

Juliano Fernandes de Oliveira

Avaliação das funções erétil e vascular de ratos com
inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental
liberado na exaustão do diesel

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2010

Juliano Fernandes de Oliveira

Avaliação das funções erétil e vascular de ratos com
inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental
liberado na exaustão do diesel

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador (a):
Prof.^a Dr.^a Soraia Kátia Pereira Costa

São Paulo
2010

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

reprodução não autorizada pelo autor

Oliveira, Juliano Fernandes.

Avaliação das funções erétil e vascular de rato com inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental liberado na exaustão do diesel / Juliano Fernandes Oliveira. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Soraia Katia Pereira Costa.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Disfunção vascular (inflamação).

Versão do título para o inglês: Evaluation of erectile and vascular functions in rat with lung inflammation evoked by exposure to diesel exhaust particles.

Descritores: 1. Partículas de exaustão do diesel 2. Corpo cavernoso 3. Aorta 4. 1,2-naftoquinona 5. Inflamação pulmonar 6. Espécies reativas de oxigênio (ERO) I. Costa, Soraia Katia Pereira II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB066/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato (a): Juliano Fernandes de Oliveira

TÍTULO DA TESE: Avaliação das funções erétil e vascular de ratos com inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental liberado na exaustão do diesel.

Orientador (a): Soraia Katia Pereira Costa

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Tese de Doutorado**, em sessão pública realizada a//, considerou o candidato:

Aprovado(a) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:.....

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

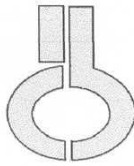
Nome:

Instituição:.....

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **127** nas fls. **21** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do(a) Prof.(a) Dr.(a) Soraia Kátia P. Costa, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Efeitos e consequências de toxinas animais e substâncias tóxicas ou irritantes sobre as respostas neurovasculares em roedores**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Aila Mirtes Teles, Juliano Fernandes de Oliveira, Lídia Mitiko Yshii, Mônica Magalhães C. Dantas, Lívia de Lucca Camargo, Juliana Florenzano e o pesquisador Marcelo N. Muscará**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **24.10.2005**.

São Paulo, 08 de novembro de 2005.

P/

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Dedico este trabalho ao meu filho Guilherme:

Por ficar me esperando para brincar...

Que o Criador lhe proteja sempre!

Papai.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a *Iahweh Deus* por ter me feito à sua imagem e semelhança (Gen 1:26-27).

À minha Família por ir “Tocando em frente” – Créditos Almir Sater & Renato Teixeira.

À Professora Soraia K. P. Costa, pela dedicação e apoio em todas as etapas deste trabalho. Agradeço pela confiança e credibilidade que me fortaleceu neste tempo de convivência e por transmitir sempre seriedade em momentos preocupantes e de incerteza.

Ao Mestre Dr. Ricardo Martins de Oliveira Filho:

Um alento

Em tão fraudulento mundo,

Um sopro de prazer

Ao mestre que não permite seu próprio repouso:

Um dia um menino atirou uma pedra num rio...(13/06/2006 - 01. 19'. 45'').

Sou grato aos Professores *Marcelo Nicolás Muscará*, *Wothan Tavares de Lima* e *Pedro Fernandes Lara* pelas sábias contribuições científicas e por cederem o laboratório e equipamentos, sem restrição.

Agradeço a *Dra. Simone*, *Dr. Dayson*, *Sra. Alice*, *Sra. Zilma*, *Irene*, *Marcão André Alves* e *Maneco* pelos préstimos diários. À *Selma Rigonati* e *Julieta* por tão zelosa compreensão aos meus pedidos.

Aos amigos que ficarão para sempre: Fernando Coelho, Paula Campi, Denadai, Bia, Alexandre Learts, Ana Alice, Simoninha, André, Ana Paula Ligeiro, Adriana Lino, Carly, Labat, Dr. Sócrates, Luciano, Dr. Enilton, Dra. Aila, Juliana Florenzano, Ekundi, Karen, Leandro.

Meu reconhecimento às *Profas. Lia*, *Maria Helena*, *Zuleica*, *Rosana*, *Lúcia*, *Dorothy*, *Sandra Farsky*, *Profs. “Toninho”*, *Rodrigo Martins*, *Moacir*, *Cristóforo*, *Bóris* e *Belizário*.

Ao *Prof. Edson Antunes* por estar presente mais uma vez em meu trabalho; *Dr. Mário (Marinho)*; *Profa. Sisi e André (UNICAMP)* pelo apoio.

Profa. Primavera Borelli e Karina Nakajima pela atenção especial na área hematológica. *Profa. Norma Yamanouye e Milena Kabbara (Butantan)* pela amizade.

Profa. Telma Zorn por permitir o labor, *Rodolfo Favaro* pela amizade incondicional.

À Eva, André e a todos do serviço de Biblioteca do ICB/USP pela ajuda na correção e confecção deste trabalho. Ao amigo Celso, seção de alunos.

Aos amigos do CRUSP/COSEAS: Carla, e em especial Joilson (pela perseverança em me apoiar e vigiar) Daniel (HISTÓRIA), Joel (FMVZUSP), e outros que ficaram pelo caminho. Aos amigos José Carlos e Édna Pereira, Amauri e Vânia De Grande, Sueli, Lidiane e Daniel Rosestolato. Ao amigo Vicente Guimarães pelo realinhamento.

Ao Seu João, Gino, Geraldo, Cirilo, Nilton Campos, Hélio e outros muitos outros companheiros por estenderem a mão.

A todos que de uma forma ou de outra em todos os âmbitos cooperaram, acreditaram e me ajudaram a concluir este trabalho, e que eu tenha me esquecido de supra citar.

Aos experientes Srs. João Reis, João Dangel, Josué, Lúcio, Lito, Raimundo e tantos outro/as, que dia após dia levam o amor, o verdadeiro amor, a tantos que necessitam nestes últimos tempos.

À minha querida Elda, Decrétese que nada estará obrigado ni prohibido. Todo será permitido, inclusive jugar con los rinocerontes y caminar por las tardes con una inmensa begonia en la solapa. Sólo una cosa queda prohibida: *amar sin amor*. Créditos: Os Estatutos do Homem - Artigo 12 *Thiago de Mello / Pablo Neruda*.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela aprovação dos Projetos Temáticos que propiciaram este trabalho.

Progresso do Evangelho (Epístola de Paulo aos Filipenses)

1 ¹²...

...²⁰Meu ardente desejo e minha esperança são que em nada serei confundido, mas que, hoje como sempre, Cristo será glorificado no meu corpo (tenho toda a certeza disto) quer pela minha *vida* quer pela minha *morte*. ²¹*Porque para mim o viver é Cristo e o morrer é lucro.*

²²Mas, se o viver no corpo é útil para o meu trabalho, não sei então o que devo preferir. ²³Sinto-me pressionado dos dois lados: por uma parte, desejaria *desprender-me* para estar com Cristo – o que seria imensamente melhor; ²⁴mas por outra parte, continuar a viver é mais necessário, por causa de vós... ²⁵Persuadido disto sei que ficarei e continuarei com todos vós, para proveito vosso e consolação da Vossa fé. Assim, minha volta para junto de vós vos dará um novo motivo de alegria em Cristo Jesus.

