte migration by adhesion molecules]." Schweiz Med Wochenschr 126(45): 1926-1934.

SVARCOVA, I., HEINRICH, J., et al. (2007). "Berry fruits as a source of biologically active compounds: the case of Lonicera caerulea." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 151(2): 163-174.

TAKADA, Y., YE, X., et al. (2007). "The integrins." Genome Biol 8(5): 215.

TAKEUCHI, O. and AKIRA, S. (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." Cell 140(6): 805-820.

TAYSSE, L., TROUTAUD, D., et al. (1995). "Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (Cyprinus carpio)." Toxicology 98(1-3): 207-214.

TERASAKA, H., MORSHED, S. R., et al. (2005). "Hydroquinone-induced apoptosis in HL-60 cells." Anticancer Res **25**(1A): 161-170.

THAVARAJAH, P. and LOW, N. H. (2006). "Adulteration of apple with pear juice: emphasis on major carbohydrates, proline, and arbutin." J Agric Food Chem 54(13): 4861-4867.

TIBURTIUS, E. R. L., PERALTA-ZAMORA, P., et al. (2004). "Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites." Quimica Nova 27(3): 441-446.

TOZLOVANU, M., FAUCET-MARQUIS, V., et al. (2006). "Genotoxicity of the hydroquinone metabolite of ochratoxin A: structure-activity relationships for covalent DNA adduction." Chem Res Toxicol 19(9): 1241-1247.

TRIANTAFILOU, M. and TRIANTAFILOU, K. (2005). "The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors." J Endotoxin Res 11(1): 5-11.

VARKONYI, A., KELSEY, K., et al. (2006). "Polyphenol associated-DNA adducts in lung and blood mononuclear cells from lung cancer patients." Cancer Lett 236(1): 24-31.

VESTWEBER, D. (2007). "Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium." Immunol Rev 218: 178-196.

WARD, P. A. (1997). "Recruitment of inflammatory cells into lung: Roles of cytokines, adhesion molecules, and complement." Journal of Laboratory and Clinical Medicine 129(4): 400-404.

WEBER, C., FRAEMOHS, L., et al. (2007). "The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation." Nat Rev Immunol 7(6): 467-477.

WEISEL, C. P. (2010). "Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings." Chemico-Biological Interactions 184(1-2): 58-66.

WESTERHOF, W. and KOOYERS, T. J. (2005). "Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk." J Cosmet Dermatol 4(2): 55-59.

WHITWORTH, K. W., SYMANSKI, E., et al. (2011). "Kriged and modeled ambient air levels of benzene in an urban environment: an exposure assessment study." Environ Health **10**(1): 21.

WHYSNER, J., REDDY, M. V., et al. (2004). "Genotoxicity of benzene and its metabolites." Mutat Res 566(2): 99-130.

WIEDLE, G., DUNON, D., et al. (2001). "Current concepts in lymphocyte homing and recirculation." Crit Rev Clin Lab Sci 38(1): 1-31.

WOJCIKIEWICZ, E. P., KOENEN, R. R., et al. (2009). "LFA-1 Binding Destabilizes the JAM-A Homophilic Interaction During Leukocyte Transmigration." Biophysical Journal 96(1): 285-293.

WOODFIN, A., VOISIN, M. B., et al. (2007). "PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology." Arterioscler Thromb Vasc Biol 27(12): 2514-2523.

WORTHYLAKE, R. A. and BURRIDGE, K. (2001). "Leukocyte transendothelial migration: orchestrating the underlying molecular machinery." Current Opinion in Cell Biology 13(5): 569-577.

WU, W. S. (2006). "The signaling mechanism of ROS in tumor progression." Cancer Metastasis Rev **25**(4): 695-705.

YANG, E. J., LEE, J. S., et al. (2011). "The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils." Toxicol In Vitro **25**(1): 131-137.

YUSUF-MAKAGIANSAR, H., ANDERSON, M. E., et al. (2002). "Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases." Med Res Rev 22(2): 146-167.

Zaha A, Ferreira HB, Passaglia LMP. (2003) Biologia Molecular Básica. 3ª edição, PortoAlegre: Mercado Aberto.

ZHAO, Z., HE, X., et al. (2009). "Induction of CYP4F3 by benzene metabolites in human white blood cells in vivo in human promyelocytic leukemic cell lines and ex vivo in human blood neutrophils." Drug Metab Dispos 37(2): 282-291.

ZHONG, L. F., LUO, L. H., et al. (2008). "Hydroquinone-induced genotoxicity and oxidative DNA damage in HepG2 cells." Chemico-Biological Interactions **173**(1): 1-8.

Anexos

8.1 Ficha do Aluno

Ficha do Aluno https://janus.usp.br/janus/alunoGeral/ficha/fichaDoAlunoParaImpressao.jsf

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9141 - 6726185/1 - Andre Luiz Teroso Ribeiro

Email:	altribeiro@usp.br
Data de Nascimento:	27/12/1985
Cédula de Identidade:	
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2009

Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	03/02/2009
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2009
Data Limite:	03/08/2011
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 03/02/2009 até o presente. E.Mail: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 21/10/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 22/11/2010
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 03/02/2009 Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011
Impresso em: 04/04/11 17:05:51

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9141 - 6726185/1 - Andre Luiz Teroso Ribeiro

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/2	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/03/2009	30/06/2009	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5755-1/1	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	01/04/2009	05/05/2009	60	4	80	A	N	Concluída
FBC5746-2/2	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	19/05/2009	29/06/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5752-1/3	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	02/06/2009	06/07/2009	45	0	0	-	N	Turma cancelada
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC-0520 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (1)	01/07/2009	30/11/2009	-	3	0	-	-	-
FBC5802-2/2	Tópicos Avançados em Toxicologia I	17/08/2009	29/11/2009	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5752-2/1	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	21/08/2009	24/09/2009	45	3	100	A	N	Concluída
6045842-1/1	Escola de Altos Estudos em Toxicologia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	30/11/2009	13/12/2009	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	28
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

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

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

8.2 Currículo lattes

André Luiz Teroso Ribeiro

Possui graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista (2008). Atualmente é mestrando no Programa de Pós Graduação da Universidade de São Paulo no departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

(Texto informado pelo autor)

Última atualização em 17/03/2011

Endereço para acessar este CV:
http://lattes.cnpq.br/4163660610117459

Dados Pessoais

Nome André Luiz Teroso Ribeiro

Filiação Luiz Carlos Ribeiro e Clarisse Teroso Ribeiro

Nascimento 27/12/1985 - Cândido Mota/SP - Brasil

Carteira de Identidade

CPF

Formação Acadêmica/Titulação

2009 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Caracterização dos efeitos da exposição à hidroquinona sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado
Orientador: Sandra Helena Poliselli Farsky
Áreas do conhecimento : Análise Toxicológica

2004 - 2008 Graduação em Farmácia e Bioquímica.
Universidade Paulista, UNIP, Sao Paulo, Brasil
Título: nenhum

Formação complementar

2009 - 2009 Escola de Altos Estudos em Toxicologia.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

2006 - 2006 Curso de curta duração em Técnicas de Administração de Farmacos.
Universidade Paulista, UNIP, Sao Paulo, Brasil

2005 - 2005 Curso de curta duração em Diagnostico de Parasitoses.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2009 - Atual Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Aluno, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

06/2009 - 12/2009 Extensão Universitária, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Especificação:
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) Monitoria na disciplina Analises Toxicológicas (FBC0520) sob supervisão do Prof. Ernani Pinto Jr..

