

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

ANTONIO GARCIA SOARES JÚNIOR

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NAFTOQUINONA SOBRE A
FUNÇÃO VASCULAR E CARDÍACA: PAPEL DOS CANAIS IÔNICOS RECEPTORES DE
POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)**

SÃO PAULO

2018

ANTONIO GARCIA SOARES JÚNIOR

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRECOCE AO POLUENTE 1,2-NAFTOQUINONA SOBRE A
FUNÇÃO VASCULAR E CARDÍACA: PAPEL DOS CANAIS IÔNICOS RECEPTORES DE
POTENCIAL TRANSITÓRIO (TRP)**

Versão Original

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Soraia Kátia Pereira Costa

São Paulo

2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Soares Júnior, Antonio Garcia

Efeito da exposição precoce ao poluente 1,2-naftoquinona sobre a função vascular e cardíaca: papel dos canais irônicos receptores de potencial transitório (TRP) / Antonio Garcia Soares Júnior; orientadora Soraia Kátia Pereira Costa. -- São Paulo, 2019.

116 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. átrio direito. 2. artéria mesentérica. 3. artéria pulmonar. 4. 1,2-naftoquinona. I. Costa, Soraia Kátia Pereira, orientador. II. Título.

Nome: SOARES JR., Antonio Garcia

Título: Efeito da Exposição Precoce ao Poluente 1,2-Naftoquinona sobre a Função Vascular e Cardíaca: Papel dos Canais Iônicos Receptores de Potencial Transitório (TRP)

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "***Efeito da exposição neonatal ao poluente ambiental 1,2-naftoquinona na inflamação pulmonar e função cardiovascular em camundongos: papel do dimorfismo sexual, dos receptores de potencial transiente (TRP), toll 4 (TLR4) e da apolipoproteína (APO-E)***", registrado sob o protocolo nº **48/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/08/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Soraia Katia Pereira Costa**

- Departamento: *Farmacologia*

- Membros da Equipe: *Charliston Alves da Cunha (Iniciação Científica), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Pós-Graduando), Simone Aparecida Teixeira (Técnico de laboratório), Leandro Rodrigues (Pós-graduando), Karla Barroso Feitosa (Pós-Graduando), Flávia Neto de Jesus (Pós-graduando), Letícia Zorante de Lucena (Iniciação Científica), Lucia Rossetti Lopes (Pesquisador Colaborador), Marcelo Nicolás Muscará (Pesquisador Colaborador), Antonio Garcia Soares Jr (Pós-Graduando), Juliana Florenzano Martorelli (Pós-Graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "***Effect of neonatal exposure to the ambiente pollutant 1,2-naphthoquinone in the lung inflammation and cardiovascular function in mice: role of sexual dimorphism, transient receptors potential channels (TRP), toll 4 receptors (TLR4) and apolipoprotein (APO)***", protocol nº **48/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/8/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Soraia Katia Pereira Costa**

- Team members: *Charliston Alves da Cunha (Undergraduate Student), Anderson Romério Azevedo Cerqueira (Graduate Student), Simone Aparecida Teixeira (Laboratory Technician), Leandro Rodrigues*

(Graduate Student), Karla Barroso Feitosa (Graduate Student), Flávia Neto de Jesus (Graduate Student), Leticia Zorante de Lucena (Undergraduate Student), Lucia Rossetti Lopes (Colaborator Researcher), Marcelo Nicolás Muscará (Colaborator Researcher), Antonio Garcia Soares Jr (Graduate Student), Juliana Florenzano Martorelli (Graduate Student)

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	C57BL/6	Macho/male	2-15 g	60
	C57BI/6 KO APO-E	Macho/male	2-15 g	42
	C57BL/6	Fêmea/female	2-15 g	60
	C57BI/6 KO Toll 4 (TLR4)	Macho/male	2-15 g	20

São Paulo, 08 de junho de 2016.



Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha querida Jaqueline Soares, companheira sempre presente e prestativa, me apoiando e incentivando em todos os momentos.

Aos meus pais Antônio e Ironilda, por todo o apoio e dedicação.

Aos meus irmãos Sara (*in memoriam*), Aníbal e Sandra.

Muitíssimo obrigado por fazerem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que tem me permitido realizar nessa vida de aprendizado.

À minha orientadora e “chefa” Dra. Soraia pela oportunidade, orientação, constante incentivo e pela confiança. Serei eternamente grato por tudo.

Ao Prof. Marcelo Muscará pelas orientações, oportunidade de trabalho com muito apoio, muito jazz e heavy metal.

À Profa. Susan Brain pelo apoio e oportunidade de intercâmbio no King’s College.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, minha segunda casa e onde construí uma carreira profissional repleta de muitas conquistas.

Aos grandes amigos de ICB: Super Simon, Tia Irene, Cida (Conheeeeeeeeece), Rosângela “My Friéndy”, Sônia, Guiomar, Manuel, Moacir, Carmen, Diana, Larissa, Sidney e muitos outros que de alguma forma fizeram parte dessa caminhada!

Às secretárias do Departamento de Farmacologia Camila, Mônica, Rosa e Larissa.

Aos alunos e colegas de laboratório: Leandro, Anderson, Silvia, Carol, Flávia, Tuanny, Leonardo, Juliana, Elly, Gabriel, Marcella, Caíque, Mariana(s)!, Sibebe, Charles, Andreia, Mayrine, Karla Maná e muitos outros !!!

Aos meus irmãos de jornada da 84a Turma da EAE do Grupo Socorrista Maria de Magdala, todos vocês fazem parte dessa conquista!!!

Aos colegas do Cabra Xadrez que sempre me apoiaram e estiveram sempre presentes nos torneios.

Aos coleguinhas felinos Luke e Alaska.

São muitos os agradecimentos a tantas pessoas queridas que faltariam páginas para expressar minha gratidão.

E, finalmente, um agradecimento especialmente aos músicos Chick Corea, Mike Stern, Jaco Pastorius, Pat Metheny, Steve Morse, Allan Holdsworth e muitos outros, já que sem música não haveria tese!!!

"Do or do not. There is no try!"

Jedi Master Yoda

Resumo

A poluição do ar ambiente (PAA) e do material particulado ($MP_{2,5}$) estão sendo associados à efeitos adversos na saúde, embora pouco se sabe sobre os efeitos de PAA contaminantes do MP, como a 1,2-naftoquinona (1,2-NQ). Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito *in vitro* e da exposição inalatória precoce da 1,2-NQ sobre a função atrial e cardiovascular (CV) de camundongos, além de investigar potenciais mecanismos, com ênfase em receptores de potencial transitório (TRP). No átrio direito (AD) isolado de camundongos, a adição *in vitro* da 1,2-NQ elevou a frequência atrial (FA) espontânea e reduziu o cronotropismo positivo frente a agonistas β -adrenérgico, sendo este revertido pelo bloqueio de receptores β_1 . Na artéria mesentérica (AM) ou pulmonar (AP) de camundongos selvagens, a 1,2-NQ causou vasoconstricção concentração-dependente, que foi abolida na AM do animal KO TRPA1, e exacerbada pelo bloqueio do TRPV1 (capsazepina; CPZ) e TRPV4 (HC-067047). Na AP de animais selvagens e KO para TRPV1 e TRPA1, a 1,2-NQ reduziu o relaxamento evocado por acetilcolina (ACh). Na AM, a 1,2-NQ reduziu a sensibilidade (pD_2) a ACh, sendo este efeito abolido na AM de animais KO TRPA1 e inalterada em KO TRPV1. No AD de animais expostos a 1,2-NQ, a FA (pD_2) frente a NE foi reduzida, sendo este efeito revertido pelo bloqueio do TRPV1, e exacerbado pelo antagonista TRPV4. No AD desses animais, a FA (E_{max}) frente a NE foi reduzida pelo bloqueio do TRPC5, ML-204, e observou-se um aumento na expressão (RNAm) dos receptores HCN4, TRPA1, TRPV1, β_2 e β_3 , mas não de canais/proteínas envolvidas na homeostase do Ca^{2+} (ex.: RyR2, Serca2a, Cav1.2). Na AP destes, observou-se aumento $P < 0,05$ da expressão (RNAm) para o fator Nrf2, sendo este efeito potencializado pelo bloqueio do TRPV1. Camundongos expostos a 1,2-NQ não apresentaram alterações na pressão arterial caudal, mas exibiram alterações nos parâmetros RR, SDRR, RMSSD, LF/HF do ECG, e na sensibilidade (PD_2) a fenilefrina (FE) e ACh na AP isolada. O bloqueio dos TRPV1 e TRPV4 exacerbou o efeito da FE e inibiu a resposta da ACh, respectivamente, na AP de animais expostos a 1,2-NQ, e estimulou a fibrilação atrial frente a ouabaína. Em conclusão, estes resultados mostram, pela primeira vez, o potencial molecular dos receptores TRP (TRPV1) e β_1 nas alterações funcionais em AD e sistema CV murino frente a adição *in vitro* ou exposição neonatal *in vivo* a 1,2-NQ, revelando a vulnerabilidade da idade aos efeitos adversos da 1,2-NQ. Estes achados funcionais e moleculares servem ainda como indicadores de susceptibilidade ao desencadeamento de disfunções CV frente a 1,2-NQ.

Palavras-chave: átrio direito, artéria mesentérica, artéria pulmonar, 1,2-naftoquinona.

Abstract

Environmental air pollution (EAP) and particulate matter (PM_{2.5}) are being associated with adverse health effects, although little is known about the effects of PM contaminant EAP, such as 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). The objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect and early inhalation exposure of 1,2-NQ on atrial and cardiovascular (CV) function of mice, in addition to investigating potential mechanisms, with emphasis on transient potential receptors (TRP). In the right atrium (RA) isolated from mice, *in vitro* 1,2-NQ addition increased the spontaneous atrial frequency (AF) and reduced the positive chronotropism to β -adrenergic agonists, which was reversed by β 1 receptor blockade. In the mesenteric (MA) or pulmonary (PA) arteries of wild mice, 1,2-NQ caused concentration-dependent vasoconstriction, which was abolished in MA of KO TRPA1 animal, and exacerbated by TRPV1 (capsazepine; CPZ) and TRPV4 (HC-067047). In wildtype PA and KO for TRPV1 and TRPA1, 1,2-NQ reduced acetylcholine evoked relaxation (ACh). In MA, 1,2-NQ reduced the sensitivity (pD₂) to ACh, and this effect was abolished in MA of TRPA1 KO animals and unchanged in TRPV1 KO. In RA of animals exposed to 1,2-NQ, FA (pD₂) evoked by NE was reduced; such effect was reversed by TRPV1 blockade, and exacerbated by the TRPV4 antagonist. In RA of these animals, FA (E_{max}) evoked by NE was reduced by TRPC5 blockade, ML-204, and an increase in the expression (mRNA) of the receptors HCN4, TRPA1, TRPV1, β 2 and β 3 was observed but not of channels / proteins involved in Ca²⁺ homeostasis (eg, RyR2, Serca2a, Ca_v1.2). In the PA of these, a significant increase of the expression (mRNA) for factor Nrf2 was observed, and this effect was potentiated by TRPV1 blockade. Mice exposed to 1,2-NQ had no changes in caudal blood pressure, but exhibited changes in RR, SDRR, RMSSD, LF/HF ECG parameters, and phenylephrine (Phe) and ACh sensitivity in PA. Blockade of TRPV1 and TRPV4 exacerbated the effect of Phe and inhibited ACh response, respectively, in the PA of animals exposed to 1,2-NQ, and stimulated atrial fibrillation in the ouabain-induced model. In conclusion, these results show, for the first time, the molecular potential of TRP receptors (TRPV1) and β 1 in functional alterations in RA and murine CV system *in vitro* incubation or *in vivo* neonatal exposure to 1,2-NQ, revealing the vulnerability of age to the adverse effects of 1,2-NQ. These functional and molecular findings also serve as indicators of susceptibility to the onset of CV dysfunctions elicited by 1,2-NQ.

Keywords: right atria, mesenteric artery, pulmonary artery, 1,2-naphthoquinone.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mortes atribuídas à exposição ambiental no ano de 2012.....	20
Figura 2 – Naftaleno a seu derivado 1,2-naftoquinona.....	22
Figura 3 – Estrutura dos canais TRP.....	35
Figura 4 – Fatores ativadores de canais TRP no músculo cardíaco.....	37
Figura 5 – Ilustração esquemática do delineamento experimental.....	44
Figura 6 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em átrio direito isolados de camundongos.....	54
Figura 7 – Curvas concentração-resposta em artérias mesentérica e pulmonar.....	56
Figura 8 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em artérias mesentérica e pulmonar de camundongos selvagens (WT) e nocautes para TRPA1.....	58
Figura 9 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em artérias pulmonar (A) e mesentérica (B) de camundongos selvagens (WT) e nocautes para TRP....	61
Figura 10 – Figura representativa das curvas concentração-resposta de 1,2-naftoquinona realizadas em artéria mesentérica de camundongos selvagens.....	62
Figura 11 – Figura representativa das curvas concentração-resposta de 1,2-naftoquinona realizadas em artéria pulmonar de camundongos selvagens.....	63
Figura 12 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para Nrf2 (A: AP e D: AM), TRPV1 (B: AP e E:AM) e TRPV4 (C: AP e F: AM) em artérias pulmonares e mesentéricas incubadas com 1,2-NQ (1 μ M, 1h).....	65
Figura 13 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para RyR2 (A), SERCA2a (B), PLB (C), HCN4 (D) e Ca _v 1.2 (E) em átrio direito de animais pré-tratados ou não com antagonista de TRPV1, CZP, expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal.....	67
Figura 14 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para TRPA1 (A), TRPV1 (B), TRPV4 (C) e Nrf2 (D) em átrio direito de animais pré-tratados ou não com antagonista de TRPV1, CZP, expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal.....	69
Figura 15 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para receptor adrenérgico tipo β 1 (A), β 2 (B), β 3 (C) em átrio direito de animais pré-tratados ou não com antagonista de TRPV1, CZP, expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal.....	71
Figura 16 – Pressão arterial caudal realizada em camundongos expostos à 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) ou ao veículo (VEH) na fase neonatal.....	72
Figura 17 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	74
Figura 18 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos pré-tratados ou não com capsazepina (CZP) e expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	75

Figura 19 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos pré-tratados ou não com HC-067047 e expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	77
Figura 20 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos pré-tratados ou não com ML-204 e expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	79
Figura 21 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas NE (A), SB (B), ISO (C), 1,2-NQ (D) e FK (E) realizadas em átrios direito isolados de camundongos.....	82
Figura 22 – Figura representativa da alteração na força de contração induzida por ouabaína (10^{-6} M) em átrios de animais expostos ao poluente 1,2-naftoquinona e ao veículo.....	84
Figura 23 – Figura representativa da alteração na força de contração induzida por ouabaína (10^{-6} M) e BPM em átrios de camundongos naïve.....	85
Figura 24 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em anéis de artérias pulmonares de camundongos pré-tratados com capsazepina e expostos ao 1,2-NQ durante a fase neonatal para os agonistas fenilefrina (A) e acetilcolina (B).....	86
Figura 25 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em anéis de artérias pulmonares de camundongos pré-tratados com HC-067047 e expostos ao 1,2-NQ durante a fase neonatal para os agonistas fenilefrina (A) e acetilcolina (B).....	87
Figura 26 – Esquema ilustrativo dos mecanismos de ação da 1,2-NQ.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Antagonistas de canais TRP e suas concentrações utilizadas.....	46
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real.....	49
Tabela 3 – Variáveis farmacológicas (EMax e pD ₂) avaliadas em função das curvas concentração-resposta para o agonista acetilcolina em AM e AP de animais naïve ou nocautes para TRPA1 incubados com a 1,2-NQ ou respectivo veículo.....	59
Tabela 4 – Variações farmacológicas (EMax e pD ₂) avaliadas em função das curvas concentração-resposta para acetilcolina em AM e AP de animais naïve ou nocautes para TRPV1 incubados com veículo ou 1,2-NQ.....	61
Tabela 5 – Parâmetros do ECG analisados em camundongos jovens anestesiados expostos ao poluente 1,2-NQ ou respectivo veículo na fase neonatal.....	73
Tabela 6 – Resposta máxima (EMax) e pD ₂ calculada das curvas obtidas com NE em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ (ou seu veículo) e tratados ou não com capsazepina na fase neonatal.....	76
Tabela 7 – pD ₂ calculada a partir das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com capsazepina.....	76
Tabela 8 – Resposta máxima (EMax) e pD ₂ calculadas a partir das curvas-concentração à NE em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com HC-067047.....	78
Tabela 9 – pD ₂ calculada das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com HC-067047.....	78
Tabela 10 – Resposta máxima (EMax) e pD ₂ calculadas a partir das curvas-concentração à NE em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com ML-204.....	80
Tabela 11 – pD ₂ calculada das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com ML-204.....	80
Tabela 12 – Resposta máxima (BPM) e pD ₂ calculada das curvas à NE, SB e ISO em átrio direito isolado de camundongos. Os tecidos foram expostos a 100 nmol de 1,2-NQ ou veículo (VEH).....	83

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Poluentes ambientais: considerações gerais	16
2. Justificativa	39
3. Objetivos	40
4. Material e Métodos	41
4.1. Soluções e Reagentes	41
4.1.1. <i>Preparo da solução do poluente 1,2-NQ</i>	41
4.1.2. <i>Preparo das soluções nutritivas empregadas na reatividade</i>	41
4.1.3. <i>Preparo dos fármacos empregados</i>	42
4.2. Animais e Ética Experimental	42
4.3. Delineamento Experimental <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	43
4.3.1 Tratamentos farmacológicos	43
4.4.1. <i>Padronização da reatividade vascular em artérias</i>	45
4.4.2. <i>Normalização das artérias</i>	45
4.4.3. <i>Curvas concentração-resposta ao poluente 1,2-NQ e agentes testes em artérias (mesentérica e pulmonar) de camundongos naïve</i>	46
4.4.4 <i>Padronização e registro das atividades cronotrópica e inotrópica em átrio isolado de camundongos frente a administração <i>in vitro</i> do poluente 1,2-NQ</i>	47
4.6. Avaliações cardiovasculares <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> e bioquímicas em camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal	50
4.6.1. <i>Medição da pressão arterial (PA) caudal</i>	50
4.6.2. <i>Eletrocardiograma (ECG)</i>	50
4.6.3 <i>Ensaio <i>in vitro</i> da reatividade vascular em artéria pulmonar obtida de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal</i>	51
4.6.4 <i>Registro das atividades cronotrópica e inotrópica em átrio isolado de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal</i>	51
4.8. Análise estatística	52
5. RESULTADOS	53
5.1. Efeitos cronotrópico e vascular do tratamento <i>in vitro</i> com a 1,2-NQ	53
5.1.1. <i>A administração <i>in vitro</i> da 1,2-NQ em átrio direito isolado de camundongos naïve altera a função cronotrópica</i>	53
5.1.2. <i>Aplicação <i>in vitro</i> da 1,2-NQ induz contração arteriolar enquanto a pré-incubação do poluente nesses tecidos reduz o relaxamento dependente do endotélio</i>	55
5.2. Efeitos vascular <i>in vitro</i> do poluente 1,2-NQ após deleção ou bloqueio farmacológico de receptores TRP	57
5.2.1. <i>Papel dos receptores TRPA1 nas alterações de reatividade das AM e AP expostas <i>in vitro</i> ao poluente 1,2-NQ</i>	57
5.2.2. <i>As alterações de reatividade das AM, mas não AP, expostas <i>in vitro</i> ao poluente 1,2-NQ são protegidas pela deleção do TRPV1</i>	60
5.2.3. <i>Efeitos farmacológicos decorrentes ao bloqueio dos canais receptores TRPA1, TRPV1 e TRPV4 nas alterações de reatividade da AM exposta ao poluente 1,2-NQ</i>	62

5.2.4. Efeitos distintos do bloqueio farmacológico dos canais TRPA1, TRPV1 e TRPV4 nas alterações de reatividade da AP exposta in vitro ao poluente 1,2-NQ.....	63
5.3. Análise do perfil de expressão de RNA mensageiros	64
5.3.1 O poluente 1,2-NQ in vitro aumenta a expressão RNAm do Nrf2 em AM de animais selvagens, sem afetar a expressão dos TRPV1 e TRPV4 em AP e AM	64
5.3.2 O bloqueio do TRPV1 reduz a expressão do HCN4 em átrio direito de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, mas não interfere no RNAm para canais e ou proteínas responsáveis pela homeostase do Ca ²⁺ intracelular	66
5.3.3 O bloqueio dos TRPV1 não reverteu a redução na expressão RNAm de canais TRPV1 e TRPA1 em átrio de camundongos expostos a 1,2-NQ, mas aumentou o Nrf2	68
5.3.3 A exposição precoce a 1,2-NQ reduz a expressão RNAm de receptores beta adrenérgicos subtipos 2 e 3, mas não interfere no subtipo 1	70
5.4. Avaliação do perfil hemodinâmico e eletrocardiográfico de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	72
5.4.1. A exposição neonatal a 1,2-NQ não afeta a pressão arterial na fase juvenil	72
5.4.2. A exposição precoce a 1,2-NQ interfere com parâmetros do eletrocardiograma (ECG) na fase juvenil	73
5.5. Efeitos cronotrópico e vascular em camundongos machos jovens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal	74
5.5.1. Exposição precoce a 1,2-NQ reduz resposta cronotrópica basal in vitro frente ao estímulo adrenérgico, mas não colinérgico	74
5.5.2. Antagonismo dos TRPV1 reverte a redução do cronotropismo positivo frente ao estímulo adrenérgico em AD de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal	75
5.5.3. Antagonismo dos TRPV4 estimula o cronotropismo positivo frente a NE em átrio de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	77
5.5.4. Antagonismo dos TRPC5 reduz cronotropismo positivo frente a NE em AD de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal.....	79
5.5.5. Bloqueio dos receptores TRPV1 altera a reatividade da AP obtida de camundongos expostos a 1,2-NQ	86
5.5.6. Bloqueio dos receptores TRPV4 intensifica a reatividade da AP de animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal frente aos estímulos adrenérgico e colinérgico.....	87
6. DISCUSSÃO.....	88
6.1. Átrio Direito.....	89
6.1.1. Efeito da exposição in vitro e in vivo da 1,2-naftoquinona sobre a função atrial isolada e coração de camundongos.....	89
6.1.2. Mecanismos e efeito no AD frente a 1,2-NQ: papel dos TRP.....	92
6.2. Efeitos in vitro e in vivo da 1,2-NQ no leito arteriolar: papel dos TRP.....	96
7. CONCLUSÃO.....	103
8.REFERÊNCIAS.....	105

1. INTRODUÇÃO

1.1. Poluentes ambientais: considerações gerais

1.1.1. Da Antiguidade à revolução industrial

Através do estudo com isótopos de carbono ($\delta^{13}\text{C}$ – onde cerca de 60% oriundo de fontes biogênicas, p.e. liberação de metano por animais; 38% fontes geológicas, p.e. vulcões e; 22% de fontes pirogênicas como incêndios, queima de carvão e outros combustíveis) pesquisadores puderam determinar as variações destas fontes de metano oriundos da ação humana, e observaram que tais ações datam de cerca de mais de 100 anos a.C., demonstrando dessa maneira que ações antropogênicas como o manejo de animais e a queima de matéria orgânica impactavam o meio ambiente muito antes da revolução industrial (Sapart et al., 2012).

O primeiro relato demonstrando o impacto da poluição do ar foi descrito em 1257 pela esposa do rei Henry III da Inglaterra, Eleanor, devido ao uso de carvão que fora implementado nas fornalhas de fundição no início do século XIII (Brimblecombe, 1974). Ao final da era “Elizabetana” (~1600) o carvão deixou de ser o combustível exclusivo nas fornalhas industriais, uma vez que a lenha estava sendo utilizada também em residências. Curiosamente, já naquela época as preocupações com a poluição do ar se mostraram alarmantes uma vez que mortes e o desenvolvimento de diversas doenças já estavam sendo associadas com a poluição observada na cidade de Londres do século XVII, pois verificaram um grande aumento no número de óbitos na cidade quando comparadas com as regiões rurais, bem como eventuais alterações meteorológicas também associadas à poluição do ar (Manley, 1952).

O material particulado foi descrito por John Evelyn em 1661 em forma de protesto através do folhetim intitulado “*Fumifugium*” (John Evelyn, 1976), onde descrevia que não só o MP reduzia a visibilidade como também proporcionava uma coloração amarronzada, e que “fazia mal à saúde”. Ainda no século XVII, devido às características observadas com a utilização do carvão e, associado às alterações climáticas na cidade de Londres, expressões como “*London have a thick fog and cloudy weather*” passaram a expressar a realidade londrina conhecida entre os viajantes (Robson-Scott, 1953).

Ainda, dados relacionados à poluição do ar e ao clima tiveram seus efeitos documentados antes mesmo do século XVII. Em um artigo escrito por Brimblecombe (1977), há uma apresentação de dados históricos que datam do período compreendido entre 1500 e 1900. Os autores utilizaram modelos matemáticos para prever as concentrações de alguns gases, como SO₂, e material particulado. De acordo com esses ensaios de modelagem matemática foi possível observar que a concentração máxima de dióxido de enxofre atingiu 200 µg/m³ no período estimado entre 1690 – 1880 (Brimblecombe, 1977), para efeito de comparação, no estado de São Paulo é definido como aceitável a concentração anual de dióxido de enxofre em 40 µg/m³ (CETESB).

As características tóxicas e prejudiciais à saúde humana foram descritas em outras cidades. No ano de 1930, condições atmosféricas instáveis e poluição oriunda de siderúrgicas e diversas fundições na região de Liege, Bélgica, contribuíram para um aumento no acúmulo de poluentes atmosféricos (incluindo SO₂, névoas de ácido sulfúrico entre outros gases) e levou a morte de 60 pessoas, o que representou um aumento de 10 vezes da taxa de mortalidade considerada normal para a época (Firket, 1936). Em 1948, na cidade de Donora no estado da Pensilvânia, EUA, uma inversão atmosférica intensa promoveu um grande acúmulo de poluentes oriundos das instalações industriais que consumiam carvão como combustível, levando a morte de 17 pessoas (Shrenck et al., 1949). Em dezembro de 1952, Londres enfrentou um nevoeiro letal que resultou na morte de cerca de 3.000 pessoas. Ainda que o governo na época tenha considerado que algum tipo de vírus influenza teria sido responsável pelo grande número de vítimas, por fim acabou confirmando-se que os efeitos da grande quantidade de poluentes do ar na cidade tiveram participação crucial no grande número de óbitos (Ministry of Health – Reino Unido, 1954). Finalmente no ano de 1956, o parlamento britânico aprovou o importante “Clean Air Act”, que apresentava diversas leis que priorizavam a melhoria do ar. Esse documento serviu de exemplo para diversos países que passaram a adotar medidas no combate à poluição do ar (Brimblecombe, 2006).

1.1.2. A poluição ambiental em São Paulo

Na região metropolitana da cidade de São Paulo, o crescimento desordenado e intenso iniciado durante o final da década de 1930, levou a emissão de grandes quantidades de poluentes, uma vez que não havia preocupações com os efeitos deletérios promovidos pelos poluentes e nenhuma legislação específica para controlar os níveis de contaminantes despejados diariamente na atmosfera. Alguns registros de jornais das décadas de 60 e 70 apresentavam alguns episódios agudos de poluição do ar que causaram pânico na população devido aos fortes odores e mal-estar, levando a um grande número de internações nos hospitais (Acervo online do Jornal O Estado de São Paulo, 1960 a 1970, como palavras-chave: poluição do ar, através do sítio: <https://acervo.estadao.com.br> em 10 de agosto de 2018).

Em função do grande número de indústrias na região metropolitana da capital paulista, foi criado em 1956 a Comissão Intermunicipal de Controle da Poluição das Águas e do Ar - CICIPAA, que envolvia os municípios de Santo André, São Bernardo do Campo, São Caetano do Sul e Mauá. As medições realizadas por esta comissão se restringiram em avaliar as taxas mensais de sulfatação, poeira sedimentar e corrosividade. No ano de 1975 foi criada a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) e a CICIPAA foi incorporada ao novo órgão estadual (CETESB, 2018).

No ano de 1972, o monitoramento da qualidade do ar com a avaliação das concentrações de poluentes no Estado foi instituído em 14 estações de medição. Nestas estações eram realizadas medições diárias de SO₂ e fumaça preta, com boletins divulgados à população. Finalmente no ano de 1981, medidores automatizados passaram a ser utilizados e novas instalações de monitoramento inauguradas. Dessa vez passou-se a realizar medições diárias de SO₂, MP₁₀, O₃, óxidos de nitrogênio (NO, NO₂, NO_x), CO e hidrocarbonetos não metálicos. Atualmente a CETESB realiza monitoramento diário não apenas dos contaminantes supracitados, mas também de chumbo, aldeídos e compostos reduzidos de enxofre.

As legislações para controle de emissão de poluentes no estado de São Paulo foram instituídas apenas no ano de 1976 através da Lei 997/76, na qual constava um programa de redução das emissões industriais de material particulado. Nas décadas seguintes, outro projeto de Lei de âmbito federal, através do Conselho

Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), foi implementado no qual constava resoluções para o controle de emissão de poluentes de veículos automotores através do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE).

Na década de 90, graças às medidas implementadas de controle de emissões de poluentes, a CETESB observou uma redução nos níveis de CO na atmosfera da região metropolitana da cidade de São Paulo. Além disso, outro projeto de Lei instituída na cidade de São Paulo foi a Operação Rodízio, com o intuito não apenas de conscientizar a população, mas também em reduzir a emissão de poluentes dos veículos automotores (CETESB, 2018).

O impacto financeiro causado pela poluição do ar é grande aos cofres públicos. De acordo com trabalho publicado recentemente, estimaram-se os gastos com o sistema de saúde com custo estimado de R\$ 30 bilhões/anuais (Abe e Miraglia, 2016). Diversos outros estudos têm correlacionado os efeitos da poluição do ar com uma maior taxa de mortalidade e internações de recém-nascidos e idosos em cidades com altos níveis de poluição (Saldiva et al., 1994; Saldiva et al., 1995; Lin et al., 1999; Gouveia e Junger, 2018; Saldiva et al., 2018). De fato, muitos outros estudos da literatura já tem demonstrado que faz-se necessário um melhor controle nas taxas de emissão de poluentes visando uma melhora na saúde de indivíduos mais susceptíveis aos efeitos deletérios da PA, como idosos, crianças e indivíduos que apresentam comorbidades como diabetes e doenças cardiovasculares (Martins et al., 2004; Miraglia et al., 2005; Rivero et al., 2005; Cendon et al., 2006; Martins et al., 2006; Santos et al., 2008; Arbex et al., 2010).

1.1.3. Características da poluição atmosférica

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (WHO – World Health Organization) define poluição atmosférica como a contaminação do ambiente interno e externo por diversos agentes químicos, físicos ou biológicos, os quais modificam as características naturais da atmosfera (WHO, 2016). Dentre os poluentes de relevância para a saúde pública, encontram-se o material particulado (MP), monóxido de carbono, ozônio, nitrogênio e dióxido de enxofre (WHO, 2016). Os dispositivos de combustão domésticos, veículos automotores, instalações industriais

e a queima da lavoura e de florestas são fontes comuns de poluentes particulados (Bernstein, 2004). De acordo com a WHO, as mortes provocadas e/ou associadas à poluição ambiental supera a marca de 3 milhões em todo o mundo (WHO, 2016) (Figura 1).

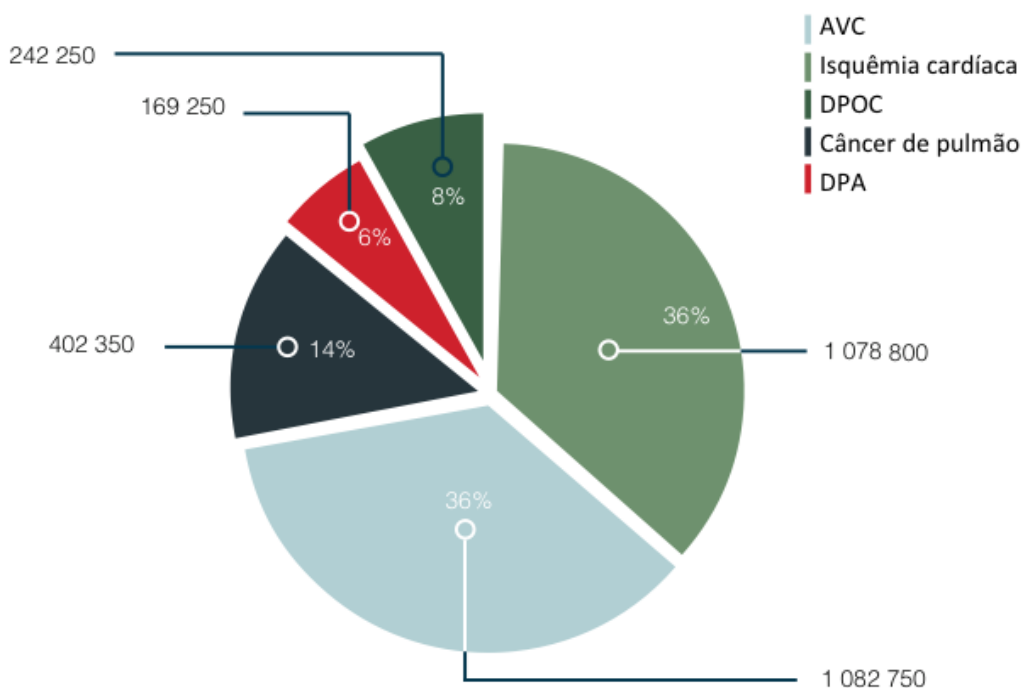


Figura 1 – Mortes atribuídas à exposição inalatória da poluição ambiental no ano de 2012, publicado pela OMS em 2016. AVC: acidente vascular encefálico, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica e DPA: doença pulmonar aguda. (Adaptado de WHO – Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease – 2016).