Bíblia Sagrada

RESUMO

OLIVEIRA, J. F. **Avaliação das funções erétil e vascular de ratos com inflamação pulmonar decorrente da exposição ao material particulado ambiental liberado na exaustão do diesel.** 2010. 93 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Este estudo se propôs a avaliar o potencial inflamatório das partículas eliminadas na exaustão do diesel (PED) e 1,2-naftoquinona (1,2-NQ) sobre outros compartimentos, como o músculo liso vascular (aorta torácica; RTA) e do corpo cavernoso isolados de ratos (RCC) e os mecanismos envolvidos via ensaios funcionais e bioquímicos. A injeção i.tr. das PED e 1,2-NQ em ratos Wistar causou inflamação e hiporreatividade das vias aéreas associados ao aumento significativo do relaxamento evocado pela ACh na RTA. No RCC desses mesmos animais, tanto o GTN quanto o estímulo elétrico (EFS) causou maior relaxamento. O conteúdo basal de TBARs na RTA e pulmão foi reduzido, embora outros testes indicadores de estresse oxidativo e / ou atividade antioxidante não mostraram diferenças entre os grupos. As taxas de expressão gênica / protéica da nNOS no RCC de ratos não diferiram do grupo controle, mas a expressão da eNOS e iNOS foi reduzida na RTA e RCC. Não foram quantificadas concentrações séricas do TNF α ou IL-1 β , sugerindo que os efeitos sistêmicos ocorrem independentemente destas citocinas. Conclui-se que o tratamento agudo de ratos com a mistura de poluentes induziu inflamação das vias aéreas (e hiporreatividade), capaz de afetar outros compartimentos, como a musculatura lisa vascular (RTA) e do RCC.

Palavras-chave: Partículas de exaustão do diesel. Corpo cavernoso. Aorta. 1,2-naftoquinona. Inflamação pulmonar. Espécies reativas de oxigênio (ERO).

ABSTRACT

OLIVEIRA, J. F. **Evaluation of erectile and vascular functions in rat with lung inflammation evoked by exposure to diesel exhaust particles.** 93 f. Ph. D. thesis. (Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

We tested the hypothesis that local inflammation in the airways evoked by intra-tracheal instillation of the environmental chemical 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) and diesel exhaust particles (DEP) is capable of targeting other systemic compartments, such as vessels (rat thoracic aorta; RTA) and corpus cavernosum (RCC), and possible involved mechanisms. After 3h, this treatment induced airways hyporesponsiveness to ACh and local inflammation. This effect was associated with decreased numbers of leukocyte in the blood and spleen and increased number of leukocytes in the bone marrow. Pollutant treatment also markedly increased ACh-induced relaxation in RTA and by both GTN- and electrical stimulation-induced relaxation in RCC. Exposure to pollutants did not affect FE-induced contraction in RTA. Neither serum levels of cytokines (TNF α e IL-1 β) nor basal concentration of total nitrate were different amongst groups. No evidence of increased catalase activity in RTA, RCC and lung was found. The treatment reduced the eNOS e iNOS gene expression in RTA e RCC, without significantly affecting the nNOS gene expression in RCC. Our results are consistent with the hypothesis that DEP-induced airways hyporesponsiveness and inflammation can account to produce systemic changes, such as structural and functional changes in the RTA and RCC by means of substances derived from endothelium or due to the ability of these pollutants to act to stimulate *de novo* the production of scavenger of free radical.

Key Words: Diesel exhaust particles. Cavernosum corpus. Aorta. 1,2-naphthoquinone. Lung inflammation. Reactive oxygen species (ROS).

LISTA DE ABREVIATURAS

1,2-NQ	1,2-naftoquinona
μM	Micromolar
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
BH ₄	Tetrahidrobiopterina
CaM	Calmodulina
CC-R	Curva concentração-resposta
DE	Disfunção erétil
DMSO	dimetil sulfóxido
EDHF	fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	fator de relaxamento derivado do endotélio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	estimulação elétrica
E_{max}	resposta máxima
Enos	sintase endotelial de óxido nítrico
EPM	erro padrão da média
EPO	Eritroblasto policromático
EOC	Eritroblasto ortocromático
ERNs	espécies reativas do nitrogênio
EROS	espécies reativas do oxigênio
FE	Fenilefrina
g.	Gramas
GCs	guanilato ciclase solúvel
GMPc	monofosfato 3',5'-cíclico de guanosina
GTN	trinitrato de glicerila
GTP	trifosfato de guanosina
Hz	Hertz
IFN- γ	Interferon- γ

IL	Interleucina
iNOS	sintase induzível de óxido nítrico
i.p.	Intraperitonal
i.tr.	Intratraqueal
IP ₃	inositol-1,4,5-trifosfato
KCl	cloreto de potássio
LBA	Lavadobroncoalveolar
L-arg	L-arginina
L-NAME	N ^o -nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo
MCh	Metacolina
MPO	Mieloperoxidase
MCP-1	Proteína-1 quimiotática de macrófago/monócito
Mm	Milímetros
mmHg	Milímetro de mercúrio
mM	Milimolar
mN	MiliNewton
MP	material particulado
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NANC	Sistema não-adrenérgico não-colinérgico
NK ₁	receptor de neurocinina tipo 1
NK ₂	receptor de neurocinina tipo 2
NK ₃	receptor de neurocinina tipo 3
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
nNOS	sintase neuronal de óxido nítrico
NO	Óxido nítrico
NOS	sintase de óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4] oxadiazol [4,3,-a]quinoxalin-1-ona
PBS	tampão fosfato salina
pD ₂	log negativo para as concentrações dos agonistas produzirem 50% da E _{max}

PDE5	Fosfodiesterase-5
Pg	Picograma
PED	Partículas de exaustão do diesel
RCC	Corpo cavernoso de rato
RTA	aorta torácica de rato
s.c.	subcutânea
TNF- α	fator de necrose tumoral- α

LISTA DE DROGAS E REAGENTES

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
1,2-Naftoquinona	Prof. Dr. Yoshito Kumagai (Departamento de Medicina do Meio Ambiente, Universidade de Tsukuba, Japão).
Acetilcolina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
ácido acético 30 %	Nova Analítica, SP – Brasil
ácido clorídrico	Mallinckrodt Chem. SP – Brasil
ácido tricloroacético	Synth; SP – Brasil
CaCl ₂	Mallinckrodt Chem. Paris, França
Carbôgênio	White Martins; SP – Brasil
Cloridrato de acetil - β -metacolina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
DEP	Prof. Dr. Yoshito Kumagai (Departamento de Medicina do Meio Ambiente, Universidade de Tsukuba, Japão).
DMSO	Universal Herbs Inc.
D-Glicose Anidra	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
EDTA	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
FAD	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Fenilefrina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Heparina Sódica	Hipolabor; MG – Brasil
HCl	Chemco (Campinas, Brasil)
Indometacina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
KCl	Synth; SP – Brasil
Ketamina	VetBrands; SP – Brasil
KH ₂ PO ₄	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
lactato desidrogenase	Calbiochem, EUA
May-Grünwald-Giemsa	Merck (Darmstadt, Germany)
MgSO ₄	Synth; SP – Brasil
NaCl	Mallinckrodt Chem. (Paris, França)

NADPH	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
NaHCO ₃	Merck (Rio de Janeiro, Brasil)
Piruvato	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Reagente de Griess	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
RPMI1640	Gibcol BRL (Califórnia EUA)
Tween 80	Sigma Chemical Co. (St. Louis, EUA)
Xilazina	VetBrands; SP – Brasil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Cortes longitudinais de artéria e veia.	23
Figura 2.	Anatomia e mecanismo da tumescência peniana	24
Figura 3.	Classificação aerodinâmica do diâmetro do MP.	29
Figura 4.	Desenho esquemático do tratamento com os poluentes e protocolos experimentais.	34
Figura 5.	Efeito da instilação i.tr. de poluentes (PED + 1,2-NQ) no recrutamento de leucócitos no pulmão.	45
Figura 6.	Efeito da instilação i.tr. de poluentes (PED + 1,2-NQ) sobre a série vermelha e branca no sangue periférico.	47
Figura 7.	Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre a celularidade da medula óssea.	49
Figura 8.	Efeito da instilação i.tr. dos poluentes sobre o esplenograma.	50
Figura 9.	Efeitos da instilação i.tr. da mistura PED e 1,2-NQ sobre as contrações evocadas pela metacolina em traquéia e brônquio principal de ratos.	52
Figura 10.	Efeitos da injeção i.tr. da mistura PED e 1,2-NQ sobre a CC-R evocada pela fenilefrina em aorta torácica e corpo cavernoso de ratos.	54
Figura 11.	Curva concentração-resposta induzida pela ACh em aorta de animais tratados com os poluentes ou seu respectivo veículo.	56
	<i>Typical Trace</i> - Curva concentração-resposta induzida pela ACh em aorta de animais tratados com os poluentes ou seu respectivo veículo.	57
Figura 12.	Curva concentração-resposta induzida pelo GTN em aorta e corpo cavernoso de ratos expostos aos poluentes e veículo dos poluentes.	59
Figura 13.	Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre os relaxamentos ou contrações induzidos pela EFS em corpo cavernoso de rato.	61
Figura 14.	Latência da resposta obtida com a estimulação elétrica em corpo cavernoso de ratos expostos aos poluentes	62
Figura 15.	Efeito dos poluentes sobre a latência da resposta no corpo cavernoso de ratos estimulados eletricamente	63
Figura 16.	Concentração de nitratos totais (NO _x) em plasma de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes.	65