02/2009 - Atual Outra atividade técnico-científica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Especificação:
Participação no projeto caracterização dos efeitos da exposição à hidroquinona sobre o recrutamento leucocitário para o pulmão inflamado

2. Universidade Paulista - UNIP

Vínculo institucional

2004 - 2008 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Acadêmico, Regime: Dedicação Exclusiva

Atividades

08/2005 - 08/2006 Estágio, Campus Assis

Estágio:
Monitoria na disciplina de Anatomia dos Sistemas nos cursos de Nutrição, Farmácia e Bioquímica, Enfermagem, Fisioterapia

Idiomas

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

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., Lino dos Santos Franco, A., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Effects of hydroquinone inhalation on functions of tracheal tissue In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2010. v.46. p.43 - 43
Palavras-chave: Alveolar, Phagocitic, Macrophages
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [http://www.bjps.br]

2. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Effects of hydroquinone inhalation on secretion of trachea cells In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona.
Toxicology Letters. , 2010. p.34 -
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS, Trachea
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Espanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

3. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
In vivo hydroquinone exposure affects leukocyte recruitment and adhesion molecules expression on LPS inflamed lung In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 2010. v.46. p.59 - 59
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digitalHome page: [http://www.bjps.br]

4. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
INHALED HYDROQUINONE AFFECTS LEUKICYTE RECRUITMENT INTO LUNG AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION In: XII International Congress of Toxicology, 2010, Barcelona.
Toxicology Letters. , 2010. p.33 - 34
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Espanha/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

5. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Effects of Inhalation of Hydroquinone on Lung Leukocyte Recruitment Induced by LPS In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêticas da USP, 2009. v.45. p.25 - 25
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

6. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Effects of Inhalation of Hydroquinone on Phagocitic and Fungicidal Activities on Alveolar Macrophages In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.

Brazilian Journal of Toxicology. São Paulo: Sociedade Brasileira de Toxicologia, 2009. v.22. p.220 - 220
Palavras-chave: Alveolar, Phagocitic, Macrophages, hydroquinone
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso

7. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., SILVA, P. C. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Inhalation of Hydroquinone Impairs LPS-Induced Leukocyte Migration to the Lung In: 41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, 2009, Ribeirão Preto.
41º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. Ribeirão Preto: , 2009.
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital

8. RIBEIRO, A. L. T.
Estudo da Incidencia de Entereparasitoses na Cidade de Cândido Mota - Estado de São Paulo In: X Encontro de Iniciação Cientifica - UNIP, 2008, São Paulo.
VIII Encontro Cientifico / X Encontro de Iniciação Cientifica INIP/PIBIC - CNPq. São Paulo: Equipe Educação Digital - UNIP, 2008.
Palavras-chave: enteroparasitoses; incidência; Cândido Mota
Áreas do conhecimento : Parasitologia,Farmácia
Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

9. CONTE, A. C., RIBEIRO, A. L. T., ARAUJO, J., MONTEQUESE, A.
PARASITOSES INTESTINAIS EM ESCOLARES: Ocorrência e Campanhas Educativas In: EBBA VII Encontro de Biociencias e biotecnologia, 2005, Assis.
CD de divulgação do EBBA. , 2005.
Áreas do conhecimento : Farmácia,Parasitologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Apresentação de Trabalho

1. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., Lino dos Santos Franco, A., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
EFFECTS OF HYDROQUINONE INHALATION ON FUNCTIONS OF TRACHEAL TISSUE, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Trachea, Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: ImpressoHome page: http://www.supfabusp.com.br/; Local: FCF-USP; Cidade: São Paulo; Evento: XLV SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA; Inst.promotora/financiadora: FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - USP

2. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., Lino dos Santos Franco, A., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
Effects of Hydroquinone Inhalation on Functions of Tracheal Tissue, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Trachea, Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Ribeirão Preto; Evento: 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental; Inst.promotora/financiadora: SBFTE

3. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
EFFECTS OF HYDROQUINONE INHALATION ON SECRETION OF TRACHEA CELLS, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS, Trachea
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Home page: http://gestion.pacifico-meetings.com/www/iutox2010/index.html; Cidade: Barcelona; Evento: XII International Congress of Toxicology; Inst.promotora/financiadora: INTERNATIONAL UNION OF TOXICOLOGY

4. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., BOLONHEIS, S. M., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
IN VIVO HYDROQUINONE EXPOSURE AFFECTS LEUKOCYTE RECRUITMENT AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION ON LPS INFLAMED LUNG, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: ImpressoHome page: http://www.supfabusp.com.br/; Local: FCF-USP; Cidade: São Paulo; Evento: XLV SEMANA UNIVERSITÁRIA PAULISTA DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA; Inst.promotora/financiadora: FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - USP

5. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
INHALED HYDROQUINONE AFFECTS LEUKOCYTE RECRUITMENT INTO LUNG AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Imunologia,Toxicologia,Farmacologia
Referências adicionais : Espanha/Inglês. Meio de divulgação: ImpressoHome page: www.iutox2010.org; Cidade: Barcelona; Evento: XII International Congress of Toxicology; Inst.promotora/financiadora: International Union of Toxicology (IUTOX)

6. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., LIMA, P. C. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
EFFECTS OF INHALATION OF HYDROQUINONE ON LUNG LEUKOCYTE RECRUITMENT INDUCED BY LPS, 2009. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Farmacologia,Toxicologia,Imunologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Cidade: São Paulo; Evento: Simpósio Anual de Pesquisas em Ciencias; Inst.promotora/financiadora: Universidade de São Paulo

7. RIBEIRO, A. L. T., SHIMADA, A. L. B., HEBEDA, C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
EFFECTS OF INHALATION OF HYDROQUINONE ON PHAGOCYTIC AND FUNGICIDAL ACTIVITIES ON ALVEOLAR MACROPHAGES, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Alveolar, Phagocitic, Macrophages, Hidroquinone
Áreas do conhecimento : Farmacologia,Toxicologia,Imunologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local: Minas Centro; Cidade: Belos Horizonte; Evento: xvi congresso brasileiro de toxicologia; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Toxicologia