O MP pode ser classificado de acordo com o diâmetro (μm) em grosso ou bruto ($<10 \mu\text{m}$), fino ($<2,5 \mu\text{m}$) e nano-particulados ou ultrafinos ($<1 \mu\text{m}$). Cabe ressaltar ainda que o MP é capaz de agir em diversos tecidos, podendo depositar-se na porção superior (MP_{10} grosso) ou inferior ($\text{MP}_{2,5}$ fino) do trato respiratório, podendo se translocar do pulmão para a corrente sanguínea ($\text{MP}_{2,5}$ e MP_1 ultrafino), onde atinge órgãos e tecidos distantes (Weichenthal et al., 2007).

De acordo com a WHO, o $\text{MP}_{2,5}$ representa um dos principais responsáveis pelo aumento da mortalidade global associado à exposição ao poluente atmosférico,

principalmente devido ao desenvolvimento de problemas cardiovasculares. Ademais, adsorvido ao MP, existe uma imensa gama de compostos químicos, tais como as quinonas, capazes de torná-lo ainda mais tóxico, como por exemplo a 1,2-naftoquinona (Schuetzle et al., 1981; Cho et al., 2004; Sandstrom et al., 2005). Segundo Cho et al (2004), aproximadamente 13,7 µg de 1,2-NQ encontram-se incorporadas em 1 g de MP.

1.1.4. 1,2-Naftoquinona – revisão de literatura

O composto 1,2-naftoquinona (1,2-naftalenedione ou naftaleno-1,2-dione) possui CID de identificação 10667 com fórmula molecular $C_{10}H_6O_2$ e peso molecular de 158,156 g/mol, pó amarelo amarronzado, com ponto de fusão entre 145 a 147 °C, sem cheiro e com solubilidade de 1 mg/ml em temperatura ambiente. Outras informações relevantes são encontradas em CID10667 – <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10667>.

A 1,2-NQ é gerada a partir do naftaleno via metabolismo de auto-oxidação e/ou enzimaticamente via ação da citocromo p450 ou GSH. Em termos estruturais, o grupamento carbonila α,β -insaturado, presente na molécula, favorece ligações fortes com macromoléculas (ex.: proteínas) de tecidos que possuem grupamento tióis na sua estrutura e no DNA, conseqüentemente, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, subsequentemente, lesam os tecidos (Bolton et al., 2000; Kumagai, Shimojo, 2002; Endo et al., 2007; Saeed et al., 2007) (Figura 2).

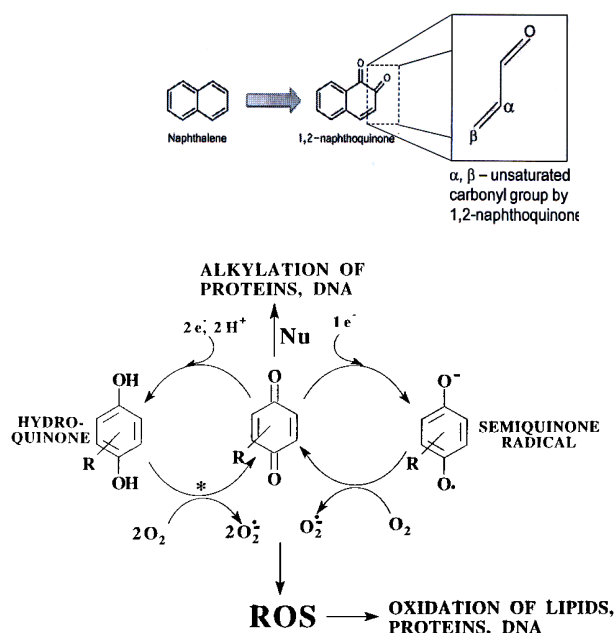


Figura 2 – Naftaleno a seu derivado 1,2-naftoquinona. Alquilação e ciclo redox na geração de semiquinonas e espécies reativas de oxigênio. A 1,2-NQ é gerada via metabolismo de auto-oxidação e/ou enzimaticamente via ação da citocromo p450 ou GSH (adaptado de Bolton et al., 2000).

Os primeiros artigos que descreveram as ações biológicas a respeito da quinona 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) datam da década de 1960, quando se buscavam marcadores para o potencial efeito cancerígeno do naftaleno na bexiga (Ollodart e Rose, 1962). No trabalho publicado no periódico *Cancer Research*, em 1962, Ollodart e Rose desenvolveram e quantificaram no plasma dos pacientes anticorpos anti-1,2-NQ, um dos intermediários do naftaleno (Ollodart e Rose, 1962). Posteriormente, o detalhamento dos metabólitos intermediários gerados pelo metabolismo do naftaleno foi demonstrado em *C. elegans*, sendo estes formados por 1-naftol (67,9%), 4-hidroxi-1-tetralone (16,7%), 1,4-naftoquinona (2,8%), 1,2-naftoquinona (0,2%), 2-naftol (6,3%) e trans-1,2-dihidroxi-1,2-dihidronaftaleno (5,3%), (Cerniglia e Gibson, 1977).

Devido às características de neutralidades das quinonas, estas podem sofrer reações de protonação, além de exibirem propriedades químicas relevantes, atuando como agentes oxidantes além de eletrofílico. Tais propriedades conferem às quinonas a capacidade de atuar em reações de Michael e do ciclo redox, sendo que o estado redox das quinonas pode ser ainda afetado pelo pH do meio. Assim, as quinonas por serem moléculas altamente reativas promovem a formação de radicais semiquinona, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo superóxido, peróxido de hidrogênio e, finalmente, o radical hidroxila. A produção de ROS, por sua vez, pode causar estresse oxidativo dentro das células por meio da formação de macromoléculas celulares oxidadas, incluindo lipídios, proteínas e DNA. A formação de bases de DNA danificadas via oxidação, como a 8-oxideoxiguanosina, está associada ao envelhecimento e à carcinogênese. Além disso, as ROS podem ativar várias vias de sinalização, incluindo a proteína quinase C e RAS (Bolton et al., 2000). Por seu turno, a reação de Michael pode promover danos celulares por meio da alquilação de proteínas celulares e/ou DNA.

1.3.1. Efeitos tóxicos da 1,2-naftoquinona

Em outro estudo, foi observado que hepatócitos ao serem tratados com 1-naftol, 1,2-NQ e 1,4-NQ em concentrações crescentes apresentavam redução nos níveis de glutatona, culminando com morte celular (citotoxicidade) (Doherty et al., 1984). A busca por terapias para o tratamento de melanomas levou a outro estudo

em que se observou que a formação de 1,2-NQ se devia a reação promovida pela tirosinase (produzida em células epiteliais) sobre 1-naftol, sugerindo o possível efeito citotóxico da 1,2-NQ em função da exposição ao 1-naftol (Doherty et al., 1985). Curiosamente em trabalho publicado por Miller e colaboradores (1986), no qual foi estudado a possível conjugação de 1-naftol e as naftoquinonas (1,2- e 1,4-), a detecção de conjugados com glutathione não foi identificado quando as amostras foram incubadas com 1,2-NQ. Os autores sugerem que possivelmente não conseguiram detectar as naftoquinonas devido a reatividade desses compostos, uma vez que as reações ocorrem de forma muito rápida (Miller et al., 1986).

Estudos de citotoxicidade e genotoxicidade foram realizados por Wilson e colaboradores (1996) e, foi observado que tanto a 1,2-NQ quanto 1,4-NQ se mostraram tóxicos em concentrações superiores a 50 μ M em amostras de sangue total após análise cromossômica e, foi observado que concentrações superiores a 0,1 μ M promoveram aumento na taxa de morte celular (Wilson et al., 1996). Em artigo publicado por Shang e colaboradores (2014) foi avaliada os potenciais efeitos protetores da N-acetilcisteína em modelo *in vitro* de exposição a quinonas. De fato, os autores observaram que a 1,2-NQ promoveu seus efeitos citotóxicos e genotóxicos, porém o tratamento com N-acetilcisteína foi eficaz em reverter tais ações da 1,2-NQ (Shang et al., 2014).

Recentemente, Sheng e Lu (2017) demonstraram que a 1,2-NQ leva a aumento na expressão de diversos marcadores pró-inflamatórios em células humanas de pulmão humano (A549), entre eles: IL-6, IL-8, TNF- α , Cyp1a1, e hemeoxigenase 1 (HO-1) (Sheng, Lu, 2017). Novamente, Abiko e colaboradores (2016) descreveram a ativação do receptor aril (AhR) pelas quinonas em células HepG2 (células de linhagem de tumor de fígado) e a translocação deste receptor para o núcleo (Abiko et al., 2016). Já Nishina e colaboradores (2017) mostraram que 1,2-NQ leva a produção de IL-11 via ativação de ERK, e uma interação nuclear de dois sítios promotores de AP-1 (Nishina et al., 2017). Ainda, Lavrich e colaboradores (2018) demonstraram que a produção de H₂O₂ pela 1,2-NQ ocorre por via mitocondrial em células epiteliais humanas de pulmão (Lavrich et al., 2018).

1.3.2. Mecanismos de ação da 1,2-naftoquinona

Já no ano de 1972, foi descrito o efeito inibitório da 1,2-NQ sobre a enzima catecol-1,2-oxigenase (Varga e Neujahr, 1972). Nesnow e colaboradores (1980) descreveram os efeitos da 1,2-NQ sobre a oxidação de benzopireno e a interação de 1,2-NQ com NADPH. Os autores demonstraram que o potencial eletrofílico da 1,2-NQ foi comprovado devido às reações da 1,2-NQ com NADPH, e que as interações da 1,2-NQ poderiam ocorrer em sistemas enzimáticos hepáticos dependentes de oxigênio (Nesnow et al., 1980).

A formação de ânions superóxido foi inicialmente demonstrada em sistema microsomal hepático. Em artigo publicado por Thornalley e colaboradores (1984), o estudo de toxicidade do 1-naftol e as naftoquinonas (1,2- e 1,4-) mostrou que há produção de ânion superóxido na presença de NAD e NADPH em hepatócitos de ratos. Ainda, esse sistema de produção de ROS foi abolida quando as células foram tratadas com superóxido dismutase (SOD). Nesse trabalho, que buscava entender os mecanismos pelo qual o 1-naftol exerce seu efeito tóxico em células tumorais, permitiu um melhor entendimento das ações tóxicas das naftoquinonas (Thornalley et al., 1984). Em importante trabalho publicado por Zheng e colaboradores (1997) foi observado que a 1,2-NQ tem a capacidade de reagir com resíduos de cisteína através de ligações covalentes, assim alterando a estrutura protéica (Zheng et al., 1997).

Em um outro importante estudo de Ahn e colaboradores (2002) foi verificado que 1,2-NQ tem a capacidade de inibir PTP1B (proteína tirosina fosfatase 1B) um importante regulador negativo da sinalização da insulina e que possui um papel importante no desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (Kennedy e Ramachandran, 2000). Nesse estudo, os autores buscaram criar novas moléculas que apresentassem características semelhantes a estrutura da 1,2-NQ, visto que na condição da diabetes do tipo 2, a inibição de PTP1B poderia ser um novo alvo terapêutico para o tratamento dessa doença (Ahn et al., 2002; Cheon et al., 2004).

Ainda assim, o mecanismo de ação precisava ser determinado e, Kikuno e colaboradores demonstraram que a exposição de traqueias de cobaias a 1,2-NQ pode, através de ligação covalente, causar a fosforilação de proteína tirosina (PTP) quinase, levando a ativação da via fosfolipase A2/lipoxigenase/TRPV1. Ainda, no

mesmo trabalho os autores demonstraram que 1,2-NQ pode também promover alterações proteicas via ligação covalente em grupamentos tióis (Kikuno et al., 2006). Ainda, a inibição de PTP está associada com aumento da ativação do EGFR em células epiteliais de linhagem (Iwamoto et al., 2007). Sun e colaboradores (2006) apresentaram dados interessantes dos efeitos da 1,2-NQ sobre a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) de aorta de coelho. Em concentrações crescentes (1 a 5 μ M) a 1,2-NQ tem a capacidade de reduzir a vasodilatação e a atividade da enzima eNOS de maneira significativa. Os autores concluem que os efeitos da 1,2-NQ sobre a eNOS ocorre de maneira dependente do estado redox produzido pelo composto por uma interação na estrutura da eNOS (por exemplo, via alteração covalente de grupamentos tióis) (Sun et al., 2006). Sumi e colaboradores (2010) verificaram os efeitos da 1,2-NQ sobre a isoforma da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células RAW264.7 tratadas com LPS. Os autores observaram que o tratamento com 1,2-NQ foi capaz de reduzir os níveis de NO, via iNOS, possivelmente por desacoplamento da enzima. E, ainda observaram que em pulmões de camundongos tratados com LPS esse efeito foi reproduzido, além disso verificaram que a exposição a 1,2-NQ também promoveu alteração na via de sinalização da IKK β /NF- κ B, através da inibição da translocação da fração p65 (Sumi et al., 2010).

Endo e colaboradores apresentaram outro mecanismo pelo qual a 1,2-NQ pode promover seus efeitos tóxicos. Nesse estudo, com o uso de células endoteliais derivadas de aorta bovina e expostas a 1,2-NQ, foi possível observar que CREB (proteína de ligação responsiva a AMP cíclico), um fator de transcrição com grupamentos de cisteína, alvo para ligações covalente em porções tióis pela 1,2-NQ, teve sua atividade de ligação em DNA nuclear reduzida (Endo et al., 2007), e que essa inibição se deve a modificação estrutural na posição Cys-286 (Endo et al., 2011).

Outros efeitos inibitórios oriundos da interação com a 1,2-NQ foi demonstrado por Shimada e colaboradores (2007). Extratos de diferentes tecidos (fígado, rins e pulmão) foram preparados e incubados com 1,2-NQ (10 μ M). A 20-alfa-hidroxi-esteróide-desidrogensase (HSD) que catalisa a redução da progesterona ao seu metabólito inativo 20 α -hidroxi-4-pregnen-3-ona e está envolvida na regulação da quantidade de progesterona que se liga ao seu receptor nuclear, teve sua atividade

reduzida a 50% na presença de 1,2-NQ, enquanto em amostras de pulmão e rins a inibição da mesma enzima foi de aproximadamente 10% (Shimada et al., 2007).

Em estudo publicado por Miura e colaboradores (2011), a 1,2-NQ promoveu arilação do fator Keap1, o regulador negativo de Nrf2. E, a exposição de hepatócitos primários de rato a 1,2-NQ resultou na ativação de Nrf2 e na regulação positiva de alguns dos genes ativados por Nrf2. Os autores também demonstraram que NADPH:quinona oxidoreductase-1 e uridina 5'-difosfato-glucuronosil-transferases são responsáveis pelo processo de detoxificação dos hepatócitos expostos a 1,2-NQ, e que a via Keap1/Nrf2 é importante para a defesa redox da célula quando exposta a esse contaminante ambiental (Miura et al., 2011a).

Miura e colaboradores demonstraram que outro possível alvo para modificação estrutural seria a GAPDH. Entretanto, através de ensaios *in vitro* os autores observaram que células epiteliais humanas de linhagem A549 sofreram uma pequena alteração estrutural no GAPDH, e o tratamento das células com concentrações crescente de glutathione foi capaz de reverter o efeito da 1,2-NQ sobre a formação de aductos de GAPDH-1,2-NQ (Miura et al., 2011b; Miura et al., 2011c).

Ainda na busca por novos alvos onde a 1,2-NQ poderia estar promovendo seus efeitos tóxicos, Takayama e colaboradores (2011) observaram que em células epiteliais de pulmão A549 expostas a 1,2-NQ promovia arilação de peroxirredoxina 6 (uma proteína com atividades de glutathione peroxidase e de fosfolipase A2 e de grande importância na defesa antioxidante) através de ligações covalentes em diversos sítios (Cys47, Lys144 e Cys91) resultando em redução na atividade da fosfolipase A2 (Takayama et al., 2011). Outro estudo na mesma linha para identificação de novos alvos para 1,2-NQ publicado por Gurbani e colaboradores demonstrou inicialmente através de ensaios de binding o potencial da 1,2-NQ em bloquear a enzima topoisomerase-II, o que se confirmou em ensaios *in vitro* com células BEAS-2B (Gurbani et al., 2012).

Shinkai e colaboradores (2012) demonstraram que células RAW264.7 expostas a 1,2-NQ tiveram redução na atividade de tiorredoxina 1 (Trx1) devido a ligações covalentes em resíduos Cys32 e Cys35 da enzima, aumentando assim a lista de enzimas e proteínas que sofrem ação da 1,2-NQ (Shinkai et al., 2012).

Novos estudos têm demonstrado a importância de técnicas mais sofisticadas para detectar os aductos formados no organismo quando expostos a 1,2-NQ. Phan e

colaboradores (2012), através da utilização de espectrometria de massa de alta resolução identificaram os locais de ligação, as taxas relativas de depleção do péptido não-alterado e a seletividade de ligação aos resíduos de aminoácidos. Através deste método pode se concluir que ocorreu a formação de aductos nos resíduos de cisteína, lisina e histidina e na cadeia amino terminal (Pham et al., 2012).

Outro alvo descrito é a sepiapterina redutase, uma enzima dependente de NADPH que catalisa a formação da diidrobiopterina (BH₂), um precursor da tetrahydrobiopterina (BH₄), um cofator crítico no metabolismo de aminoácidos aromáticos e na biossíntese de óxido nítrico. Utilizando enzima humana recombinante, verificou-se que a sepiapterina redutase é altamente eficiente na mediação do ciclo de redox químico e na geração de ROS. Curiosamente, o ciclo redox reduziu acentuadamente a capacidade da enzima em gerar BH₂. Ao contrário de outras enzimas que medeiam o ciclo redox, a sepiapterina redutase não contém flavinas ou outros co-fatores, sugerindo que ela funcione por um mecanismo único. Os autores demonstraram uma via independente de flavina, mediando o ciclo redox químico em células epiteliais pulmonares. Além disso, eles observaram que os produtos químicos redox podem controlar uma enzima chave necessária para a biossíntese de um cofator importante na geração de mediadores que regulam a função pulmonar. Os autores observaram que quinonas reagem com a sepiapterina redutase inibindo a capacidade da enzima para reduzir a sepiapterina. Sendo a 1,2-NQ uma das mais potentes no bloqueio da redução da sepiapterina (Yang et al., 2013).

Beei e colaboradores (2013) observaram que células epiteliais de pulmão (A459) quando expostas a 1,2-NQ ocorria um aumento na fosforilação de EGRF, e consequentemente ativação da via de sinalização intracelular MEK/ERK, levando a ativação do fator de transcrição AP-1 (Beei et al., 2013). Ainda, Lin e colaboradores (2014) demonstraram que as quinonas (1,2- e 1,4-NQ) podem além de formar aductos com albumina sérica, também reagir com estrógeno formando aductos, detectados no plasma, e correlacionados com um aumento no risco para desenvolvimento de câncer de mama em mulheres (Lin et al., 2014).

Abiko e colaboradores (2015) demonstrou recentemente que 1,2-NQ pode ativar a citocromo P450 1A1 (Cyp1a1) em células c35, via receptor de

hidrocarboneto arilo (AhR) e ainda promoveu a expressão de genes relacionados à defesa antioxidantes (Abiko et al., 2015). Wages e colaboradores (2015) por sua vez, demonstraram os efeitos da 1,2-NQ sobre células BEAS-2B com concentrações crescentes e avaliaram o potencial de sulfenilação das proteínas GAPDH e PTP1B (Wages et al., 2015).

1.3.5. Efeitos biológicos da 1,2-naftoquinona como poluente ambiental e os mecanismos relacionados

As ações das quinonas como PAA são amplamente demonstrados em estudos *in vitro* por Kumagai e colaboradores, e muito pouco em estudos farmacológicos e toxicológicos *in vivo*. A 1,2-NQ, contaminante das partículas oriundas da queima do diesel (PED), possui a capacidade de bloquear a SOD e, ainda, reagir com superóxido, gerando hidroquinona, e um radical semiquinona capaz de reduzir o citocromo c (Kumagai et al., 1995). As quinonas presentes nas PED servem como substrato para a NADPH-P450-redutase, mantendo a produção elevada de superóxido, demonstrando dessa forma o potencial tóxico das PED e seus contaminantes (Kumagai et al., 1995). Terada e colaboradores (1995) observaram a inativação de glutathione S-transferase, subtipo *pi*, após incubação com a 1,2-NQ (Terada et al., 1995).

Cho e colaboradores conseguiram determinar a [1,2-NQ] em PED com limite medição de até 300 pg (Cho et al., 2004; McDonald et al., 2004). Segundo esses autores, para cada grama de PED existe aproximadamente 13,7 mg de 1,2-NQ. Dependendo do tipo de motor, tipos de combustíveis (gasolina e diesel) e testes de detecção aplicados, Jakober e colaboradores (2007) demonstraram que a concentração de 1,2-NQ pode variar entre 10 e 340 mg/L (Jakober et al., 2007).

Uma vez estabelecido que a 1,2-NQ pode levar a danos celulares diversos trabalhos buscaram entender os efeitos relacionados à exposição a este poluente. Cheng e colaboradores (2012) avaliaram a exposição de células epiteliais pulmonares (BEAS) buscando compreender os efeitos de 1,2-NQ na resposta inflamatória e gênica. Os autores observaram aumento na produção de peróxido de hidrogênio, levando a aumento da expressão de genes inflamatórios como IL-8 e COX-2. O tratamento das células com catalase reverteu esses efeitos. Além disso os autores também demonstraram que a fonte de produção de H₂O₂ é via mitocondrial. Muito do observado neste estudo foi correlacionado com dados prévios da literatura onde PED e outros contaminantes podem promover efeitos similares aos observados com 1,2-NQ (Cheng et al., 2012).

Em 2002, Troester e colaboradores buscaram identificar potenciais marcadores biológicos para avaliar a toxicidade *in vivo* de exposição ao naftaleno e

quinonas. Como demonstrado anteriormente *in vitro*, os aductos da reação entre 1,2-NQ e as proteínas séricas se mostraram instáveis e de difícil detecção (Troester et al., 2002). Com o auxílio de técnicas mais sofisticadas, que empregaram clivagem e derivatização de aductos por anidrido trifluoroacético e ácido metanossulfônico seguido de cromatografia gasosa e espectrometria de massa, Waidyanatha e colaboradores (2002) observaram que o naftaleno, nas doses de 100 a 800 mg/kg, causou alterações de forma dose dependente em proteínas séricas (hemoglobina e albumina) de ratos bem como aductos de 1,2-NQ em hemoglobina e albumina (Waidyanatha et al., 2002). A fim de demonstrar biomarcadores para exposição ao naftaleno e hidrocarbonetos policíclicos, o mesmo grupo realizou em estudo translacional em indivíduos que trabalhavam em indústrias de aço na China, o qual revelou aductos de albumina para 1,2-NQ e 1,4-NQ. Os níveis de detecção foram evidenciados na faixa de picomoles, sendo ainda possível correlacionar o tempo de exposição com os níveis séricos de aductos de albumina (1,2-NQ-Alb; Waidyanatha et al., 2004). Os efeitos cumulativos da exposição a naftoquinonas em indivíduos saudáveis, no Taiwan, revelaram concentrações medianas de aductos de 1,2-NPQ no plasma de homens (268; variando entre 139-857 pmol / g; n= 11) e mulheres (203; variando 128-1352 pmol / g; n= 11) (Lin et al., 2009).

Estudo do nosso grupo, em 2010, revelou que a co-injeção da 1,2-NQ com o MP eliminado na exaustão do diesel (PED) na traquéia de ratos exacerbou o extravasamento plasmático evocado pelas PED na traqueia e brônquio principal de ratos, bem como induziu aumento da expressão (RNAm) para TRPV1 e os receptores de taquicininas (NK1 e NK2) para substância P em brônquio de ratos. Esses efeitos foram parcialmente revertidos pelo pré-tratamento com capsaicina e antagonistas de NK1/NK2 (Teles et al., 2010).

Mais recentemente, em outro trabalho do nosso grupo, demonstramos que a exposição aguda ao poluente 1,2-NQ promoveu aumento da suscetibilidade diferencial à asma alérgica em camundongos expostos no período pós-natal em relação àqueles expostos ao poluente na fase adulta (Santos et al., 2014). Esse mesmo estudo demonstrou que o mecanismo envolvido inclui o aumento da expressão de moléculas co-estimulatórias, que leva à amplificação da apresentação celular, polarização Th2 e aumento das concentrações de LTB4, resposta humoral e citocinas Th1/Th2 (Santos et al., 2014). Em trabalho ainda não publicado do grupo,

demonstramos que os receptores TLR4 estão envolvidos, pelo menos em parte, via ativação da via de sinalização dependente da molécula adaptadora MyD88 (Santos et al., dados ainda não publicados).

Em outro estudo, também não publicado do grupo, verificou-se que os camundongos machos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal exibem maior susceptibilidade à asma alérgica do que as fêmeas (Florenzano et al., dados não publicados). A via de sinalização regulada por TRPA1 está envolvida na maior susceptibilidade à asma em machos jovens pré-expostos a 1,2-NQ, enquanto a ausência deste efeito em fêmeas se deve ao aumento das defesas antioxidantes (catalase, peroxidases), da atividade do fator nuclear NRF2 e da maturidade pulmonar/imunológica. Corroborando esses dados, Carrat e colaboradores (2016) demonstraram que a exposição de camundongos selvagens ao naftaleno promoveu lesão pulmonar com diferenças significativas entre machos e fêmeas selvagens (Carratt et al., 2016). Nesse sentido, outros estudos por Toyama e colaboradores (2014) demonstraram *in vitro*, em cultura de células de neuroblastoma, que a 1,2-NQ, atua via ativação da GSH, promovendo transarilação no sítio catalítico da ubiquitina carboxil-terminal hidrolase L1 (UCH-L1), nas porções Cys152, levando à inibição dessa enzima (Toyama et al., 2014).

Ainda, Shinkai e colaboradores (2015) buscaram compreender o papel do grupamento tiol na formação de aductos de 1,2-NQ, e observaram que o processo de adução de proteínas por 1,2-NQ por meio de ligação tioéter (CSC) diminui lentamente devido a reação de transarilação-S dependente de GSH, enquanto que a formação de 1,2-dihidroquinaftaleno-4-tiol (1,2-NQH₂-S_{Ac}) ocorreu através de uma ligação dissulfeto (CSSC) que foi rapidamente restaurada para a proteína livre nas células. Este último componente, por sua vez, foi capaz de ativar Nrf2 levando a aumento da expressão de genes relacionados com as defesas antioxidantes, esse trabalho ainda demonstrou outra reação química que pode ocorrer com a 1,2-NQ por processo de sulfidação (Shinkai et al., 2015).

1.3.6. Efeitos da 1,2-naftoquinona no sistema cardiovascular

Ratos expostos a 1,2-NQ apresentaram aumento na capacidade vasorrelaxante em aorta e corpo cavernoso de ratos (Oliveira, 2010). Ainda, a

exposição a 1,2-NQ na fase neonatal promoveu disfunção endotelial em artéria pulmonar de camundongos machos (Amaral-Neto et al., manuscrito à ser submetido). Ainda, o presente estudo observou que a 1,2-NQ pode promover cronotropismo positivo em átrio direito de camundongos possivelmente via receptor adrenérgico beta-1 e ainda interagir com receptores TRPV1 (Soares et al., 2018a, manuscrito em preparação). Ainda, 1,2-NQ promove vasoconstrição em artéria pulmonar e mesentérica isoladas de camundongos, e o bloqueio de TRPA1 e TRPV1 demonstrou respostas específicas a cada leito vascular estudado (Soares et al., 2018b, manuscrito em preparação). Demonstrando o que o sistema cardiovascular é um importante alvo para os efeitos tóxicos da 1,2-NQ.

1.4. Efeitos deletérios da PAA sobre o sistema cardiovascular

No que diz respeito aos efeitos da poluição atmosférica no sistema cardiovascular podemos citar alterações importantes como uma maior susceptibilidade ao infarto agudo do miocárdio (Shah et al., 2013), maior probabilidade de ocorrência de episódios de arritmias, alterações tanto na plasticidade do tecido cardíaco (Andre et al., 2010; Bartell et al., 2013; Newby et al., 2015) quanto na estrutura e funcionalidade das artérias coronárias e pulmonar (Lemos et al., 2006; Meyer et al., 2011) e hipertensão (Adamopoulos et al., 2010).

O funcionamento normal do coração depende da atividade do NSA, que controla a ritmicidade cardíaca, onde uma série de canais iônicos (ex.: K^+ , Na^+ e Ca^{2+}) participam da regulação do potencial de ação que controla o ritmo cardíaco. Alterações na atividade desses canais poderiam levar a arritmias. De relevância, substâncias químicas, como o MP e PAA podem causar processos arrítmicos (Newby et al., 2015).

Os efeitos adversos do MP sobre o sistema cardiovascular (SCV) têm sido amplamente discutidos em estudos epidemiológicos e alguns estudos farmacológicos, porém nenhuma relação ou contribuição isolada foi feita com o estudo da exposição inalatória à 1,2-NQ ou mesmo de outras quinonas contaminantes químicos presentes no MP.

Segundo Brook et al. (2010), a exposição inalatória de indivíduos saudáveis ao $MP_{2,5}$ resulta em inflamação sistêmica, estresse oxidativo e alteração dos processos

elétricos cardíacos, concomitantes ao aumento de biomarcadores inflamatórios presentes nas doenças cardiovasculares (p.e. proteína C reativa). Ainda, estudos “cohort” revelam que a exposição prolongada de indivíduos que residem próximos às rodovias com tráfego intenso, exibem aumento significativo de biomarcadores para aterosclerose, incluindo a calcificação da artéria coronária, espessamento da camada íntima coronariana e aumento de lipídeos circulantes (Bauer et al., 2010; Hoffmann et al., 2006, 2007; Künzli et al. 2005, 2010). Outros estudos mostram forte correlação entre o aumento da PAA, arritmias e vasoconstrição em diferentes leitos vasculares (vide revisão: Brook et al., 2010), muitos desses sendo mediados por canais receptores de potencial transitório (TRP).

É importante salientar que a PAA, tal como a 1,2-NQ possui uma ampla gama de ações com vias de ativação de alvos distintos, mostrando a importância de se adquirir melhores conhecimentos sobre os mecanismos de ação destes compostos

1.5. Canais receptores TRP como alvos de PAA

Os canais receptores de potencial transitório (TRP - *Transient Receptor Potential*) compreendem uma grande família de receptores em mamíferos, que englobam seis subfamílias (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP e TRPML) subdivididas em 28 membros, cuja estrutura molecular proteica é formada por seis domínios transmembrana e um canal iônico disposto entre o 5º e o 6º domínio. As porções C- e N- terminais dos canais TRP estão localizados intracelularmente e participam da função e organização do canal iônico (Ramsey et al., 2006) (Figura 3). Estes, quando ativados, traduzem sua atividade intracelular, principalmente via entrada de Ca^{2+} e/ou despolarização da membrana celular, desempenhando um papel essencial na regulação de funções celulares, tais como a contração, relaxamento, proliferação, diferenciação e morte celular (Yue et al., 2015).

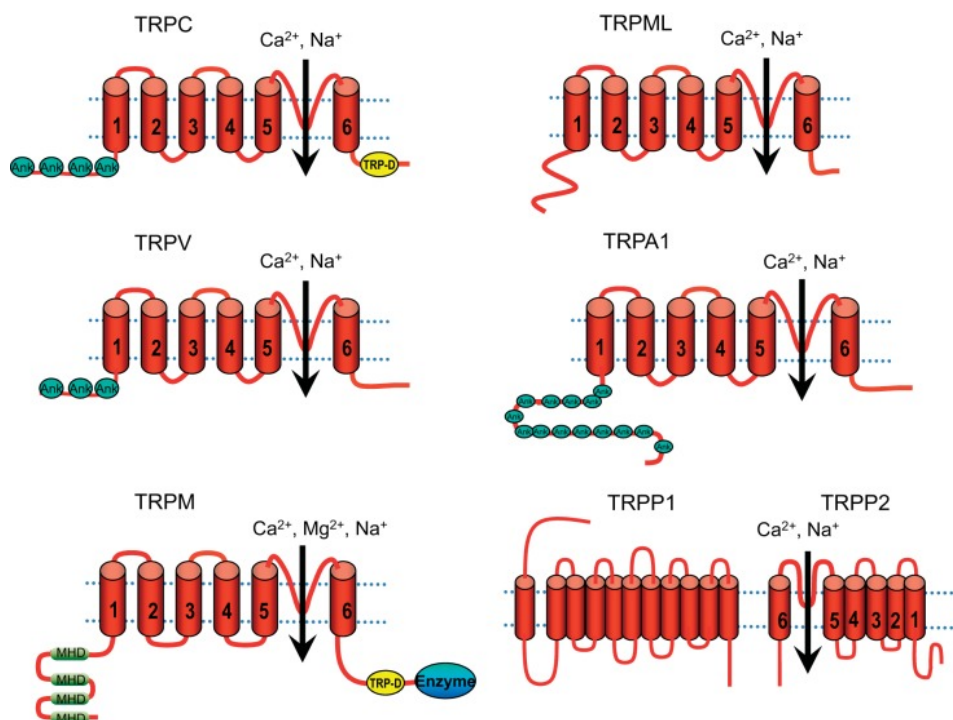


Figura 3 – Estrutura dos canais TRP. Os canais TRP contêm 6 segmentos transmembranares (S1 a S6) com um poro (P) entre os domínios S5 e S6. As porções amino (NH₂-) e carboxi (COOH-) terminais são variáveis e contêm diferentes arranjos de domínios. Adaptado: Yue et al., 2015.