Figura 17.	Concentração de TBARS em amostras de tecidos / órgãos de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes.	67
Figura 18.	Concentração de catalase em amostras de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes.	68
Figura 19.	Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre as taxas de expressão gênica da eNOS e iNOS em aorta de ratos.	70
Figura 20.	Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre as taxas de expressão da eNOS, iNOS e nNOS em corpo cavernoso de ratos.	71
Figura 21.	Avaliação de expressão protéica da isoforma da nNOS (Western Blot) no tecido cavernoso de animais veículo e tratado com poluentes.	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Caracterização dos estágios envolvidos no processo de ereção e detumescência	25
Tabela 2 -	Lista dos primers utilizados nos ensaios de qPCR	42
Tabela 3 -	Efeito da instilação i.tr. de poluentes sobre o relaxamento de corpo cavernoso de rato induzidos por EFS	64
Tabela 4 -	Produção de TBARS em amostras de órgãos de ratos tratados com o veículo ou a mistura dos poluentes	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	Sistema circulatório e função erétil.....	22
1.2	Poluição atmosférica e o impacto sobre a economia e saúde.....	27
2	OBJETIVO E HIPÓTESE INICIAL.....	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1	Animais.....	33
3.2	Administração intra-traqueal dos poluentes PED e 1,2-NQ em ratos.....	33
3.3	Avaliação dos parâmetros da resposta inflamatória.....	34
3.3.1	Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), preparo e quantificação celular.....	34
3.3.2	Obtenção do sangue periférico, preparo e quantificação celular.....	35
3.3.3	Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular.....	35
3.3.4	Obtenção do baço, preparo e quantificação celular.....	36
3.4	Avaliação dos parâmetros funcionais.....	36
3.4.1	Medida da reatividade de anéis de traquéia e brônquio principal.....	36
3.4.2	Medida da reatividade vascular de anéis de aorta (ascendente).....	37
3.4.3	Medida funcional do tecido cavernoso isolado.....	37
3.5	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	38
3.5.1	Determinação de nitratos totais (NOx -).....	38
3.5.2	Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs).....	38
3.5.3	Mensuração de conteúdos de catalase nos tecidos.....	39
3.5.4	Análise da Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR).....	40
3.5.5	Avaliação de expressão protéica por Western Blot.....	42
3.5.6	Determinação de citocinas no plasma.....	43
3.6	Obtenção e preparo dos poluentes.....	44
3.7	Cálculos e análise estatística.....	44
4	RESULTADOS.....	45
4.1	Parâmetros inflamatórios.....	45
4.1.1	Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão.....	45

4.1.2	Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre a população de células das séries vermelha (eritrograma) e branca (leucograma) no sangue periférico.....	46
4.1.3	Efeito dos poluentes sobre a população de leucócitos na medula óssea e baço.....	48
4.2	Parâmetros funcionais.....	51
4.2.1	Efeito dos poluentes sobre a reatividade em traquéia e brônquio principal de ratos.....	51
4.2.2	Curva concentração-resposta evocada pela fenilefrina (FE) na aorta e corpo cavernoso de ratos expostos aos poluentes.....	53
4.2.3	Curva concentração-resposta (relaxamento) evocada pela acetilcolina (ACh) na aorta de ratos expostos aos poluentes.....	55
4.2.4	Efeitos da exposição aos poluentes sobre a resposta induzida pelo doador de NO, trinitrato de glicerila (GTN), em aorta e corpo cavernoso de ratos.....	58
4.2.5	Efeito da exposição aos poluentes sobre a estimulação elétrica em corpo cavernoso.....	60
4.3	Parâmetros bioquímicos.....	65
4.3.1	Concentração de nitrato total (NOX-) no plasma de ratos expostos aos poluentes.....	65
4.3.2	Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) em diferentes tecidos.....	66
4.3.3	Determinação da concentração de catalase em diferentes tecidos.....	68
4.3.4	Efeito da exposição de ratos aos poluentes sobre a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) das isoformas de NOS na aorta e corpo cavernoso.....	69
4.3.5	Avaliação de expressão protéica da nNOS (via Western Blot) no corpo cavernoso.....	72
4.3.6	Avaliação da concentração de citocinas no plasma.....	73
5	DISCUSSÃO.....	74
6	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema circulatório e função erétil

O sistema circulatório é composto de sangue, coração e vasos sanguíneos, que compreendem as artérias, veias e os capilares. O coração bombeia o sangue, enquanto o sistema vascular é responsável pelo transporte do mesmo.

Dentre as principais funções desse sistema, incluem-se a de realizar a circulação sanguínea e de conduzir elementos essenciais (ex.: transporte de O₂ e hormônios para as células, a condução de CO₂, controle de doenças e da temperatura) para todos os tecidos do corpo.

As paredes das artérias compreendem três túnicas, dispostas concentricamente, do nível interno para o externo, da seguinte forma: i) *túnica interna*: formada pelo endotélio, que possui contato direto com o sangue circulante; ii) *túnica média*: compreende fibras musculares e elásticas, as quais conferem à artéria a propriedade de dilatar-se ou contrair-se, conforme o estímulo; e, iii) *túnica externa* ou *adventia*: contem tecido conjuntivo e terminações nervosas, que, quando estimuladas, promovem respostas arteriolares como vasoconstrição ou vasodilatação. As veias possuem uma estrutura análoga às artérias, porém a parede das veias é mais delgada e contem poucas fibras musculares e elásticas (Figura 1). Isto explica, portanto, algumas funções distintas entre as veias e as artérias.

Na vigência do fluxo sanguíneo, as artérias imediatamente dilatam-se e, em seguida, contraem-se para ejetar o volume de sangue para a periferia do corpo. As veias, ao contrário, recebem o sangue depois que esse percorreu os capilares. Quanto maior o diâmetro de um vaso, menor será a velocidade do sangue para que um mesmo fluxo ocorra através desse vaso (SHEPHERD e VANHOUTTE, 1979).