8. SHIMADA, A. L. B., RIBEIRO, A. L. T., LIMA, P. C. B., TAVARES DE LIMA, W., FARSKY, S. H. P.
INHALATION OF HYDROQUINONE IMPAIRS LPS-INDUCED LEUKOCITE MIGRATION TO THE LUNG, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Lung,Leukocyte, Hydroquinone, LPS
Áreas do conhecimento : Toxicologia,Farmacologia,Imunologia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Centro de Eventos de Ribeirão Preto; Cidade: Ribeirão Preto; Evento: 41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental; Inst.promotora/financiadora: SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL

9. RIBEIRO, A. L. T., DECLEVA, D.V. L., CONTE, A. C., Ludwig, K. M.
Estudo da Incidencia de Entereparasitoses na Cidade de Cândido Mota - Estado de São Paulo, 2008. (Conferência ou palestra,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: enteroparasitoses; incidência; Cândido Mota
Áreas do conhecimento : Parasitologia
Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Universidade Paulista; Cidade: Assis; Evento: I Semana Cientifica da Area da Saúde; Inst.promotora/financiadora: Universidade Paulista

10. RIBEIRO, A. L. T., CONTE, A. C., Ludwig, K. M.
Estudo da Incidencia de Entereparasitoses na Cidade de Cândido Mota - Estado de São Paulo, 2008. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: enteroparasitoses; incidência; Cândido Mota
Áreas do conhecimento : Parasitologia
Setores de atividade : Saúde e Serviços Sociais
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Campus Indianópolos; Cidade: São Paulo; Evento: X Encontro de Iniciação Cientifica UNIP; Inst.promotora/financiadora: Universidade Paulista

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLV SUPFAB - Semana universitária Paulista de farmácia e Bioquímica**, 2010. (Congresso)
IN VIVO HYDROQUINONE EXPOSURE AFFECTS LEUKOCYTE RECRUITMENT AND ADHESION MOLECULES EXPRESSION ON LPS INFLAMED LUNG.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **IUTOX - XII International Congress of Toxicology**, 2010. (Congresso)
INHALED HYDROQUINONE EFFECTS ON LEUKOCYTE RECRUITMENT INTO THE LUNG AND ADHESION MOLECULES FROM CIRCULATING BLOOD.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências**, 2009. (Simpósio)
EFFECTS OF INHALATION OF HYDROQUINONE ON LUNG LEUKOCYTE RECRUITMENT INDUCED BY LPS.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia**, 2009. (Congresso)
EFFECTS OF INHALATION OF HYDROQUINONE ON PHAGOCYTIC AND FUNGICIDAL ACTIVITIES ON ALVEOLAR MACROPHAGES.

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **41 Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapeutica Experimental**, 2009. (Congresso)
INHLATION OF HYDROQUINONE IMPAIRS LPS-INDUCED LEUKOCYTE MIGRATION TO THE LUNG.

6. **ESCOLA DE ALTOS ESTUDOS EM TOXICOLOGIA**, 2009. (Outra)
.

7. Apresentação Oral no(a) **I Semana Cientifica da Area da Saúde**, 2008. (Simpósio)
Estudo da Incidencia de Entereparasitoses na Cidade de Cândido Mota - Estado de São Paulo.

8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Semana da Saúde**, 2007. (Outra)
Parasitoses Intestinais em escolares: Ocorrência e Campanhas Educativas.

9. **XV Congresso Paulista de Farmacêuticos e VII Seminário Internacional de Farmacêuticos**, 2007. (Congresso)
.

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **PARASITOSES INTESTINAIS EM ESCOLARES: Ocorrência e Campanhas Educativas**, 2005. (Congresso)
EBBA VII Encontro de Biociência e Biotecnologia.

11. Apresentação Oral no(a) **I JORNADA INTEGRADA DA SAÚDE**, 2005. (Encontro)
PARASITOSES INTESTINAIS EM ESCOLARES: Ocorrência e Campanhas Educativas.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos	9
Apresentações de Trabalhos (Conferência ou palestra)	1
Apresentações de Trabalhos (Congresso)	7
Apresentações de Trabalhos (Simpósio)	1
Apresentações de Trabalhos (Outra)	1

Eventos

Participações em eventos (congresso)	6
Participações em eventos (simpósio)	2
Participações em eventos (encontro)	1
Participações em eventos (outra)	2

Outras informações relevantes

1 1) Vice-Representante discente dos alunos de pós-graduacao do Programa de Análises Clinicas e Toxicológicas na Faculdade de Ciencias Farmaceuticas da Universidade de Sao Paulo. Período: Janeiro 2010 - Janeiro 2011.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 04/04/2011 às 17:15:47.

8.3 Certificado do comitê de ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comissão de Ética em Experimentação Animal - CEEA

Ofício CEEA/FCF nº 53/2008

CERTIFICADO

*Certificamos que o Projeto "**Efeitos da exposição 'in vivo' à hidroquinona sobre a resposta inflamatória aguda: Caracterização dos mecanismos de ação**" (Protocolo CEEA nº196), de responsabilidade da pesquisadora **Profa. Sandra Helena Poliselli Farsky**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) desta Faculdade, em 13/10/2008.*

São Paulo, 13 de outubro de 2008.

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

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

8.4 Artigo submetido para publicação n.1

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

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

[1] Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

[2] Laboratory of Exposure Markers to Xenobiotics; Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo

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

[4] Department of Pharmacology, Bioscience Institute, University of São Paulo

*The authors contributed similarly in this paper.

Corresponding author: Sandra Helena Poliselli Farsky[1]

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

Telephone: +55 11 3091-1193

Fax number: +55-11-3815-6593

Email: sfarsky@usp.br

Abstract

Hydroquinone (HQ) is an environmental contaminant with important detrimental effects on immune cells. In this study the effects of low doses of HQ exposure on neutrophil mobilization into the LPS-inflamed lung has been investigated. Male Swiss mice were exposed to aerosolized vehicle (control) or 12.5, 25 or 50 ppm HQ (1 hour/day/5 days). One hour after, animals were or not inflamed by LPS

inhalation (0.1 mg/ml/10 min) and three hours later, the oxidative burst, cellular cycle and DNA fragmentation in circulating neutrophils were determined by flow cytometer; plasma malondialdehyde (MDA) levels were measured by HPLC; the number of circulating leukocytes and in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were quantified using Neubauer chamber and stained smears; adhesion molecules expressions on circulating neutrophils and lung microvessels endothelial cells were quantified by flow cytometry and immunohistochemistry, respectively; myeloperoxidase (MPO) activity was measured in the pulmonary tissue by colorimetric assay; cytokines in the BALF were determined by ELISA. *In vivo* HQ exposure augmented plasma MDA levels and oxidative activity of neutrophils, but did not cause alterations on cellular cycle and DNA fragmentation. In this condition, the number of circulating leukocytes was not altered, but HQ exposure reduced LPS-induced neutrophil migration into the alveolar space, as these cells were maintained in the pulmonary tissue. The HQ toxic effect did not depend on impairment on cytokines secretions in the BALF and lung endothelial adhesion molecules expressions. However, HQ exposure elevated β_2 and β_3 integrins and platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expressions in neutrophils, which were not further enhanced by fMLP *in vitro* stimulation, indicating that HQ exposure activates circulating neutrophils, impairing further stimulatory responses. Therefore, it has been shown, for the first time, the target action of lower levels of *in vivo* HQ exposure in specific pathways of circulating neutrophils activation, which may be considered in infectious diseases host defense.