Primariamente, a expressão da subfamília TRPA (anquirina) foi demonstrada em fibroblastos (Stokes et al., 2006) e, posteriormente, em fibras sensoriais que inervam as vias aéreas e também em linfócitos T CD8+ e CD4+ e B, sugerindo um papel importante para esses receptores na fisiopatologia de doenças respiratórias (Colsoul et al., 2009; Banner et al., 2011). Recentemente, o receptor TRPA1 foi descrito como um alvo em potencial para a ação de agentes irritantes e tóxicos, como os PAA e seus produtos de formação (ex.: H₂O₂) (Maher et al., 2011; Belvisi et al., 2011; Deering-Rice et al., 2012; Geppetti et al., 2014). Corroborando esses achados, resultados prévios do grupo demonstraram que a injeção intratraqueal (i. tr.) da mistura dos poluentes 1,2-NQ e PED aumentou a expressão gênica dos canais receptores TRPV1 bem como exacerbou a inflamação aguda em ratos induzida pelas PED. Tal efeito foi inibido pelo tratamento dos animais com o antagonista de substância P ou, ainda, pela degeneração das fibras sensoriais do tipo C, indicando a participação de mecanismos neurogênicos (Teles et al., 2010).

No tecido cardíaco, pelo menos oito isoformas de canais TRP foram identificados, sendo estas da subfamília dos receptores canônicos (TRPC1, TRPC3-7), vaniloides (TRPV2, TRPV4), melastatina (TRPM2, TRPM4-5, TRPM7), policistina (TRPP1/2) (Watanabe et al., 2008); enquanto todas as isoformas, exceto o canal TRPC5, são expressas nas células do NSA (Ju et al., 2007). Quanto ao tecido vascular, os canais TRPV1 foram encontrados em células da musculatura lisa e endoteliais, assim como nos nervos perivasculares, sugerindo um papel importante para a modulação da função vascular (Himi et al., 2012; Yang et al., 2010). Da mesma forma, a expressão do canal TRPV4 foi demonstrada em diversos leitos vasculares, incluindo a artéria cerebral e pulmonar (Marrelli et al., 2007; Filosa et al., 2013; Gao e Wang, 2010), bem como no endotélio vascular de vasos de condutância e resistência (Watanabe et al., 2008) (Figura 4). Os canais TRPV4 encontram-se expressos em astrócitos, células bem próximas à rede vascular podendo atuar como sensores de alterações hemodinâmicas e reguladores do tônus vascular cerebral (Filosa e Iddings, 2013).

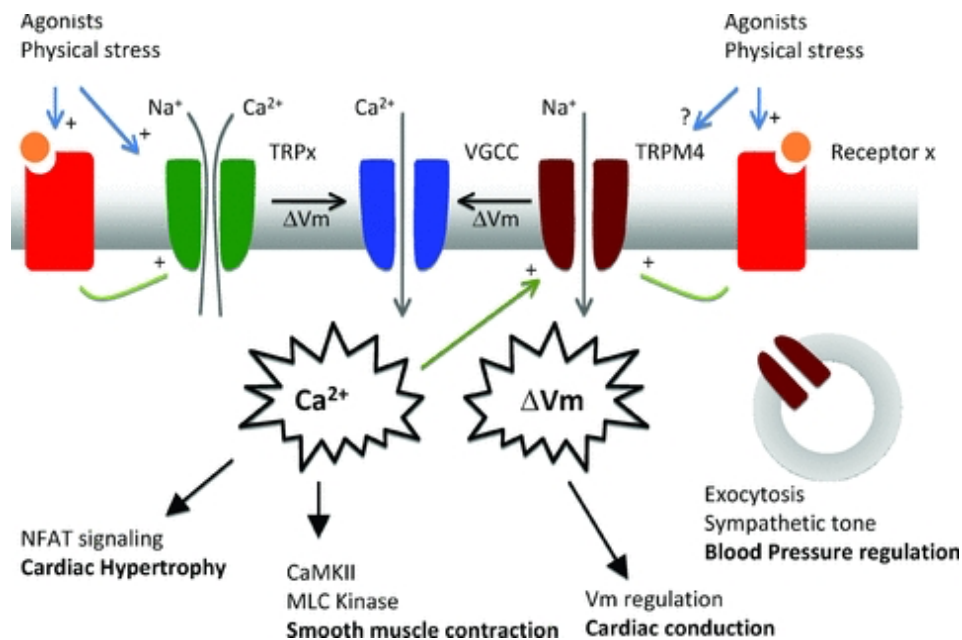


Figura 4 – Fatores ativadores de canais TRP no músculo cardíaco. Os canais TRP podem ser ativados diretamente por agonistas ou indiretamente através de receptores acoplados à proteína G. O influxo de Ca²⁺ a sinalização intracelular e através de fatores como NFAT levam ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, sem alterar a concentração de transitória Ca²⁺ durante o ciclo cardíaco normal. Influxo de Ca²⁺ através de ambos os canais TRP ou canal de Ca²⁺-dependentes de voltagem após a despolarização mediada pelo canal TRP está relacionada com a fosforilação da cadeia leve da miosina quinase (MLCK) e contração do músculo liso durante o desenvolvimento de tónus miogênico. Fonte: Vennekens (2011).

Os efeitos adversos cardiovasculares das PED têm sido alvo de inúmeros estudos. Por exemplo, as PED podem afetar a cascata de coagulação, levando à trombose (Brook et al., 2004; Lee et al., 2014; Koulova e Frishman, 2014) e, também, podem promover a geração de ERO, causando danos celulares e o aumento da expressão de receptores da resposta inata, como os receptores tipo-*toll* (ex.: TLR4 e TLR2; Takano et al., 2002). Nos últimos dez anos, o envolvimento de canais TRP, em particular TRPA1 e TRPV1, tem sido proposto na gênese de doenças cardiovasculares e/ou geneticamente adquiridas frente a uma variedade de estímulos, tais como alterações na pressão arterial, estresse de cisalhamento ou

mecânico, estresse oxidativo, por moléculas lipídicas endógenas (ex.: dianisilfosfato e metabólitos do ácido araquidônico como as prostaglandinas), sinais hipertróficos, maior geração de mediadores inflamatórios. e produtos de peroxidação lipídica formados ou liberados por PAA (Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008).

A ativação de TRPA1 ocorre de diversas maneiras, onde o íon Ca^{2+} representa um dos reguladores mais importantes, podendo tanto potencializar quanto inativar esse receptor (Wang et al., 2008), a saber: 1) pela ligação de seus agonistas (ex.: acroleína, H_2O_2), que induzem correntes internas (despolarização), principalmente de Ca^{2+} ; 2) indiretamente, via ativação de outros canais TRP presentes na mesma fibra nervosa e, 3) via influxo de Ca^{2+} resultante da ativação do próprio TRPA1 que *per se* induz aumento da concentração de íons Ca^{2+} intracelular, levando ao fenômeno de feedback positivo (Doerner et al., 2007; Zurborg et al., 2007; Belvisi et al., 2011).

Além disto, a ativação dos canais TRPV1 leva à geração de NO e, subsequentemente, a ativação de proteínas quinases (PKA), que favorecem a vasodilatação (Himi et al., 2012; Yang et al., 2010). Sob condições isquêmicas, os canais TRPV1 ativados regulam efeitos protetores contra a lesão isquêmica, possivelmente via liberação de neuropeptídeos, cujas ações vasodilatadoras são conhecidas (Wang e Wang, 2005). Corroborando essas evidências, Zhong e Wang (2007) demonstraram que a deleção dos canais TRPV1 em camundongos agravou a lesão miocárdica, enquanto a ativação destes por derivados da 12-lipoxigenase promoveu efeito protetor contra lesões cardíacas oriundas de isquemia (Sexton, et al., 2007).

Considerando que os mecanismos de ativação e liberação de NO, PGI_2 e EDHF são Ca^{2+} -dependente, acredita-se que o influxo de Ca^{2+} , via canais TRPV, podem ativar essas vias (Baylie e Brayden, 2011). Resultados prévios de Köhler e colaboradores (2006) mostram que a inibição da óxido nítrico sintase (NOS) aboliu significativamente a vasodilatação induzida por 4α -PDD (agonista de canais TRPV4) em vasos de grande calibre (artéria carótida), enquanto a vasodilatação induzida pelos canais TRPV4 em vasos de resistência foi inibida por bloqueadores de canais de K^+ ativados por cálcio ($\text{SK}_{\text{Ca}}/\text{K}_{\text{Ca}2.3}$ e $\text{IK}_{\text{Ca}}/\text{K}_{\text{Ca}3.1}$).

2. Justificativa

De acordo com o relatório da OMS (ano), cerca de 3 milhões de óbitos/ano foram atribuídos ao impacto da PAA, como o MP eliminado da exaustão do diesel (PED), a qual também leva à incapacitação de $\approx 22\%$ da população mundial devido, principalmente, distúrbios cardiovasculares, como a isquemia cardíaca e hipertensão. Todavia, os efeitos cardiovasculares e mecanismos da exposição inalatória ao contaminante das PED, 1,2-NQ, são ainda limitados.

Por sua vez, evidências mostram os canais TRP (ex.: subclasses TRPA1, TRPV1 e TRPV4) expressos em fibras nervosas sensoriais do tipo C, que inervam diferentes estruturas nas cavidades torácica e abdominal, representam alvos em potencial para as ações irritantes e lesivas dos PAA (ou dos metabólitos e EROs oriundos destes; vide revisão: Geppetti et al., 2014). Considerando ainda que estudos recentes sugerem que os esses receptores participam do controle e regulação de funções fisiológicas e efeitos fisiopatológicas no coração e vasos (ex.: função e adaptação cardíaca ao estresse isquêmico), acredita-se ser pertinente aprofundar o conhecimento sobre a possibilidade de ativação dos canais TRP pela 1,2-NQ, a qual temos hipotetizado como um dos contaminantes causadores dos efeitos adversos cardiorrespiratórios das PED. Descobertas recentes do grupo complementam essa sugestão e mostram que em artéria pulmonar (AP) de camundongos machos jovens expostos ao poluente 1,2-NQ no período neonatal, os valores de pD_2 e E_{max} frente à fenilefrina ou acetilcolina foram reduzidos comparados com o controle, assim como a atividade de enzimas antioxidantes (SOD e catalase) (Amaral-Neto et al, manuscrito em submissão). Por outro lado, questões mais amplas e prementes relacionadas ao mecanismo de ação da 1,2-NQ (ex.: via ativação de subclasses de canais TRP, geração de EROs) em determinada preparação (vascular ou atrial *in vivo* e *in vitro*), seu metabolismo e efeitos sistêmicos versus locais são hipotetizadas e precisam ser investigadas.

Com esse conhecimento, espera-se auxiliar na compreensão dos efeitos adversos e mecanismos cardiovasculares relacionados à exposição aos PAA. Ainda, contribuir com a introdução e sugestão de novas estratégias terapêuticas (ou moléculas complementares) para as doenças cardiovasculares secundárias à exposição aos PAA e seus produtos de metabolismo.

3. Objetivos

Com base no pressuposto, foram abordados os seguintes objetivos neste estudo:

- i. Padronizar o método de reatividade atrial e caracterizar, de maneira concentração-dependente os efeitos da administração *in vitro* da 1,2-NQ sobre a função atrial *in vitro*;
- ii. Avaliação do aumento da susceptibilidade aos efeitos autonômicos na função atrial (direito) e reatividade vascular (artéria pulmonar e mesentérica) *in vitro* de camundongos jovens expostos precocemente (fase neonatal) ao poluente 1,2-NQ;
- iii. Averiguar se o poluente 1,2-NQ pode piorar o processo arritmico em modelo *in vitro* induzido por Ouabaína;
- iv. Investigar o envolvimento de subclasses dos TRPs nas potenciais alterações cardiovasculares promovidas pela administração *in vitro* ou exposição inalatória *in vivo* do poluente 1,2-NQ;
- v. Determinar a expressão gênica dos receptores TRPA1, TRPV1 e TRPV4, bem como do fator Nrf2 em tecidos expostos agudamente *in vitro* ao poluente 1,2-NQ. Outros genes relacionados à funcionalidade atrial foram avaliados nesses tecidos, tais como: RyR2, SERCA2a, PLB, HCN4 e Ca_v1.2.

4. Material e Métodos

4.1. Soluções e Reagentes

Acetilcolina, fenilefrina, norepinefrina, carbacol, 1,2-naftoquinona, capsazepina, capsaicina, metoprolol e ouabaína foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). HC-033031, HC-047067 e ML-204 foram adquiridos da Tocris Bioscience (MN, EUA). Isoflurano foi obtido da empresa Cristália (Itapira, SP, Brasil). O reagente de Trizol foi adquirido da empresa Thermo-Fischer (MA, EUA) e o SYBR Green obtido da empresa Qiagen (Hilden, Alemanha).

4.1.1. Preparo da solução do poluente 1,2-NQ

O grau de pureza do composto 1,2-naftoquinona utilizado nesse estudo é de 97%, obtido da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Para os estudos de incubação dos vasos e átrio *in vitro*, a solução do poluente 1,2-NQ, na concentração de 100 nM, foi preparada em PBS, contendo DMSO (0,1%). Para os protocolos de exposição ao poluente *in vivo*, a solução de 1,2-NQ, na concentração de 100 nM, foi sempre preparada previamente ao uso em PBS, contendo DMSO e Tween-80 na seguinte proporção, respectivamente: 99,998:0,001:0,001%. O volume da solução de 1,2-NQ (100 nM) colocado no nebulizador para exposição dos animais utilizados nesse estudo foi sempre 10 ml.

4.1.2. Preparo das soluções nutritivas empregadas na reatividade

Para os ensaios de reatividade vascular e atrial foi utilizado a solução de Krebs-Henseleit com a seguinte composição em mM: NaCl 130; KCl 4,7; NaHCO₃ 14,9; CaCl₂.2H₂O 1,6; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄.7H₂O 1,17; EDTA 0,026 e glicose 5,5. A solução foi mantida sob aeração de 95% de O₂ + 5% de CO₂. Durante a coleta dos tecidos essa solução foi mantida sob refrigeração a 4 °C.

4.1.3. Preparo dos fármacos empregados

As soluções estoques dos antagonistas dos receptores TRPV4 e TRPC5, HC-067047 e ML-204, respectivamente, foram dissolvidas em DMSO e, depois, diluídas em solução salina para posterior injeção nos animais (10 mg/kg e 2 mg/kg, respectivamente) ou pré-incubação dos tecidos isolados de animais naive (5 μ M HC-067047). A solução estoque de capsazepina foi preparada em etanol e, em seguida, diluída em solução salina para o tratamento dos animais (50 mg/kg) ou incubação de tecidos (10 μ M) nos protocolos *in vitro*. Os estoques dos fármacos acetilcolina, fenilefrina, norepinefrina, carbacol e ouabaína foram preparados em água destilada, na concentração de 10^{-1} M e, depois, alíquotados para os estudos de reatividade vascular e/ou cronotropismo do átrio isolado nos protocolos *in vitro*.

4.2. Animais e Ética Experimental

Casais de camundongos (um macho e duas fêmeas por gaiola) C57bl/6 selvagens, foram obtidos de matrizes fornecidas pelo Biotério de Camundongos isogênicos do Departamento de Imunologia do ICB/USP, sendo estes mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia do ICB/USP, sob condições controladas de temperatura (22°C) e iluminação (ciclo claro-escuro de 12h), com água e ração *ad libitum*. Uma vez que filhotes nasciam, eram pesados e realizada a sexagem dos mesmos, e apenas machos selecionados para o estudo.

Em determinados protocolos, camundongos da linhagem 129SvWT, background dos nocautes para TRPV1 pesando ~25 g com ~40 dias de vida, foram obtidos do Biotério de Matrizes do ICB.

Nos experimentos realizados na Inglaterra foram utilizados camundongos nocautes para os canais receptores TRPA1 e TRPV1, obtidos do Biotério do *Cardiovascular Division, Life Sciences and Medicine Faculty, King's College, Londres, Inglaterra*.

Os animais foram empregados conforme as normas regidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICB/USP (CEUA número 48/2016) e, quando necessário, do Comitê de Ética em Pesquisa Animal do *King's College*, o qual é regulado pela Agência do Governo do Reino Unido (*Home Office, Scientific*

Procedure) Act 1986. Os animais nocautes utilizados no Reino Unido foram empregados somente nos estudos *in vitro*.

4.3. Delineamento Experimental *in vitro* e *in vivo*

Grupos de 4 ou 5 camundongos selvagens foram expostos ao poluente 1,2-NQ ou seu veículo, durante 15 min, em três dias alternados (6°, 8° e 10° dias de vida; Figura 4), com base no estudo prévio do grupo, sofrendo pequenas modificações (Santos et al., 2014). No 42° dia de vida, os animais jovens foram submetidos ao teste *in vivo* de eletrocardiograma (ECG) e, ao 43° dia de vida, estes foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical mediante anestesia com isoflurano. O material biológico destes foi removido (sangue, artérias e átrio direito) e empregado em testes de reatividade e / ou análises bioquímicas e moleculares (itens 4.4.1, 4.4.4; Figura 4). Em alguns protocolos, os animais neonatos foram previamente tratados (30 minutos antes da nebulização), no 6°, 8° e 10° de vida, com antagonistas de TRPV1, TRPV4 ou TRPC5 conforme descrito no item 4.3.1.

Em protocolos independentes, no Brasil ou Reino Unido, a reatividade das artérias pulmonar e mesentérica e da frequência atrial, assim como de parâmetros bioquímicos e moleculares foram avaliados nesses tecidos obtidos de camundongos selvagens e nocautes TRPA1 e TRPV1 jovens (43 dias de vida) foram avaliadas frente ao tratamento *in vitro* com o poluente 1,2-NQ.

4.3.1 Tratamentos farmacológicos

A fim de avaliar o envolvimento dos canais TRPV1, TRPV4 e TRPC5 nas possíveis disfunções das artérias e coração (átrio direito) de animais submetidos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal, antagonistas dos canais TRPV1 (capsazepina, 50 mg/kg), TRPV4 (HC-067047; 10 mg/kg) e TRPC5 (ML-204; 2 mg/kg) foram administrados pela via intraperitoneal (i.p.) 30 min antes da exposição a 1,2-NQ (6°, 8° e 10° dias; Figura 4). Após 24 horas da última exposição (correspondente ao 43° dia de vida), os animais foram submetidos à eutanásia e, os tecidos foram coletados

para a realização dos ensaios funcionais e moleculares, conforme descrito nos itens 4.3 – 4.6.

4.3.2 Exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ

Grupos de 4 ou 5 camundongos neonatos machos foram nebulizados com poluente 1,2-NQ (100nM, 10ml – 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) ou seu respectivo veículo (Figura 4), durante 15 min. Para isto, os camundongos foram colocados em cuba de polietileno (área de 600 cm^2) acoplada ao inalador ultrassônico com capacidade de nebulização de 1 ml/min (Mod. Respiramax, São Paulo, Brasil), durante 15 minutos em 3 dias alternados (6°, 8° e 10° dias de vida). A capacidade de nebulização corresponde ao volume de 1 mL/min com, aproximadamente, 3% de perda. Após 20 dias de vida, os animais foram separados da mãe e mantidos no biotério de manutenção até a fase juvenil (43° dia de vida), quando então foram usados para a realização dos ensaios (*in vivo* e *in vitro*) funcionais e bioquímicos subsequentes. No 42° dia de vida, os camundongos foram anestesiados e submetidos a eletrocardiograma como descrito em detalhes no item 4.6.3.

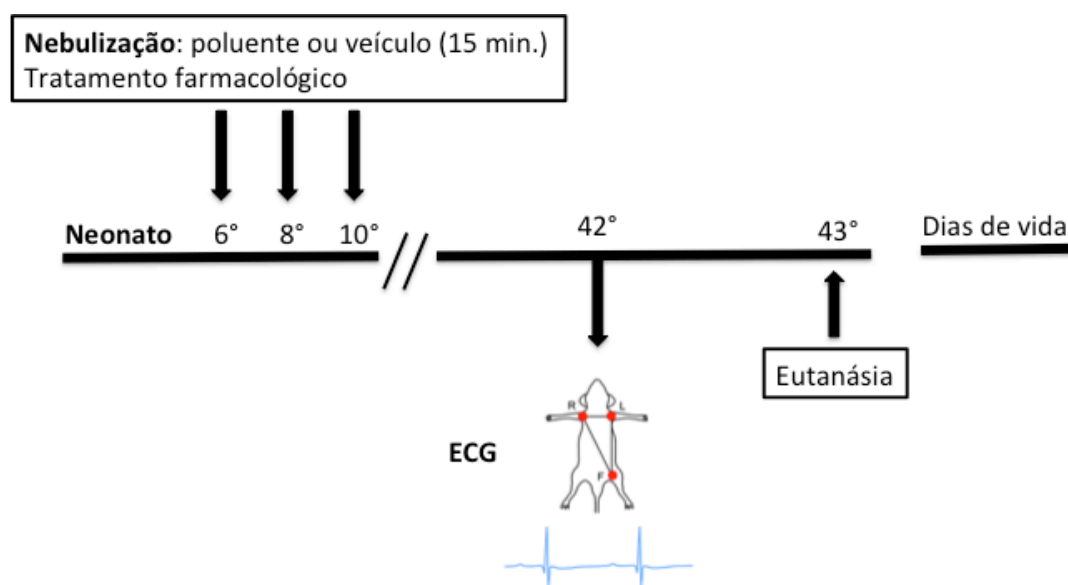


Figura 5 – Ilustração esquemática do delineamento experimental. Ilustração apresenta os períodos da exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ (com e sem tratamentos farmacológicos) e a avaliação dos parâmetros cardiovasculares na fase juvenil destes *in vitro* e *in vivo*. Fonte: Soares (2018).

4.4. Experimentos *in vitro* realizados em artérias (mesentérica e pulmonar) e átrio isolados de camundongos naïve

4.4.1. Padronização da reatividade vascular em artérias

A medida de reatividade vascular em artérias pulmonar (AP) e mesentérica (AM) de camundongos submetidos ao poluente na fase neonatal ou *in vitro* foi realizada com base no método descrito por Mulvany e Halpern (1977). Os animais foram anestesiados e exsanguinados pela aorta abdominal e, em seguida, o coração, pulmão e o mesentério foram removidos e dispostos em placa de Petri, contendo a solução de Krebs-Henseleit a 4 °C. As AP e AM foram dissecadas e segmentadas (2,0 mm) com o auxílio de um microscópio de dissecação. Dois fios de tungstênio (25 µm de diâmetro) foram inseridos no lúmen das artérias e fixados em um miógrafo de força (MultWire Myograph System 620M, DMT, Aarhus, Dinamarca) para o registro da tensão isométrica, que foi realizado pelo sistema de aquisição de dados (PowerLab / 8SP, ADInstruments, Bella Vista, New South Wales, Austrália) e visualizados no computador.

4.4.2. Normalização das artérias

O procedimento de normalização das artérias visa determinar a circunferência interna de um segmento vascular, na qual o desenvolvimento de força é máximo (IC1). Para tanto, determina-se a circunferência interna (IC100) que o segmento vascular totalmente relaxado possui em determinada pressão transmural. Para as AP de resistência, a pressão transmural alvo é de 25 mmHg, que corresponde a 3,32 kPa, enquanto para as AM é de 100 mmHg correspondendo a 13,3 kPa (Mulvany, Halpern, 1977). Após o período de estabilização e aquecimento dos segmentos vasculares (15 minutos) em solução de Krebs-Henseleit (pH 7,4 e a 37 °C), gaseificado com 95% de O₂ e 5% de CO₂, as artérias foram distendidas, de forma gradativa, e a leitura da distância dos arames (µm) e da força aplicada foram registrados a cada ponto. Utilizando-se o programa de normalização (*DMT Normalization Module*, ADInstruments, Austrália), a circunferência interna (µm) foi

calculada a partir da distância dos arames e do diâmetro desses arames, e a tensão da parede (mN/mm), a partir da divisão da força pelo comprimento da parede (duas vezes o comprimento do segmento vascular). A partir da relação de Laplace [$P = \text{tensão da parede} / (\text{circunferência interna} / (2 \cdot \pi))$], a pressão necessária para distender o segmento vascular foi estimada a cada circunferência interna calculada. Ajustando a equação de Laplace na curva gerada pela tensão na parede do vaso plotada contra a circunferência interna, determinou-se a IC100. A IC1 foi calculada, a partir da IC100, via fórmula $IC1 = 0,90 \times IC100$, gerando uma circunferência interna, cuja produção de força ativa e sensibilidade do segmento aos agonistas é máxima. O diâmetro interno normalizado foi calculado dividindo-se IC1 por π .

4.4.3. Curvas concentração-resposta ao poluente 1,2-NQ e agentes testes em artérias (mesentérica e pulmonar) de camundongos naïve

As AP e AM foram isoladas, montadas no sistema e normalizadas, conforme descrito nos itens 4.4.1 e 4.4.2. Concentrações crescentes da 1,2-NQ (10^{-11} - 10^{-4} M) foram adicionadas à preparação (cuba) e a resposta vascular foi avaliada ao longo de 2 min para cada concentração aplicada. Para avaliar potenciais mecanismos dependentes e independentes do endotélio envolvidos nos efeitos do poluente, algumas manobras farmacológicas foram realizadas, via emprego prévio de antagonistas por 60 minutos na preparação relacionados na Tabela 1:

Tabela 1 – Antagonistas de canais TRP e suas concentrações utilizadas.

Fármaco	Mecanismo de ação	Concentração	Referência
Capsazepina	Antagonista de TRPV1	10 μ M	Caterina et al., 1997
HC-067047	Antagonista de TRPV4	5 μ M	Vriens et al., 2009
HC-030031	Antagonista de TRPA1	10 μ M	Bodkin and Brain, 2011

Fonte: Soares (2018).

Os agentes testes (agonistas/antagonistas) foram diluídos no banho e incubados juntamente com os tecidos durante 60 minutos. Como controle positivo, curvas concentração-resposta aos agonistas dos canais receptores TRPs foram também realizadas na ausência e presença dos respectivos antagonistas nas

mesmas concentrações, a saber: agonistas para TRPA1 (alil-isotiocianato – AITC, 10 pM a 300 μ M), TRPV1 (capsaicina, 10 pM a 300 μ M) e TRPV4 (GSK1016790a, 10 pM a 300 μ M).

4.4.4 Padronização e registro das atividades cronotrópica e inotrópica em átrio isolado de camundongos frente a administração in vitro do poluente 1,2-NQ

Camundongos, de 4 a 5 semanas, foram anestesiados com o anestésico gasoso isoflurano (5% + 95% O₂) e submetidos à eutanásia via deslocamento cervical. O coração foi cuidadosamente removido e mantido em solução Krebs-Henseleit, a 4 °C, onde o átrio direito foi cuidadosamente isolado, preservando a orientação das fibras musculares. Com o auxílio de fio de tungstênio (40 μ m), as extremidades foram fixadas em cuba do miógrafo (DMT620), preenchida com a solução de Krebs-Henseleit (5 ml; 37 °C), constantemente aerada (5% de CO₂ e 95%O₂). Os tecidos cardíacos foram submetidos ao processo de lavagem em intervalos de 15 minutos durante o período de 60 minutos, ou até atingir um sinal estável de contrações.

Concentrações crescentes de NE (10⁻¹¹ a 10⁻⁴M) foram adicionadas à cuba com período de 2 minutos de incubação à cada aplicação. Em seguida, os tecidos foram lavados 4 vezes com solução nutriente, estabilizados por 60 minutos, com lavagens a cada 15 minutos, e realizada curva concentração-resposta frente à CCh (10⁻¹¹ a 10⁻⁵M) realizada.

4.4.5. Registro da atividade cronotrópica em átrio isolado de camundongos para análise de agonistas beta adrenérgicos

Camundongos jovens foram anestesiados com isoflurano (5% + 95% O₂) e submetidos à eutanásia via deslocamento cervical. O átrio direito foi cuidadosamente isolado e montado na cuba do miógrafo (DMT620), conforme descrito no *item 2.4.4*. Curvas concentração-resposta para os efeitos cronotrópicos positivos dos agentes adrenérgicos norepinefrina (NE), salbutamol (SB) e isoproterenol (ISO) e de forksolin (FK) (agonista de adenilato ciclase) na presença de 1,2-NQ (100 nmol) foram construídas via variação cumulativa da concentração

dos agonistas supracitados. Foi realizada curva concentração-resposta para 1,2-NQ na presença do antagonista de receptor beta adrenérgico do tipo 1, metoprolol na concentração de 0,4 μ M.

4.4.6. Indução de fibrilação em átrio isolado e efeito da 1,2-NQ

Camundongos jovens foram anestesiados com isoflurano (5% CO₂ + 95% O₂) e submetidos à eutanásia via deslocamento cervical. O átrio direito foi cuidadosamente isolado e montado na cuba do miógrafo (DMT620), conforme descrito no *item 2.4.4*. Ouabaína foi incubada por 30 min na concentração de 1 μ M. Após verificar a existência de fibrilação, concentrações crescentes de 1,2-NQ foi aplicado no banho. Os registros foram analisados, definido como contrações rápidas contínuas ou irregulares por 30 segundos contínuos (Shpak et al., 2006), para verificação dos níveis de fibrilação na presença e ausência do poluente.

4.4.7. Determinação de arritmias em átrio direito de camundongos expostos a 1,2-NQ

Para avaliar a propensão de desenvolvimento de arritmias atrial, nas curvas concentração-resposta para o agonista NE, foi avaliado se ocorreu arritmias e comparado entre os grupos estudados. Os resultados foram expressos como porcentagem de episódios arrítmicos.

4.5. Análise da expressão do RNAm para receptores TRP, β -adrenérgicos, Nrf2 e canais em artérias e átrio direito de camundongos frente a 1,2-NQ

Amostras de AP e AM e do átrio direito foram removidas dos diferentes grupos experimentais de camundongos jovens após a eutanásia. Para extração do RNA total, foi utilizado o método de Trizol, conforme instruções do fabricante (Life Technologies, Carlsbad, EUA). Feito isto, uma quantidade de 0,5 μ g de RNA total para cada amostra foi separada e utilizada para obtenção da fita de cDNA, pelo método da transcriptase reversa. O ensaio de PCR em tempo real foi realizado em volume final de 12,5 μ l, contendo oligonucleotídeos específicos para os receptores

beta adrenérgicos (tipo 1, 2 e 3), Nrf2, TRPA1, TRPV1, TRPV4, Ca_v1.2 (canal de Ca²⁺ -dependente de voltagem do tipo 1.2), RyR2 (canal de rianodina tipo 2), SERCA2a (retículo sarcoendoplasmático do tipo 2A), PLB (fosfolamban), HCN4 (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide regulation of cation channel*). A especificidade da reação com SYBR® Green foi confirmada via análise da curva de dissociação.

As reações de PCR foram realizadas e analisadas utilizando-se o sistema Corbett Research (Corbett Life Sc., Sydney, Austrália). A expressão de RNAm foi quantificada, utilizando-se o cálculo do $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl, 2001), enquanto a normalização das amostras foi realizada utilizando-se o RNAm para o controle interno padronizado, HPRT (Tabela 3). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR em tempo real.

Gene	Senso	Antisenso
<i>Ca_v1.2</i>	ACCATTGAATTGCTCTAAAGATGA	CTAACCACCAGCAGGTCCAG
<i>RyR2</i>	CACCAGTACGACACAGGCTT	TGCGTTTGATGCTCTCATGC
<i>SERCA2a</i>	GGCTCCATCTGCTTGTCAT	TGGAAAATGAGCGGCAAAGG
<i>PLB</i>	TGGGACCAAAGGAACTTGCC	TAGGAGACCTGTTACGCAGGAA
<i>HCN4</i>	CTGGACCGCATAGGCAAGAA	GAAGACGCCTGAGTTGAGGT
<i>Nrf2</i>	GCATGATGGACTTGGAGTTGC	GCTCATAGTCCTTCTGTGCGCT
<i>TRPA1</i>	AGGTGATTTTTAAACATTGCTGAG	CTCGATAATTGATGTCTCCTAGCAT
<i>TRPV1</i>	GCGACCATCCCTCAAGAGT	CTTGCGATGGCTGAAGTACA
<i>TRPV4</i>	CGGACCACAGTGGACTACCT	AGCCATCGACGAAGAGAGAA
<i>Adb1</i>	CTACAACGACCCCAAGTGCT	ACGTAGAAGGAGACGACGGA
<i>Adb2</i>	AATAGCAACGGCAGAACGGA	TCAACGCTAAGGCTAGGCAC
<i>Adb3</i>	GCACCATCTTGGACCATCTCT	AGTGAAAAAGGACCCATTCC
<i>HPRT</i>	TATCTGCACTGCCAAGACTGAAT	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC

Fonte: Soares (2018).