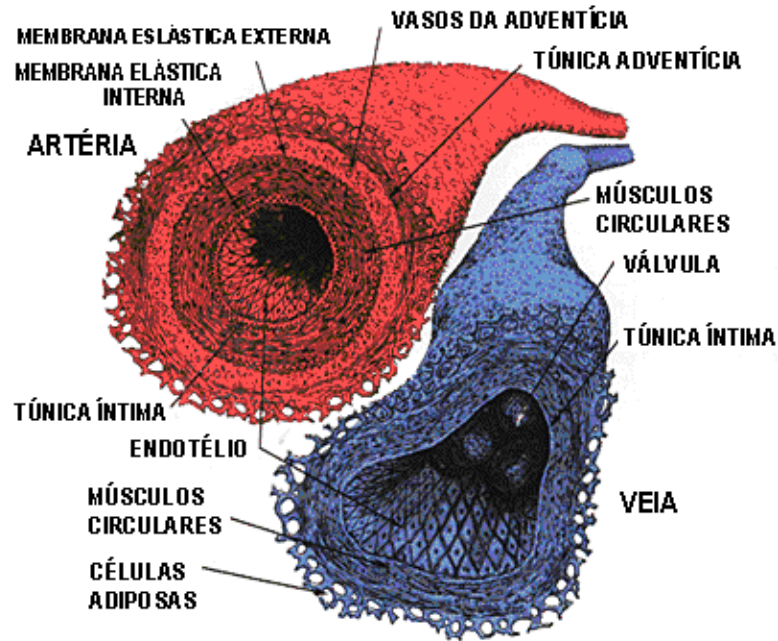


Figura 1. Cortes longitudinais de artéria e veia, mostrando as principais estruturas da parede.
 Fonte: Adaptado de Shepherd e Vanhoutte (1979).

Neste contexto, é interessante ressaltar que a função erétil sofre grande influência da integridade do sistema vascular, pois algumas disfunções vasculares tais como aterosclerose ou mesmo trauma podem comprometer o mecanismo da ereção. A disfunção erétil (DE) é um marcador precoce de aterosclerose sistêmica (SCHWARTZ e KLONER, 2009).

O órgão sexual masculino humano, assim como em outras espécies de mamíferos, consiste de três segmentos cilíndricos (Figura 2): os corpos cavernosos na parte dorsal e o corpo esponjoso na parte ventral, que circunda a uretra e forma a glândula peniana na porção distal (SACHS e MEISEL, 1980). Os corpos cavernosos são circundados pela túnica albugínea (fibras de colágeno e algumas fibras de elastina; SATTAR et al., 1994). O tecido erétil dos corpos cavernosos é composto de múltiplos espaços lacunares interconectados, revestidos por células endoteliais (GOLDSTEIN et al., 1982; KRANE et al., 1989). A glândula peniana apresenta uma aparência de esponja devido a um vasto plexo venoso com um grande número de anastomoses.

A ereção peniana é um evento neurovascular modulado por fatores fisiológicos, psicológicos e hormonais, cujo resultado final é o relaxamento da musculatura lisa peniana. (ANDERSSON, 2001; ANDERSSON e HEDLUND, 2002; THOMAS, 2002). Assim, durante o estímulo sexual, impulsos nervosos promovem a liberação de

neurotransmissores dos terminais nervosos do tecido cavernoso bem como de fatores relaxantes derivados do endotélio, levando ao aumento do fluxo sanguíneo local. Paralelamente, o relaxamento do músculo liso trabecular promove a expansão dos espaços sinusoidais do corpo cavernoso e, assim, os plexos venosos da subtúnica são comprimidos entre a trabécula e a túnica albugínea, causando o bloqueio, praticamente, total do retorno venoso e aumento concomitante da pressão intracavernosa, promovendo o fenômeno da ereção completa (FOURNIER et al., 1987).

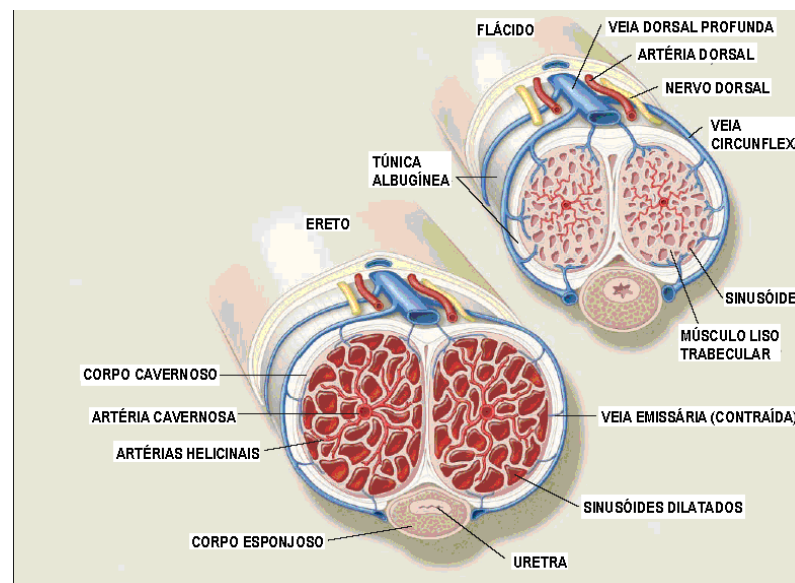


Figura 2. Anatomia e mecanismo da ereção peniana.

Fonte: Adaptado de Fazio e Brock (2004).

A inervação do tecido cavernoso compreende o sistema nervoso autônomo SNA (adrenérgico e colinérgico) e o sistema não adrenérgico e não colinérgico (NANC; LUE, 2000, ANDERSSON, 2001). Os processos de ereção e detumescência envolvem mecanismos mediados pelo SNA e subseqüentes alterações no fluxo sanguíneo local, podendo ser divididos em 7 fases (THOMAS, 2002; NEVES et al., 2004; Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos estágios envolvidos no processo de ereção e detumescência. SNA: Sistema Nervoso Autônomo; S: simpático; PS: parassimpático; PIC: pressão intracavernosa.

Fases	Respostas	Mecanismos
0	Flácida	SNA - (S)
1	Latente ou de preenchimento	Após estímulo sexual - ↓ (S) e ↑ (PS)
2	Tumescência	Discreto ↑ fluxo sanguíneo local
3	Ereção completa	Crescente ↑ fluxo sanguíneo local
4	Ereção rígida	Preenchimento total dos sinusóides
5	Fase de transição	Ativação do SNA (S; estado inicial)
6	Detumescência inicial	Início da redução da PIC
7	Detumescência rápida	↓ da PIC / inativação dos mecanismos veno-oclusivos

Fonte: Adaptada de Thomas (2002) e Neves et al. (2004).

Está bem estabelecido que o relaxamento em vasos isolados (ex.: aorta) frente a estímulos, tais como a acetilcolina (ACh) ocorre somente na vigência de endotélio íntegro, via geração do óxido nítrico (NO; IGNARRO et al., 1988). No endotélio (e outros tipos celulares), o NO é sintetizado pela conversão da L-arginina em L-citrulina mediante ação das enzimas sintases de óxido nítrico (NOS), também conhecidas como NOS I, II e III. As isoformas NOS-I e NOS-III são enzimas constitutivas, enquanto a NOS II é induzível. As isoformas constitutivas estão presentes em neurônios (NOS I ou nNOS) e células endoteliais (NOS III ou eNOS) e são reguladas pelo complexo Ca^{2+} /calmodulina (CaM). A NOS II (iNOS), independente de Ca^{2+} , atua como principal efetor da atividade antiproliferativa induzida por macrófagos ativados.

No tecido cavernoso a remoção do endotélio sinusoidal não previne os efeitos relaxantes, indicando que nessa estrutura o endotélio funciona apenas como uma fonte auxiliar de NO (IGNARRO et al., 1990; KIM et al., 1993). Por seu turno, este não possui nenhuma outra atividade conhecida no endotélio do corpo cavernoso, embora possua um papel importante na ativação da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) presente em células musculares lisas, levando assim ao aumento da Guanilato monofosfato cíclico (GMPc), a partir do trifosfato de guanosina (GTP; RAPOPORT e MURAD, 1983; LUCAS et al., 2000). O GMPc promove uma série de eventos que culmina com a redução dos níveis de cálcio intracelular, promovendo o relaxamento da musculatura lisa e consequente vasodilatação.