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

1 Introduction

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

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

As HQ is promptly absorbed by respiratory tract and derma, gaining access to other compartments, as bone marrow, it easily interacts with circulating immune cells. The HQ actions on different leukocytes types *in vitro* have shown impairment on secretory functions which are essential during an *in vivo* inflammatory response (Lee et al., 2010; Cho, 2008; Choi et al., 2008). Leukocyte-endothelial interactions are the initial and fundamental events to the leukocyte migration into an

inflammatory focus. This highly coordinated process depends on sequential expressions of selectins, integrins and immunoglobulin superfamily molecules. These molecules are expressed on leukocytes and endothelial cells, which control rolling behavior, adherence and transmigration of circulating cells into the inflammatory focus (Wong et al., 2010; Ley et al., 2007). Vascular, metabolic, immune diseases, as well as environmental and occupational pollutants can modify the physiological pattern of adhesion molecules expression leading to altered host defense (Khan et al., 2010; Barreiro et al., 2010; Etzioni et al., 2010; Lino-dos-Santos-Franco et al., 2010).

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

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

2 Materials and Methods

2.1 Reagents

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

2.2 Animals

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

2.3 HQ exposure

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

2.4 Levels of HQ in the exposure box

HQ concentrations in the exposure box were quantified accordingly to the NIOSH protocol Nº 5004. Briefly, a cassette containing a 0.8 µm cellulose ester membrane was placed on the bottom of the exposure box. The cassette was linked to a sampling pump (A. P. BUCK inc., model VSS5. Orlando, Fl, USA) and the air in the exposure box was captured in a flow rate of 2 l/min, during one hour. After that, the cassette was opened and the cellulose ester membrane was removed and placed in a bottle containing 10 ml of glacial acetic acid 1%. Twenty four hours later, the membrane was washed 3 times with 5 ml of glacial acetic acid 1% and the fluid resulting from washing was added to the initial volume of glacial acetic acid 1% (10 ml). HQ concentration levels were analyzed by high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD). The analytical system consisted of a Shimadzu HPLC (Kyoto, Kansai, Japan) equipped with two LC-20AT pumps, a CTO-10AS/VP column oven, a PDA-20AV diode array detector, an Proeminence SIL-20AC auto sampler, controlled by a CBM-20A communication module. The following chromatography condition was used for the analyses. A 250 x 4,6 mm ID, 5 µm C18 column (Phenomenex, Torrance, CA) with a C18 security guard cartridge, 4.0 x 3.0 mm (Phenomenex, Torrance, CA), was eluted in isocratic mode with a mobile phase consisting of glacial acetic acid 1% in water and 10 % acetonitrile at a flow rate of 1 ml/min and 30°C. The diode array detector was set at 290 nm for quantification of HQ. Calibration curves were constructed at intervals of 0 to 500 ng of HQ. The data were acquired and processed using LC-Solution Software (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). All solvents used were previously filtered (cellulose acetate membrane filter 5 µm – Millipore) and degassed.

2.5 Induction of LPS lung inflammatory reaction

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

2.6 Blood leukocytes

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

2.7 Bronchoalveolar lavage (BALF) and cell counts

BALF was collected from vehicle or HQ exposed animals to determine the number of migrated leukocytes and concentrations of cytokines. Briefly, the trachea was exposed and cannulated with a polyethylene tube and the lung washed by flushing with phosphate buffered saline solution (PBS; 0.1 mM NaCl, 3 mM NaH_2PO_4, 7mM Na_2HPO_4; 2 ml). The volumes recovered were similar in all experimental groups and equated to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in a Neubauer chamber and differential cell counts were carried out on cytocentrifuge (Cytospin; Fanen, Sao Paulo, SP, Brazil) and subsequently stained with Panotico®.

2.8 Myeloperoxidase (MPO) activity

Pulmonary tissue obtained from vehicle or HQ exposed animals was homogenized in 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB, 1 ml/50 mg of tissue). The homogenates were maintained at 60° C during 2 h and then centrifuged (9,300 × g, 2 min). The supernatant (10 µl) was

added to ortho-dianisidine solution (200 μl). The kinetic activity of MPO was determined on spectrophotometer at 460 nm based on velocity of ortho-dianisidine oxidation product formation. Results are presented as MPO units per milligram of tissue.

2.9 Adhesion molecules expression

2.9.1 Immunohistochemistry

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

2.9.2 Flow cytometry

Leucocytes collected from blood of the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify L-selectin, β_2-integrin, β_3-integrin and PECAM-1 expression. Briefly, erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13M) to the samples and leukocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). To quantify the expression of adhesion molecules, leukocytes (1×10^5) were incubated for 20 to 60 minutes in the dark at 4° C with 10 μl of monoclonal antibody (L-selectin conjugated with FITC; β_2 or β_3-integrin conjugated with FITC or PECAM-1 conjugated with PE). After that, the cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results are presented as arbitrary units of fluorescence.

2.10 Malondialdehyde (MDA) levels

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

2.11 ROS generation

Leukocytes collected from blood from the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify oxidative burst. Intracellular ROS was measured by using a non fluorescent probe, 2',7'-dichlorfluorescein-diacetate (DCFH-DA) that can penetrate into the intracellular matrix of cells where it is oxidized by ROS to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) (Elbim and Lizard, 2009). Erythrocytes were lysed by adding ammonium chloride solution (0.13M) to the samples, and leukocytes were recovered after washing with PBS. Fluorescent dye DCFH-DA (340 µM; diluted in PBS) was added to 2 x 10^5 cells in a final volume of 1.1ml. Cells were maintained at 37°C for 30 min and rinsed with EDTA (3 mM; 2 ml) to remove the excess dye. Cells were ressuspended with

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

2.12 Cellular cycle and DNA fragmentation

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

2.13 Statistical Analyses

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

3 Results

3.1 Concentration of HQ into the exposure chamber

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

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

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

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

In vivo HQ exposure at 12.5, 25 or 50 ppm did not modify the number of circulating leukocytes after LPS challenge. The number of neutrophils and mononuclear cells was equivalent in vehicle and HQ exposed animals (Table 1). Normal values of polymorphonuclear leukocytes (PMN) in mice blood are around 15-20%, which is highly enhanced after acute inflammation. This pattern of response was here detected in both groups of animals, indicating that neutrophil mobilization from storage compartments is not affected by HQ exposure. It is noteworthy that PMN and mononuclear

cells (MN) values in vehicle and HQ exposed animals (Table 1) must be compared in the same concentration exposure, as assays were performed on different days and mice total leukocyte numbers range about 3,500 to 6,000 mm^3.