4.6. Avaliações cardiovasculares *in vivo* e *in vitro* e bioquímicas em camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

4.6.1. Medição da pressão arterial (PA) caudal

No 42º dia de vida dos camundongos expostos na fase neonatal ao poluente (1,2-NQ) ou seu veículo, a PA caudal destes animais foi indiretamente aferida por meio do método de pletismografia de cauda. Para isto, um oclisor e um sensor de pulso foram colocados na porção proximal da cauda de cada camundongo e então acoplados ao esfigmomanômetro elétrico PE-300 conectado ao sistema de transdução de sinal (PowerLab/4S, ADInstrument Pty Ltd, Austrália). Os camundongos foram mantidos, por cerca de 5 minutos, em caixa com temperatura elevada (40 °C) e, depois, foram individualmente acomodados em cilindro de contenção com abertura para a cauda e focinho. A média final da pressão arterial caudal de cada camundongo foi determinada com base em 5 medidas sequenciais, e expressa como mmHg.

4.6.2. Eletrocardiograma (ECG)

Camundongos jovens, com 43 dias de vida, expostos a 1,2-NQ (ou respectivo veículo) na fase neonatal foram submetidos ao teste de eletrocardiograma sob anestesia inalatória com o anestésico isoflurano (2,5% em O₂).

O método do registro dos sinais biológicos de ECG foi obtido por meio de derivações bipolares (triângulo de Einthoven), onde os eletrodos foram implantados nas patas posteriores e na pata anterior esquerda, seguindo o modelo de 3 derivações clássicas. A aquisição dos sinais foi realizada, utilizando-se o sistema de registro de biopotenciais Neurolog System (Digitimer Ltd, Inglaterra, Reino Unido), usando uma interface A/D CED 1401 (CED, Cambridge Eletronic Design, Cambridge, Reino Unido) e armazenado em computador, operado pelo programa Spike 2 (CED), cujo roteiro padrão é capaz de acessar dados e análises *on-line* e *off-line*. Os registros foram obtidos com uma amostragem temporal de 5 minutos ininterruptos. Com o auxílio do módulo HRV (Heart Rate Variability) - LabChart Pro 8

(ADInstruments, Australia), foram calculados os parâmetros *RR* (médias de todos os intervalos R-R), *SDRR* (desvio padrão de todos os intervalos R-R), *RMSSD* (raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos R-R normais adjacentes ao quadrado) e a relação *LF/HF*, onde LF (banda de baixa frequência 0,4 a 1,5 Hz) reflete a modulação pelos tônus simpático e parassimpático por meio da atividade barorreflexa (regulação da pressão sanguínea), enquanto a banda de frequência de 0,15 a 5,0 Hz (frequência alta: HF) representa a modulação da atividade vagal.

4.6.3 Ensaio in vitro da reatividade vascular em artéria pulmonar obtida de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Após 15 minutos do processo de normalização, conforme descrito no item 4.4.2, os anéis de AP obtidos de animais controle e expostos ao poluente foram pré-contraídos com a solução de KCl (60 mM), a fim de avaliar a integridade do músculo liso. Adiante, as artérias foram lavadas (3 vezes) com a solução de Krebs-Henseleit e, após 15 minutos, os vasos foram pré-contraídos com fenilefrina (Phe, 1 μ M), e a integridade do endotélio avaliada por meio da capacidade vasodilatadora da acetilcolina (ACh, 1 μ M). Os anéis foram lavados com a solução de Krebs e mantidos durante 30 minutos para estabilização. A seguir, os vasos foram pré-contraídos com a Phe (1 μ M) e, depois, curvas concentração-respostas à ACh foram realizadas em concentrações crescentes (10 pM a 300 μ M). Curvas concentração-respostas foram também realizadas para o agonista β -adrenérgico Phe (10 pM a 300 μ M).

4.6.4 Registro das atividades cronotrópica e inotrópica em átrio isolado de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

O átrio direito foi cuidadosamente isolado e montado na cuba do miógrafo (DMT620), conforme descrito no item 4.4.4. Curvas concentração-resposta para os efeitos cronotrópicos positivos do agente adrenérgico norepinefrina, ou cronotrópicos

negativos com o agente colinérgico carbacol, foram construídas via variação cumulativa da concentração dos agonistas supracitados.

4.8. Análise estatística

Para os resultados dos estudos de tecido *in vitro*, a resposta máxima, medida em mN/mm de tensão (artérias) e batimentos por minuto (BPM; átrio direito) e a concentração do agonista, que induz metade da resposta máxima EC_{50} , foi expressa como pD_2 , sendo esta calculada a partir das curvas concentração-resposta. Para cada curva concentração-resposta, a resposta máxima e a pD_2 foram calculadas utilizando-se a análise de regressão não-linear (GraphPad-Prism, version 5 Software). Para os estudos *in vivo* (eletrocardiograma) e da expressão de RNA mensageiro, os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão da média (epm). As análises estatísticas foram realizadas via análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós- teste Bonferroni para múltiplas comparações ou teste *t* de Student não pareado, quando apropriado. O nível de significância mínima aceitável foi de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeitos cronotrópico e vascular do tratamento *in vitro* com a 1,2-NQ

5.1.1. A administração *in vitro* da 1,2-NQ em átrio direito isolado de camundongos naïve altera a função cronotrópica

Curvas clássicas concentração-resposta à administração de agonistas adrenérgico e colinérgico foram realizadas em átrio direito isolado de camundongos naïve (Figura 6). Conforme esperado, a administração do agonista de receptores adrenérgico norepinefrina (NE) aumentou marcadamente o batimento cardíaco espontâneo (BPM) (cronotropismo positivo), enquanto o agonista colinérgico (receptor muscarínico), carbacol (CCh), reduziu o BPM (cronotropismo negativo) de forma concentração-dependente (Figura 6A-B).

A incubação prévia de átrios (-30 min) com a solução nutritiva contendo 1,2-NQ (100 nM) reduziu significativamente (* $P < 0,05$) a resposta máxima cronotrópica positiva (EMax; 150 ± 11 BPM) frente ao agonista adrenérgico NE, que foi estatisticamente diferente do grupo não tratado com o poluente ($197 \pm 10^*$ BPM, $n=5$ /grupo; Figura 6C). Em contrapartida, a adição de concentrações crescentes (10^{-10} - 10^{-6} M) da 1,2-NQ na preparação de átrio isolado promoveu *per se* aumento do BPM espontâneo, atingindo um platô entre as concentrações de 10^{-8} - 10^{-6} M (Figura 6D).

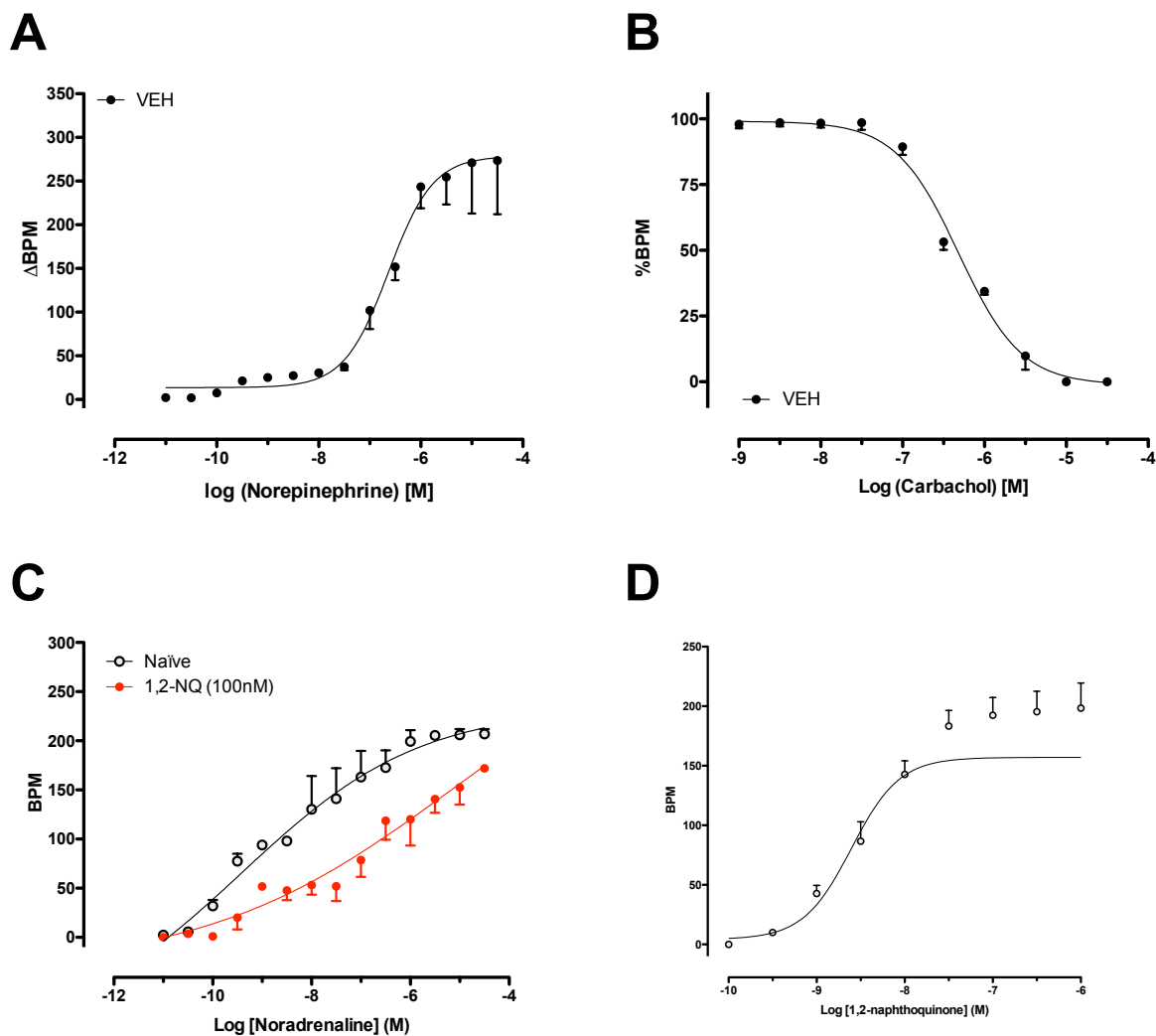


Figura 6 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em átrio direito isolados de camundongos. Em (A), concentrações crescentes de norepinefrina promoveram o aumento dos batimentos espontâneos (BPM), enquanto carbachol (B) promoveu a redução dos batimentos. A incubação de 1,2-NQ por 30 minutos altera o cronotropismo positivo (C). Em concentrações crescentes *in vitro*, a 1,2-NQ aumentou o BPM em átrio direito de camundongos (D). Fonte: Soares (2018).

5.1.2. Aplicação in vitro da 1,2-NQ induz contração arteriolar enquanto a pré-incubação do poluente nesses tecidos reduz o relaxamento dependente do endotélio

A incubação prévia (-30 min) de segmentos de AM e AP com a solução nutritiva contendo 1,2-NQ (100 nM e 1000 nM, respectivamente) reduziu significativamente (*P<0,05) a resposta máxima de relaxamento promovida pela ACh em ambas AM (Figura 7A) e AP (Figura 7B): (EMax (%) – WT 32,46 ± 2,06 vs 1,2-NQ 15,10 ± 1,39*, onde *P<0,05 vs WT, n=4).

Quando concentrações crescentes da 1,2-NQ (10^{-8} – 10^{-4} M) foram administradas nas AM ou AP isoladas de camundongos naïve, um aumento na reatividade (contração) dessas artérias foi observado, de maneira concentração-dependente (Figura 7C e D; AM e AP respectivamente).

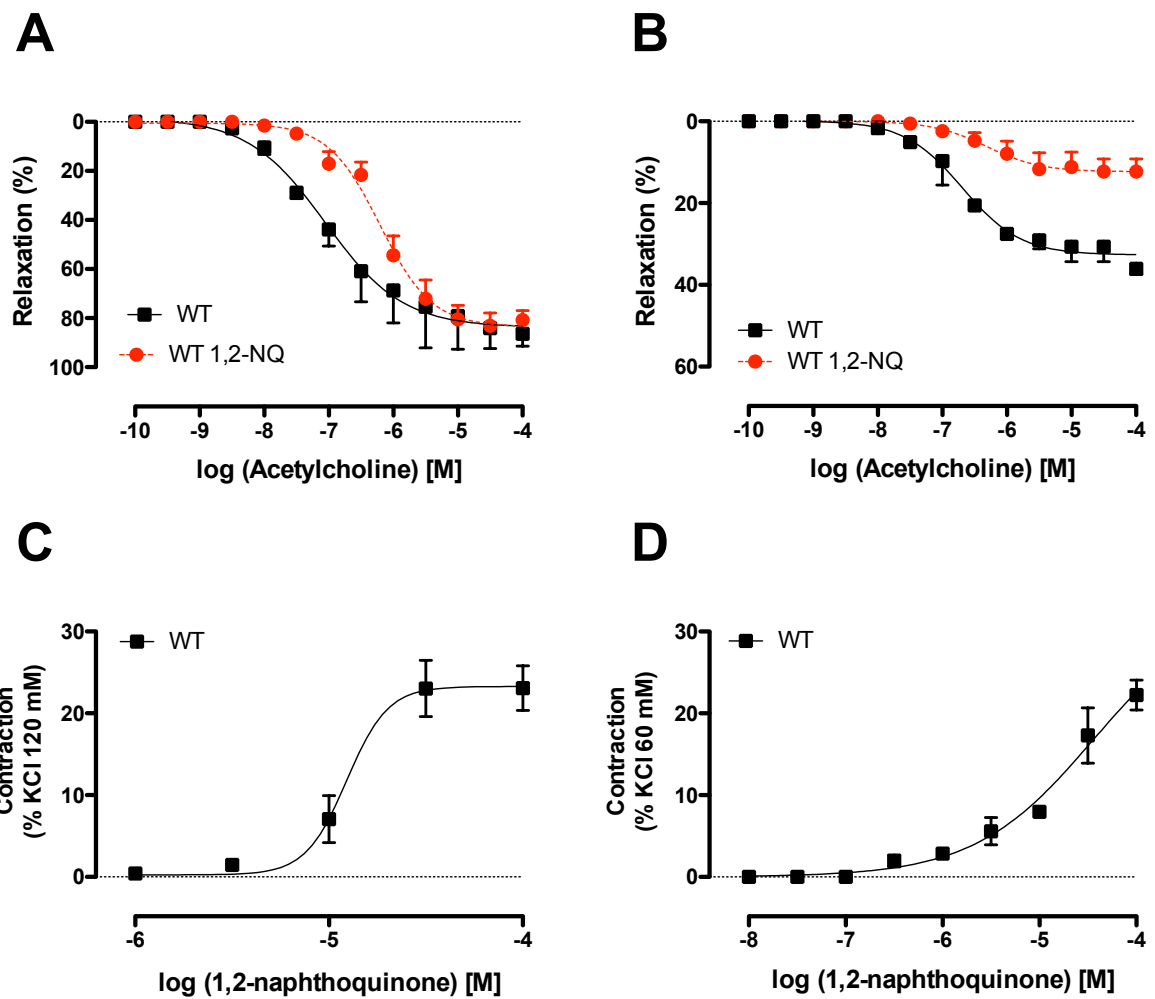


Figura 7 – Curvas concentração-resposta em artérias mesentérica e pulmonar. Em (A), a incubação com a 1,2-NQ (100 nM, 30 min) reduziu a pD₂ para a acetilcolina. Em artéria pulmonar, a incubação com a 1,2-NQ (1000 nM, 30 min) reduziu a vasodilatação da acetilcolina (B). Concentrações crescentes do poluente promovem vasoconstrição em artéria mesentérica (C) e pulmonar (D). Fonte: Soares (2018).

5.2. Efeitos vascular *in vitro* do poluente 1,2-NQ após deleção ou bloqueio farmacológico de receptores TRP

5.2.1. Papel dos receptores TRPA1 nas alterações de reatividade das AM e AP expostas *in vitro* ao poluente 1,2-NQ

Conforme demonstrado acima, a administração *in vitro* de concentrações crescentes da 1,2-NQ em AM ou AP isoladas de camundongos selvagens promoveu contração de maneira concentração-dependente. Em camundongos nocautes para TRPA1, essas respostas foram semelhantes àsquelas observadas na AP (Figura 8B) de camundongos selvagens; porém, marcadamente diferente quando a resposta máxima foi avaliada na AM dos mesmos animais nocautes para TRPA1 (EMax 24.3 ± 2.5 vs. $17.3 \pm 1.2^*$ TRPA1^{-/-}; n=5, *P<0,05) (Figura 8A).

Quando os segmentos de AP de camundongos selvagens foram pré-incubadas com a solução nutritiva contendo 1,2-NQ (1000 nM) e pré-contraídas com Phe, a resposta vasodilatadora máxima (EMax) frente ao agente colinérgico ACh foi significativamente reduzida em relação à vasodilatação na AP controle tratada com o veículo (animais selvagens); todavia, essa resposta não diferiu da vasodilatação promovida pela ACh na AP pré-incubada com 1,2-NQ obtida de camundongos nocautes para TRPA1 (Figura 8C, Tabela 3).

A pré-incubação de segmentos de AM de camundongos selvagens com a solução de 1,2-NQ (100 nM) não afetou a resposta máxima de relaxamento promovida pela ACh em relação ao relaxamento obtido em AM de camundongos nocautes de receptores TRPA1 que foram pré-expostas ao poluente 1,2-NQ ou comparada à vasodilatação evocada pela ACh em AM controle (veículo) obtida de animais selvagens (Figura 8D).

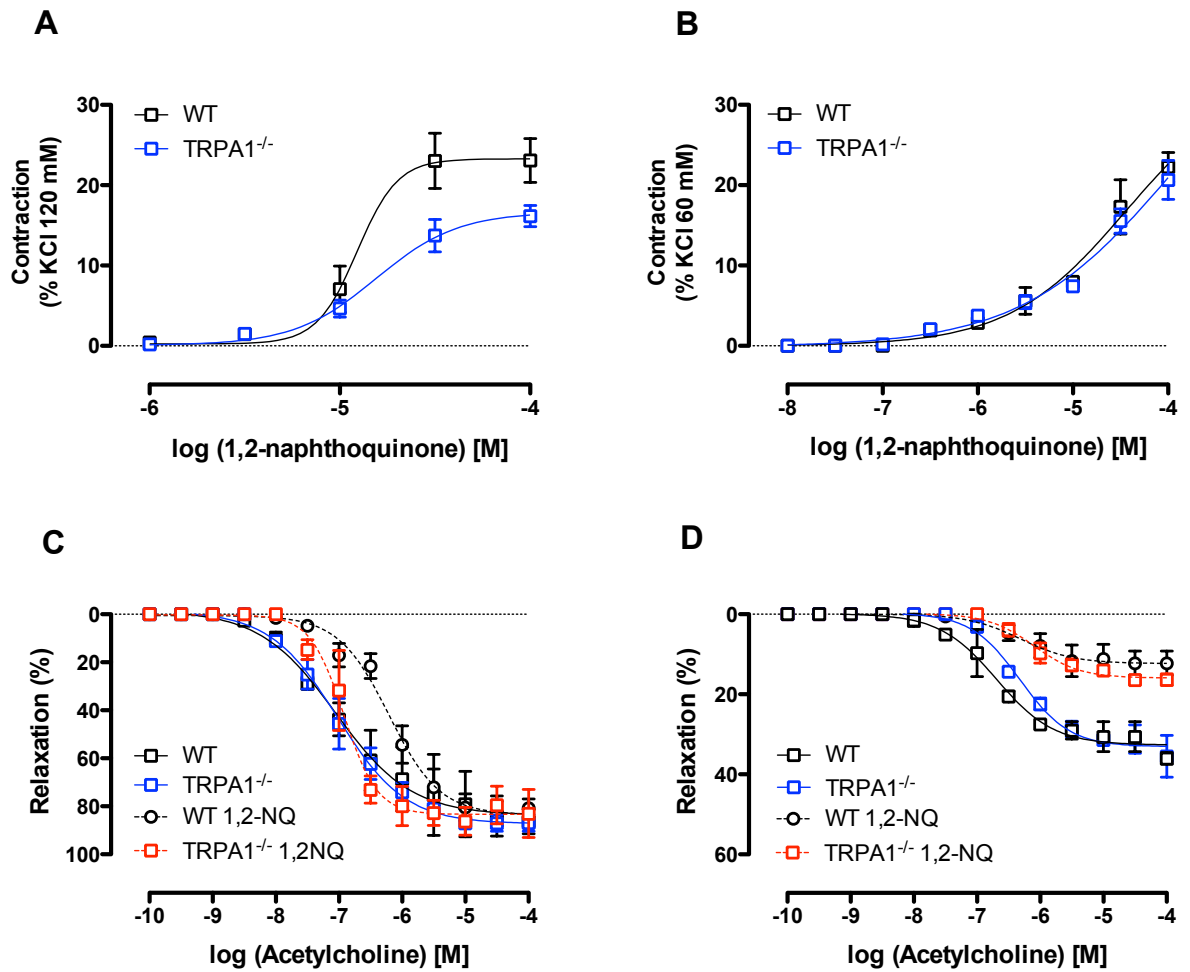


Figura 8 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em artérias mesentérica e pulmonar de camundongos selvagens (WT) e nocautes para TRPA1. Concentrações crescentes de 1,2-NQ promoveram vasoconstrição em artéria mesentérica (A) e pulmonar (B). A incubação com a 1,2-NQ (100 nM, 30 min) reduziu a pD₂ frente ao agonista colinérgico acetilcolina, sem alterar a reatividade vascular de animais nocautes para TRPA1 (C). Em artéria pulmonar de animais selvagens e nocautes para TRPA1, a incubação com a 1,2-NQ (1000 nM) não alterou a vasodilatação da acetilcolina (D). Fonte: Soares (2018).

Tabela 3 – Variáveis farmacológicas ($EMax$ e pD_2) avaliadas em função das curvas concentração-resposta para o agonista acetilcolina em AM e AP de animais naïve ou nocautes para TRPA1 incubados com a 1,2-NQ ou respectivo veículo.

<i>Artéria Mesentérica</i>	<i>EMax (%)</i>		<i>pD₂</i>	
	VEH	1,2-NQ	VEH	1,2-NQ
Naïve	88.20±5.30	84.45±4.41	6.06±0.98	6.22±0.12
TRPA1-KO	90.07±1.87	89.15±4.28	7.02±0.16	6.91±0.22

<i>Artéria Pulmonar</i>	<i>EMax (%)</i>		<i>pD₂</i>	
	VEH	1,2-NQ	VEH	1,2-NQ
Naïve	35.95±0.59	12.58±2.10*	6.56±0.19	5.84±0.52*
TRPA1-KO	35.42±3.44	17.26±0.71 [#]	6.19±0.14	6.11±0.11

Valores estão expressos como media ± epm, *P<0.001 vs. Naïve; [#]P<0.001 vs. TRPA1-KO; n=5.

Fonte: Soares (2018).

5.2.2. As alterações de reatividade das AM, mas não AP, expostas in vitro ao poluente 1,2-NQ são protegidas pela deleção do TRPV1

Quando os segmentos de AP de camundongos selvagens foram pré-incubadas com a solução nutritiva contendo 1,2-NQ (1000 nM) e pré-contraídos com Phe, a resposta máxima (EMax) evocada pela ACh foi significativamente reduzida em relação à respectiva EMax na AP controle tratada com o veículo; todavia, essa resposta não foi diferente da vasodilatação promovida pela ACh na AP pré-incubada com a 1,2-NQ obtida de camundongos nocautes para TRPV1 (Figura 9A, Tabela 4).

A pré-incubação de segmentos de AM de camundongos selvagens com a solução de 1,2-NQ (100 nM) não afetou a resposta máxima de relaxamento promovida pela ACh em relação a resposta relaxante observada em AM pré-expostas a 1,2-NQ e obtidas de camundongos selvagens; todavia, a resposta vasodilatadora induzida pela ACh em vasos de animais nocautes para TRPV1 que foram incubados com a 1,2-NQ foi suprimida (Figura 9B e Tabela 4).

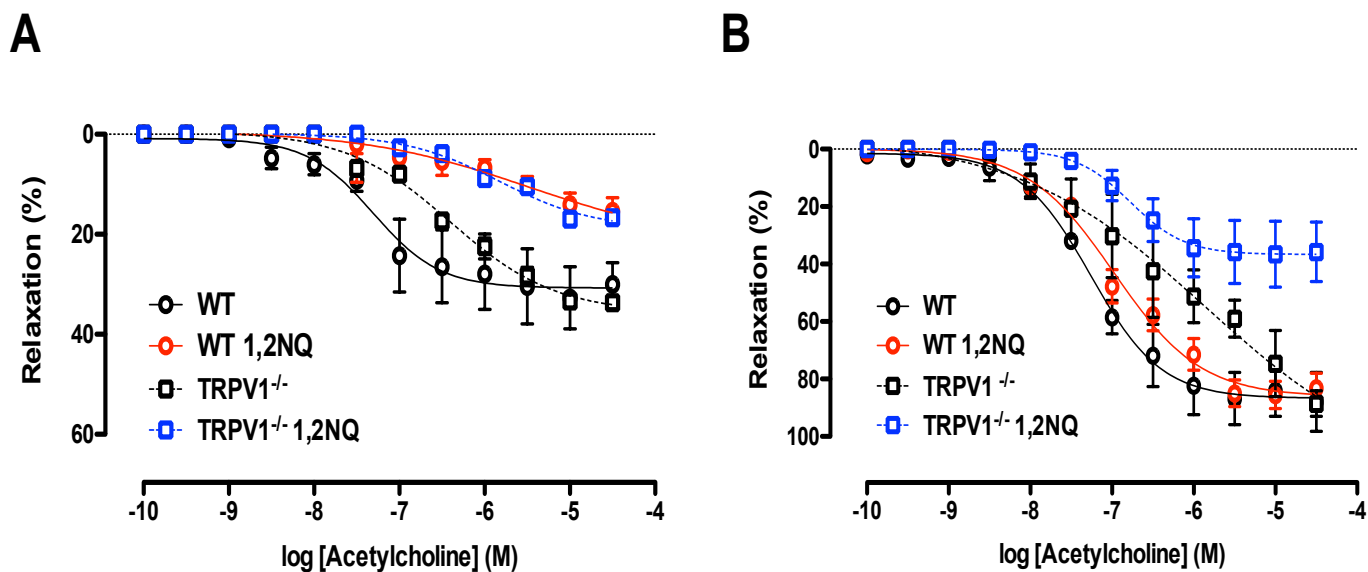


Figura 9 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em artérias pulmonar (A) e mesentérica (B) de camundongos selvagens (WT) e nocautes para TRPV1. A incubação por 30 minutos com a 1,2-naftoquinona (100 nM) reduziu a pD_2 para o agonista ACh, sem alterar a resposta em vasos de animais nocautes para TRPV1. A incubação com poluente (1000 nM) em artéria pulmonar de animais selvagens e nocautes para TRPV1 reduziu o efeito vasodilatador da acetilcolina. Fonte: Soares (2018).

Tabela 4 – Variações farmacológicas ($EMax$ e pD_2) avaliadas em função das curvas concentração-resposta para acetilcolina em AM e AP de animais naïve ou nocautes para TRPV1 incubados com veículo ou 1,2-NQ.

Artéria Mesentérica	$EMax$ (%)		pD_2	
	VEH	1,2-NQ	VEH	1,2-NQ
Naïve	85.36±6.51	83.22±5.10	6.24±0.01	5.74±0.2*
TRPV1-KO	89.10±2.60	37.44±10.96 [#]	5.86±0.38	5.77±0.11

Artéria Pulmonar	$EMax$ (%)		pD_2	
	VEH	1,2-NQ	VEH	1,2-NQ
Naïve	36.66±4.93	15.41±2.68*	6.47±0.86	6.54±0.63
TRPV1-KO	33.44±0.29	16.63±0.40 [#]	6.37±0,05	5.81±0.06 [#]

Os valores estão expressos como a média ± epm, * $P < 0.001$ vs. Naïve; [#] $P < 0.01$ vs. TRPV1-KO; n=3-4. Fonte: Soares (2018).

5.2.3. Efeitos farmacológicos decorrentes ao bloqueio dos canais receptores TRPA1, TRPV1 e TRPV4 nas alterações de reatividade da AM exposta ao poluente 1,2-NQ

A Figura 10 demonstra que a administração *in vitro* de concentrações crescentes da 1,2-NQ em AM isoladas de camundongos selvagens promoveu, de maneira concentração-dependente, vasoconstrição nesse tecido. O bloqueio farmacológico prévio (- 30 min) dos canais TRPV1 com a CZP (10 μ M) ou dos TRPV4 com o HC-067047 (5 μ M) aumentou parcialmente a vasoconstrição gerada pela 1,2-NQ em AM isoladas de camundongos selvagens (EMax(%): 23,3 \pm 0,5; 27,7 \pm 0,04*; 30,5 \pm 0,3*, naïve, CZP e HC067047, respectivamente; *P<0,05 vs Naïve; n=5). Já o antagonismo de TRPA1 com o HC-030031 (10 μ M) não alterou a resposta máxima, porém aumentou (*P<0,05) a sensibilidade ao poluente 1,2-NQ (pD₂: 4.91 \pm 0,03; 5,13 \pm 0,02*; 5,27 \pm 0,04*, naïve, HC-030031 e L-NAME, respectivamente; *P<0,05 vs Naïve; n=5).

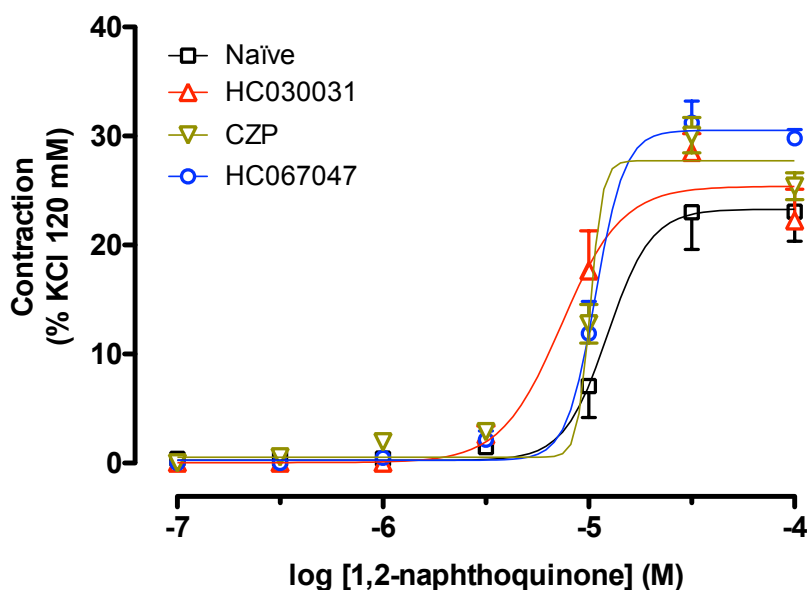


Figura 10 – Figura representativa das curvas concentração-resposta de 1,2-naftoquinona em artéria mesentérica de camundongos selvagens. Os antagonistas de TRPA1 (HC-030031), TRPV1 (CZP) e TRPV4 (HC-067047) foram aplicados aos tecidos 30 minutos antes da realização da curva concentração-resposta. Fonte: Soares (2018).

5.2.4. Efeitos distintos do bloqueio farmacológico dos canais TRPA1, TRPV1 e TRPV4 nas alterações de reatividade da AP exposta in vitro ao poluente 1,2-NQ

A Figura 11 demonstra que o bloqueio farmacológico prévio (- 30 min) dos canais TRPA1 com a HC-030031 (10 μ M) ou do TRPV1 com a CZP (10 μ M) aumentou parcialmente a vasoconstrição gerada pela 1,2-NQ em AP isoladas de camundongos selvagens (EMax(%): 22,2 \pm 1,8; 37,2 \pm 1,1*; 28,9 \pm 0,9*, Naïve, HC-030031 e CZP, respectivamente; *P<0,05 vs Naïve, n=4). Por outro lado, o bloqueio farmacológico do canal TRPV4 com o antagonista HC-067047 (5 μ M) reduziu a vasoconstrição evocada pela 1,2-NQ em relação àquela observada no grupo naïve (EMax(%): 22,2 \pm 1,8; 14,2 \pm 0,1*, naïve e HC-067047, respectivamente; *P<0,05 vs Naïve, n=4).

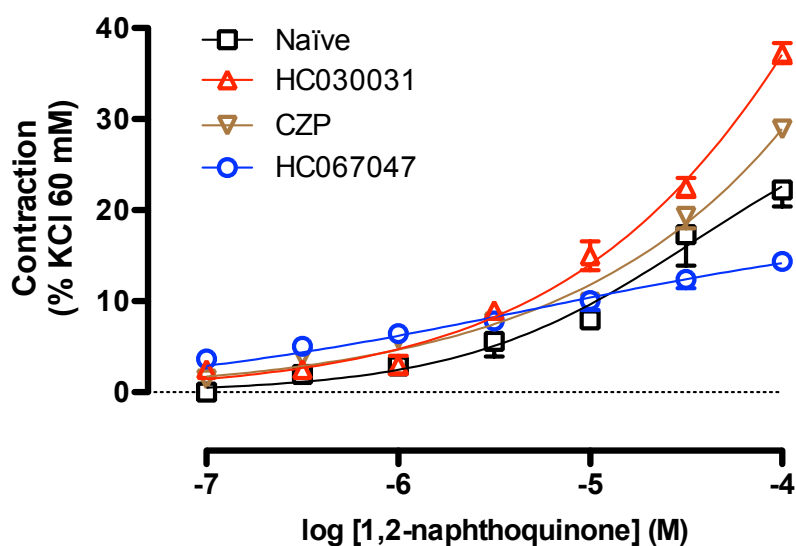


Figura 11 – Figura representativa das curvas concentração-resposta de 1,2-naftoquinona realizadas em artéria pulmonar de camundongos selvagens. A incubação com os antagonistas de TRPA1 (HC-030031), TRPV1 (CZP) e TRPV4 (HC-067047) foi realizada por 30 minutos antes da realização da curva concentração-resposta. Fonte: Soares (2018).