Associado ao papel do NO, postula-se que a manutenção da função de relaxamento peniano é regulada por neuropeptídeos liberados de fibras NANC, incluindo o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) e o peptídeo vasodilatador

relacionado ao gene da calcitonina (CGRP; BIVALACQUA et al., 2001). De fato, Champion et al. (1997) demonstraram que a ereção peniana induzida pelo CGRP em gatos ocorre independentemente do NO (ou da ativação dos canais de K^+ dependentes de ATP), confirmando uma via alternativa para a ereção peniana. Ao contrário, o neuropeptídeo Y (NPY) destaca-se como um dos mediadores envolvidos no mecanismo antierétil (ANDERSSON, 2000).

É interessante ressaltar que segundo uma projeção mundial da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999), em torno de 322 milhões de homens apresentarão algum tipo de distúrbio erétil até o ano de 2025. Em Massachusetts (EUA), estima-se que 52% da população masculina, entre 40 e 70 anos de idade, apresentam graus variados de disfunção erétil (DE) (BASU e RYDER, 2004; SAFARINEJAD e HOSSEINI, 2004a,b). No Brasil, na população da mesma faixa etária, a percentagem de DE gira em torno de 48%, sendo que 12% desses casos são considerados graves, onde são recomendados a colocação de prótese peniana (SANTOS e VIEIRA, 1999).

A disfunção erétil (DE) é o termo médico mais comumente aceito que define a “incapacidade do homem em alcançar ou manter uma ereção (peniana) adequada para satisfação sexual”. De etiologia variada, a DE resulta de fatores físicos, psicológicos ou, muitas das vezes, da combinação de ambos. Sugere-se que 70% dos casos de DE são ocasionados por problemas psicológicos, enquanto os 30% restantes envolvem problemas orgânicos (NEVES et al., 2004).

Acrescenta-se que, similar ao fumo, a poluição do ar acelera o espessamento e endurecimento da parede arterial (aterosclerose; ARMANI et al., 2009; TIMOTHY et al., 2009) bem como contribui para o aumento de acidentes cardiovasculares e morte na população de grandes centros urbanos (BELL et al., 2006; BASU, 2009; BRUNEKREEF et al., 2009). Em parte, poluentes, tais como o material particulado eliminado na exaustão do diesel (PED), além de causar efeitos inflamatórios locais (TELES et al., 2007; VAN EEDEN e HOGG, 2002; CHEN e SCHWARTZ 2008) também promovem a geração de moléculas instáveis/reativas, que causam danos sistêmicos, especialmente nas artérias e vasos (TIMOTHY et al., 2009).

Estima-se que as cardiopatias, principais causas de morte na população de grandes centros urbanos, estão associadas ao alto teor de poluentes atmosféricos nessas cidades (MIRAGLIA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2006; BRUNEKREEF et al.,

2009). No entanto, as possíveis implicações para as disfunções em outros órgãos / sistemas, incluindo a DE, podem ser imensas, mas muito pouco conhecida.

1.2 Poluição atmosférica e o impacto sobre a economia e saúde

A terminologia poluição atmosférica pode ser definida como a emissão de resíduos sólidos, líquidos e gasosos em quantidade superior à capacidade de absorção do meio ambiente, que leva o ar a tornar-se prejudicial à saúde (TATTERSFIELD, 1996). Essa contaminação do ar pode ocorrer com uma ou mais substâncias produzidas naturalmente ou pelo homem. Ademais, a concentração dos poluentes no meio ambiente depende da quantidade emitida para a atmosfera, de suas interações físico-químicas, de sua absorção e das condições meteorológicas para a sua dispersão. Esses também sofrem influência cíclica, a qual pode ser diurna, diária, semanal ou sazonal.

Os poluentes atmosféricos podem ser classificados como primários e secundários: os primários são aqueles emitidos diretamente na atmosfera, tais como o dióxido de enxofre, alguns tipos de óxido de nitrogênio (NO_x), monóxido de carbono e material particulado (MP). Os secundários são os poluentes resultantes de reações químicas com outros poluentes ou gases atmosféricos, incluindo o ozônio e o óxido de nitrogênio (para revisão: BERNSTEIN et al., 2004). Os poluentes de ocorrência natural englobam as fuligens e gases provenientes de vulcões, incêndios em florestas e tempestades de areia. Já o poluente antropogênico é aquele eliminado na queima de combustível fóssil por indústrias, veículos automotores e usinas de geração de energia e, neste caso, atinge a atmosfera a partir de fontes estacionárias (chaminés de fábricas e indústrias, caldeiras, queima de lixo, fornos) e móveis (veículos automotores).

A associação entre os diferentes tipos de poluentes, mesmo em baixas concentrações, e em altas temperaturas é mais prejudicial à saúde (BECKER et al., 1996; BASU, 2009; TIMOTHY et al., 2009). Por exemplo, alguns dos efeitos tóxicos das PED são, em grande parte, advindos do efeito irritante de contaminantes químicos, incluindo as quinonas (DELFINO et al., 2002; CHO et al., 2004; KIKUNO et al., 2006). Essas substâncias e seus produtos de redução (ex. hidroquinona, semiquinonas) podem ser encontrados na natureza ou em MP suspenso no ar. Possuem particular interesse farmacológico e toxicológico, pois produzem, via mecanismos bem complexos, uma variedade de efeitos nocivos, como a citotoxicidade, apoptose, capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio e promovem ligações covalentes com macromoléculas dos

tecidos (O'BRIEN, 1991; CADENAS et al., 1992; CHO et al., 2004). Ainda, interferem com algumas reações enzimáticas, causando imunotoxicidade e carcinogênese (para revisão: MONKS e JONES, 2002).

A poluição ambiental constitui um dos maiores problemas da atualidade, cujo interesse para saúde pública é mundial; não apenas pela sua influência na mudança climática do mundo, mas também pela sua ação nociva sobre a saúde humana. Surpreendentemente, estima-se que em torno de 800.000 óbitos a cada ano serão atribuídas ao MP da poluição aérea mundial (OMS, 2002), secundariamente a infarto agudo do miocárdio (PETERS, 2001), arritmias (PETERS, 2000) ou falhas cardíacas (BROOK, 2004). Cabe ressaltar que na atmosfera da cidade de São Paulo e outras grandes cidades da América Latina (ex.: cidade do México, Santiago do Chile), o MP é considerado um dos poluentes mais comuns (BELL et al., 2006).

O MP é formado primariamente durante a combustão de produtos de combustível fóssil e, principalmente, pelas fábricas e veículos automotores movidos a diesel. Estima-se que 80% do MP encontrado na atmosfera originam-se da engenharia e exaustão da queima do óleo (fumaça negra) dos veículos automotores (RIEDIKER, 2007). De acordo com o diâmetro aerodinâmico, o MP pode ser classificado em PM₁₀ grosso ou bruto (<10 µm), PM_{2,5} fino (<2,5 µm) e nanopartículas ou ultrafinos (<1 µm) (Figura 3; DONALDSON et al., 2001). O MP possui grande superfície catalítica, capaz de adsorver várias substâncias químicas com alto teor tóxico e cancerígeno (ex.: cobre, enxofre, aldeídos, cálcio, e cromo; GARG, 2000). Essas e outras produzidas cataliticamente (ex.: espécies reativas) são co-transportadas para o pulmão, onde irão atuar sobre os diversos tipos celulares, como as células endoteliais e epiteliais (PEREIRA et al., 1995; RIEDIKER, 2007).

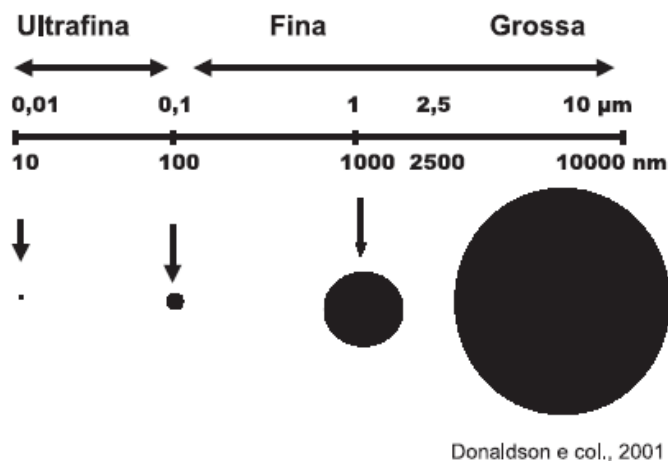


Figura 3. Classificação aerodinâmica do diâmetro do MP.
 Fonte: Donaldson et al. (2001).

