

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

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 b-adrenérgico, sendo este revertido pelo bloqueio de receptores b₁. Na artéria mesentérica (AM) ou pulmonar (AP) de camundongos selvagens, a 1,2-NQ causou vasoconstricção dependente de concentração, 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 (pD₂) 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 (pD₂) 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, β₂ e β₃, mas não de canais/proteínas envolvidas na homeostase do Ca²⁺ (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 (PD₂) 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 b₁ 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.

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 - CICPAA, 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 CICPAA 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).

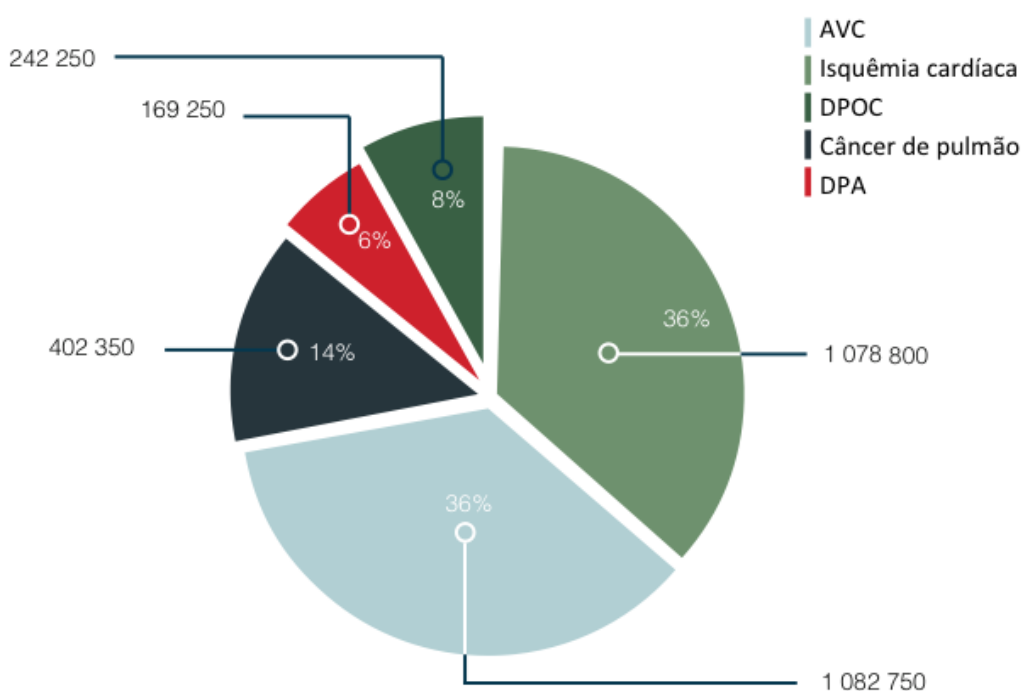


Figura 1 – Mortes atribuídas à exposição inalatória da poluição ambiental no ano de 2012, publicado pela OMS em 2016. AVC: acidente vascular encefálico, DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica e DPA: doença pulmonar aguda. (Adaptado de WHO – Ambient air pollution: A global assessment of exposure and 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, subseqüentemente, lesam os tecidos (Bolton et al., 2000; Kumagai, Shimojo, 2002; Endo et al., 2007; Saeed et al., 2007) (Figura 2).

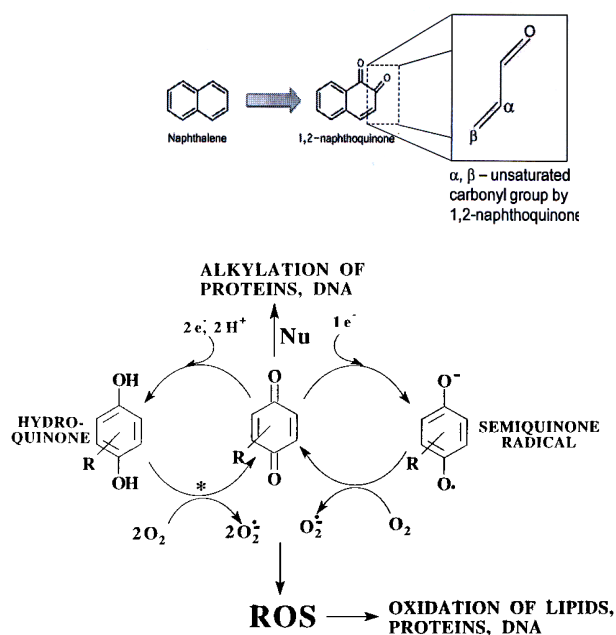


Figura 2 – Naftaleno a seu derivado 1,2-naftoquinona. Alquilação e ciclo redox na geração de semiquinonas e espécies reativas de oxigênio. A 1,2-NQ é gerada via metabolismo de auto-oxidação e/ou enzimaticamente via ação da citocromo p450 ou GSH (adaptado de Bolton et al., 2000).