5.3. Análise do perfil de expressão de RNA mensageiros

5.3.1 O poluente 1,2-NQ *in vitro* aumenta a expressão RNAm do Nrf2 em AM de animais selvagens, sem afetar a expressão dos TRPV1 e TRPV4 em AP e AM

A Figura 12 representa o perfil de expressão de RNA mensageiro para as subclasses de canais receptores TRP (TRPV1 e TRPV4) e o fator nuclear (Nrf2) em AM e AP tratadas (ou não; 1h) com a 1,2-NQ (1000 nM) na presença ou ausência dos antagonistas para os TRPV1 (CZP 10 μ M) e TRPV4 (HC-067047 5 μ M).

Conforme ilustram as figuras 12A e D, a adição *in vitro* da 1,2-NQ aumentou significativamente a expressão RNAm para o Nrf2 na AM, mas não afetou estatisticamente a expressão desse fator na AP, respectivamente. O bloqueio farmacológico do TRPV1 aumentou $*P < 0,001$ *per se* a expressão RNAm para o Nrf2 na AP, sendo esse aumento (RNAm para o Nrf2) visto em menor proporção na AM (Figura 12A e D). P tratada com a 1,2-NQ e, surpreendentemente, aumentou expressão desse fator na AM exposta ao poluente (Figura 12D). Quando a AP e AM foram tratadas com o poluente e CPZ, a expressão (RNAm) do Nrf2 reduziu discretamente na AP, e aumentou na AM em relação ao respectivo grupo de tecido exposto ao veículo (Figura 12A-D). O tratamento dos vasos com o antagonista TRPV4, HC-067047, promoveu *per se* um aumento significativo da expressão de Nrf2 na AM, mas não na AP em relação ao controle (veículo; Figura 12A-D). Esse antagonista reverteu o aumento (RNAm) do Nrf2 na AM, sem alterar de forma significativa a expressão do fator na AP (Figura 12A-D).

Em ambas AP e AM, o tratamento *in vitro* com a 1,2-NQ na presença ou ausência dos antagonistas de canais TRPV1 e TRPV4 não alterou o perfil de expressão para TRPV1 nesses vasos em relação ao controle (Figura 12E e 12F). Da mesma forma, o perfil de expressão para o TRPV4 na AP e AM não foi alterado nesses vasos na vigência do tratamento com a 1,2-NQ e/ou dos antagonistas TRPV1 e TRPV4 *per se*; exceto, um aumento significativo na expressão TRPV4 foi obtido na AP tratada simultaneamente com a 1,2-NQ e CZP (Figura 12C-F).

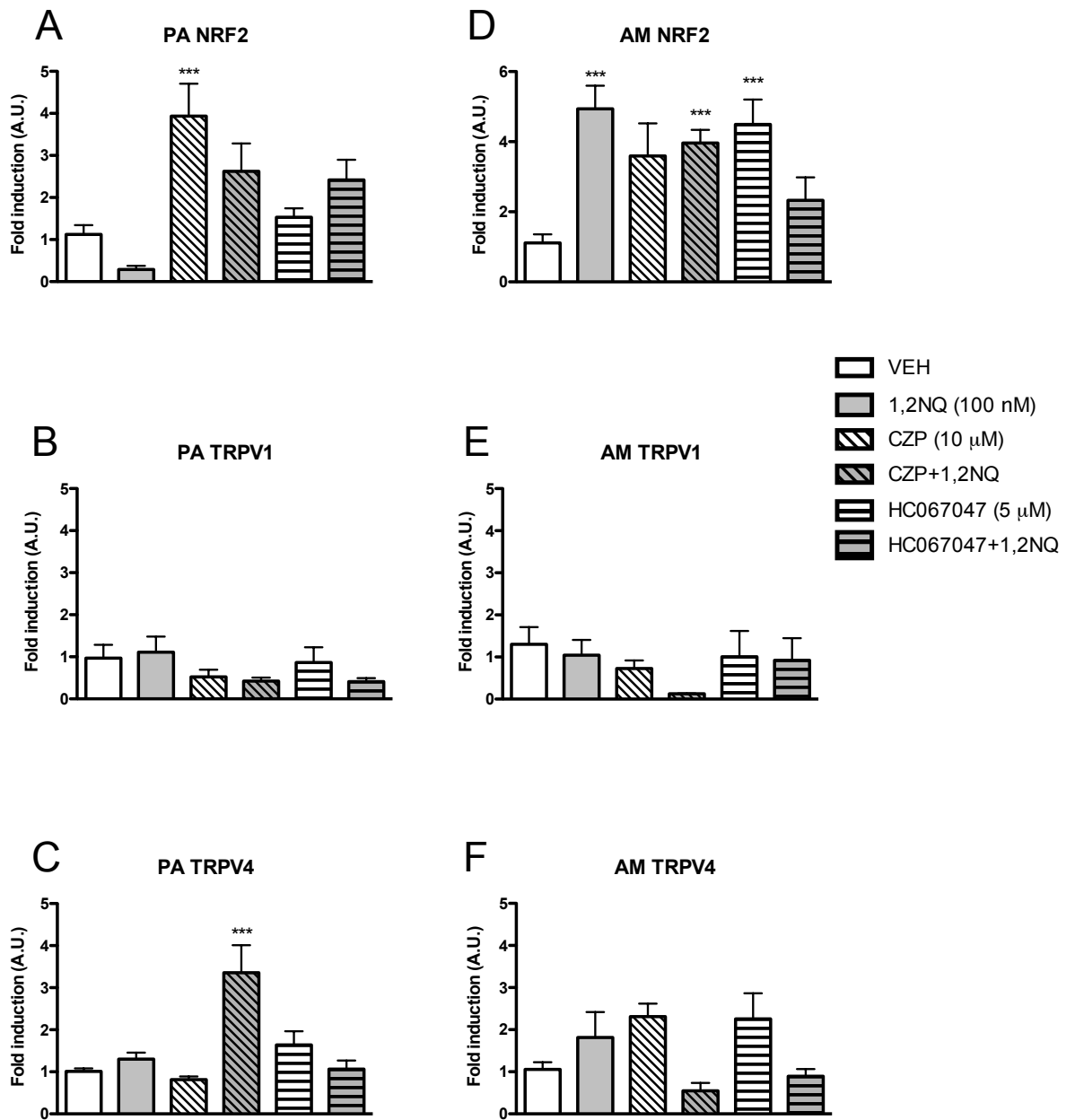


Figura 12 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para Nrf2 (A: AP e D: AM), TRPV1 (B: AP e E:AM) e TRPV4 (C: AP e F: AM) em artérias pulmonares e mesentéricas incubadas com 1,2-NQ (1 μM, 1h). Fonte: Soares (2018).

5.3.2 O bloqueio do TRPV1 reduz a expressão do HCN4 em átrio direito de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, mas não interfere no RNAm para canais e ou proteínas responsáveis pela homeostase do Ca²⁺ intracelular

O efeito da exposição precoce (período neonatal) ao poluente 1,2-NQ sobre o perfil de expressão (RNAm) de diferentes canais e proteínas responsáveis pela homeostase do Ca²⁺ na célula cardíaca, tais como, receptores de rianodina (RyR2), bomba de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático (Serca2a), fosfolambam (PLB), HCN4 e a subunidade $\alpha 1c$ do canal de Ca²⁺ tipo L dependente de voltagem (Ca_v1.2), foi avaliado em átrio de camundongos exposto a 1,2-NQ e não revelou alterações significativas no átrio destes quando comparado com o grupo exposto ao veículo (Figura 13 – A, B, C e D; respectivamente). Apenas foi observado redução significativa na expressão do canal HCN4 em átrio de animais expostos ao 1,2-NQ e pré-tratados com a CZP comparado ao grupo poluente não tratado com o antagonista (P<0,05).

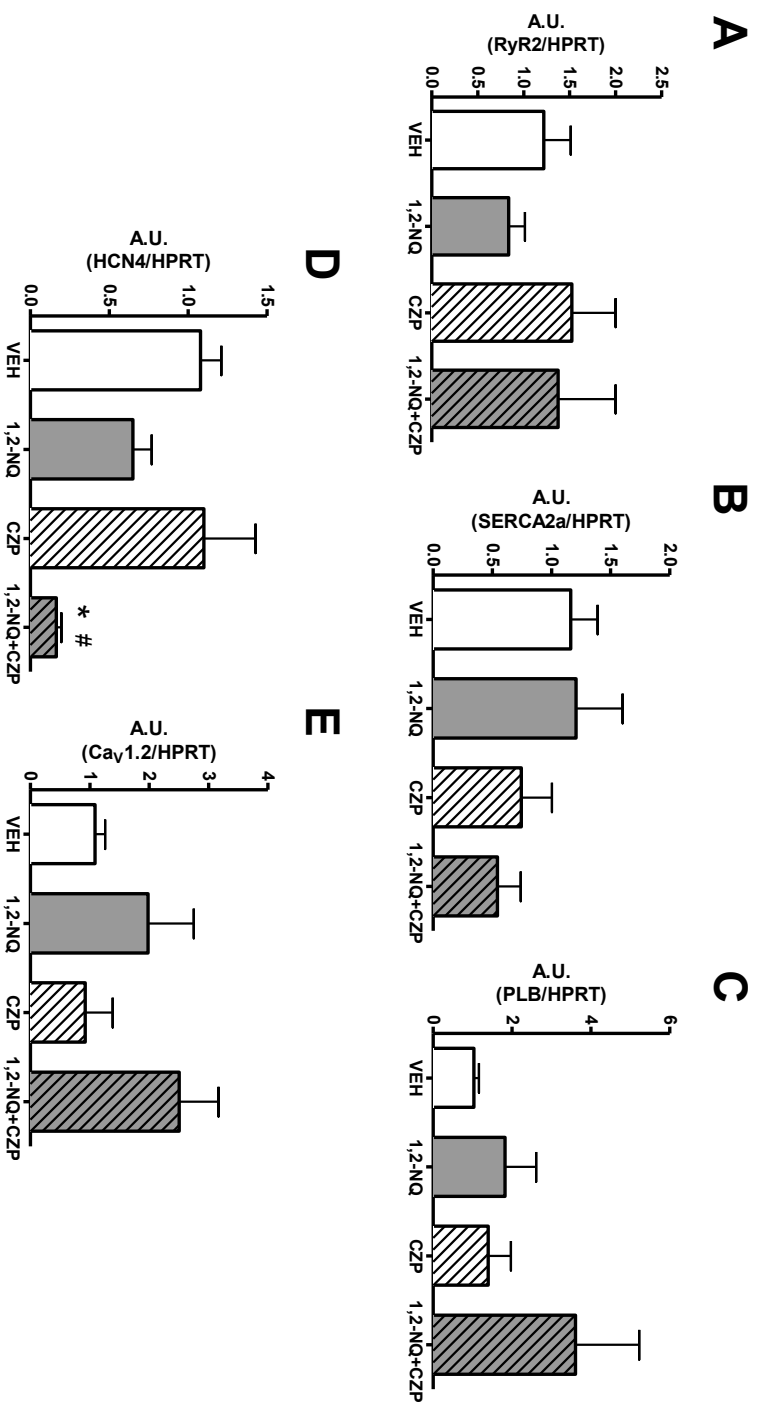


Figura 13 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para RyR2 (A), SERCA2a (B), PLB (C), HCN4 (D) e Cav1.2 (E) em átrio direito de animais pré-tratados ou não com antagonista de TRPV1, CZP, expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal. Onde, *P<0,05 vs VEH e #P<0,05 vs CZP, n=6. Fonte: Soares (2018).

5.3.3 O bloqueio dos TRPV1 não reverteu a redução na expressão RNAm de canais TRPV1 e TRPA1 em átrio de camundongos expostos a 1,2-NQ, mas aumentou o Nrf2

Nas figuras 14A-D, o perfil de expressão de RNAm para TRPA1 e TRPV1, mas não do TRPV4 e Nrf2, mostrou-se reduzido no átrio de camundongos expostos na fase neonatal ao poluente comparado com o grupo controle. A expressão RNAm de TRPA1 no grupo de animais expostos ao poluente 1,2-NQ mostrou-se reduzida comparada com o grupo VEH, e pré-tratado com 1,2-NQ e CZP (Figura 14A). Já a expressão de TRPV1 em AD de camundongos expostos ao poluente mostrou-se reduzida, ainda que sem apresentar diferença significativa nos grupos 1,2-NQ e CZP, o que foi observado apenas no grupo exposto a 1,2-NQ e pré-tratado com CZP ($P < 0,05$) (Figura 14B). A expressão de TRPV4 não apresentou alteração no perfil de expressão entre os grupos. No perfil de expressão do fator de transcrição Nrf2, apenas o grupo exposto a 1,2-NQ e pré-tratado com CZP apresentou aumento na expressão de mRNA, sem diferença estatística significativa.

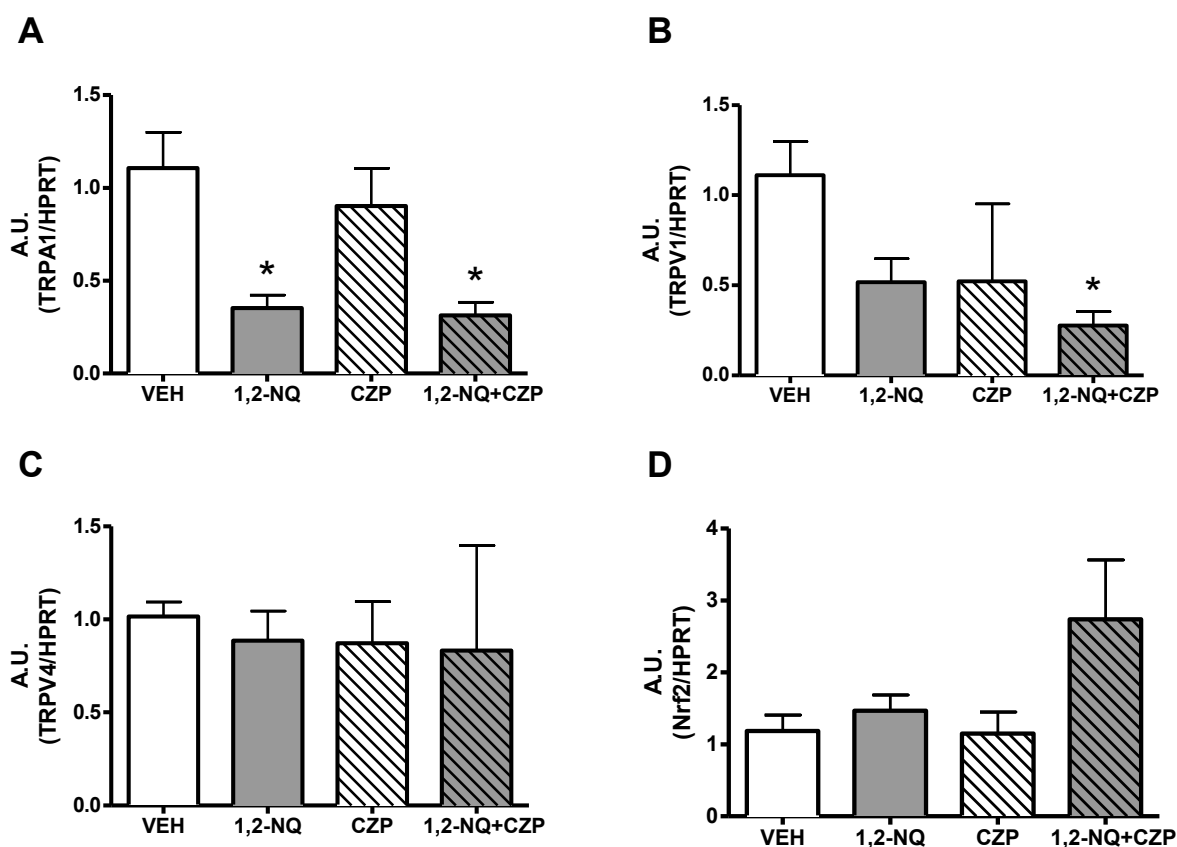


Figura 14 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para TRPA1 (A), TRPV1 (B), TRPV4 (C) e Nrf2 (D) em átrio direito de animais pré-tratados ou não com antagonista de TRPV1, CZP, expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo na fase neonatal. Onde, * $P < 0,05$ vs VEH, $n=6$. Fonte: Soares (2018).

5.3.3 A exposição precoce a 1,2-NQ reduz a expressão RNAm de receptores beta adrenérgicos subtipos 2 e 3, mas não interfere no subtipo 1

Em AD de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a expressão para os receptores $\beta 2$ e $\beta 3$ mostrou-se significativamente reduzida comparada com o AD do grupo controle, exposto ao veículo do poluente. A expressão RNAm dos receptores $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ no AD de animais submetidos ao tratamento simultâneo com 1,2-NQ e CZP na fase neonatal não diferiu de forma significativa da expressão mRNA reduzida para os receptivos receptores no grupo submetido somente ao poluente. O pré-tratamento com CZP *per se* reduziu significativamente a expressão RNAm para os receptores $\beta 2$ e $\beta 3$, mas não afetou o subtipo $\beta 1$ (Figura 15A).

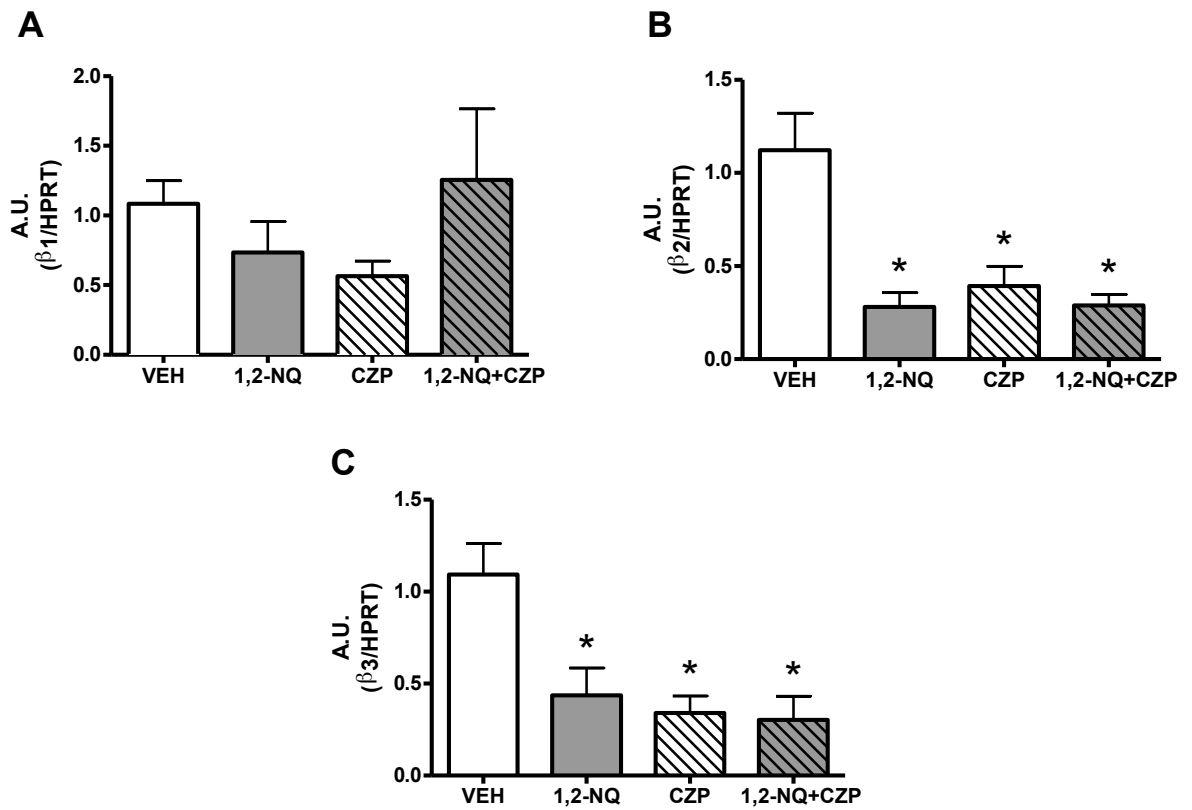


Figura 15 – Figura representativa da expressão de RNA mensageiro para receptores adrenérgicos tipo β_1 (A), β_2 (B), β_3 (C) em átrio direito de animais expostos ao poluente ambiental 1,2-NQ ou veículo e simultaneamente tratados com o antagonista de TRPV1, capsazepina (CZP), na fase neonatal. Onde, * $P < 0,05$ vs VEH, $n = 5-6$. Fonte: Soares (2018).

5.4. Avaliação do perfil hemodinâmico e eletrocardiográfico de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

5.4.1. A exposição neonatal a 1,2-NQ não afeta a pressão arterial na fase juvenil

Conforme demonstrado na Figura 16, a aferição da PA caudal no 43º dia dos camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal não foi estatisticamente diferente da PA caudal mensurada no respectivo grupo de camundongos controle expostos ao veículo do poluente na fase neonatal.

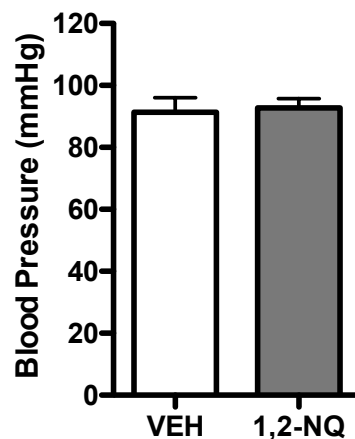


Figura 16 – Pressão arterial caudal mensurada em camundongos expostos ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) ou seu veículo (VEH) na fase neonatal. n=5 animais/grupo. Fonte: Soares (2018).

5.4.2. A exposição precoce a 1,2-NQ interfere com parâmetros do eletrocardiograma (ECG) na fase juvenil

As análises cardíacas realizadas por meio do ECG dos camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal demonstrou alterações significativas na função elétrica cardíaca dos animais em relação ao grupo controle, que recebeu o veículo. Em particular, as medidas dos parâmetros de RR, SDRR e LF/HF, mas não do RMSSD e frequência cardíaca (BPM) foram estatisticamente diferentes entre os animais expostos ao poluente e grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5 – Parâmetros do ECG analisados em camundongos jovens anestesiados expostos ao poluente 1,2-NQ ou respectivo veículo na fase neonatal.

	Veículo (n=6)	1,2-Naftoquinona (n=7)
RR (ms)	100,00 ± 3,4	91,36 ± 1,3 *
SDRR (ms)	4,149 ± 0,559	2,428 ± 0,196 *
RMSSD (ms)	1,0180 ± 0,2109	0,7787 ± 0,082
LF/HF	0,1281 ± 0,016	0,3422 ± 0,069 *
Frequência cardíaca (BPM)	612 ± 18	650 ± 12

Os valores representam a média ± sem. * $P < 0,05$ vs. Veículo. Fonte: Soares (2018).

5.5. Efeitos cronotrópico e vascular em camundongos machos jovens expostos ao poluente 1,2-NQ na fase neonatal

5.5.1. Exposição precoce a 1,2-NQ reduz resposta cronotrópica basal in vitro frente ao estímulo adrenérgico, mas não colinérgico

No AD de camundongos jovens pré-expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, a curva concentração-resposta e valores de pD_2 frente ao agonista adrenérgico NE foi reduzida em relação ao grupo controle exposto ao veículo ($6,72 \pm 0,21$ e $5,72 \pm 0,27^*$ BPM VEH e 1,2-NQ, respectivamente; $n=5$ /grupo; Figura 17A). A exposição neonatal ao poluente 1,2-NQ não afetou a resposta cronotrópica negativa frente ao agonista CCh comparado ao respectivo grupo controle (Figura 17B).

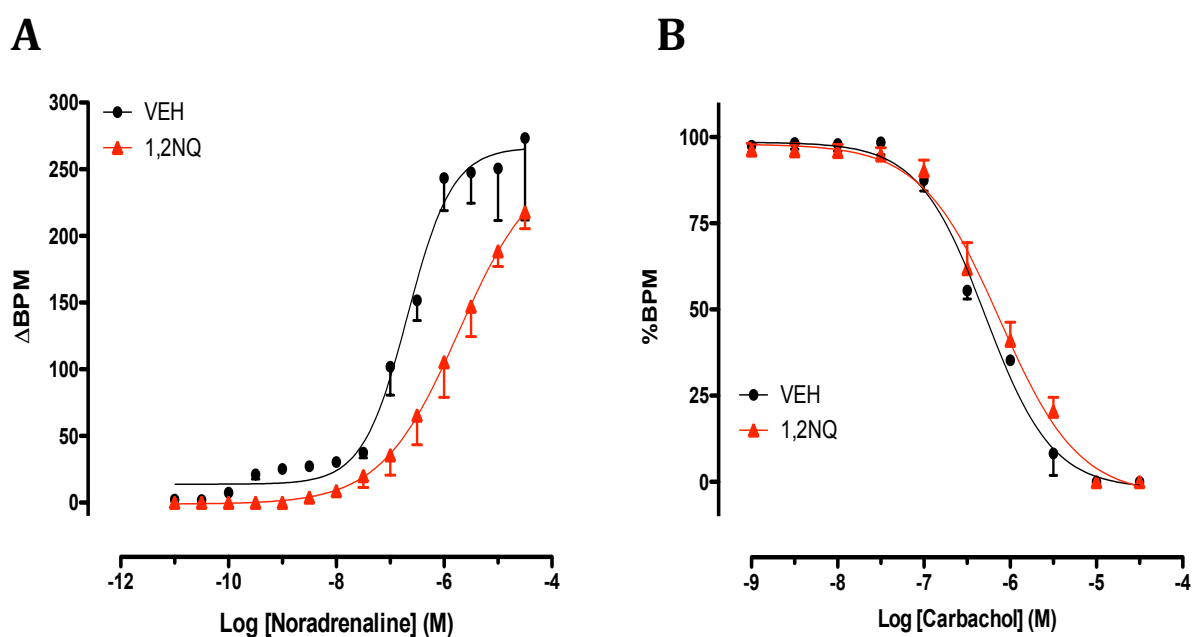


Figura 17 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (NE, A) e carbacol (B) em átrio direito isolado de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. Fonte: Soares (2018).

5.5.2. Antagonismo dos TRPV1 reverte a redução do cronotropismo positivo frente ao estímulo adrenérgico em AD de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Como observado no item anterior (5.5.1.), o AD de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal apresentou redução na EMax das curvas concentração-resposta para NE. O tratamento simultâneo dos animais expostos a 1,2-NQ com a CZP na fase neonatal reverteu a queda na contratilidade atrial, se assemelhando ao efeito obtido no AD dos animais controle (Tabela 6; Figura 18A).

Redução significativa da sensibilidade ao CCh foi observada no AD dos animais expostos a 1,2-NQ e tratados com a CZP; contudo, sem alterar a EMax (Tabela 7; Figura 18B) e não apresentar diferença estatística comparada aos demais grupos.

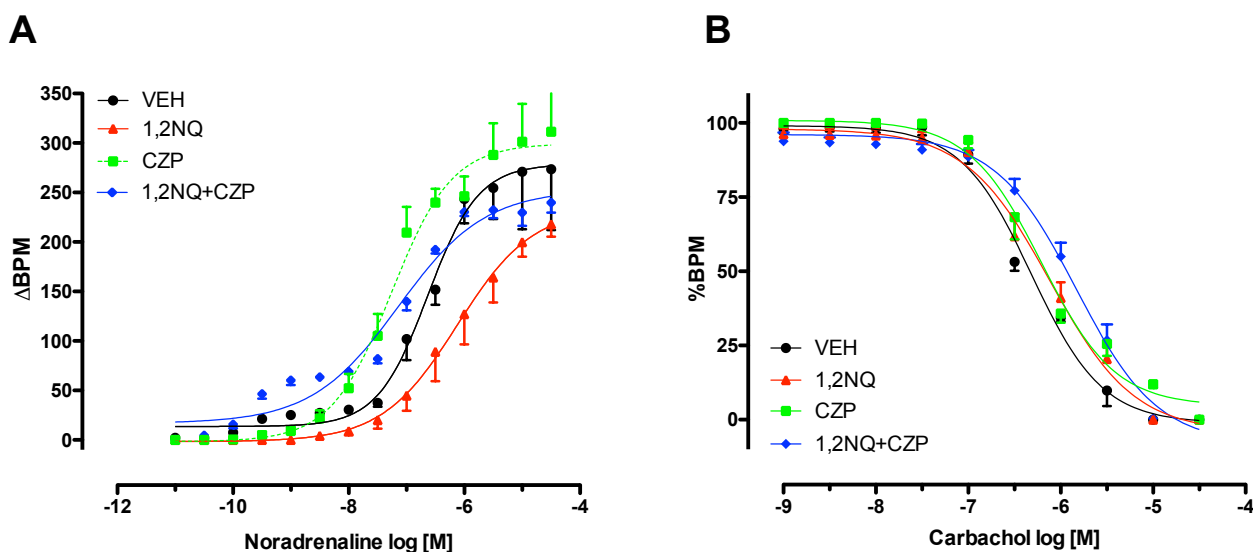


Figura 18 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos simultaneamente tratados com capsazepina (CZP) e 1,2-NQ na fase neonatal. Fonte: Soares (2018).

Tabela 6 – Resposta máxima (EMax) e pD₂ calculada das curvas obtidas com NE em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ (ou seu veículo) e tratados ou não com capsazepina na fase neonatal.

Norepinefrina	VEH	1,2-NQ	CZP	1,2-NQ+CZP
EMax (BPM)	259 ± 27	218 ± 12	313 ± 43	242 ± 9
pD₂	6.63 ± 0.1	5.73 ± 0.2*	7.26 ± 0.1* [#]	7.14 ± 0.1* [#]

Dados expressos como média±EPM, onde *P<0,05 vs VEH, [#]P<0,05 vs 1,2-NQ. n=5/grupo.

Fonte: Soares (2018).

Tabela 7 – pD₂ calculada a partir das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com capsazepina.

	VEH	1,2-NQ	CZP	1,2-NQ+CZP
pD₂	6.29 ± 0.04	6.12 ± 0.06	6.20 ± 0,05	5.83 ± 0,05* ^{\$}

*P<0,05 vs VEH, ^{\$}P<0,05 vs CZP. n=5/grupo. Fonte: Soares (2018).

5.5.3. Antagonismo dos TRPV4 estimula o cronotropismo positivo frente a NE em átrio de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Em AD de camundongos tratados com o antagonista de TRPV4, HC-067047 (10 mg/kg), na fase neonatal e simultaneamente expostos a 1,2-NQ observou-se potente aumento da contratilidade atrial (BPM) frente ao agonista NE em relação aos animais não tratados com o HC-067047. O tratamento de animais com HC-067047 *per se* reduziu a frequência dos BPM aos valores semelhantes ao mensurado no AD de animais expostos a 1,2-NQ (Figura 19A, Tabela 8). Em contrapartida, o bloqueio dos TRPV4 não alterou a frequência atrial (BPM) frente ao agonista colinérgico CCh (Figura 19B, Tabela 9).

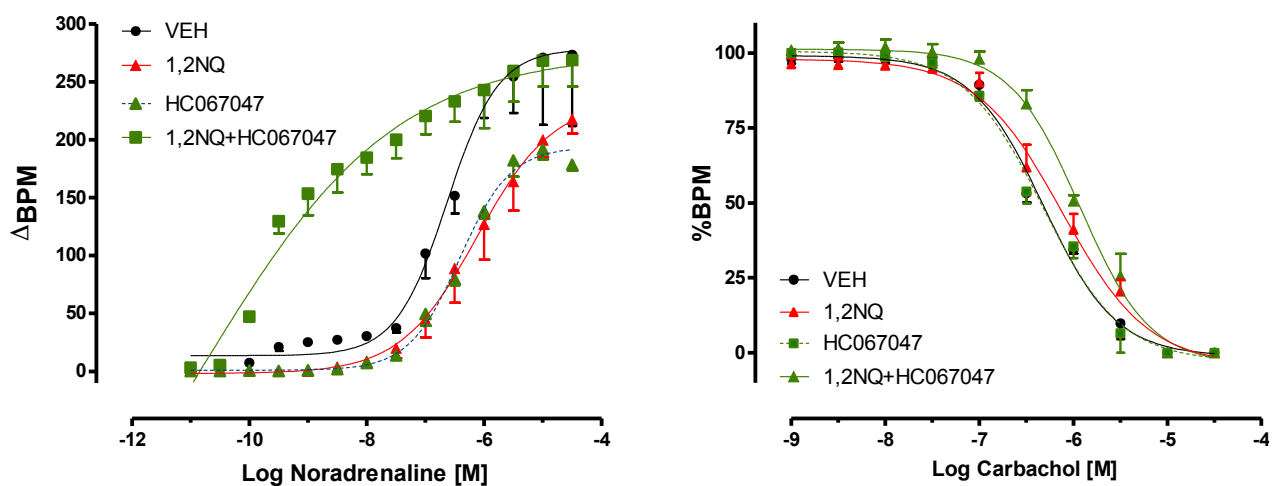


Figura 19 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbachol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos pré-tratados ou não com HC-067047 e expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. Fonte: Soares (2018).