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

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

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

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

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

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

On the other hand, HQ exposure affected the expression of adhesion molecules in circulating neutrophils in the absence of inflammatory stimulus. While L-selectin expression was not altered by HQ intoxication (Figure 6A), levels of β_2 and β_3 integrins and PECAM-1 were significantly enhanced in neutrophil membranes (Figures 6B, C and D, respectively). In addition, levels of L-selectin, β_2 and β_3

integrins and PECAM-1 were enhanced after *in vitro* fMLP stimulation in neutrophil obtained from vehicle exposed animals. Differently, these enhancements were not observed in neutrophils collected from HQ exposed mice (Figures 6B, C and D, respectively).

4 Discussion

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

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

In vitro HQ exposure causes oxidative damage in different cell types, including leukocytes, and DNA lesion is an out coming effect (Ji et al., 2009; Várkoni et al., 2006; Gaskell et al., 2005a; 2005b; Gaskell et al., 2004). The mechanism is based on HQ biotransformation into semiquinones via redox cycling which induces ROS production, including superoxide radical anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide ($NO^{\bullet}$) and hydroxyl radical ($OH^{\bullet}$) (Winn et al., 2003). Here we have demonstrated that even low concentrations of *in vivo* aerosolized HQ exposure evoked activation of oxidative pathways, as measured by MDA plasma levels and ROS production by circulating cells. Nevertheless, oxidative stress was not accompanied by DNA fragmentation and cell cycle changes.

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

Neutrophil migration into inflamed areas depends on a diversity of chemical mediators secreted by resident and migrated cells into inflammatory site, and by membrane receptors expressed on leukocytes and endothelial cells (Ley et al., 2007). While cytokines display pleiotropic actions, adhesion molecules exert specific actions on pathways of leukocyte migration. E and P-selectins mediates the fundamental and initial leukocyte interaction on endothelium, the subsequent expression of ICAM-1 and VCAM-1 mediates the cell firm adhesion and PECAM-1 expression is responsible for the leukocyte transmigration into the inflamed tissue (Borregaard, et al., 2010; Ley et al., 2007). In our model, *in vivo* HQ exposure did not affect secretory activity of inflammatory

resident cells and the adhesive functions of the microvascular endothelium. Of the interest, synthesis of cytokines and endothelial adhesion molecules depends on nuclear factor κB (NF-κB) transcriptional activation (Lawrence, 2009), and although inhibitory action on this pathway is involved in the BZ and HQ toxicity (Choi et al., 2008; Ma et al., 2003; Kerzic et al., 2003), it seems to be not related to HQ actions on lung resident or endothelial cells.

Interestingly, *in vivo* HQ exposure markedly enhanced integrins and PECAM-1 expressions on circulating neutrophils, which, respectively, mediates the firm leukocyte adhesion to the vessel wall and transmigration (Ley et al., 2007). These surprisingly data may be implicated in the HQ toxicity, as integrins and PECAM-1 quiescent expressions in the absence of inflammatory diseases are pivotal to homeostasis and for mounting the host defense (Borregaard, et al., 2010; Ley et al., 2007). Elevated levels of circulating β2 and β3 integrins and PECAM-1 molecules, which may be the result of higher membrane expressions and/or subsequent cleavage, are found in artherosclerosis, diabetes, cancer and others (Mousa, 2008). Integrin membrane expressions on neutrophil depend on gene synthesis, via activation of NF-κB or activating protein-1 (AP-1) transcription factors (Borregaard, 2010); and PECAM-1 membrane levels are determined by membrane cleavage, re-internalization and gene synthesis (Privratsky et al, 2010; Garnacho et al., 2008). Considering that mice have low number of neutrophils into the blood, it is not possible to extract mRNA and nuclear proteins to elucidate the mechanisms of *in vivo* HQ exposure on adhesion molecule expressions.

Adhesion molecules mediate adhesive interactions between cells and activate intracellular signaling. In this context, PECAM-1 and integrin activation are involved on NO production via eNOS stimulation and superoxide generation, respectively (Privratsky et al., 2010; Zarbock and Ley, 2009; Fleming et al, 2005). Therefore, elevated integrins and PECAM-1 expressions may be determined by a direct action of HQ on cell membranes or indirectly by increasing the ROS production. In fact, it has been clearly demonstrated that ROS induces adhesion molecules expression on diverse types of cells (Sadok et al., 2009; Dworakowski et al., 2008; Wu, 2006; Mori et al., 2004). Specifically, H_2O_2 is able to induce β integrins expressions on epithelial cells, contributing to the modifications on its

phenotype (Mori et al., 2004). In the current study we have shown that HQ exposure induced adhesion molecules expressions and ROS generation in neutrophils, which, in association, may render a state of inactivation in response to a second stimulus. In fact, here it has been shown that *in vitro* fMLP stimulation did not induce increment on adhesion molecule expressions on cells obtained from HQ animals. Therefore, it is possible to infer that this mechanism of HQ action may be relevant to the impaired mounting of the acute inflammatory reaction here detected in the lung after LPS inhalation. It is difficult to be sure if HQ is acting directly on adhesion molecule expression or via ROS production or whether both mechanisms occur simultaneously. This assumption needs further investigation.

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

5 References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Fleming, I., Fisslthaler, B., Dixit, M., Busse, R., 2005. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. J. Cell Sci. 118, 4103-4111.

Garnacho, C., Albelda, S.M., Muzykantov, V.R., Muro, S., 2008. Differential intra-endothelial delivery of polymer nanocarriers targeted to distinct PECAM-1 epitopes. J. Control. Release 130, 226-233.

Gaskell, M., McLuckie, K.I., Farmer, P.B., 2004. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites, hydroquinone and para-benzoquinone in the supF forward mutation assay: a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity. Mutat. Res. 554, 387-398.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lee, J.Y., Lee, Y.G., Lee, J., Yang, K.J., Kim, A.R., Kim, J.Y., Won, M.H., Park, J., Yoo, B.C., Kim, S., Cho, W.J., Cho, J.Y., 2010. Akt Cys-310-targeted inhibition by hydroxylated benzene derivatives is tightly linked to their immunosuppressive effects. J. Biol. Chem. 285, 9932-9948.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

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

Figures and table

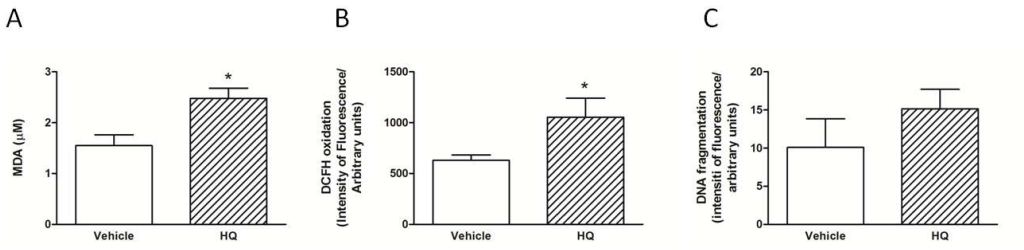

Fig.1. Effects of HQ exposure on cellular oxidative biomarkers. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Plasma was used to quantify MDA levels (HPLC) and leukocytes were recovery to determine ROS generation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