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 glutathiona, 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 μM) 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 μM). 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 conseqüentemente 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).

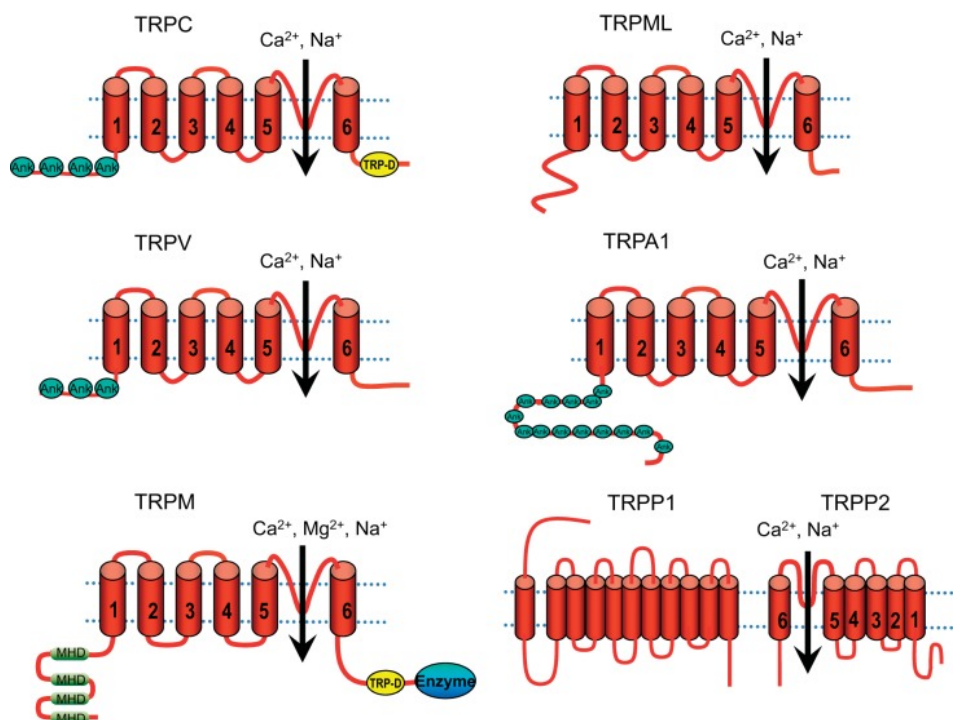


Figura 3 – Estrutura dos canais TRP. Os canais TRP contêm 6 segmentos transmembranares (S1 a S6) com um poro (P) entre os domínios S5 e S6. As porções amino (NH₂-) e carboxi (COOH-) terminais são variáveis e contêm diferentes arranjos de domínios. Adaptado: Yue et al., 2015.

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).