Tabela 8 – Resposta máxima (EMax) e pD2 calculadas a partir das curvas-concentração à NE em átrio direito isolado de camundongos expostos ao poluente 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com HC-067047.

Norepinefrina	VEH	1,2-NQ	HC067047	1,2-NQ+HC067047
EMax (BPM)	259±27	218±12	194±5* #	276±24*#
pD₂	6,63±0,1	5,73±0,2*	6,41±0,05*#	10,81±2,0*#

Dados expressos como média±EPM, onde *P<0,05 vs VEH, #P<0,05 vs 1,2-NQ. n=5/grupo.

Fonte: Soares (2018).

Tabela 9 – pD2 calculada das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com HC-067047.

	VEH	1,2-NQ	HC067047	1,2-NQ+ HC067047
pD₂	6,29±0,04	6,12±0,06	6,33±0,04#	5,93±0,04\$

*P<0,05 vs VEH, #P<0,05 vs 1,2-NQ e \$P<0,05 vs HC. n=5/grupo. Fonte: Soares (2018).

5.5.4. Antagonismo dos TRPC5 reduz cronotropismo positivo frente a NE em AD de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal

Em AD de camundongos tratados com o antagonista de receptores TRPC5, ML-204 (2 mg/kg, i.p.), na fase neonatal e expostos 30 minutos depois a 1,2-NQ, observou-se redução significativa na resposta máxima atrial frente ao agonista NE em relação aos animais somente expostos a 1,2-NQ (Tabela 10). O bloqueio dos TRPC5 alterou a resposta atrial frente ao CCh (Tabela 11 e Figura 20B), e o antagonismo com TRPC5 reduziu a EMax frente ao estímulo a NE (Figura 20A).

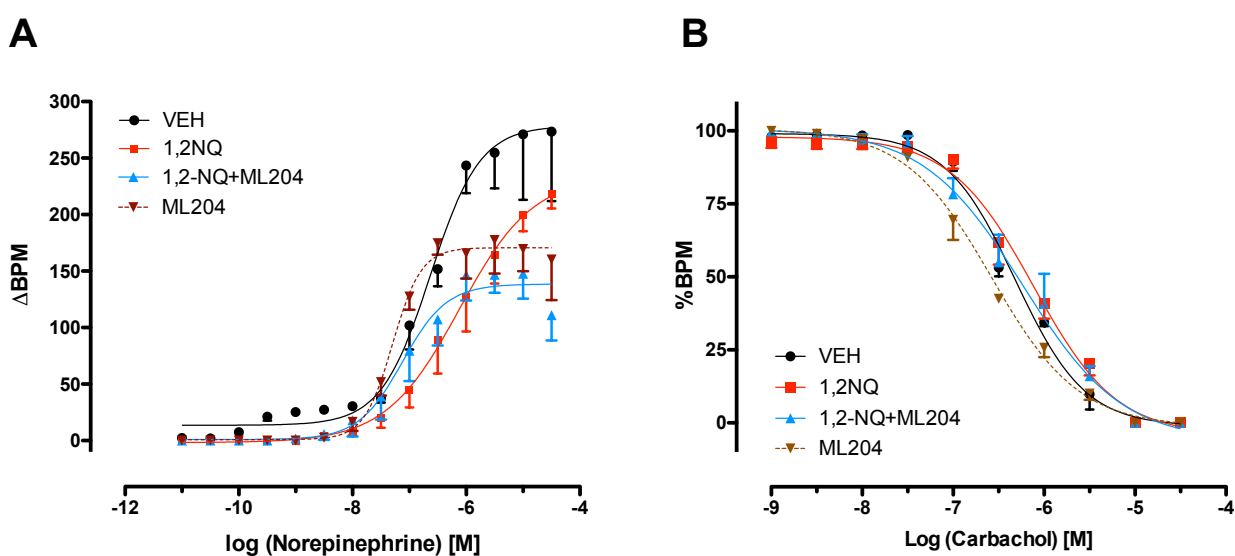


Figura 20 – Figura representativa das curvas concentração-resposta para os agonistas norepinefrina (A) e carbacol (B) realizadas em átrios direito isolados de camundongos pré-tratados ou não com ML-204 e expostos a 1,2-NQ na fase neonatal. Fonte: Soares (2018).

Tabela 10 – Resposta máxima (EMax) e pD2 calculadas a partir das curvas-concentração à NE em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com ML-204.

Norepinefrina	VEH	1,2-NQ	ML-204	1,2-NQ+ML-204
EMax (BPM)	259±27	218±12	170±10* [#]	138±9* [#]
pD₂	6.63±0.1	5.73±0.2*	7.29±0.1* [#]	7.12±0.1* [#]

Dados expressos como média±EPM, onde *P<0,05 vs VEH, [#]P<0,05 vs 1,2-NQ. n=4-5/grupo.

Fonte: Soares (2018).

Tabela 11 – pD2 calculada das curvas à CCh em átrio direito isolado de camundongos que foram expostos ao 1,2-NQ ou seu veículo e tratados ou não com ML-204.

	VEH	1,2-NQ	ML-204	1,2-NQ+ML-204
pD₂	6.29±0.04	6.12±0.06	6.57±0.04* [#]	6.23±0,05 ^{\$}

*P<0,05 vs VEH, [#]P<0,05 vs 1,2-NQ e ^{\$}P<0,05 vs ML-204. n=4-5/grupo.

Fonte: Soares (2018).

5.5.5. Avaliação da participação dos receptores beta adrenérgicos na reatividade atrial frente a incubação com o poluente 1,2-NQ

A incubação de AD isolado de camundongos selvagens com o poluente 1,2-NQ (100 nM) reduziu a EMax de curvas-concentração aos agonistas NE (10^{-11} – 10^{-5} M) e isoproterenol (ISO) (10^{-11} – 10^{-6} M) e, ainda, aumentou a pD2 para o agonista salbutamol (SB, 10^{-9} – 10^{-4} M) (Figura 21A - C, Tabela 12). O bloqueio do receptor β_1 pelo emprego do antagonista metoprolol (0,4 μ M) aboliu os efeitos da 1,2-NQ observado em curva concentração resposta (10^{-11} – 10^{-5} M) (EMax (BPM) – VEH: 185 ± 6 vs MET: $63 \pm 7^*$ e pD2 – VEH: $8,488 \pm 0,11$ vs MET: $5,540 \pm 0,12^*$; onde $*P < 0,05$ e $n=5$ /grupo) (Figura 21D). Ainda, a curva concentração-resposta para o agonista da adenilato ciclase, forksolin (FK) (10^{-12} – 10^{-5} M), não foi diferente quando o AD foi incubado com 1,2-NQ (Figura 21E, Tabela 12).

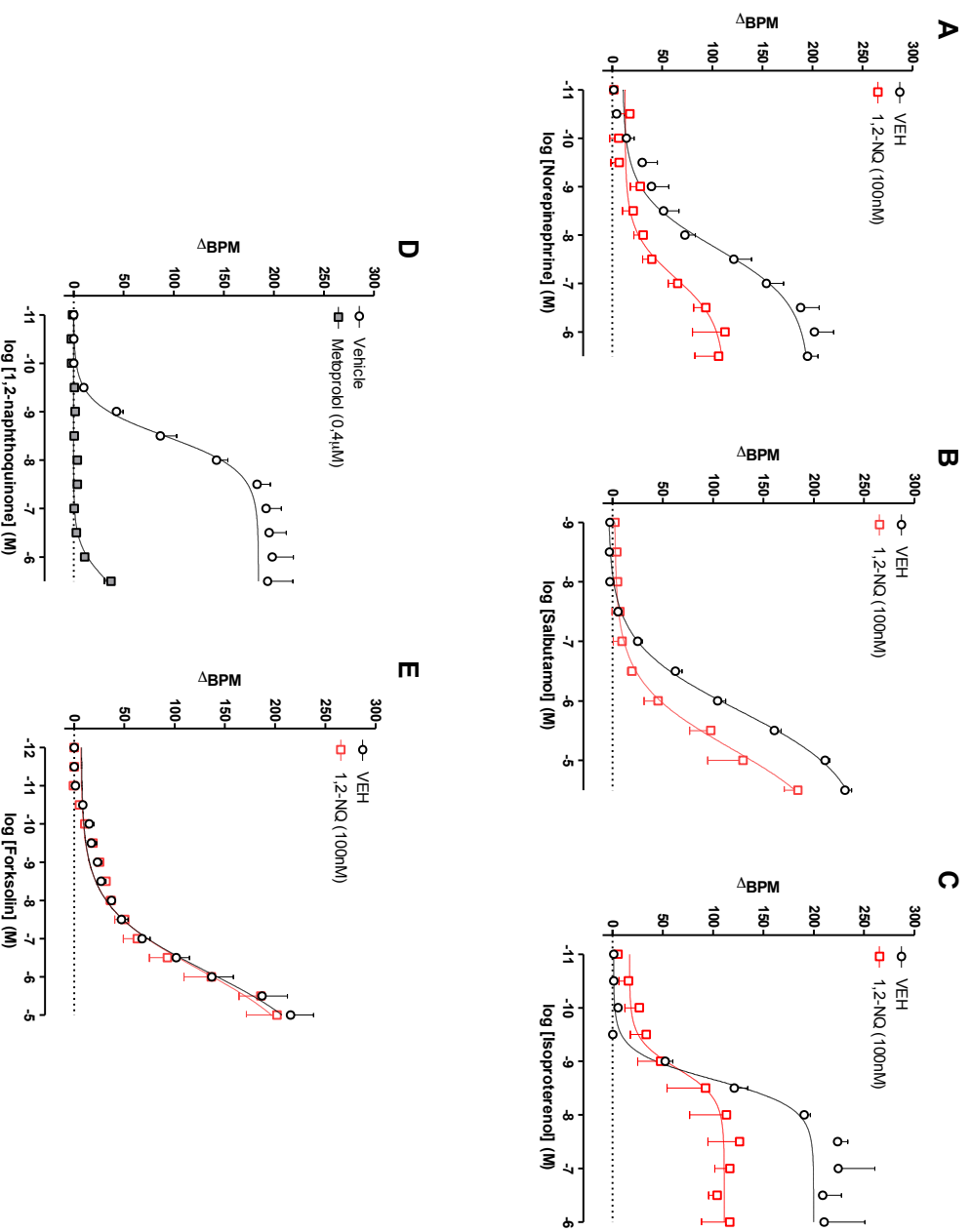


Figura 21 – Figura representativa das curvas concentração-resposta (BPM) para os agonistas NE (A), SB (B), ISO (C), 1,2-NQ (D) e FK (E) realizadas em átrios direito isolados de camundongos. Os tecidos foram expostos a 100 nmol de 1,2-NQ ou veículo (VEH). Fonte: Soares (2018).

Tabela 12 – Reposta máxima (BPM) e pD2 calculadas a partir das curvas à NE, SB e ISO em átrio direito isolado de camundongos. Os tecidos forma expostos a 100 nmol de 1,2-NQ ou veículo (VEH).

	EMax (BPM)		pD2	
	VEH	1,2-NQ	VEH	1,2-NQ
NE	197 ± 11	112 ± 12*	7,730 ± 0,15	7,123 ± 0,25*
SB	254 ± 8	233 ± 30	5,844 ± 0,05	5,202 ± 0,18*
ISO	200 ± 7	111 ± 7*	8,658 ± 0,09	8,870 ± 0,22
FK	261 ± 29	245 ± 20	6,113 ± 0,25	6,177 ± 0,18

Dados expressos como média±EPM, onde *P<0,05 vs VEH e n=5/grupo. Fonte: Soares (2018).

5.5.5. Avaliação da ação da 1,2-naftoquinona em modelo de fibrilação induzida por ouabaína em átrio direito isolado

Definido que contaminantes do ar promovem alterações no sistema cardiovascular (arritmias), averiguou-se o potencial da 1,2-NQ em promover alterações na frequência atrial quando exposto a ouabaína, um tratamento clássico em que se verifica a maior sensibilidade do tecido cardíaco a alterações de condução de sinal, decorrente de perturbações nas concentrações de íons (sódio e cálcio), capazes de promover eventos arrítmicos e possível fibrilação.

Em AD incubados com 1,2-NQ e estimulados com ouabaína (10^{-6} M), apresentaram “lag” menor comparado com o grupo veículo. A força de contração foi maior em AD de animais que foram expostos na fase neonatal quando comparado com o grupo exposto apenas ao veículo (Figura 22).

Resultado semelhante foi observado em AD de animais naïve. A incubação prévia (-30 min) com 1,2-NQ apresentou uma maior força de contração quando comparado ao grupo incubado apenas com o veículo (Figura 23A), sem alterar a frequência (BPM) (Figura 23B).

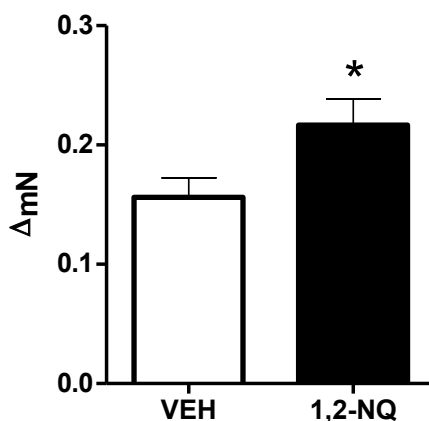


Figura 22 – Figura representativa da alteração na força de contração induzida (BPM) por ouabaína (10^{-6} M) em átrio direito de animais expostos ao poluente 1,2-naftoquinona e ao veículo. A exposição neonatal a 1,2-NQ promoveu um aumento na força de contração atrial. Onde, * $P < 0,05$ vs VEH. $n = 4$ /grupo. Fonte: Soares (2018).

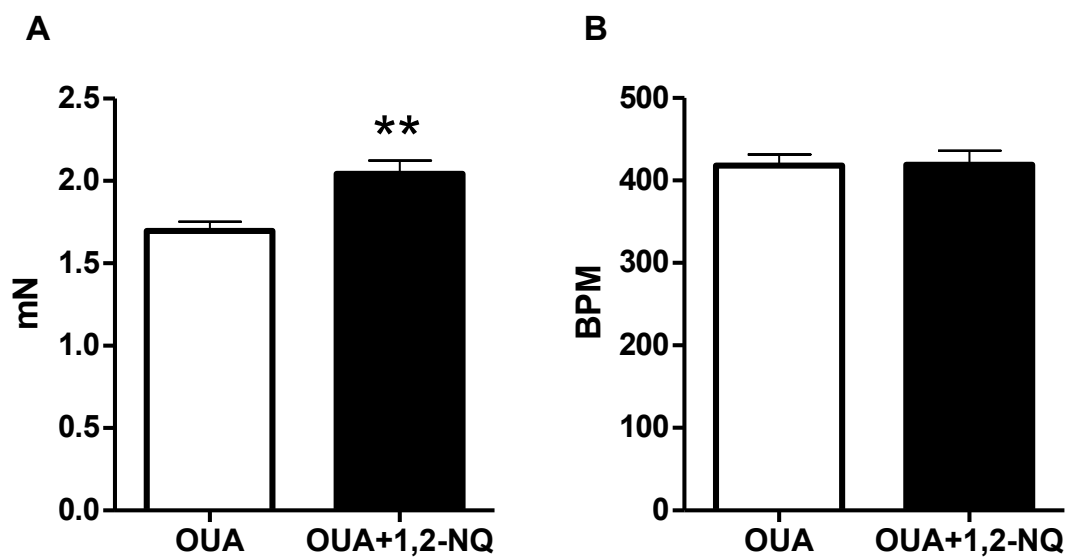


Figura 23 – Figura representativa da alteração na força de contração induzida por ouabaína (10^{-6} M) e BPM em átrios de camundongos naïve. A incubação prévia com ouabaína promove aumento na força de contração foi maior em átrios incubados concomitantemente com 1,2-NQ (100 nM) (A), sem alterar a frequência atrial (B). Onde, ** $P < 0,05$ vs VEH. $n = 5-7$ /grupo. Fonte: Soares (2018).

5.5.5. Bloqueio dos receptores TRPV1 altera a reatividade da AP obtida de camundongos expostos a 1,2-NQ

Em AP de camundongos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, observou-se aumento na sensibilidade à Phe, calculada a partir da curva concentração-resposta, comparado com a resposta na AP de animais expostos apenas ao veículo. Em AP de camundongos expostos simultaneamente, na fase neonatal, ao poluente e CZP, observou-se potencialização da resposta contrátil ao agonista adrenérgico Phe (EMax: $100,0 \pm 3,5$; $102,3 \pm 2,3$; 1,2- $125,9 \pm 5,0^*$; VEH, 1,2-NQ e 1,2-NQ+CZP, respectivamente. $*P < 0,05$; $n = 3-5$; Figura 24A).

De acordo com a Figura 24B, a resposta vasodilatadora frente ao agonista colinérgico ACh foi marcadamente reduzida na AP de animais expostos na fase neonatal ao poluente e CZP (EMax: $45,9 \pm 0,4$; $69,0 \pm 2,4^*$; $13,7 \pm 0,7^{*\#}$, VEH, 1,2-NQ e 1,2-NQ+CZP, respectivamente, onde $*P < 0,05$ vs VEH, $\#P < 0,05$ vs 1,2-NQ, $n = 3-5$ /grupo).

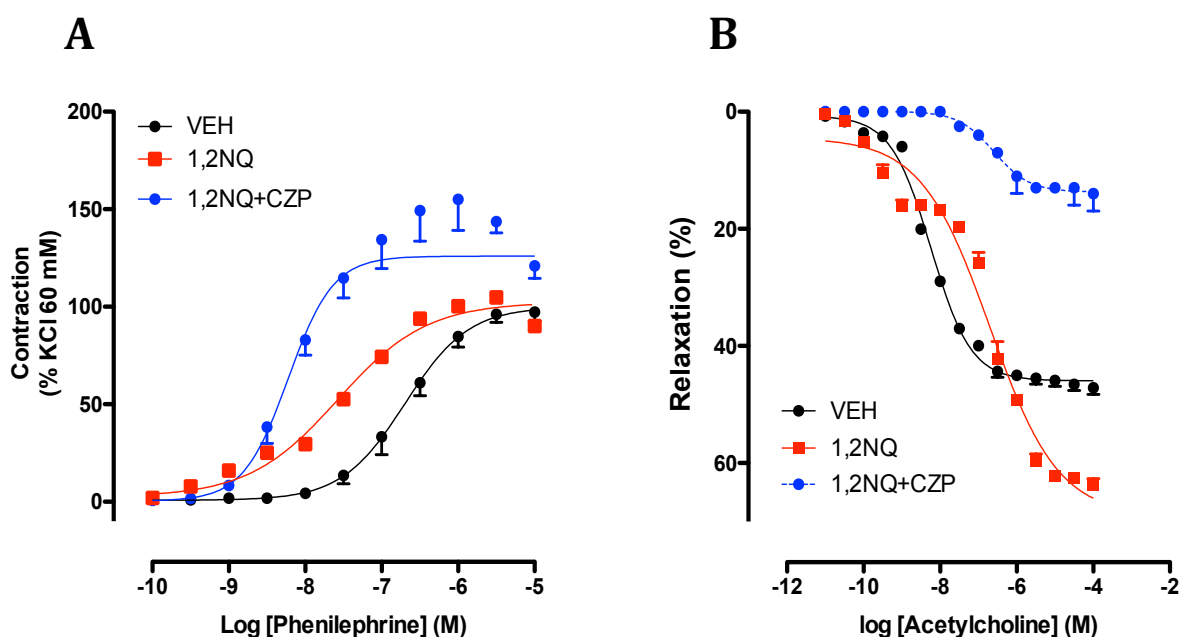


Figura 24 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em anéis de artérias pulmonares de camundongos pré-tratados com capsazepina e expostos ao 1,2-NQ durante a fase neonatal para os agonistas fenilefrina (A) e acetilcolina (B). Fonte: Soares (2018).

5.5.6. Bloqueio dos receptores TRPV4 intensifica a reatividade da AP de animais expostos a 1,2-NQ na fase neonatal frente aos estímulos adrenérgico e colinérgico

Conforme ilustra a Figura 25A, o tratamento farmacológico de animais com o antagonista do receptor TRPV4, HC-067047, paralelo a exposição precoce ao poluente 1,2-NQ promoveu na AP isolada destes na fase juvenil, aumento da resposta máxima contrátil frente a Phe comparado com a EMax na AP de animais expostos somente a 1,2-NQ na fase neonatal (EMax: VEH $100,0 \pm 3,5$; 1,2-NQ $102,3 \pm 2,3$; 1,2-NQ+HC067047 $139,9 \pm 4,1^*$, VEH, 1,2-NQ e 1,2-NQ+HC067047, respectivamente, onde $*P < 0,05$ vs VEH e 1,2-NQ, $n=3-5$ /grupo).

O bloqueio farmacológico com HC-067047 também reduziu a resposta vasodilatadora na AP dos animais expostos a 1,2-NQ frente a ACh em comparação com o relaxamento observado na AP de animais expostos somente a 1,2-NQ (Figura 25B) (EMax: VEH $45,9 \pm 0,4$; 1,2-NQ $69,0 \pm 2,4^*$; 1,2-NQ+HC067047 $37,7 \pm 2,6^{*\#}$, VEH, 1,2-NQ e 1,2-NQ+HC067047, respectivamente, onde $*P < 0,05$ vs VEH, $\#P < 0,05$ vs 1,2-NQ, $n=3-5$ /grupo).

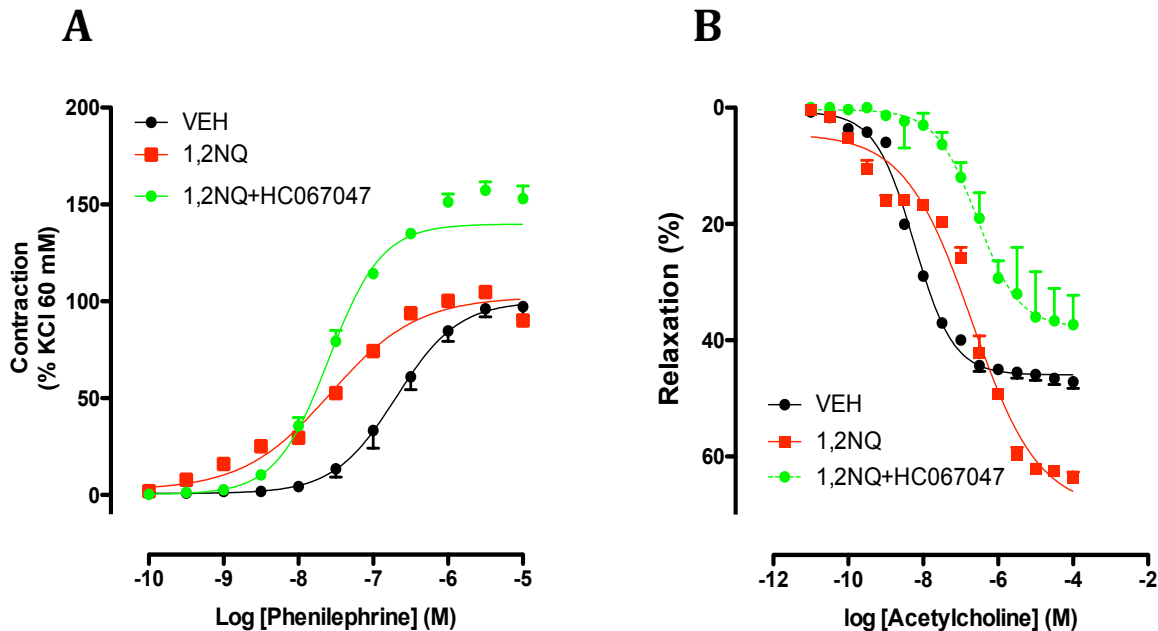


Figura 25 – Figura representativa das curvas concentração-resposta realizadas em anéis de artérias pulmonares de camundongos tratados com HC-067047 e expostos simultaneamente ao 1,2-NQ durante a fase neonatal para os agonistas fenilefrina (A) e acetilcolina (B). Fonte: Soares (2018).

6. DISCUSSÃO

A exposição aos PAA vem sendo correlacionada com um incremento significativo no número de óbitos que, em geral, resultam de disfunções cardiovasculares e respiratórias (WHO, 2016; Fiordelisi et al., 2017). Os mecanismos envolvidos nessas alterações são pouco explorados, embora uma vasta literatura sugere que o MP_{2.5} representa um dos principais responsáveis, pois ao ser inalado, transloca-se dos pulmões (via alvéolos) para circulação (Nemmar et al., 2002; Fiordelisi et al., 2017), onde estimula a geração de mediadores inflamatórios, de ERO/ERN (Fiordelisi et al., 2017) e, *per se*, promove a formação de trombos que, subsequentemente, causam acidentes vasculares e cardiopatias (Nemmar et al., 2002; Lawal, 2017). A gravidade dessas patologias parece ser grandemente influenciada pela idade, gênero e, principalmente, pela capacidade do MP em adsorver e/ou incorporar substâncias químicas, como o poluente eletrofílico 1,2-NQ. Nesse contexto, estudos prévios do nosso grupo mostraram que a inflamação aguda promovida pelas PED em vias aéreas de rato foi exacerbada pela co-instilação da 1,2-NQ (Teles et al., 2010). Em camundongos neonatos machos, mas não em camundongos adultos ou fêmeas, o nosso grupo revelou que a exposição inalatória a 1,2-NQ promoveu maior susceptibilidade destes à inflamação alérgica pulmonar (Santos et al., 2014; Florenzano et al., 2018). O mecanismo de ação envolvido é complexo e consiste, em parte, do aumento na apresentação de células CD11c, desbalanço na biossíntese de citocinas Th1 e Th2 e, ainda, da ativação de enzimas antioxidantes e de receptores de resposta inata Toll-4 (Santos et al., 2017) e dos TRP (Florenzano et al., 2018).

Considerando que os efeitos cardiovasculares da exposição precoce ao PAA eletrofílico 1,2-NQ, cuja concentração por grama de PED oscila em torno de 13,7 ug (Cho et al., 2004), são pouco conhecidos e explorados, este estudo considerou pertinente avaliar funcionalmente (*in vitro* e *in vivo*) os efeitos deste PAA no SCV (em particular, artérias pulmonar e mesentérica e átrio direito) na fase juvenil dos animais.

6.1. Átrio Direito

6.1.1. Efeito da exposição *in vitro* e *in vivo* da 1,2-naftoquinona sobre a função atrial isolada e coração de camundongos

A fim de aprofundar o conhecimento sobre as ações tóxicas da 1,2-NQ na ritmicidade cardíaca, padronizou-se inicialmente neste laboratório a técnica de reatividade do átrio direito isolado (AD). Após padronização, verificou-se que a técnica se mostrou bastante robusta e reprodutível, permitindo avaliar agudamente o efeito da 1,2-NQ na ritmicidade atrial. Isto é relevante, uma vez que o NSA presente nessa região do tecido cardíaco nos permitiu avaliar respostas cronotrópicas sem a necessidade de eletroestimulação, necessária em estudos com o átrio esquerdo.

Em estudos prévios de séries temporais, as evidências mostram que os efeitos adversos cardíacos aumentam significativamente após horas ou dias de exposição aos PAA (Sarnat et al., 2014; Farmer et al., 2014). O presente estudo revelou, pela primeira vez, que a administração *in vitro* da 1,2-NQ em AD isolado de camundongos jovens estimulou o cronotropismo positivo, de maneira concentração-dependente, corroborando achados anteriores e sugerindo que a 1,2-NQ representa um dos fatores responsáveis pelos efeitos adversos cardiovasculares associados ao MP fino eliminado na queima do diesel (PED).

É de conhecimento que a exposição aos PAA pode desencadear arritmias (Link et al., 2013; Monrad et al., 2017). No presente estudo, um modelo experimental de fibrilação atrial induzida pelo fármaco ouabaína, na presença ou ausência da 1,2-NQ, confirmou que a ouabaína *per se* promoveu alterações funcionais no AD de camundongos jovens, e este efeito foi potencializado pela co-incubação com a 1,2-NQ. As alterações na força de contração no AD incubado com a ouabaína foram também semelhantes ao do AD de camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, reforçando a hipótese de que a 1,2-NQ representa um dos principais contaminantes das PED, capaz de induzir efeitos cardiovasculares, incluindo arritmias.

Ainda, observamos que a expressão de RNAm para a isoforma $\beta 1$ apresentou uma tendência de redução em animais expostos ao contaminante 1,2-NQ, enquanto o bloqueio de TRPV1 com o antagonista CZP, promoveu uma reversão nesse efeito.

Outras isoformas β_2 e β_3 apresentaram redução significativa na expressão (RNAm) no AD de animais expostos ao contaminante, e no grupo apenas tratado com o antagonista para TRPV1.

De modo a buscar um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação da 1,2-NQ sobre o tecido cardíaco, o mecanismo regulado por receptores beta adrenérgicos foi avaliado nas ações atriais (cronotrópicas) da 1,2-NQ. Foi curioso observar que, a incubação com a 1,2-NQ alterou significativamente a resposta aos agonistas adrenérgicos utilizados: norepinefrina, salbutamol e isoproterenol. Interessantemente, o bloqueio com metropolol, um antagonista seletivo dos receptores β_1 , inibiu o efeito cronotrópico positivo da 1,2-NQ, sugerindo que este contaminante (ou produtos gerados dele ou por ele) atua diretamente em receptores β adrenérgicos em AD isolado de camundongos e que, subsequentemente, induzem respostas cronotrópicas e outras alterações cardíacas descritas por outros autores em estudos experimentais e epidemiológicos. Por exemplo, em modelo experimental murino instilado com MP, Robertson e colaboradores (2014) observaram que tanto o bloqueio sistêmico de receptor β adrenérgico tipo 1 quanto o bloqueio de TRPV1 preveniu o estresse oxidativo formado pela lesão miocárdica, resultante do protocolo de isquemia e reperfusão. Reforçando essa sugestão, estudos “*cohort*” revelaram que a exposição aguda ou crônica de indivíduos ao MP_{2,5} promoveu fibrilação atrial, uma condição comumente associada à morbidade e mortalidade cardiovascular (Link et al., 2013; Monrad et al., 2017). Outros mostraram que em pacientes com histórico de cardiopatias, possivelmente decorrente de alterações no tônus autonômico (adrenérgico e colinérgico) e vascular, os efeitos da exposição ao PAA foram mais proeminentes (Link e Dockery, 2010; Huang et al., 2012); todavia, ainda muito pouco se conhece sobre os efeitos direto da 1,2-NQ no átrio direito e suas possíveis implicações no desenvolvimento de arritmias.

Por seu turno, a exposição neonatal ao PAA, 1,2-NQ reduziu a frequência atrial (BPM) do AD isolado de camundongos na fase juvenil, frente ao agonista adrenérgico NE, reiterando a sugestão de que esse PAA está positivamente associado com a morbidade cardiovascular, particularmente em indivíduos mais susceptíveis (Giorgini et al., 2016; Simkhovich et al., 2008). Coletivamente, os resultados deste estudo demonstram que a 1,2-NQ *per se* promoveu alteração na função atrial, quando administrado na preparação *in vitro* ou *in vivo*, durante o

período neonatal. Isto é relevante, pois sugere que a 1,2-NQ (e não somente o MP) responde por alterações na função atrial, especialmente numa fase susceptível (período neonatal) da população exposta.

O teste de eletrocardiograma (ECG) é capaz de registrar a atividade elétrica do coração, por meio de padrões específicos, como as ondas P (câmaras cardíacas superiores), complexo QRS (câmaras cardíacas inferiores) e ondas T (pausa/descanso). Em conjunto, estas alterações revelam a atividade de diferentes áreas do coração e, assim, representam índices importantes de lesões cardíacas. Neste estudo, a integridade cardíaca *in vivo* e *in vitro* (átrio isolado) e a vascular (*in vitro*) dos camundongos jovens expostos a 1,2-NQ na fase neonatal foi também averiguada e revelou ações depressoras significativas nos parâmetros RR, SDRR e LF/HF. Além disto, promoveu um aumento, embora não estatisticamente significativo, da frequência cardíaca (BPM). Outros achados vão ao encontro destes resultados, e mostram que a exposição humana ou animal ao MP modifica parâmetros cardíacos, tais como RMSSD e LF/HF (Perez et al., 2015). Interessantemente, Kurhanewicz et al., (2014) sugerem que o tamanho do MP e a associação deste com poluentes gasosos promovem respostas variáveis na função cardíaca, indicando que os efeitos deletérios resultantes de poluentes associados não são simplesmente aditivos ou mesmo generalizáveis.

Rotineiramente, sabe-se que a medida da PA representa um índice importante, capaz de revelar a pressão do sangue circulante contra a parede dos vasos sanguíneos (artérias da circulação sistêmica) e, assim, revelar doenças importantes, como a hipertensão arterial, um dos principais fatores de risco, que contribui para o aumento global de doenças cardiovasculares e óbitos (WHO, 2016). Além dos fatores de risco controláveis (ex.: ingestão de sódio, dieta, obesidade, etc.), a exposição não controlada ao PAA vem se destacando como um fator importante no desencadeamento da hipertensão arterial (Brook et al. 2010, Cosselman et al. 2012; Ying et al., 2014).