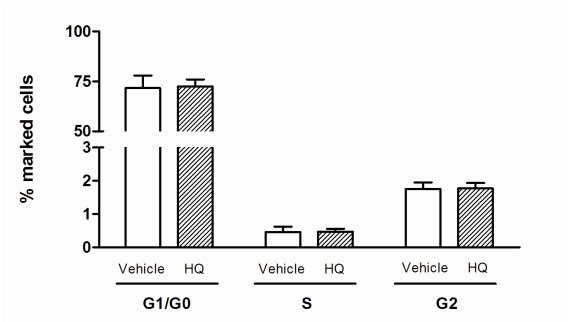

Fig. 2. Effects of HQ exposure on cellular cycle. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Leukocytes were recovery to determine cellular cycle by flow cytometry. Results are expressed as the mean± s.e.m. of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

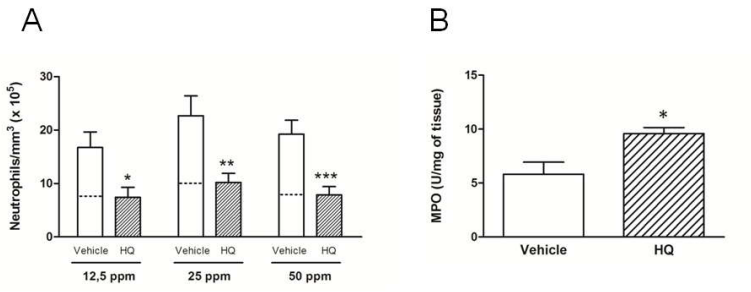

Fig. 3. Effects of HQ exposure on leukocyte migration into the BALF and MPO activity in the lung tissue. The animals were exposed to vehicle or HQ (12.5, 25 or 50 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and the number of neutrophils was quantified using Neubauer chamber and stained smears (A). In sequence, lungs were collected and used to quantify MPO activity by o-dianisidine-H_2O_2 assay (B). The dotted line indicates neutrophil counts of vehicle and non inflamed exposed animals. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001 vs. respective control.

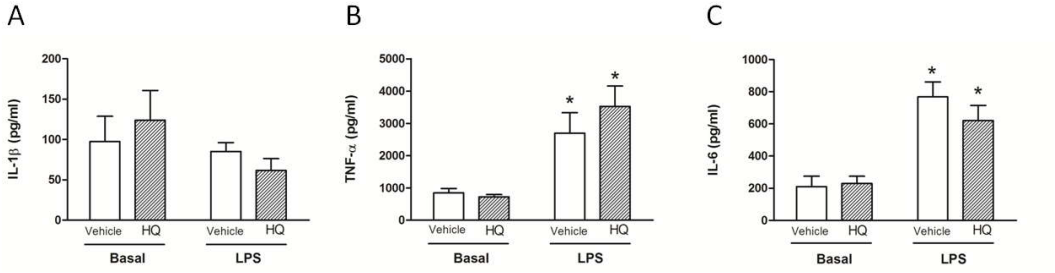

Fig. 4. Effects of HQ exposure on IL-1β, TNF-α and IL-6 levels into the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were or not exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and levels of cytokines were quantified by ELISA. Results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

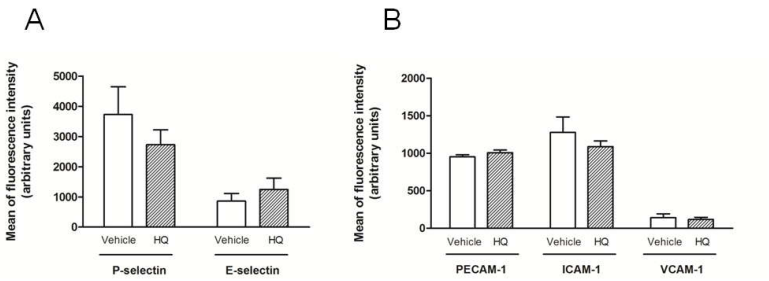

Fig. 5. Effects of HQ exposure on adhesion molecules expression on lung microvascular endothelium. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, lung was collected and used to determine expression of E-selectin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

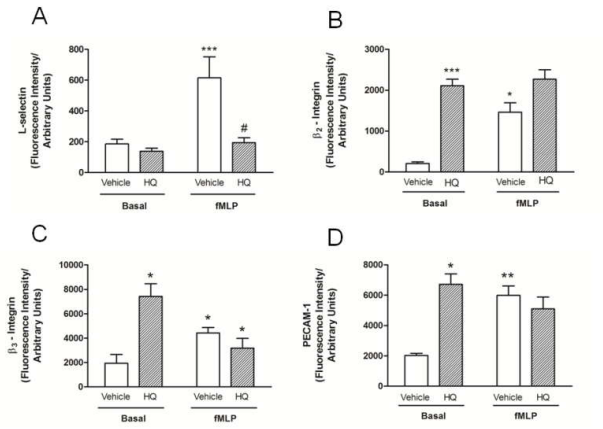

Fig. 6. Effects of HQ exposure on adhesion molecules expressions on neutrophils membranes. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later blood was collected from the abdominal aorta. Expressions of L-selectin (A), β_2 integrin (B), β_3 integrin (C) and PECAM-1 (D) were quantified on neutrophil membranes in the absence (basal) or presenœ of fMLP *in vitro* (10^{-9}M) by flow cytometry. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals in each group. *P<0.05, **P<0.01 and **P<0.01 vs. respective basal values; [a]P<0.05 vs. respective control stimulated with fMLP.

Leucogram (leukocytes/mm^3)				
HQ concentration	Vehicle		HQ	
	PMN	MN	PMN	MN
12.5 ppm	2108 ± 189.1	1432 ± 170.4	2534 ± 290.6	1663 ± 235.4
25 ppm	1978 ± 420.7	2737 ± 356.7	1884 ± 357.0	3358 ± 542.9
50 ppm	3214 ± 277.9	856.3 ± 173.2	4143 ± 397.8	1194 ± 255.3

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

8.5 Draft do artigo para publicação n.2

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

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

[1]Laboratory of Experimental Toxicology, Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo
[2]Department of Pharmacology, Bioscience Institute, University of São Paulo

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

Abstract

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

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

1. ***Introduction***

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

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

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

It has been clearly demonstrated that HQ causes different degrees of toxicity to the immune cells, and immune responses mediated by mononuclear (MN) cells seem to be the most affected (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Choi et al., 2008). The toxicity has been related to the impairment on MN functions, fundamental for an efficient inflammatory response. In this context, HQ has shown inhibited secretion of several cytokines as tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1α, IL-1β, IL-6, IL-12 and other mediators such as nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) by MN/macrophages (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Choi et al., 2008; Kim et al., 2005; Carbonnelle et al., 1995). In addition, HQ reduced cell-cell adherence mediated by the integrins CD29 and CD18 and phagocytic uptake mediated by the co-stimulatory molecules CD80 and CD86. *In vitro* but not *in vivo* HQ exposure inhibited lymphocyte proliferation from bone marrow and spleen (Lee et al., 2007; Cho, 2008; Macedo et al. 2007, Kim et al., 2005). This broad spectrum of immunosuppressive effects has been associated to the HQ inhibition on NF-κB. The role of HQ on MCP-1 production has recently observed. *In vitro* HQ exposure inhibited MCP-1 secretion via transcriptional modification by human retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 (Pons and Marin-Castaño, 2011).