Embora o risco associado à poluição atmosférica seja menor do que àqueles relacionados ao tabagismo, o impacto da poluição na saúde pública atenta para o fato de que esta é onipresente, ou seja, é involuntária tanto em ambientes externos como internos (POPE, 2000). Nesse sentido, pesquisadores brasileiros (MATSUMOTO et al., 2010) observaram que a exposição prolongada de camundongos ao ar livre da cidade de São Paulo resultou em vasoconstrição e aumento da expressão de receptores de endotelina A nas arteríolas pulmonares destes. Outro estudo importante, coordenado pelo Prof. Saldiva (Universidade de São Paulo), revela que o aumento da poluição atmosférica na cidade de São Paulo interfere no sexo de fetos humanos e de roedores, levando a uma maior geração de fêmeas (LICHTENFELS et al., 2007). Segundo os autores, é provável que os poluentes estejam interferindo na população de sêmen que carrega o cromossomo X e Y. Isto é de especial importância, pois entende-se que a poluição pode também determinar a taxa de natalidade por sexo de uma população.

Paralelamente, vários estudos epidemiológicos e poucos farmacológicos tentam demonstrar os mecanismos dos efeitos tóxicos produzidos por poluentes, incluindo das partículas eliminadas na queima do diesel (PED), na queima de óleo industrial (ROFA - residual oil fly ash) e de seus contaminantes. Segundo VERONESI et al., (2000) o MP formado na queima de óleo industrial (ROFA) causou neutrofilia no lavado broncoalveolar de camundongos, via VR1 receptor. Paralelamente, NEMMAR et al., (2003) demonstraram que a injeção intra-traqueal de PED, numa dose inferior a deste estudo, causou influxo de neutrófilos no pulmão de cobaias. Mais recentemente, resultados do nosso grupo mostraram que a co-injeção da suspensão de PED com um

dos seus contaminantes, a 1,2-NQ, intensificou o aumento de permeabilidade vascular (extravasamento plasmático) nas vias aéreas de ratos. Isto sugere que a 1,2-NQ influencia grandemente no efeito deletério das PED, via mecanismo dependente da ativação de receptores NK-1 de taquicininas (TELES et al., 2010). Corroborando nossos dados, outros autores observaram que a 1,2-NQ causa contração em traquéia isolada de cobaia via ativação de receptores vanilóides (TRPV1; KIKUNO et al., 2006). Ainda no nosso grupo, um recente estudo de SANTOS et al., (2009) demonstrou que a curta exposição de camundongos neonatos à 1,2-NQ promoveu maior susceptibilidade destes à inflamação alérgica pulmonar na idade adulta. Tais efeitos compreendem, pelo menos em parte, um desbalanço na biossíntese de citocinas Th1/Th2 e ativação de células dendríticas.

Cabe acrescentar que a inflamação pulmonar evocada pelo MP não depende exclusivamente do tamanho das partículas, mas também da concentração de dispersão das mesmas e das cargas positivas associadas a elas (HAMOIR et al., 2003). Assim, a possível translocação do MP das vias aéreas para a corrente sanguínea e, conseqüentemente, para outros alvos e tecidos pode ocorrer em graus variados, dependendo da concentração e contaminação desses. Nesse sentido, as PED são consideradas uma das principais vilãs no desencadeamento de reações inflamatórias e alérgicas, pois suas partículas finas e ultrafinas penetram mais facilmente pelas vias aéreas, alcançando os alvéolos pulmonares e causando complicações locais (pulmão) e sistêmicas (SEATON et al., 1995). Nesse contexto, Nemmar e Inuwa (2008) observaram que 48h após a administração e.v. das PED em ratos, esses animais exibiram inflamação sistêmica e alterações morfológicas importantes no pulmão. De modo semelhante, (KREYLING et al., 2009) observaram biodistribuição importante de nanopartículas de carbono marcadas com Ir¹⁹² no fígado, baço, rim, coração e cérebro de ratos, após 24h da inalação.

Curiosamente, a poluição atmosférica parece causar danos à saúde menos evidentes ou, ainda, causa sintomas leves em indivíduos saudáveis, que passam muitas vezes despercebidos. Mesmo assim, alguns estudos postulam que a exposição aguda de indivíduos à poluição ambiental promove alterações inflamatórias sistêmicas, culminando na alteração dos batimentos cardíacos, aumentando assim o risco de doenças cardiovasculares ou agravando as doenças vasculares pré-existentes (GOLDBERG et al., 2001; HOEK et al., 2001; SULLIVAN et al., 2005). Já a exposição prolongada de indivíduos à poluição ambiental está associada à diminuição da função

pulmonar, que muitas vezes resulta em comprometimento nas atividades escolar e laborial (NASCIMENTO et al., 2006; KARAKATSANI et al., 2010). Todavia, a susceptibilidade aos danos da poluição atmosférica é mais comum em indivíduos com histórico de doenças vasculares e respiratórias (ex.: diabetes, isquemia, doença pulmonar obstrutiva) (RUMEL et al., 1993; SEATON et al., 1995; BURNETT et al., 1999; POPE et al., 2002; ZANOBETTI e SCHWARTZ, 2002) e idosos (NASCIMENTO et al., 2006).

Em grandes cidades, como Santiago, São Paulo e México, a ausência de uma política séria no controle da poluição ambiental acarretará conseqüências desastrosas para a saúde da população nos próximos 20 anos, cuja estimativa compreende \cong 156.000 óbitos/ ano, \cong 4 milhões de visitas médicas de indivíduos (crianças) com crises asmáticas/ ano, mais de 48.000 casos de bronquite/ ano e \cong 300.000 visitas médicas de crianças/ ano (BELL et al., 2006). Somente na cidade de São Paulo, MIRAGLIA et al. (2005) demonstraram que o custo indireto com o tratamento de doenças em crianças e idosos oriundas da poluição ambiental nessa corresponde ao valor de U\$ 3.222.676,00/ ano. Assim, acredita-se que se a poluição atmosférica nesses grandes centros geradores de poluição não for evitada ou reduzida, cifras em torno de 21 a 165 bilhões de dólares serão poupadas nesses países (BELL et al., 2006).

No conjunto, essas informações reforçam a necessidade do controle da poluição atmosférica e um melhor conhecimento dos mecanismos envolvidos nas doenças respiratórias e vasculares.

2 OBJETIVO E HIPÓTESE INICIAL

A translocação de MP (< 100 nm) para além da esfera pulmonar causa efeitos sistêmicos importantes e, em alguns casos fatais, devido aos acidentes trombóticos, alterações cardíacas e acidentes vasculares cerebrais (OBERDORSTER, 2002; VERMYLEN et al., 2005; NEMMAR, 2001, 2004, 2008). Apesar dessas evidências sinalizarem para um grau de comprometimento importante dos aparelhos respiratório e cardiovascular frente ao excesso de poluição atmosférica, as implicações diretas sobre as funções de outros órgãos, incluindo a função erétil, são pouco conhecidas e discutidas. Em vista disto, a hipótese de que a administração i.tr. aguda da mistura do MP fino eliminado do diesel (PED) e 1,2-NQ, nas doses conhecidas por causar inflamação aguda nas vias aéreas de ratos (TELES et al., 2007), resultaria em comprometimento das funções vascular e erétil foi testada. Para esclarecer tais suposições, os objetivos deste estudo incluíram:

1. Avaliar a correlação entre a resposta inflamatória (local / sistêmica) e as possíveis alterações na atividade funcional do músculo liso vascular (aorta) e peniano (corpo cavernoso) produzida pela exposição aguda (3h) da mistura dos poluentes ambientais PED e 1,2-NQ
2. Averiguar as interferências dessa exposição sobre genes inflamatórios, esclarecendo alguns dos mecanismos bioquímicos e/ou moleculares envolvidos em tais efeitos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente projeto foi desenvolvido de acordo com as normas pré-estabelecidas pelo Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), conforme o certificado emitido (protocolo registrado sob o nº 127 nas folhas 21 do livro 2).

Foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (200 – 300 g.) obtidos do Biotério Central (ICB-USP) ou do Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB; UNICAMP).

Em todos os procedimentos experimentais, a anestesia foi induzida pela mistura de cetamina e xilazina pela via intraperitoneal (80 mg/kg e 16 mg/kg, respectivamente; i.p.). Quando necessário, foram administradas doses de manutenção anestésica.

3.2 Administração intra-traqueal dos poluentes PED e 1,2-NQ em ratos

Após anestesia e tricotomia, foi realizada uma incisão na região cervical dos animais, de aproximadamente 2 cm. Com o auxílio de uma pinça curva, os tecidos adjacentes foram afastados e a traquéia foi exposta para administração da mistura dos poluentes PED (1 mg/kg) e 1,2-NQ (35 nmol/kg) ou veículo correspondente (DMSO: 0,01%; Tween 80: 0,05%) sempre no volume de 100 µl. Após 3h, os animais foram mortos por superdosagem anestésica e, em seguida, foi realizada laparotomia mediana e exsanguinação destes via secção da aorta abdominal. O leito vascular do pulmão foi imediatamente perfundido com PBS heparinizado (20 ml) e as amostras de sangue ou tecidos foram obtidas quando necessárias, de acordo com a figura 4.

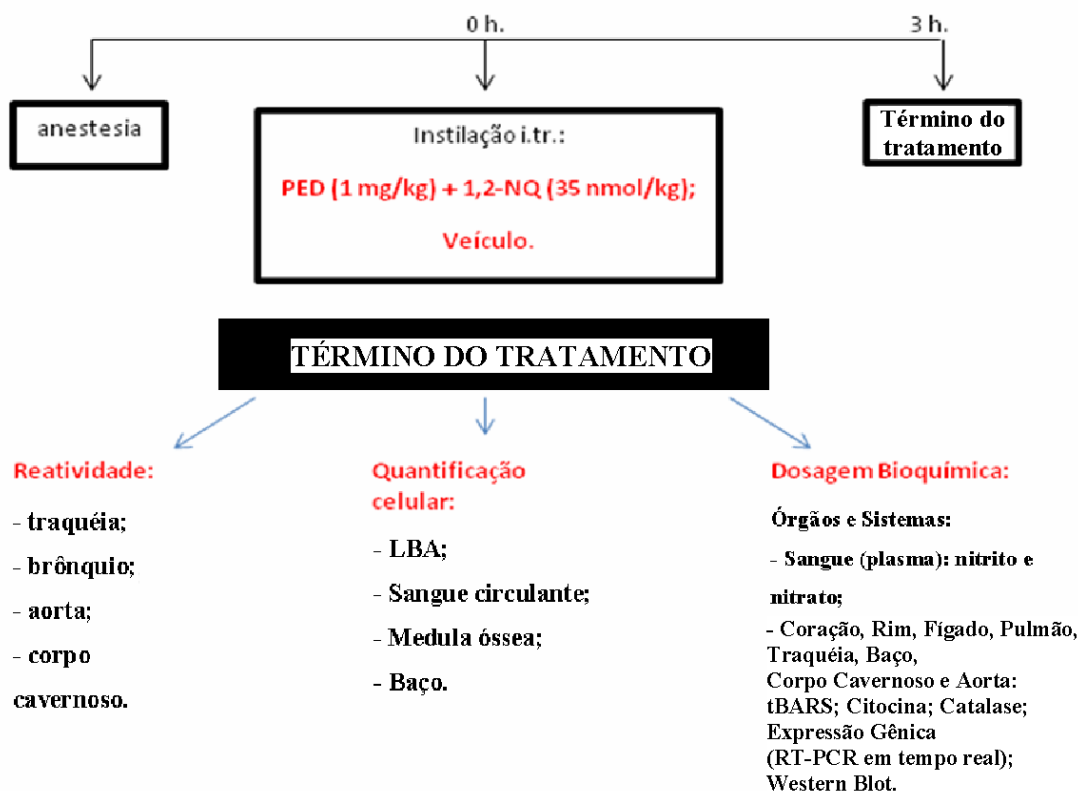


Figura 4. Desenho esquemático do tratamento com os poluentes e protocolos experimentais.

3.3 Avaliação dos parâmetros da resposta inflamatória

3.3.1 Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA), preparo e quantificação celular

A coleta do LBA foi realizada via canulação da traquéia do animal com um tubo de polietileno, pelo qual administrou-se o volume de 2,5 ml do PBS heparinizado (5 UI/ml). O volume injetado foi cuidadosamente aspirado com o fluido broncoalveolar e tal procedimento foi repetido por mais 4 vezes.

O LBA coletado foi submetido à centrifugação (1000 rpm; 10 min) e as células (botão celular) obtidas foram ressuspensas em 1 ml de tampão PBS (0,2 ml). Um volume de 10 µL dessa amostra foi adicionado ao volume de 190 µL de cristal violeta (0,2% diluído em ácido acético 30%) para contagem do número total de células em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos nas amostras de LBA ressuspensas foi efetuada por técnica de citocentrífuga (1000 rpm; 3 min; MOD 2400; Fanem, Brasil) em lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). O número de células diferenciais (mononucleares e

polimorfonucleares) foi quantificado com o auxílio de microscopia óptica e os resultados foram expressos como número de células ($\times 10^5$) por LBA.

3.3.2 Obtenção do sangue periférico, preparo e quantificação celular

Mediante anestesia com a mistura de cetamina e xilazina, os animais foram submetidos à coleta de sangue periférico pela artéria abdominal e, em seguida, mortos por deslocamento cervical. Do sangue periférico coletado em EDTA (1 mg/ml; Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi retirado um volume de 10 μ l e adicionado ao volume de 190 μ l do corante cristal violeta (0,2% em ácido acético 30%) para contagem do número total de células usando-se a câmara de Neubauer. A análise diferencial dos leucócitos do sangue periférico foi efetuada em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa e os dados foram analisados sob microscopia comum e expressos como número de células por (10^6) mm^3 .

A determinação da concentração de hemoglobina e hematócrito no sangue periférico foi realizada pelo método de oxihemoglobina e pela técnica do microhematócrito respectivamente (WINTROBE, 1967; LEWIS, et al., 2005; BORELLI et al., 2007).

3.3.3 Obtenção da medula óssea, preparo e quantificação celular

O fêmur esquerdo dos animais foi removido (\cong 3 cm) e com o auxílio de uma seringa e agulha descartável (5 ml; 0,70x25; 22G1) contendo 5 ml de tampão PBS heparinizado, foi realizado a inserção desta numa das extremidades do fêmur, e a solução foi injetada lentamente. O lavado medular foi aspirado, centrifugado (1.000 rpm; 10 min) e as células ressuspensas em 1 ml de tampão PBS. A seguir, cada alíquota foi ressuspensa em 190 μ L da solução de cristal violeta (0,2%). A quantificação do número total do homogenato final foi feita em câmara de Neubauer, enquanto a análise diferencial das células do lavado medular foi feita por microscopia óptica após o processamento das amostras utilizando-se a técnica de citocentrífuga. Os resultados foram expressos como número de células por mm^3 .