Em modelos animais experimentais, a aferição da PA é comumente realizada de forma não invasiva, via sistema computadorizado de medida de pressão na cauda (tail-cuff), ou de forma invasiva por radiotelemetria, no qual um transdutor é implantado no animal. Em condições basais, a medida da PA em camundongos saudáveis oscila em média no valor de 90 a 120 mmHg. Neste estudo, muito embora

alterações significativas foram mensuradas no teste ECG de camundongos jovens expostos precocemente a 1,2-NQ, a medida da PA nesses animais não diferiu estatisticamente do grupo controle, sugerindo que, pelo menos no período avaliado, a exposição a 1,2-NQ não afetou a PA dos camundongos na fase juvenil. Isto é curioso, uma vez que outras evidências mostram que alterações no teste ECG de animais expostos ao MP são comumente paralelas às alterações nas medidas de PA e da FC (Ying et al., 2014). É possível que em nosso estudo, a técnica não invasiva de mensuração da PA não seja suficientemente sensível para detectar diferenças mais sutis; todavia, vale ressaltar que os estudos supracitados realizaram exposições crônicas ao PAA (Ying et al., 2014). Segundo esses autores, esse aumento da PA basal nos animais foi paralelo ao aumento da excreção urinária da catecolamina noradrenalina.

Em resumo, nossos resultados *in vivo* reforçam àqueles dados obtidos *in vitro* (átrio) e, ainda, contribuem para demonstrar que a susceptibilidade aos danos da 1,2-NQ em camundongos neonatos não é observado somente no órgão alvo (pulmão), mas também em outros compartimentos, como o coração. Até presente momento não se pode determinar se essa susceptibilidade aumentada no coração dos animais resulta de ações inflamatórias observadas no pulmão destes (Santos et al., 2014; Florenzano et al., 2018), ou de uma ação direta da 1,2-NQ sobre o SCV, que estimula subsequentemente o tônus simpático (> liberação de NE), direta ou indiretamente relacionado ao processo inflamatório.

6.1.2. Mecanismos e efeito no AD frente a 1,2-NQ: papel dos TRP

Nesta etapa do estudo, o envolvimento de mecanismos dependentes dos subtipos dos canais receptores TRP: TRPV1, TRPV4 e TRPC5 foi avaliado, uma vez que estudos prévios do grupo revelaram a participação dos subtipos TRPV1 e TRPA1 nas ações inflamatórias das PED e 1,2-NQ nas vias aéreas de roedores (Teles et al., 2010; Florenzano et al., 2018). Além disto, Sun e colaboradores (2006) sugerem que a 1,2-NQ pode agir sobre TRPV1 em vasos isolados. Wang e Wang (2005) mostram que os canais TRPV1 medeiam efeitos protetores contra lesões isquêmicas, sendo que sua deleção ou bloqueio agrava esta lesão (Zhong e Wang, 2007).

Demonstramos aqui que o bloqueio do TRPV1, via tratamento com o seu antagonista CZP, preveniu a redução na sensibilidade a NE no AD de camundongos expostos na fase neonatal a 1,2-NQ. Tal efeito é curioso, visto que o bloqueio farmacológico com a CPZ se deu em paralelo a exposição neonatal ao PAA, mas o efeito foi mensurado na fase juvenil dos animais. Em estudo anterior, outros autores observaram que a instilação de MP em camundongos, levou ao aumento na PA e alterações cardíacas (isquemia cardíaca), sendo o bloqueio com antagonista de TRPV1 (AMG9810) capaz de prevenir os efeitos observados (Robertson et al., 2014). Ainda, Wang e Wang (2005) demonstraram a importância do receptor TRPV1 em modelo murino de isquemia e reperfusão, onde observaram que a deleção desse receptor promove exacerbação das lesões.

Outra possível explicação para os resultados observados na reatividade atrial está relacionada com as proteínas e outros receptores responsáveis pela maquinaria contrátil. De fato, a exposição a 1,2-NQ promoveu uma redução na expressão de RNAm de importantes receptores como HCN4, não revertido com o antagonismo de TRPV1 (CZP). Além disso, uma tendência a redução na expressão de RNAm foi observada em RyR2, revertido com o bloqueio de TRPV1. Porém, PLB e CaV1.2 apresentaram uma tendência no aumento da expressão, não revertida pelo pré-tratamento com CZP. Estes resultados demonstram a importância do íon cálcio na sinalização e funcionalidade no tecido cardíaco. Outro importante resultado observado, foi a expressão reduzida de RNAm para TRPV1, que não foi revertido pelo tratamento com CZP. Em conjunto, estes dados de expressão de RNAm nos indicam que a 1,2-NQ interfere diretamente na funcionalidade do AD de camundongos expostos e, assim, podemos hipotetizar que a redução de “atividade” ou mesmo expressão de RNAm para TRPV1 possa estar alterando diretamente a expressão desses componentes da maquinaria contrátil do tecido miocárdico, uma vez que a regulação de Ca^{2+} é essencial para célula cardíaca. Assim, alterações nas concentrações deste íon devem ser reguladas por mecanismos compensatórios. Em suma, os resultados desta etapa do estudo sugerem que em coração isolado de camundongos jovens, a exposição a 1,2-NQ levou a alterações na mobilidade Ca^{2+} e discreta manipulação de proteínas, que resultou em efeitos adversos no coração (e AD). De fato, a fina regulação entre esses diversos componentes avaliados é extremamente importante para a atividade atrial normal, sendo que alterações

nesses moduladores podem levar a arritmias. Sabe-se que os canais $Ca_v1.2$ são importantes alvos receptores, que controlam a duração do potencial de ação e a interação contração-excitação no cardiomiócito (Catterall, 2000). Assim, alterações nesse receptor podem alterar a função cardíaca, resultando em arritmias e infarto do miocárdio (Yang et al., 2018).

Evidências recentes mostram que a família dos receptores TRP do tipo vanilóide, em particular a isoforma 4, vem recebendo bastante atenção, pois atua como um potencial alvo para o tratamento de doenças cardiovasculares (vide revisão: Inoue et al., 2018; Yue et., 2015). Neste nosso estudo, entretanto, o antagonismo de TRPV4 pelo seu antagonista HC-067047, não reverteu as ações lesivas promovidas pela exposição a 1,2-NQ; ao contrário, exacerbou a resposta cronotrópica + promovida pela NE em AD. Além disto, o tratamento com o antagonista *per se* (sem a 1,2-NQ) promoveu resposta similar àquela observada no grupo exposto a 1,2-NQ. Além disto, a expressão de RNAm desta isoforma (TRPV4) não foi alterada pela exposição neonatal a 1,2-NQ. Estes resultados demonstram que, diferentemente do observado com o bloqueio do TRPV1, o tratamento com o antagonista HC-067047 pode ter atingido concentrações tóxicas, que justificaria, pelo menos em parte, os efeitos discrepantes observados na reatividade atrial. Cabe salientar que as doses utilizadas no tratamento estão de acordo com as doses referenciadas em estudos experimentais na literatura.

Recentemente, Jones e colaboradores demonstraram a importância do receptor TRPV4 em parâmetros cardiovasculares de camundongos jovens e adultos em modelo de isquemia e reperfusão. Os autores observaram variações na expressão do TRPV4, de acordo com a idade, onde os camundongos velhos exibem maior expressão deste receptor (Jones et al., 2019). Estudos conflitantes mostram que o coração de camundongos jovens apresenta maior expressão de TRPV4, o que justificaria e reforçaria os achados do nosso estudo, em que animais neonatos foram tratados simultaneamente com o antagonista TRPV4 e 1,2-NQ. Uma vez que, observarmos as alterações funcionais disparadas pelo bloqueio e exposição ao 1,2-NQ na fase neonatal. Além do mais, já foi descrito o importante papel de TRPV4 para o desenvolvimento (Wu et al., 2017; Dong et al., 2017).

Por fim, outro receptor avaliado da família TRP foi a isoforma TRPC5, que apesar de não ser expressa nas células do NSA exercem ações importantes na

maturação cardíaca. Neste nosso estudo, o bloqueio farmacológico de TRPC5, reduziu significativamente a Emax de reatividade à NE em AD de camundongos expostos (ou não) a 1,2-NQ na fase neonatal. É muito provável que o bloqueio deste receptor, assim como dos demais, nos primeiros dias de vida afetou a funcionalidade cardíaca. Em recente estudo experimental, Sunggip e colaboradores (2018), revelaram que o bloqueio de TRPC5 influenciou diretamente na indução de hipertrofia (Sunggip et al., 2018). Neste estudo, entretanto, o bloqueio dos TRPC5 não promoveu nenhum efeito sobre as alterações causadas pela 1,2-NQ no AD dos animais.

É importante ressaltar que a exposição precoce ao PAA, 1,2-NQ, já nos revelou promover resposta inflamatória ou exacerbação da inflamação alérgica nas vias áreas de roedores (Teles et al., 2010; Santos et al., 2014). O presente resultado acrescenta que a exposição neonatal ou *in vitro* foi também capaz de promover alterações funcionais em outros compartimentos (coração), de forma direta ou indireta (mediadores inflamatórios, proteínas).

6.2. Efeitos *in vitro* e *in vivo* da 1,2-NQ no leito arteriolar: papel dos TRP

Em continuidade a este estudo, avaliamos as associações entre a 1,2-NQ (administrada agudamente e na fase neonatal) e a reatividade vascular. Constatou-se que, em AP e AM, a administração da 1,2-NQ promoveu vasoconstrição *per se*, de forma concentração dependente, indicando que esse poluente afetou direta/indiretamente mecanismos vasocontráteis, mesmo quando aplicado agudamente *in vitro*.

Sabendo do envolvimento do receptor TRPV1 nas ações inflamatórias das quinonas em vias aéreas (Teles et al., 2010) ou vascular, observada em aorta isolada de coelho, em que a 1,2-NQ afetaria indiretamente a atividade da eNOS e, assim, o vasorrelaxamento dependente do endotélio (Sun et al., 2006), verificou-se a seguir o papel dos TRPV1 em segmentos de AP e AM de camundongos nocautes destes receptores.

Em AP de camundongos nocautes para TRPV1, verificou-se que a redução da vasodilatação (Emax) induzida por ACh na vigência da 1,2-NQ foi idêntica àquela observada na AP obtida de camundongos selvagens, excluindo assim a participação direta dos receptores TRPV1 nos efeitos vasculares agudos frente a 1,2-NQ. Em contrapartida, a Emax de relaxamento promovida pela ACh em segmentos de AM tratados com a 1,2-NQ, obtidos de camundongos nocautes TRPV1 foi reduzida em relação ao selvagem. Isto sugere que o TRPV1 participa da homeostasia vascular desse vaso que, na vigência da 1,2-NQ, é afetada. As discrepâncias nestes resultados podem ser devidas às alterações da expressão de TRPV1 nos leitos estudados.

É sabido que na hipertensão pulmonar, caracterizada pelo aumento da resistência vascular pulmonar decorrente de proliferação e migração de células muscular lisa, tanto TRPV1 quanto TRPV4 possui importante papel nesse processo, reforçando assim a relevância desses subtipos de receptores TRP na fisiopatologia da hipertensão pulmonar (Martin et al., 2012; Parpaite et al., 2016). Ainda, estes demonstraram que os agonistas seletivos desses receptores, capsaicina e 4 α -forbol-12,13-didecanoato (4 α -PDD), respectivamente, induzem aumento na concentração intracelular de Ca²⁺ nas células da musculatura lisa vascular. Corroborando esses estudos, dados não publicados do nosso grupo demonstram que em cultura de

neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos, a administração da 1,2-NQ aumentou a concentração intracelular de Ca^{2+} , a qual foi parcialmente reduzida pelo bloqueio farmacológico dos receptores TRPA1 (Florenzano et al., 2018). Assim, é plausível sugerir que as alterações observadas na reatividade da AM em resposta ao poluente 1,2-NQ são reguladas, pelo menos em parte, por receptores TRP (TRPA1, TRPV1) expressos em células do músculo liso, endoteliais e em nervos perivasculares (vide revisão: Baylie e Brayden, 2011).

Em células endoteliais, o TRPV1 é ativado por endocanabinoides, enquanto o TRPV4, pelo estresse de cisalhamento e mediadores lipídicos, como os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e mediadores da cascata de sinalização de receptores metabotrópicos (Baylie e Brayden, 2011; Storozhuk and Zholos, 2017; Grace et al., 2017). No músculo liso, o TRPV4 encontra-se expresso, onde pode ser ativado por ETs formados/liberados do endotélio e que, subsequentemente, podem ativar os canais de K^+ (de alta condutância), causando hiperpolarização do músculo liso. Adicionalmente, os TRPV1 e TRPV4 expressos em nervos sensitivos medeiam a vasodilatação por intermédio de neuropeptídios liberados, como a substância P e o peptídeo vasodilatador CGRP. Compete acrescentar que em estudo prévio do grupo, Oliveira (2010) revelou que a administração i.tr. da mistura de poluentes (PED e 1,2-NQ) interferiu na reatividade da aorta e do tecido cavernoso de ratos. Tal efeito foi paralelo ao aumento na concentração de substância P no coração desses animais, reforçando o envolvimento de mecanismos neurogênicos nas ações da 1,2-NQ (Teles et al., 2010).

Assim como observado com o antagonismo do receptor TRPV1 (CZP), o bloqueio farmacológico dos receptores TRPV4 (HC-067047) não reduziu a vasoconstrição promovida pela administração *in vitro* da 1,2-NQ em AP; ao contrário, o HC-067047 aumentou parcialmente essa vasoconstrição. Estes resultados são curiosos e excluem a participação de TRPV4 nas ações da 1,2-NQ nessa resposta. É possível também que o bloqueio desta via (TRPV4) possa interferir, de alguma forma, nas ações da 1,2-NQ na AP via mecanismos distintos, regulados por receptores metabotrópicos (Hellwig et al., 2004; Randahawa e Jaggi, 2014). Vale lembrar que na AM, diferentemente do bloqueio com o TRPV1, o bloqueio farmacológico do canal TRPV4 reduziu a vasoconstrição produzida pela

1,2-NQ, indicando que, pelo menos na AM, os receptores TRPV4 participam da ação vasoconstritora promovida por 1,2-NQ.

Curiosamente, em AP isolada de camundongos nocautes para TRPA1, a administração *in vitro* de concentrações crescentes da 1,2-NQ promoveu vasoconstrição de forma concentração dependente, semelhante àquela observada na AP de camundongos selvagens, sugerindo que os TRPA1 não participam da vasoconstrição promovida pela administração aguda *in vitro* da 1,2-NQ neste leito vascular. Curiosamente, na AM dos animais nocautes TRPA1, a resposta contrátil máxima (E_{max}) frente à administração *in vitro* da 1,2-NQ foi marcadamente reduzida em relação aos animais selvagens, sugerindo assim o envolvimento, pelo menos em parte, de TRPA1 na vasoconstrição promovida pela 1,2-NQ. O motivo para tal discrepância na AP e AM não está bem estabelecido, mas é possível que na AP, outros canais TRP sejam mais relevantes (ou mais expressos) do que na AM. Ainda, é possível que outros mecanismos, independentemente dos TRP, estejam envolvidos na resposta contrátil, visto que as respostas vasculares são, em geral, leito dependente. O presente estudo também revelou que a incubação de segmentos de AM e AP com a 1,2-NQ, por um período de 30 minutos, reduziu marcadamente a resposta máxima de relaxamento promovida pela ACh em ambas as artérias, indicando que alguma alteração ocorreu na maquinaria contrátil do músculo liso ou do endotélio.

A incubação prévia de átrios com a 1,2-NQ reduziu a resposta máxima cronotrópica positiva (E_{max}) frente a NE, como discutido acima. O presente resultado complementa dados anteriores do grupo e são consistentes com a literatura atual sobre os efeitos agudos da PAA nas respostas autonômicas cardiovasculares. Por exemplo, um estudo “cohort”, realizado em 2012 na China, revelou que a exposição aguda de indivíduos aos PAA, tais como MP_{2,5}, carbono e monóxido de carbono, elevou a pressão sanguínea dos indivíduos, mas reduziu a frequência cardíaca num subgrupo de pacientes obesos ou com inflamação sistêmica. Tais resultados reforçam uma linha de pensamento na literatura de que fatores adicionais e outras comorbidades potencializam as ações deletérias de PAA sobre o sistema cardiovascular, dentre eles o MP e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) (Huang et al., 2012; Uzoigwe et al., 2013).

Verificou-se neste nosso estudo, que a incubação da 1,2-NQ na AP reduziu a resposta relaxante (vasodilatadora) máxima (E_{max}) frente ao estímulo endotélio-dependente da ACh em segmentos de AP, obtidos de animais selvagens e nocautes TRPA1. Estes resultados reforçam os nossos achados anteriores em AP, indicando que o receptor TRPA1 não parece modular as alterações vasculares (endotélio-dependente) promovidas pela administração *in vitro* da 1,2-NQ. Outrossim, na AM de camundongos nocautes TRPA1, a resposta máxima de relaxamento promovida pela ACh não foi afetada pela pré-incubação com a 1,2-NQ, assim como foi afetada nos segmentos de AM obtidos de camundongos selvagens. Tais resultados apontam para a conclusão de que, dependendo do leito vascular, neste caso a AM, os receptores TRPA1 participam das alterações vasculares autonômicas (relaxamento endotélio-dependente) promovidas pela 1,2-NQ e, ainda, revela sua complexidade dos efeitos dos PAA (1,2-NQ) nos diferentes leitos vasculares (AM e AP).

Vale ressaltar que outros estudos recentes mostram o envolvimento do receptor TRPA1 em associação com as ERO e NO na vasodilatação neurogênica (Aubdool et al., 2016; Pan et al., 2016). Postula-se que a dilatação arterial mediada por agonistas dos receptores TRPA1, ocorra por meio de duas vias distintivas: i) neurogênica, via receptores TRPA1 expressos em nervos perivasculares, que envolve a liberação de neuropeptídeos, como o CGRP e, ii) não neurogênica, via receptores TRPA1 expressos no endotélio. Nesse último caso, a ativação de canais TRPA1 induz hiperpolarização das células do músculo liso, levando a subsequente vasodilatação, que requer a ativação dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+} de pequena e média condutância. Outros autores demonstram que agonistas de TRPA1 promovem aumento sustentado na frequência cardíaca e na pressão sanguínea, que resultam da atividade simpática aumentada (Earley, 2012).

Neste estudo, foi também muito interessante observar que, diferentemente do resultado obtido em AM do camundongo nocaute TRPA1, o E_{max} induzido pela 1,2-NQ não foi significativamente afetado pelo bloqueio farmacológico do receptor TRPA1 com o antagonista deste receptor, HC-030031, apesar de aumentar a sensibilidade ao poluente. A discrepância dos achados obtidos entre os segmentos de AM de animais nocautes TRPA1 e daqueles tratados com o antagonista TRPA1 é curiosa, mas não é bem compreendida. Assim, estudos subsequentes são necessários a fim de se investigar mais profundamente essa discrepância, mesmo

considerando que linhagens nocautes exibem, muitas vezes, respostas adaptativas e compensatórias, que podem mascarar ou potencializar diferentes respostas. Ainda, vale acrescentar que a expressão do receptor TRPA1 difere em diferentes leitos vasculares. Por exemplo, na vasculatura periférica (células endoteliais ou músculo liso vascular), a expressão protéica e gênica para o TRPA1 não foi observada, mas apenas na circulação cerebral (Earley, 2012).

No sentido de alcançar uma maior compreensão de mecanismos associados ao efeito deletério da 1,2-NQ na fisiologia das AM e AP, realizamos a medida de expressão RNAm das subclasses de receptores TRPA1, TRPV1 e TRPV4, como possíveis alvos da ação desse poluente. Corroborando dados da literatura, não conseguimos detectar a expressão de RNAm para a isoforma TRPA1 nos vasos. Curiosamente a expressão de TRPV1 em AP não foi diferente entre os grupos estudados. Por outro lado, o poluente 1,2-NQ aumentou a sensibilidade a FE, e o bloqueio farmacológico concomitante do TRPV1 com a exposição a 1,2-NQ exacerbou essa resposta, mas reduziu drasticamente a resposta vasodilatadora dependente de endotélio promovida pela ACh. Por outro lado, em AM, a expressão de RNAm foi marcadamente aumentada apenas no grupo pré-tratado com CZP e 1,2-NQ, sugerindo uma inibição devido ao sinergismo entre a ação farmacológica da CZP e a participação do poluente, o que confirma TRPV1 como alvo preferencial para a 1,2-NQ.

O resultado que mais chama atenção foi o perfil de expressão de RNAm para a isoforma TRPV4. Em AP, há uma tendência para aumentar a expressão de TRPV4 em animais expostos ao contaminante, porém sem significância estatística. Por sua vez, quando é realizado o bloqueio farmacológico de TRPV1, concomitantemente à exposição ao poluente 1,2-NQ, observa-se um grande aumento na expressão de TRPV4, sugerindo assim um mecanismo compensatório importante. Em contrapartida, o bloqueio farmacológico de TRPV4 não alterou a expressão de RNAm. Tais resultados (expressão de RNAm) podem ser correlacionados com as respostas da reatividade vascular em AP, uma vez que o bloqueio farmacológico com HC-067047 concomitantemente com a exposição ao poluente exacerbou a resposta vasocontrátil a FE e, ainda, reduziu a resposta vasodilatadora dependente de endotélio promovida pela ACh. Assim, ainda que o TRPV4 não seja um alvo direto preferencial da 1,2-NQ, essa isoforma apresenta um *crosstalk* com o TPV1 e,

portanto, um papel no controle do tônus vascular em AP de camundongos. Curiosamente, apesar de não estatisticamente significativo, a expressão (RNAm) do TRPV4 em AM de animais expostos ao poluente apresentou uma tendência de aumento, sendo que os bloqueios farmacológicos, igualmente promoveram aumento na expressão, enquanto o bloqueio paralelo a exposição neonatal reverteu esse efeito.

Sabendo que a 1,2-NQ é um eletrófilo contaminante do MP, a literatura sugere que a oxidação lipídica, capaz de gerar eletrófilos potentes, também estimula vias para ativação do Nrf2, um fator nuclear responsável pelo controle de diversas vias antioxidantes, capazes de inibir a ativação canônica do NF- κ B (Bromberg, 2016). Importaneamente, de acordo com estudos prévios do nosso grupo, a expressão de RNAm para Nrf2 em pulmões de camundongos fêmeas (10 dias de vida), mas não de machos, expostos a 1,2-NQ, mostrou-se aumentada, sendo essa resposta associada a um grau reduzido de inflamação alérgica pulmonar (Florenzano et al., 2017). Em pulmões de camundongos machos expostos a 1,2-NQ na fase neonatal, verificou-se que a exacerbação da inflamação alérgica pulmonar foi paralela ao aumento da translocação do NF- κ B (p50) (Santos et al., 2017).

O presente estudo revelou que apenas a incubação da 1,2-NQ com segmentos de AP e AM não afetou significativamente a expressão basal do Nrf2 em AP; entretanto, promoveu aumento marcante desse fator na AM. É possível que na AM, o aumento da expressão do Nrf2 seja resultado de desequilíbrio na geração de ERO frente ao poluente 1,2-NQ que, por sua vez estimulam de forma direta ou indireta (via geração de ERO) canais do tipo TRPV. Essa sugestão corrobora dados anteriores do grupo em outros compartimentos (pulmão).

Em hepatócito murino, a adição de 1,2-NQ levou à ativação do fator Nrf2, via modificação covalente em resíduos de cisteína da proteína Keap1 que, promoveu subsequente aumento na expressão de proteínas associadas a translocação de Nrf2, tais como a glutatona S-transferase (GST), NADPH:quinona oxirredutase 1 (NQO1) e aldo-ceto redutases e uridina 5'-difosfato-glucuronosil transferase (Miura et al. 2011; Lawal, 2017). Neste estudo, resultados do nosso grupo mostram que a atividade da GST foi reduzida em AP, onde a expressão basal do Nrf2 também não foi afetada pela exposição de camundongos a 1,2-NQ na fase neonatal (Amaral-Neto et al. artigo em em submissão). Contudo, o perfil das enzimas antioxidantes na

AM, que exibiu respostas distintas da AP, é desconhecido. Por outro lado, no pulmão de fêmeas expostas a 1,2-NQ na fase neonatal, tanto a expressão do Nrf2 quanto da atividade de GST mostraram-se elevadas frente a exposição da 1,2-NQ na fase neonatal. Estudo interessante de Itoh et al (2004) mostrou que a proteína Keap1 pode ser modificada por poluentes eletrofílicos, como a 1,2-NQ, favorecendo a translocação de Nrf2 para o núcleo, onde estimulará a expressão de genes associados a detoxificação de xenobióticos (Itoh et al., 2004).

Os resultados deste estudo mostram, pela primeira vez, que a administração aguda *in vitro* assim como a exposição neonatal ao PAA 1,2-NQ afetou a homeostasia cardíaca (frequência cardíaca e atrial) e o tônus vascular das artérias pulmonar e mesentérica de camundongos. Acrescentou-se ainda ao conhecimento das ações cardiovasculares da 1,2-NQ que, em AM, mais do que em AP, os receptores TRPA1 e TRPV modulam, pelo menos em parte, as alterações vasculares evocadas por esse poluente. Por fim, admite-se que este conjunto de resultados gerados são originais e relevantes, pois a maioria dos estudos são direcionados para os efeitos sistêmicos produzidos pelo MP_{2,5} (ex.: PED) e, ainda, há pouca informação sobre as diferenças de susceptibilidade relativa do coração ou vasos ao contaminante 1,2-NQ. Entende-se que existem grandes defasagens quanto ao conhecimento e importância ambiental da 1,2-NQ sobre o sistema cardiovascular de animais e humanos, em que este estudo espera ter contribuído para suprir, em parte esta defasagem.

7. CONCLUSÃO

De forma geral podemos concluir que:

1. A adição *in vitro* ou a exposição neonatal *in vivo* da 1,2-NQ desencadeia alterações no AD (aumento da FA espontânea, reduz cronotropismo positivo e negativo frente a agonistas adrenérgicos, colinérgico), em artérias isoladas, onde tanto em AP quanto AM o contaminante promove constrição e ainda pode ter um papel importante no desencadeamento de arritmias, resultando em disfunção atrial e CV global na fase juvenil destes;
2. Esses resultados também destacam o potencial envolvimento de fatores epigenéticos em sensibilizar ou predispor os animais a alterações das funções cardiovasculares na fase juvenil;
3. Conclui-se que existe um potencial mecanismo molecular regulado por receptores TRP (em particular, TRPV1) e β 1 nas alterações funcionais no AD, vascular e sistema CV murino exposto *in vitro* ou na fase neonatal *in vivo* ao poluente 1,2-NQ, revelando a vulnerabilidade da idade aos efeitos adversos no sistema CV de camundongo.
4. Tais achados poderão servir ainda como um indicador importante de susceptibilidade aumentada a doenças CV, pois revela que na vigência da exposição precoce a 1,2-NQ, estes animais são mais suscetíveis a desenvolver arritmias e distúrbios cardíacos.

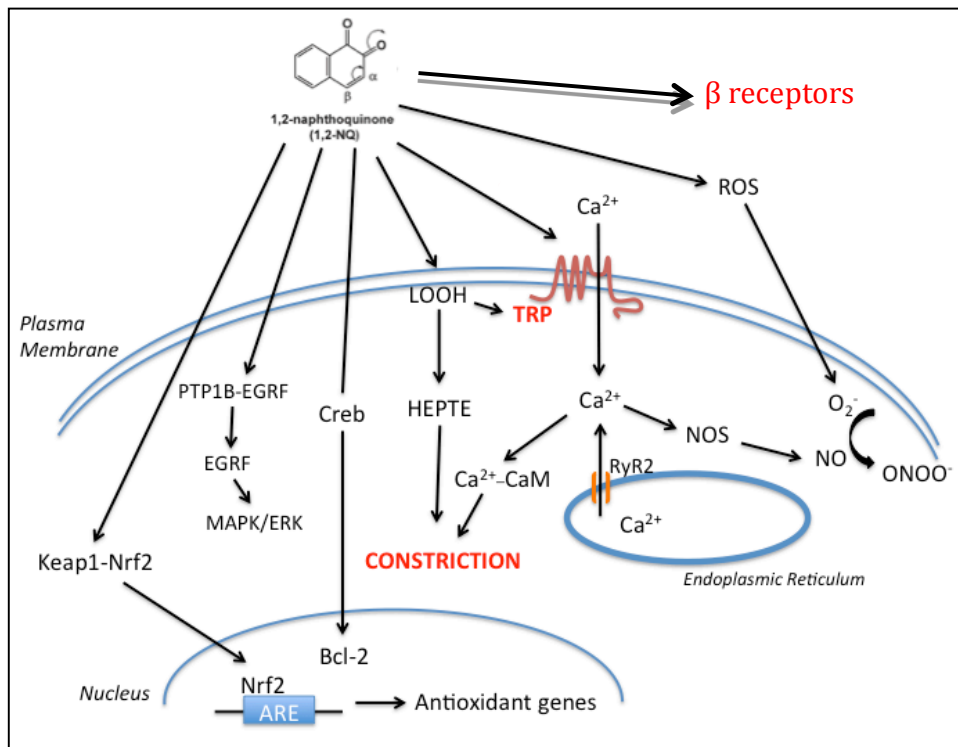


Figura 26 – Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos/vias pelo qual a 1,2-NQ pode promover sobre uma célula de músculo liso vascular. Diversos fatores de transcrição e segundo mensageiros podem ser ativados pela 1,2-NQ de maneira direta ou indiretamente. Fonte: Soares (2018).

8. REFERÊNCIAS¹

- Abe KC, Miraglia SG. Health impact assessment of air pollution in São Paulo, Brazil. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Jul 11;13(7). pii:E694.
- Abiko Y, Lin FY, Lee H, Puga A, Kumagai Y. Quinone-mediated induction of cytochrome P450 1A1 in HepG2 cells through increased interaction of aryl hydrocarbon receptor with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. *J Toxicol Sci*. 2016;41(6):775-781.
- Abiko Y, Puga A, Kumagai Y. Covalent binding of quinones activates the Ah receptor in Hepa1c1c7 cells. *J Toxicol Sci*. 2015 Dec;40(6):873-86.
- Adamopoulos D, Vyssoulis G, Karpanou E, Kyvelou SM, Argacha JF, Cokkinos D, Stefanadis C, van de Borne P. Environmental determinants of blood pressure, arterial stiffness, and central hemodynamics. *J Hypertens*. 2010 May;28(5):903-9.
- Ahn JH, Cho SY, Ha JD, Chu SY, Jung SH, Jung YS, Baek JY, Choi IK, Shin EY, Kang SK, Kim SS, Cheon HG, Yang SD, Choi JK. Synthesis and PTP1B inhibition of 1,2-naphthoquinone derivatives as potent anti-diabetic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2002 Aug 5;12(15):1941-6.
- Amaral-Neto ES, Soares AG, Florenzano J, Teixeira SA, Costa SK, Muscara MN. The exposure of newborn mice to the environmental pollutant 1,2-naphthoquinone results in gender-dependent alterations of the pulmonary artery vasomotricity at the youthhood (manuscrito à ser submetido).
- Andersson DA, Gentry C, Moss S, Bevan S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci*. 2008;28(10):2485-94.
- Andre L, Boissière J, Reboul C, Perrier R, Zalvidea S, Meyer G, Thireau J, Tanguy S, Bideaux P, Hayot M, Boucher F, Obert P, Cazorla O, Richard S. Carbon monoxide pollution promotes cardiac remodeling and ventricular arrhythmia in healthy rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010 Mar 15;181(6):587-95.
- Arbex MA, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Impact of outdoor biomass air pollution on hypertension hospital admissions. *J Epidemiol Community Health*. 2010 Jul;64(7):573-9.
- Aubdool AA, Kodji X, Abdul-Kader N, Heads R, Fernandes ES, Bevan S, Brain SD. TRPA1 activation leads to neurogenic vasodilatation: involvement of reactive oxygen nitrogen species in addition to CGRP and NO. *Br J Pharmacol*. 2016 Aug;173(15):2419-33.
- Banner KH, Igney F, Poll C. TRP channels: emerging targets for respiratory disease. *Pharmacol Ther*. 2011 Jun;130(3):371-84.
- Bartell SM, Longhurst J, Tjoa T, Sioutas C, Delfino RJ. Particulate air pollution, ambulatory heart rate variability, and cardiac arrhythmia in retirement community residents with coronary artery disease. *Environ Health Perspect*. 2013 Oct;121(10):1135-41.
- Bauer M, Moebus S, Möhlenkamp S, Dragano N, Nonnemacher M, Fuchsluger M, Kessler C, Jakobs H, Memmesheimer M, Erbel R, Jöckel KH, Hoffmann B. Urban particulate

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org>

- matter air pollution is associated with subclinical atherosclerosis: results from the HNR (Heinz Nixdorf Recall) study. *J Am Coll Cardiol* 56(22):1803-8, 2010.
- Baylie RL, Brayden JE. TRPV channels and vascular function. *Acta Physiol (Oxf.)* 203(1):99-116, 2011.
- Beei C, Iwamoto N, Inaba T, Shinkai Y, Kumagai Y. Activation of EGFR/MEK/ERK/AP-1 signaling mediated by 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary A549 cells. *J Toxicol Sci.* 2013;38(5):793-7.
- Belvisi MG, Dubuis E, Birrell MA. Transient receptor potential A1 channels: insights into cough and airway inflammatory disease. *Chest.* 2011;140(4):1040-7.
- Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;114(5):1116-23. Review.
- Bodkin JV, Brain SD. Transient receptor potential ankyrin 1: emerging pharmacology and indications for cardiovascular biology. *Acta Physiol (Oxf.)*. 2011 Sep;203(1):87-98.
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 2000 Mar;13(3):135-60.
- Brimblecombe P. London air pollution, 1500-1900. *Atmos Environ.* 1977;11(12):1157-62.
- Brimblecombe P. The Clean air act after 50 years. *Weather.* Nov 2006, 61,11:311-314
- Brimblecombe P. Industrial air pollution in thirteenth century in Britain. *Weather*, 1974, London, 30,388-396.
- Bromberg PA. Mechanisms of the acute effects of inhaled ozone in humans. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Dec;1860(12):2771-81.
- Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith SC Jr, Tager I. *Circulation.* 2004, 109(21):2655-71.
- Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Luepker RV, Mittleman MA, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 121(21):2331-78, 2010.
- Carratt SA, Morin D, Buckpitt AR, Edwards PC, Van Winkle LS. Naphthalene cytotoxicity in microsomal epoxide hydrolase deficient mice. *Toxicol Lett.* 2016 Mar 30;246:35-41.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997 Oct 23;389(6653):816-24.
- Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000;16:521-55.
- Cendon S, Pereira LA, Braga AL, Conceição GM, Cury Junior A, Romaldini H, Lopes AC, Saldiva PH. Air pollution effects on myocardial infarction. *Rev Saude Publica.* 2006 Jun;40(3):414-9.
- Cerniglia CE, Gibson DT. Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Appl Environ Microbiol.* 1977 Oct;34(4):363-70.
- CETESB Série Relatórios: Qualidade do ar no estado de São Paulo, 2015. Ano de publicação 2016. Disponível em: <http://ar.cetesb.sp.gov.br/publicacoes-relatorios/>

CETESB Histórico disponível
em: http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_historico.asp acessado em 10 de julho de 2018.