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

2. *Material and Methods*

2.1 Chemicals

Lipopolisaccharide (LPS) from Escherichia coli (serotype 026:B6), N-Formyl-methionyl-leucil-phenylalanine (fMLP), hydroquinone 99% were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); human MCP-1 from eBioscience (San Diego, CA, USA); Rat IFN-γ Recombinant was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA, USA); all RT-PCR reagents were purchased from Promega Corporation (Madison, WI, USA); MCP-1 ELISA kit and antibodies anti-L-selectin, anti-β_2 or β_3-integrin and anti-PECAM-1 from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA).

2.2 Animals

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

2.3 Protocols of exposure

2.3.1 In vivo HQ exposure

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

2.3.2 In vivo LPS exposure

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

2.3.3 In vitro HQ exposure

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

2.4 Blood and Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) collection

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

2.5 Adhesion molecules expression

Leukocytes collected from blood of the abdominal aorta of vehicle or HQ exposed mice were employed to quantify L-selectin, β_2-integrin, β_3-integrin and PECAM-1 expression. Briefly, erythrocytes were lysed by addition of ammonium chloride solution (0.13 M) to the samples and leukocytes were recovered after washing with Hank's balanced salt solution (HBSS). Leukocytes (1 x 10^5) were stimulated or not with fMLP (10^{-9}M, 1 h) and to quantify the expression of adhesion molecules, they were incubated for 20 to 60 minutes in the dark at 4 ^oC with monoclonal antibody (L-selectin, β_2 or β_3-integrin conjugated with FITC or PECAM-1 conjugated with PE). After that, the cells were analyzed in a FACS Calibur flow cytometer (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Data from 10,000 events were obtained and only the morphologically viable leukocytes were considered for analysis. Results were presented as arbitrary units of fluorescence.

2.6 Alveolar macrophages culture

One hour after the last vehicle or HQ exposure, the BALF was collected and resident alveolar macrophages (AM) were isolated, as following. Total cells (1 x 10^5 /well) were placed in a 24-well plastic microplate containing RPMI-1610 medium supplemented with 10% of fetal bovine serum during 3h to allow adherence. Then, non-adherent cells were removed by washing with culture medium and adhered cells were stimulated or not with LPS (1 μg/ml) and IFN-γ (10 ng/ml) and incubated at 37 ^oC, 5% CO_2, for 24 hours. The supernatant was collected to determine the concentrations of MCP-1.

2.7 Ex vivo trachea culture

One hour after the last vehicle or HQ exposure, the animals were anaesthetized and killed by sectioning the abdominal aorta. The trachea was collected and placed in a 24-well plastic microplate containing DMEM medium (2 ml) containing 40 mg/L of gentamicin. The tissue was incubated in the absence or presence of LPS (1 μg/ml) and maintained at 37 ^oC, 5% CO_2, during 24 hours. The supernatant was collected to determine concentrations of MCP-1.

2.8 MPC-1 levels quantification

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

2.9 Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

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

cDNA was synthesized from total RNA (2 μg) using an oligo$(dT)_{15}$ primer (20 μg/ml) after incubation (70 ^oC, 5 min) in the presence of deoxynucleotide triphosphate mixture (dNTP, 2 mM), ribonuclease inhibitor (20 U) and Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (200 U) in reverse transcriptase buffer (25 μL final volume). The reverse transcription occurred by incubation at 42 ^oC (60 min). For PCR, the cDNA obtained was incubated with Taq DNA Polymerase (2.5 U), 3'- and 5'- specific primers (0.4 μM) and dNTP mix (200 μM) in buffer-thermophilic DNA polymerase containing $MgCl_2$ (1.5 mM). The following primer sequences were used: β_2-microglobulin (internal control): 5´-CATGGCTCGCTCGGTGACC-3´ (forward) and 5´-AATGTGAGGCGGGTGGAACTG-3´ (reverse), MCP-1: 5´-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3´ (forward) and 5´-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3´ (reverse).

2.10 In vitro chemotaxis

2.10.1 THP-1 cell culture

Human monocytic leukaemia cell line, THP-1 cells, were cultivated in suspension in RPMI-1640 medium containing 10% FBS, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 μg/ml) at 37 °C in 5% CO_2.

2.10.2 Boyden chamber

THP-1 cell migration was evaluated in a 48-well Boyden chamber with the top and bottom wells separated by cellulose filters (8 μm pore size, Milipore). As chemotactic stimuli, solutions using recombinant human MCP-1 were prepared in RPMI culture medium at concentrations mimicking MPC-1 levels found in the supernatant of *ex vivo* control or HQ exposure tracheal tissue (0.1 or 0.9 ng/ml, respectively). LPS (10 μg/ml) was added to MCP-1 solutions to counterfeit residual LPS present in the ex vivo cultures. MCP-1/LPS solutions were added to the bottom wells. The THP-1 cells ($1x10^5$ cells/ml) were placed in the top wells. RPMI alone was used as negative control. Following an incubation period of 24 hours (37 °C; 5% CO_2), the filters were stained and the distance travelled by cells through the filters was counted in optic microscope.

2.11 Statistical analyses

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

3 Results

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

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

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

To verify whether reduced cell migration into the BALF was caused by alterations on adhesion molecules expressions of circulating MN cells, flow cytometry assay was employed. However, *in vivo* HQ 25ppm exposure did not modify the expression of the adhesion molecules, L-selectin, β2 integrin, β3 integrin and PECAM-1 in circulating MN cells in the absence or presence of fMLP (Figura 3).

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

To clarify the mechanisms by which HQ impairs MN cell migration to the BALF, its actions on MCP-1 secretion by lung/BALF cells were investigated. *In vivo* HQ 25ppm exposure impaired MCP-1 levels on BALF (Figure 4). Data was *ex vivo* confirmed as reduced MCP-1 levels were observed in the

supernatant of AM and tracheal tissue from HQ-exposed animals in the absence or presence of stimulus (Figure 5A and B). This effect seems to be related to a lower MCP-1 mRNA content in tracheal tissue after HQ exposure (Figure 5C).