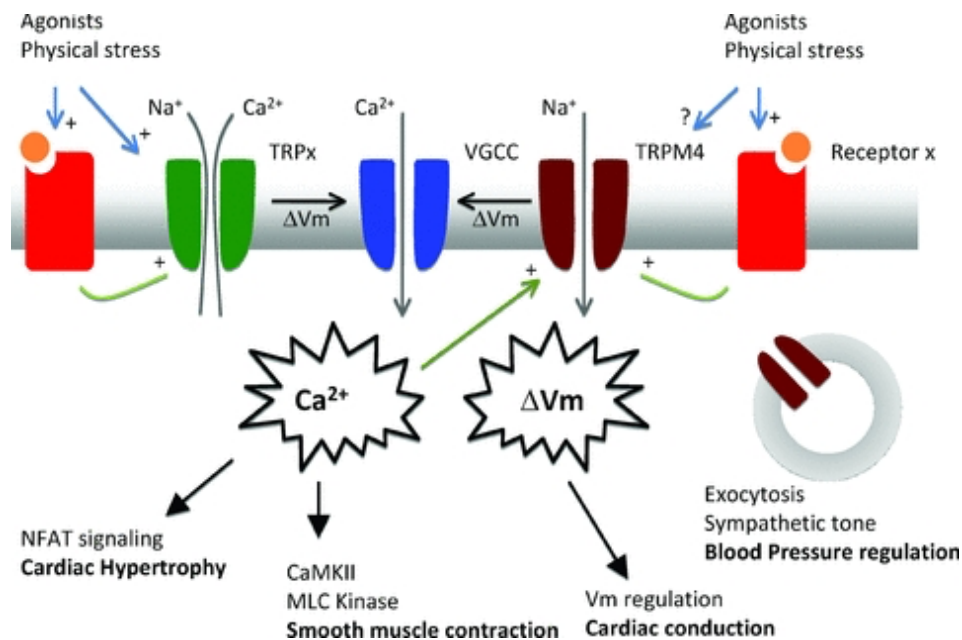


Figura 4 – Fatores ativadores de canais TRP no músculo cardíaco. Os canais TRP podem ser ativados diretamente por agonistas ou indiretamente através de receptores acoplados à proteína G. O influxo de Ca^{2+} a sinalização intracelular e através de fatores como NFAT levam ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, sem alterar a concentração de transitória Ca^{2+} durante o ciclo cardíaco normal. Influxo de Ca^{2+} através de ambos os canais TRP ou canal de Ca^{2+} -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 $\text{IK}_{\text{Ca}}/\text{K}_{\text{Ca}3.1}$).

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 $\beta 1$ 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.

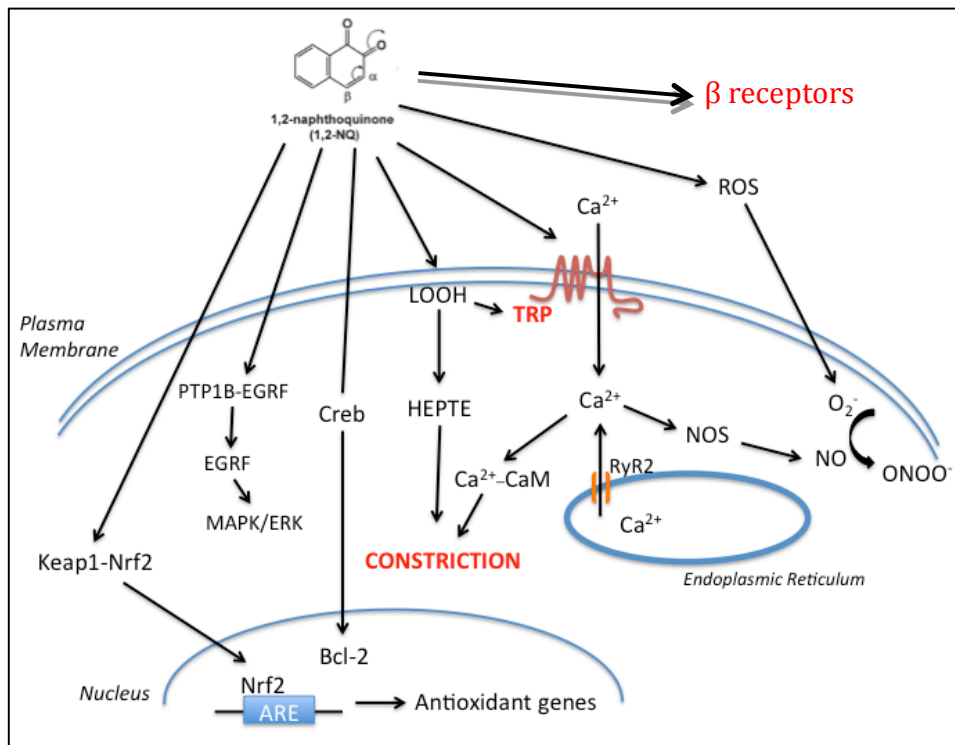


Figura 26 – Esquema ilustrativo dos possíveis mecanismos/vias pelo qual a 1,2-NQ pode promover sobre uma célula de músculo liso vascular. Diversos fatores de transcrição e segundo mensageiros podem ser ativados pela 1,2-NQ de maneira direta ou indiretamente. Fonte: Soares (2018).

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.