- Cheng WY, Currier J, Bromberg PA, Silbajoris R, Simmons SO, Samet JM. Linking oxidative events to inflammatory and adaptive gene expression induced by exposure to an organic particulate matter component. *Environ Health Perspect.* 2012 Feb;120(2):267-74.
- Cheon HG, Kim SM, Yang SD, Ha JD, Choi JK. Discovery of a novel protein tyrosine phosphatase-1B inhibitor, KR61639: potential development as an antihyperglycemic agent. *Eur J Pharmacol.* 2004 Feb 6;485(1-3):333-9.
- Cho AK, Schmitz DA, You Y, Rodriguez CE, Distefano E, Kumagai Y, Miguel AH, Figuren A, Kobayashi T, Avol EL, Froines JR. Determination of four quinones in Diesel exhaust particles, SRM1649A and atmospheric 2.5. *Aerosol Sci Technol.* 2004;38:1-14.
- Colsohl B, Nilius B, Vennekens R. On the putative role of transient receptor potential cation channels in asthma. *Clin Exp Allergy.* 2009 Oct;39(10):1456-66.
- Cosselman KE, Krishnan RM, Oron AP, Jansen K, Peretz A, Sullivan JH, Larson TV, Kaufman JD. Blood pressure response to controlled diesel exhaust exposure in human subjects. *Hypertension.* 2012 May;59(5):943-8.
- Deering-Rice CE, Romero EG, Shapiro D, Hughen RW, Light AR, Yost GS, Veranth JM, Reilly CA. Electrophilic components of diesel exhaust particles (DEP) activate transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1): a probable mechanism of acute pulmonary toxicity for DEP. *Chem Res Toxicol.* 2011;24(6):950-9.
- Doerner JF, Gisselmann G, Hatt H, Wetzel CH. Transient receptor potential channel A1 is directly gated by calcium ions. *J Biol Chem.* 2007;282(18):13180-9.
- Doherty MD, Cohen GM, Gant TW, Naish S, Riley PA. Metabolism of 1-naphthol by tyrosinase. *Biochem Pharmacol.* 1985 Sep 1;34(17):3167-72.
- Doherty MD, Cohen GM, Smith MT. Mechanisms of toxic injury to isolated hepatocytes by 1-naphthol. *Biochem Pharmacol.* 1984 Feb 15;33(4):543-9.
- Dong Q, Li J, Wu QF, Zhao N, Qian C, Ding D, Wang BB, Chen L, Guo KF, Fu D, Han B, Liao YH, Du YM. Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Sci Rep.* 2017 Feb 16;7:42678.
- Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol.* 2012 Sep;167(1):13-22. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02018.x. Review.
- Endo A, Sumi D, Iwamoto N, Kumagai Y. Inhibition of DNA binding activity of cAMP response element-binding protein by 1,2-naphthoquinone through chemical modification of Cys-286. *Chem Biol Interact.* 2011 Jul 15;192(3):272-7.
- Endo A, Sumi D, Kumagai Y. 1,2-Naphthoquinone disrupts the function of cAMP response element-binding protein through covalent modification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Sep 14;361(1):243-8.
- Farmer SA, Nelin TD, Falvo MJ, Wold LE. Ambient and household air pollution: complex triggers of disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2014 Aug 15;307(4):H467-76. Review.
- Filosa JA, Iddings JA. Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Sep 1;305(5):H609-19.

- Filosa JA, Yao X, Rath G. TRPV4 and the regulation of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol* 61(2):113-9, 2013.
- Fiordelisi A, Piscitelli P, Trimarco B, Coscioni E, Iaccarino G, Sorriento D. The mechanisms of air pollution and particulate matter in cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev.* 2017 Mar 16. doi: 10.1007/s10741-017-9606-7. [Epub ahead of print] Review.
- Firket J. Fog along the Meuse Valley. *Trans Faraday Soc* 32:1192-1197-1936
- Florenzano J, Santos KT, Teixeira SA, Rodrigues L, Brain SD, Muscará MN, Costa SKP. Neonatal exposure to electrophilic environmental pollutant induces gender- dependent susceptibility to pulmonary allergic inflammation in the juvenile period: contribution of redox cycling (manuscrito à ser submetido)
- Gao F, Wang DH. Hypotension induced by activation of the transient receptor potential vanilloid 4 channels: role of Ca²⁺-activated K⁺ channels and sensory nerves. *J Hypertens.* 2010 Jan;28(1):102-10.
- Geppetti P, Patacchini R, Nassini R. Transient receptor potential channels and occupational exposure. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2014, 14(2):77-83.
- Giorgini P, Di Giosia P, Grassi D, Rubenfire M, Brook RD, Ferri C. Air Pollution Exposure and Blood Pressure: An Updated Review of the Literature. *Curr Pharm Des.* 2016;22(1):28-51. Review.
- Gouveia N, Junger WL; ESCALA investigators. Effects of air pollution on infant and children respiratory mortality in four large Latin-American cities. *Environ Pollut.* 2018 Jan;232:385-391.
- Gurbani D, Kukshal V, Laubenthal J, Kumar A, Pandey A, Tripathi S, Arora A, Jain SK, Ramachandran R, Anderson D, Dhawan A. Mechanism of inhibition of the ATPase domain of human topoisomerase II α by 1,4-benzoquinone, 1,2 naphthoquinone, 1,4-naphthoquinone, and 9,10-phenanthroquinone. *Toxicol Sci.* 2012 Apr;126(2):372-90.
- Hellwig N, Albrecht N, Harteneck C, Schultz G, Schaefer M. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci.* 2005 Mar 1;118(Pt 5):917-28.
- Himi N, Hamaguchi A, Hashimoto K, Koga T, Narita K, Miyamoto O. Calcium influx through the TRPV1 channel of endothelial cells (ECs) correlates with a stronger adhesion between monocytes and ECs. *Adv Med Sci* 57(2): 224-229, 2012.
- Hoffmann B, Moebus S, Möhlenkamp S, Stang A, Lehmann N, Dragano N, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R, Jöckel KH. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 116(5):489-96, 2007.
- Hoffmann B, Moebus S, Stang A, Beck EM, Dragano N, Möhlenkamp S, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R, Jöckel KH. Residence close to high traffic and prevalence of coronary heart disease. *Eur Heart J* 27(22):2696-702, 2006.
- Huang W, Zhu T, Pan X, Hu M, Lu SE, Lin Y, Wang T, Zhang Y, Tang X. Air pollution and autonomic and vascular dysfunction in patients with cardiovascular disease: interactions of systemic inflammation, overweight, and gender. *Am J Epidemiol.* 2012 Jul 15;176(2):117-26.
- Inoue R, Kurahara LH, Hiraishi K. TRP channels in cardiac and intestinal fibrosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2018 Nov 17. pii: S1084-9521(18)30045-4.
- Itoh K, Tong KI, Yamamoto M. Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med.* 2004 May 15;36(10):1208-13.

- Iwamoto N, Sumi D, Ishii T, Uchida K, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. Chemical knockdown of protein-tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*. 2007 Nov 16;282(46):33396-404.
- Jakober CA, Riddle SG, Robert MA, Destailats H, Charles MJ, Green PG, Kleeman MJ. Quinone emissions from gasoline and diesel motor vehicles. *Environ Sci Technol*. 2007 Jul 1;41(13):4548-54.
- John Evelyn 1661 – *Fumifugium* – publicado por The Rota, 1976, Exeter, Reino Unido, ISBN: 0904617068.
- Jones JL, Peana D, Veteto AB, Lambert MD, Nourian Z, Karasseva NG, Hill MA, Lindman BR, Baines CP, Krenz M, Domeier TL. TRPV4 increases cardiomyocyte calcium cycling and contractility yet contributes to damage in the aged heart following hypoosmotic stress. *Cardiovasc Res*. 2019 Jan 1;115(1):46-56.
- Ju YK, Chu Y, Chaulet H, Lai D, Gervasio OL, Graham RM, Cannell MB, Allen DG. Store-Operated Ca²⁺ influx and expression of TRPC genes in mouse sinoatrial node. *Circ Res*. 100(11):1605-14, 2007.
- Kennedy BP, Ramachandran C. Protein tyrosine phosphatase-1B in diabetes. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 1;60(7):877-83.
- Kikuno S, Taguchi K, Iwamoto N, Yamano S, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. 1,2-Naphthoquinone activates vanilloid receptor 1 through increased protein tyrosine phosphorylation, leading to contraction of guinea pig trachea. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006 Jan 1;210(1-2):47-54.
- Köhler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, Kacik M, Busch C, Grgic I, Maier T, Hoyer J. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jul;26(7):1495-502.
- Koulova A, Frishman WH. Air pollution exposure as a risk factor for cardiovascular disease morbidity and mortality. *Cardiol Rev*. 2014; 22(1):30-6.
- Kumagai Y, Shimojo N. Possible mechanisms for induction of oxidative stress and suppression of systemic nitric oxide production caused by exposure to environmental chemicals. *Environ Health Prev Med*. 2002, 7(4):141-50.
- Kumagai Y, Taira J, Sagai M. Apparent inhibition of superoxide dismutase activity in vitro by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med*. 1995 Feb;18(2):365-71.
- Künzli N, Jerret M, Garcia-Esteban R, Basagaña X, Beckermann B, Gilliland F, Medina M, Peters J, Hodis HN, Mack WJ. Ambient air pollution and the progression of atherosclerosis in adults. *PLoS One* 5(2):e9096, 2010.
- Künzli N, Jerret M, Mack WJ, Beckerman B, LaBree L, Gilliland F, Thomas D, Peters J, Hodis HN. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. *Environ Health Perspect* 113(2):201-6, 2005.
- Kurhanewicz N, McIntosh-Kastrinsky R, Tong H, Walsh L, Farraj AK, Hazari MS. Ozone co-exposure modifies cardiac responses to fine and ultrafine ambient particulate matter in mice: concordance of electrocardiogram and mechanical responses. *Part Fibre Toxicol*. 2014 Oct 16;11:54.
- Lavrach KS, Corteselli EM, Wages PA, Bromberg PA, Simmons SO, Gibbs-Flournoy EA, Samet JM. Investigating mitochondrial dysfunction in human lung cells exposed to redox-active PM components. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2018 Mar 1;342:99-107.

- Lawal AO. Air particulate matter induced oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease and atherosclerosis: The role of Nrf2 and AhR-mediated pathways. *Toxicol Lett.* 2017 Mar 15;270:88-95.
- Lee BJ, Kim B, Lee K. Air pollution exposure and cardiovascular disease. *Toxicol Res.* 2014; 30(2):71-5.
- Lemos M, Mohallen SV, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção JV, Godleski JJ, Saldiva PH. Chronic exposure to urban air pollution induces structural alterations in murine pulmonary and coronary arteries. *Inhal Toxicol.* 2006 Apr;18(4):247-53.
- Lin C, Chen DR, Wang SL, Hsieh WC, Yu WF, Wang TW, Tsai CH, Wei HH, Tsuang BJ, Lin PH. Cumulative body burdens of polycyclic aromatic hydrocarbons associated with estrogen bioactivation in pregnant women: protein adducts as biomarkers of exposure. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2014;49(6):634-40.
- Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA 3rd, Conceição GM, Anastácio VM, Hatanaka M, Andrade WC, Hamaue WR, Böhm GM, Saldiva PH. Air pollution and respiratory illness of children in São Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999 Oct;13(4):475-88
- Lin PH, Chen DR, Wang TW, Lin CH, Chuang MC. Investigation of the cumulative tissue doses of naphthoquinones in human serum using protein adducts as biomarker of exposure. *Chem Biol Interact.* 2009 Sep 14;181(1):107-14.
- Link MS, Dockery DW. Air pollution and the triggering of cardiac arrhythmias. *Curr Opin Cardiol.* 2010 Jan;25(1):16-22.
- Link MS, Luttmann-Gibson H, Schwartz J, Mittleman MA, Wessler B, Gold DR, Dockery DW, Laden F. Acute exposure to air pollution triggers atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Aug 27;62(9):816-25.
- Maher SA, Dubuis ED, Belvisi MG. G-protein coupled receptors regulating cough. *Curr Opin Pharmacol.* 2011;11(3):248-53. Review.
- Manley, NN. The weather and diseases: Some eighteenth-century contributions to observational meteorology, *Notes Rec. Soc.* 1952 Lond. 9,300-307
- Marrelli SP, O'neil RG, Brown RC, Bryan RM Jr. PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Mar;292(3):H1390-7.
- Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau JP, Ducret T. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 2012 Sep;464(3):261-72.
- Martins LC, Pereira LA, Lin CA, Santos UP, Prioli G, Luiz Odo C, Saldiva PH, Braga AL. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saude Publica.* 2006 Aug;40(4):677-83.
- Martins MC, Fatigati FL, Véspoli TC, Martins LC, Pereira LA, Martins MA, Saldiva PH, Braga AL. Influence of socioeconomic conditions on air pollution adverse health effects in elderly people: an analysis of six regions in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health.* 2004 Jan;58(1):41-6.
- McDonald JD, Barr EB and White RK. Design, characterization, and evaluation of a small-scale diesel exhaust exposure system. *Aerosol Sci Technol.* 2004, 38:62-78.
- Meyer G, Boissiere J, Tanguy S, Rugale C, Gayrard S, Jover B, Obert P, Reboul C. Carbon monoxide pollution impairs myocardial perfusion reserve: implication of coronary endothelial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2011 Dec;11(4):334-40.

- Miller MG, Powell J, Cohen GM. Formation and identification of naphthoquinone glutathione conjugates following microsomal metabolism of 1-naphthol. *Adv Exp Med Biol.* 1986;197:391-7.
- Ministry of Health. Mortality and morbidity during the London fog of december 1952. Reports on Public Health and Medical subjects No95, London. London: Ministry of Health, 1954
- Miraglia SG, Veras MM, Amato-Lourenço LF, Rodrigues-Silva F, Saldiva PH. Follow-up of the air pollution and the human male-to-female ratio analysis in São Paulo, Brazil: a times series study. *BMJ Open.* 2013 Jul 26;3(7). pii: e002552.
- Miura T, Kakehashi H, Shinkai Y, Egara Y, Hirose R, Cho AK, Kumagai Y. GSH-mediated S-transarylation of a quinone glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase conjugate. *Chem Res Toxicol.* 2011 Nov 21;24(11):1836-44.**b**
- Miura T, Shinkai Y, Hirose R, Iwamoto N, Cho AK, Kumagai Y. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a quinone reductase in the suppression of 1,2-naphthoquinone protein adduct formation. *Free Radic Biol Med.* 2011 Dec 1;51(11):2082-9.**c**
- Miura T, Shinkai Y, Jiang HY, Iwamoto N, Sumi D, Taguchi K, Yamamoto M, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Cho AK, Kumagai Y. Initial response and cellular protection through the Keap1/Nrf2 system during the exposure of primary mouse hepatocytes to 1,2-naphthoquinone. *Chem Res Toxicol.* 2011 Apr 18;24(4):559-67.**a**
- Monrad M, Sajadieh A, Christensen JS, Ketzel M, Raaschou-Nielsen O, Tjønneland A, Overvad K, Loft S, Sørensen M. Long-Term Exposure to Traffic-Related Air Pollution and Risk of Incident Atrial Fibrillation: A Cohort Study. *Environ Health Perspect.* 2017 Mar;125(3):422-427.
- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res.* 1977;41(1):19-26.
- Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 2002 Jan 29;105(4):411-4.
- Nesnow S, Bergman H, Garland H, Morris M. Inhibition of microsomal metabolism and chemical oncogenesis in culture by naphthalene quinones. *J Environ Pathol Toxicol.* 1980 Nov;4(5-6):17-30.
- Newby DE, Mannucci PM, Tell GS, Baccarelli AA, Brook RD, Donaldson K, Forastiere F, Franchini M, Franco OH, Graham I, Hoek G, Hoffmann B, Hoylaerts MF, Künzli N, Mills N, Pekkanen J, Peters A, Piepoli MF, Rajagopalan S, Storey RF; ESC Working Group on Thrombosis, European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation.; ESC Heart Failure Association. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *Eur Heart J.* 2015 Jan 7;36(2):83-93b.
- Nishina T, Deguchi Y, Miura R, Yamazaki S, Shinkai Y, Kojima Y, Okumura K, Kumagai Y, Nakano H. Critical Contribution of Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2 (NRF2) to Electrophile-induced Interleukin-11 Production. *J Biol Chem.* 2017 Jan 6;292(1):205-216.
- Oliveira, JF. Avaliação das funções vascular e erétil em ratos com inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental liberado na exaustão do diesel. Tese de doutorado obtida pelo programa de pós-graduação em farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP. (2010).
- Ollodart R, rose NR. Antibodies to 1,2-naphthoquinone. *Cancer Res.* 1962 Jul;22 :689-95.

- Pan Y, Chen F, Huang S, Cai Z, Lan H, Tong Y, Yu X, Zhao G. TRPA1 and TRPM8 Receptors May Promote Local Vasodilation that Aggravates Oxaliplatin-Induced Peripheral Neuropathy Amenable to 17 β -Estradiol Treatment. *Curr Neurovasc Res*. 2016;13(4):309-317.
- Parpaite T, Cardouat G, Mauroux M, Gillibert-Duplantier J, Robillard P, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Ducret T. Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch*. 2016 Jan;468(1):111-30.
- Perez CM, Hazari MS, Farraj AK. Role of autonomic reflex arcs in cardiovascular responses to air pollution exposure. *Cardiovasc Toxicol*. 2015 Jan;15(1):69-78.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):e45.
- Pham NT, Jewell WT, Morin D, Jones AD, Buckpitt AR. Characterization of model peptide adducts with reactive metabolites of naphthalene by mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(8):e42053.
- Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68: 619-647, 2006.
- Randhawa PK, Jaggi AS. TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system. *Basic Res Cardiol*. 2015 Nov;110(6):54. doi: 10.1007/s00395-015-0512-7.
- Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci*. 2005 Jun;85(2):898-905.
- Robertson S, Thomson AL, Carter R, Stott HR, Shaw CA, Hadoke PW, Newby DE, Miller MR, Gray GA. Pulmonary diesel particulate increases susceptibility to myocardial ischemia/reperfusion injury via activation of sensory TRPV1 and β 1 adrenoreceptors. *Part Fibre Toxicol*. 2014 Feb 25;11:12.
- Robson-Scott, German Travellers in England, Blackwell, Oxford, 1953
- Saeed M, Higginbotham S, Rogan E, Cavaliere E. Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. *Chem Biol Interact*. 2007;165(3):175-88.
- Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Böhm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res*. 1994 May;65(2):218-25.
- Saldiva PH, Pope CA 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Böhm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995 Mar-Apr;50(2):159-63.
- Saldiva SRDM, Barrozo LV, Leone CR, Failla MA, Bonilha EA, Bernal RTI, Oliveira RC, Saldiva PHN. Small-Scale variations in urbana ir pollution levels are significantly associated with premature births: a case study in São Paulo. *Int J Environ Res Public Health*. 2018 Oct 12 12;15(10).pii:E2236.
- Sandström T, Cassee FR, Salonen R, Dybing E. Recent outcomes in European multicentre projects on ambient particulate air pollution. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1;207(2 Suppl):261-8. Review.

- Santos KT, Florenzano J, Rodrigues L, Fávaro RR, Ventura FF, Ribeiro MG, Teixeira SA, Ferreira HH, Brain SD, Damazo AS, Zorn TM, Câmara NO, Muscará MN, Peron JP, Costa SK. Early postnatal, but not late, exposure to chemical ambient pollutant 1,2-naphthoquinone increases susceptibility to pulmonary allergic inflammation at adulthood. *Arch Toxicol*. 2014 Aug;88(8):1589-605.
- Santos KT, Florenzano J, Rodrigues L, Teixeira SA, Câmara NO, Brain SD, Muscara MN, Peron JPS, Costa SK. Innate toll-like receptor 4 (TLR4) contribution to increased asthma susceptibility from neonate exposure to ambiente particulater matter chemical contaminant, 1.2-NQ (manuscrito à ser submetido).
- Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LA, Vieira TC, Saldiva PH, Braga AL. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2008 Mar;62(3):267-72.
- Sapart CJ, Monteil G, Prokopiou M, van de Wal RS, Kaplan JO, Sperlich P, Krumhardt KM, van der Veen C, Houweling S, Krol MC, Blunier T, Sowers T, Martinerie P, Witrant E, Dahl-Jensen D, Röckmann T. Natural and anthropogenic variations in methane sources during the past two millennia. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):85-8.
- Sarnat JA, Golan R, Greenwald R, Raysoni AU, Kewada P, Winqvist A, Sarnat SE, Dana Flanders W, Mirabelli MC, Zora JE, Bergin MH, Yip F. Exposure to traffic pollution, acute inflammation and autonomic response in a panel of car commuters. *Environ Res*. 2014 Aug;133:66-76.
- Schuetzle D, Lee FS, Prater TJ. The identification of polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) derivatives in mutagenic fractions of diesel particulate extracts. *Int J Environ Anal Chem*. 1981;9(2):93-144.
- Shah AS, Langrish JP, Nair H, McAllister DA, Hunter AL, Donaldson K, Newby DE, Mills NL. Global association of air pollution and heart failure: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2013 Sep 21;382(9897):1039-48.
- Shang Y, Zhang L, Jiang Y, Li Y, Lu P. Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: the role of reactive oxygen species. *Chemosphere*. 2014 Apr;100:42-9.
- Sheng K, Lu J. Typical airborne quinones modulate oxidative stress and cytokine expression in lung epithelial A549 cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2017 Jan 28;52(2):127-134.
- Shimada H, Ohtaguro M, Miura K, Imamura Y. Inhibitory effects of diesel exhaust components and flavonoids on 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse tissues. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007 Aug;22(4):445-9.
- Shinkai Y, Abiko Y, Ida T, Miura T, Kakehashi H, Ishii I, Nishida M, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Reactive Sulfur Species-Mediated Activation of the Keap1-Nrf2 Pathway by 1,2-Naphthoquinone through Sulfenic Acids Formation under Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol*. 2015 May 18;28(5):838-47.
- Shinkai Y, Iwamoto N, Miura T, Ishii T, Cho AK, Kumagai Y. Redox cycling of 1,2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. *Chem Res Toxicol*. 2012 Jun 18;25(6):1222-30.
- Shpak B, Gofman Y, Shpak C, Hiller R, Boyman L, Khananshvili D. Effects of purified endogenous inhibitor of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger on ouabain-induced arrhythmias in the atria and ventricle strips of guinea pig. *Eur J Pharmacol*. 2006 Dec 28;553(1-3):196-204.

- Shrenck HH, Heimann H, Clayton GD, Gafafer WM, Wexler H. Air pollution in Donora, PA: Epidemiology of the unusual smog episode of October 1948, Preliminary Report. Public Health Bulletin No306. Washington, DC:US Public Health Service, 1949
- Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air pollution and cardiovascular injury epidemiology, toxicology, and mechanisms. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Aug 26;52(9):719-26.
- Soares AG, Teixeira SA, Muscara MN, Costa SK. 1,2-Naphthoquinone interacts with beta adrenergic receptors in the atria of mice, 2018a (manuscrito em preparação).
- Soares AG, Florenzano J, Rodrigues L, Teixeira A, Muscará MN, Brain SD and Costa SK. Effects of the air pollutant 1,2-naphthoquinone in the vascular system: Role of TRP channels, 2018b (manuscrito em preparação)
- Stokes A, Wakano C, Koblan-Huberson M, Adra CN, Fleig A, Turner H. TRPA1 is a substrate for de-ubiquitination by the tumor suppressor CYLD. *Cell Signal*. 2006 Oct;18(10):1584-94.
- Storozhuk MV, Zholos AV. TRP channels as novel targets for endogenous ligands: focus on endocannabinoids and nociceptive signalling. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Apr 24. doi: 10.2174/1570159X15666170424120802. [Epub ahead of print]
- Sumi D, Akimori M, Inoue K, Takano H, Kumagai Y. 1,2-Naphthoquinone suppresses lipopolysaccharide-dependent activation of IKK β /NF- κ B/NO signaling: an alternative mechanism for the disturbance of inducible NO synthase-catalyzed NO formation. *J Toxicol Sci*. 2010 Dec;35(6):891-8.
- Sun Y, Taguchi K, Sumi D, Yamano S, Kumagai Y. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity and suppression of endothelium-dependent vasorelaxation by 1,2-naphthoquinone, a component of diesel exhaust particles. *Arch Toxicol*. 2006 May;80(5):280-5.
- Sunggip C, Shimoda K, Oda S, Tanaka T, Nishiyama K, Mangmool S, Nishimura A, Numaga-Tomita T, Nishida M. TRPC5-eNOS Axis Negatively Regulates ATP-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy. *Front Pharmacol*. 2018 May 22;9:523.
- Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Sadakane K, Yoshino S, Yoshikawa T, Morita M. Diesel exhaust particles enhance lung injury related to bacterial endotoxin through expression of proinflammatory cytokines, chemokines, and intercellular adhesion molecule-1. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 May 1;165(9):1329-35.
- Takayama N, Iwamoto N, Sumi D, Shinkai Y, Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Kumagai Y. Peroxiredoxin 6 is a molecular target for 1,2-naphthoquinone, an atmospheric electrophile, in human pulmonary epithelial A549 cells. *J Toxicol Sci*. 2011;36(6):817-21.
- Teles AM, Kumagai Y, Brain SD, Teixeira SA, Varriano AA, Barreto MA, de Lima WT, Antunes E, Muscará MN, Costa SK. Involvement of sensory nerves and TRPV1 receptors in the rat airway inflammatory response to two environment pollutants: diesel exhaust particles (DEP) and 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ). *Arch Toxicol*. 2010;84(2):109-17. Erratum in: *Arch Toxicol*. 2010;84(2):119.
- Terada T, Matsumura M, Abe A, Morita Y, Adachi H, Nanjo H. Irreversible inactivation of glutathione S-transferase- π by a low concentration of naphthoquinones. *Redox Rep*. 1995 Feb;1(2):125-30.

- Thornalley PJ, Doherty MD, Smith MT, Bannister JV, Cohen GM. The formation of active oxygen species following activation of 1-naphthol, 1,2- and 1,4-naphthoquinone by rat liver microsomes. *Chem Biol Interact.* 1984 Feb;48(2):195-206.
- Toyama T, Shinkai Y, Yazawa A, Kakehashi H, Kaji T, Kumagai Y. Glutathione-mediated reversibility of covalent modification of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 by 1,2-naphthoquinone through Cys152, but not Lys4. *Chem Biol Interact.* 2014 May 5;214:41-8.
- Trevisani M, Siemens J, Materazzi S, Bautista DM, Nassini R, Campi B, Imamachi N, André E, Patacchini R, Cottrell GS, Gatti R, Basbaum AI, Bunnett NW, Julius D, Geppetti P. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(33):13519-24.
- Troester MA, Lindstrom AB, Waidyanatha S, Kupper LL, Rappaport SM. Stability of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene oxide, 1,2-naphthoquinone, and 1,4-naphthoquinone. *Toxicol Sci.* 2002 Aug;68(2):314-21.
- Uzoigwe JC, Prum T, Bresnahan E, Garelnabi M. The emerging role of outdoor and indoor air pollution in cardiovascular disease. *N Am J Med Sci.* 2013 Aug;5(8):445-53. doi: 10.4103/1947-2714.117290. Review.
- Varga JM, Neujahr HY. The effect of 1,2-naphthoquinone on catechol 1,2-oxygenase from *Trichosporon cutaneum*. *Acta Chem Scand.* 1972;26(2):509-12.
- Vennekens R. Emerging concepts for the role of TRP channels in the cardiovascular system. *J Physiol.* 2011 Apr 1;589(Pt 7):1527-34.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol.* 2009 Jun;75(6):1262-79.
- Wages PA, Lavrich KS, Zhang Z, Cheng WY, Corteselli E, Gold A, Bromberg P, Simmons SO, Samet JM. Protein Sulfenylation: A Novel Readout of Environmental Oxidant Stress. *Chem Res Toxicol.* 2015 Dec 21;28(12):2411-8.
- Waidyanatha S, Troester MA, Lindstrom AB, Rappaport SM. Measurement of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone after administration of naphthalene to F344 rats. *Chem Biol Interact.* 2002 Oct 20;141(3):189-210.
- Waidyanatha S, Zheng Y, Serdar B, Rappaport SM. Albumin adducts of naphthalene metabolites as biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004 Jan;13(1):117-24.
- Wang L, Wang DH. TRPV1 gene knockout impairs postischemic recovery in isolated perfused heart in mice. *Circulation* 112(23):3617-3623, 2005.
- Wang YY, Chang RB, Waters HN, McKemy DD, Liman ER. The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions. *J Biol Chem.* 2008 Nov 21;283(47):32691-703.
- Watanabe H, Murakami M, Ohba T, Takahashi Y, Ito H. TRP channel and cardiovascular disease. *Pharmacol Ther* 118(3):337-51, 2008.
- Weichenthal S, Dufresne A, Infante-Rivard C, Joseph L. Indoor ultrafine particle exposures and home heating systems: a cross-sectional survey of Canadian homes during the winter months. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2007 May;17(3):288-97.

- WHO – World Health Organization: Ambient air pollution: A global assessment of exposure and burden of disease. Ed. World Health Organization, 2016. ISBN: 9789241511353.
- Wu QF, Qian C, Zhao N, Dong Q, Li J, Wang BB, Chen L, Yu L, Han B, Du YM, Liao YH. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 involves in hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes. *Cell Death Dis.* 2017 May 25;8(5):e2828.
- Wilson AS, Davis CD, Williams DP, Buckpitt AR, Pirmohamed M, Park BK. Characterisation of the toxic metabolite(s) of naphthalene. *Toxicology.* 1996 Dec 18;114(3):233-42.
- Yang D, Luo Z, Ma S, Wong WT, Ma L, Zhong J, He H, Zhao Z, Cao T, Yan Z, Liu D, Arendshorst WJ, Huang Y, Tepel M, Zhu Z. Activation of TRPV1 by dietary capsaicin improves endothelium-dependent vasorelaxation and prevents hypertension. *Cell Metab* 12(2):130-141, 2010.
- Yang L, Katchman A, Kushner JS, Kushnir A, Zakharov SI, Chen BX, Shuja Z, Subramanyam P, Liu G, Papa A, Roybal DD, Pitt GS, Colecraft HM, Marx SO. Cardiac CaV1.2 channels require β subunits for β -adrenergic-mediated modulation but not trafficking. *J Clin Invest.* 2018 Nov 13. pii: 123878.
- Yang S, Jan YH, Gray JP, Mishin V, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Sepiapterin reductase mediates chemical redox cycling in lung epithelial cells. *J Biol Chem.* 2013 Jun 28;288(26):19221-37.
- Yang XR, Lin MJ, Sham JS. Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol.* 2010; 661:109-22.
- Ying Z, Xu X, Bai Y, Zhong J, Chen M, Liang Y, Zhao J, Liu D, Morishita M, Sun Q, Spino C, Brook RD, Harkema JR, Rajagopalan S. Long-term exposure to concentrated ambient PM2.5 increases mouse blood pressure through abnormal activation of the sympathetic nervous system: a role for hypothalamic inflammation. *Environ Health Perspect.* 2014 Jan;122(1):79-86.
- Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308(3):H157-H182, 2015.
- Zheng J, Cho M, Jones AD, Hammock BD. Evidence of quinone metabolites of naphthalene covalently bound to sulfur nucleophiles of proteins of murine Clara cells after exposure to naphthalene. *Chem Res Toxicol.* 1997 Sep;10(9):1008-14.
- Zhong B, Wang DH. TRPV1 gene knockout impairs preconditioning protection against myocardial injury in isolated perfused hearts in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3):H1791-H1798, 2007.
- Zurborg S, Yurgionas B, Jira JA, Caspani O, Heppenstall PA. Direct activation of the ion channel TRPA1 by Ca²⁺. *Nat Neurosci.* 2007;10(3):277-9.