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

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

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

Discussion

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

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

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

To study the mechanisms related to the reduced MN cell migration, a screening of inflammatory cytokines secreted in the BALF was performed and the HQ actions on TNF-α, IL-1β, IL-6 and IL-10 secretions were ruled out (data not shown). Interestingly, diminished levels of MCP-1 were found

into the BALF after LPS inflammation. The effect was dependent on functional alterations on resident macrophages and tracheal tissue as reduced MCP-1 levels were found in the supernatant of these cultured cells. Since a limited number of alveolar macrophages is found into the BALF of mice and HQ exposure also reduced this number, it was performed RT-PCR assay only on tracheal tissue which demonstrated that MCP-1 reduction was defined by impaired gene synthesis. HQ directly modulates MCP-1 secretion as reduced levels of this cytokine were also detected when naïve MN cells and tracheal tissue were in vitro incubated with HQ. Recently, it was demonstrated that *in vitro* HQ exposure reduced MCP-1 secretion by human neutrophils by unknown mechanism (Yang et al., 2010).

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

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

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

5 References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Imricha, A. et al. 2007. Alveolar macrophage cytokine response to air pollution particles: oxidant mechanisms. Toxicol Appl Pharmacol. 218, 256–264.
Lee, J.Y. et al., 2007. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, reduces macrophage-mediated immune responses. Mol Cells. 23, 198-206.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6 *Conflict of interest*

The authors declare that there are no conflicts of interest.

7 Acknowledgment

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

Legend for figures

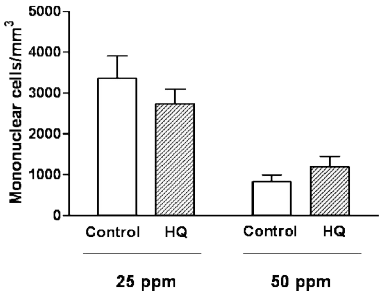

Fig. 1. Effects of HQ exposure on the number of circulating mononuclear leukocytes after LPS stimulation. The animals were exposed to vehicle or HQ (50 or 25ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10min). Three hours later, blood was collected from the abdominal aorta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

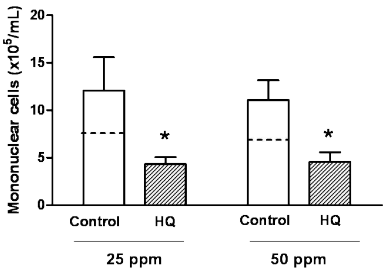

Fig. 2. Effects of HQ in vivo exposure on mononuclear leukocyte migration into the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (50 or 25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and the number of mononuclear cells was quantified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

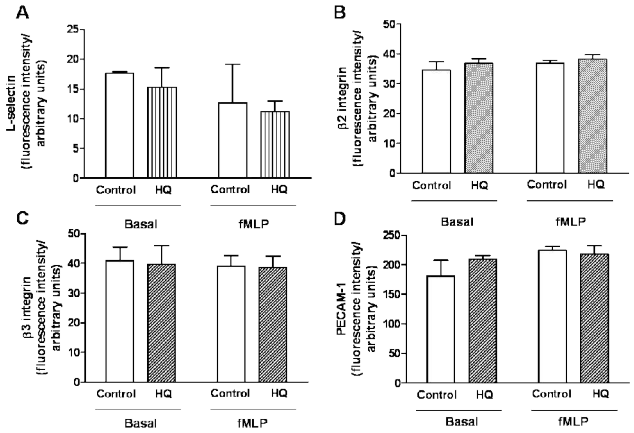

Fig.3. Effects of HQ exposure on adhesion molecules expressions on mononuclear cells membranes. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and three hours later, blood was collected from the abdominal aorta. Expressions of L-selectin (A), β_2 integrin (B), β_3 integrin (C) and PECAM-1 (D) were quantified on mononuclear cells membranes in the absence (basal) or presence of fMLP in vitro (10^{-9}M), by flow cytometry. Results are expressed as the mean ± s.e.m. of data obtained from samples collected from five animals.

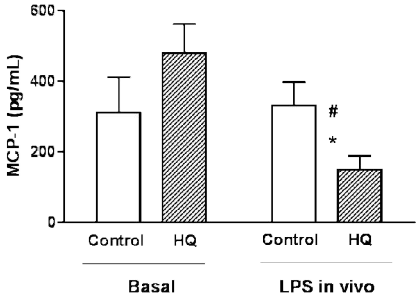

Fig.4. Effects of HQ exposure on MCP-1 levels in the BALF. The animals were exposed to vehicle or HQ (25 ppm; 1h/day; 5 days) and after 1 h they were or not exposed to LPS (0.1 mg/ml; 10 min). Three hours later, BALF was collected and levels of MCP-1 were quantified by ELISA. Results are expressed as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

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

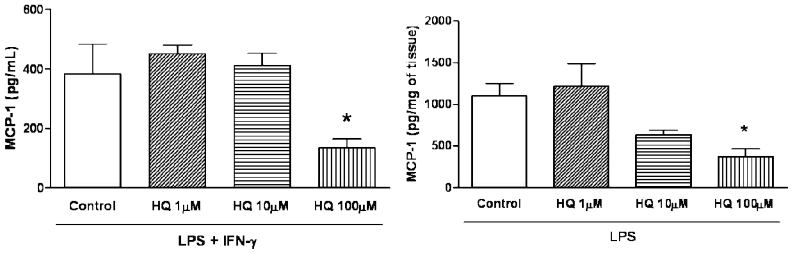

Fig.6. Effects of *in vitro* HQ exposure on MCP-1 concentration in AM and trachea culture supernatants. The trachea and AM from naïve animals were incubated with 1, 10 and 100 µM of HQ from 1 hour. Levels of MCP-1 were quantified by ELISA on supernatants of these cultures. Results are expressed as the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

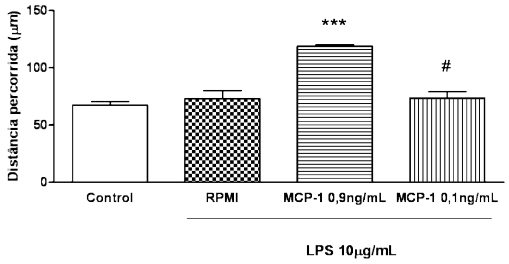

Fig.7. Effects of MCP-1 on THP-1 chemotaxis. THP-1 cells (1 x 10^5) were incubated in Boyden chamber for 24 hours (37°C; 5% CO_2). As chemotatic stimuli were used human MCP-1 (0.1 and 0.9 ng/ml) and/or LPS (10 µg/ml). The distance travelled by the cells was quantified by optical microscopy. The results are expressed as the mean ± s.e.m. of 2 independent experiments. ***P<0.001 vs control (RPMI alone); $^{\#}$P<0.05 vs MCP-1 (0.9 ng/ml + LPS 10 µg/ml).