3.3.4 Obtenção do baço, preparo e quantificação celular

Após a morte dos animais, foi realizada uma laparotomia mediana e o baço foi removido e imerso em meio de cultura (10 ml de RPMI1640) juntamente com 500 µl de EDTA (10%). Após 3 min, o baço foi rapidamente macerado em meio asséptico contendo DMEM e a suspensão celular foi submetida à centrifugação (1000 rpm; 10 min à 4 °C). O sobrenadante foi descartado e a lise das hemácias foi provocada pela adição de 1 ml de tampão específico ao botão celular obtido (Red blood cell lysing buffer; Sigma Chemical Company, EUA). Após um minuto, um volume de 39 ml de PBS gelado foi adicionado à mistura e depois esta foi novamente centrifugada (1000 rpm; 10 min à 4 °C). O botão celular resultante dessas amostras foi ressuspensão em DMEM, e as células foram quantificadas com o auxílio de microscópio. Os resultados foram expressos como número de células por mm³.

3.4 Avaliação dos parâmetros funcionais

3.4.1 Medida da reatividade de anéis de traquéia e brônquio principal

Foi realizada laparotomia mediana no animal e ambos, a traquéia (\cong 3 mm da porção inferior) e o brônquio principal foram cuidadosamente removidos, limpos de seus tecidos conjuntivos e imediatamente montados em um sistema de banho para órgão isolado contendo a solução nutritiva de Krebs-Ringer (em mM): NaCl, 118; NaHCO₃, 25; glicose, 5.6; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄.7H₂O, 1.17 e CaCl₂.6H₂O, 2.5, (95:5% de O₂:CO, pH = 7,4 e temperatura à 37 °C.) e conectado ao sistema para aquisição de dados e PC (Power lab, software v 4.0, AD Instruments, MA, EUA)

Tanto os anéis de traquéia quanto o brônquio principal isolado foram fixados entre duas extremidades da ancora de metal, com o auxílio de ganchos apropriados, onde uma das extremidades foi conectada a um transdutor de força, e a outra extremidade foi fixada a uma unidade móvel, que permitia o ajuste da tensão aplicada aos tecidos (15 mN e 8 mN para a traquéia e brônquio, ou 1,5 g. e 0,8 g. respectivamente). As alterações de tensão foram avaliadas via transdutores isométricos conectados ao sistema para aquisição de dados e PC (Power lab, software v 4.0, AD Instruments, MA, EUA). Após estabilização dos tecidos (traquéia e brônquio) por um período de 45 min, esses foram submetidos às curvas concentrações-resposta (CC-R) induzidos pela metacolina.

3.4.2 Medida da reatividade vascular de anéis de aorta (ascendente)

Foi realizada a laparotomia mediana no animal e, aproximadamente, 3-5 cm de aorta foi extraída cirurgicamente da região torácica, limpa de seus tecidos conjuntivos e imediatamente montadas em um sistema de banho para órgão isolado conectado ao sistema para aquisição de dados e PC (Power lab, software v 4.0, AD Instruments, MA, EUA) contendo a solução nutritiva de Krebs-Ringer constantemente aerada (37 °C; 95:5% de O₂:CO₂). Neste caso, entretanto, o ajuste de tensão aplicado foi 10 mN.

As alterações de tensão foram medidas usando-se transdutores isométricos e registradas em um sistema para aquisição e armazenamento de dados no computador (Power lab, software v 4.0, AD Instruments, MA, EUA). Após estabilização, os tecidos foram pré-contraídos com fenilefrina (FE, 1 μM) na presença de indometacina (5.6 μM). Avaliou-se a seguir os efeitos de relaxamento, via curva concentração-resposta (CC-R), induzidos pela ACh e Trinitrato de Glicerila (GTN). As contrações evocadas pela FE também foram escopo deste estudo e então comparadas aos seus respectivos controles.

3.4.3 Medida funcional do tecido cavernoso isolado

Após a morte por exsanguinação dos animais, o corpo cavernoso foi cuidadosamente extraído da região de inserção da crura e imediatamente transferido para a solução de Krebs-Ringer. Seguida a dissecação da túnica albugínea, o tecido cavernoso foi montado no sistema de banho para órgão isolado e, neste, foi aplicada uma tensão de 10 mN. Após 45 min de estabilização do tecido, onde a cada 15 min a solução nutritiva foi trocada e a tensão ajustada para um melhor aproveitamento da preparação, a CC-R frente à ACh foi realizada sempre após a pré-contração com fenilefrina 10 μM (FE). Em um grupo isolado de animais, o corpo cavernoso foi obtido e montado como descrito acima e, então, foi realizada a estimulação elétrica (EFS) neste. Para isto, o tecido foi disposto entre dois eletrodos de platina dispostos e a estimulação elétrica foi deflagrada gerando pulsos de 0.5 ms de duração a 20 V em frequências variadas (1-32 Hz). (Grass S48; Astro-Med Industrial Park, RI, EUA).

3.5 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

3.5.1 Determinação de nitratos totais (NO_x⁻)

Amostras de plasma foram obtidas dos diferentes grupos experimentais e então diluídas em água Milli-Q (1:2). Após desproteinizadas da água por ultrafiltração (5.000 g, 120 min à 4 °C) em tubos plásticos com filtros (*cut-off* de 5 kDa; Fisherbrand[®], Pittsburgh, PA). Volumes de 100 µl de amostra e da curva padrão (soluções aquosas de nitrato de potássio entre 0,2 e 200 µM) foram pré-incubadas com 20 µL de NADPH (100 µM; Sigma Chem. Co., EUA), 20 µL de FAD (5 µM; Sigma Chem. Co., EUA) e 20 µL de nitrato redutase (200 mU/ml) durante 1 hora a 37 °C para redução do íon nitrato para nitrito. O excesso de NADPH foi eliminado via adição de 20 µL de lactato desidrogenase (LDH, 13,5 U/ml; Calbiochem, EUA) e 20 µL de piruvato (90 mM; Sigma Chem. Co., EUA) e posterior incubação à 37 °C durante 30 min. Por último, volumes de 50 µL do reagente de Griess (solução contendo sulfanilamida 0,1% + naftiletilenodiamina 0,01% em ácido fosfórico a 5%; ambos fornecidos pela Sigma Chem. Co., EUA) foram adicionados às amostras. Após incubação dessas amostras por 10 min em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras dos valores de absorvância em espectrofotômetro (Spectramax plus, Molecular Devices, CA, USA) utilizando o comprimento de onda de 450 nm.

3.5.2 Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs)

Amostras de tecidos como traquéia, pulmão, aorta, rim, coração, fígado, baço, corpo cavernoso e sangue foram obtidas, pesadas e homogeneizadas em 5 volumes de solução de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,4) contendo butil hidroxitolueno (BHT, 12,6 mM). Alíquotas de 200 µL desse homogenato (em duplicatas) foram incubadas com 400 µL de solução contendo TBA a 0,37%, em meio fortemente ácido (ácido tricloroacético a 15% e ácido clorídrico 0,25 N), à 90 °C durante 45 minutos. A seguir, essas amostras foram centrifugadas (10.000 g, 5 min) e, depois, 300 µL dos sobrenadantes foram submetidos à extração do produto de reação com 300 µL de n-butanol com a adição de 30 µL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio pela agitação em vórtex por 30 segundos. Após centrifugação (10.000 g, 2 min), amostras de 200 µL dos sobrenadantes (fase orgânica) foram dispostas em microplaca e submetidas à leitura em medidor de Elisa (535 nm) corrigidos pelos valores de absorvância a 572

nm. Os resultados foram expressos como nmol de aldeído formado por g de tecido (BOSE et al., 1989) utilizando-se para o cálculo um coeficiente de extinção molar de $1.55 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A determinação dos produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) determina a quantidade de peroxidação lipídica mediante a quantificação dos aldeídos formados pela degradação de hidroperóxidos, incluindo o malondialdeído (MDA).

3.5.3 Mensuração de conteúdos de catalase nos tecidos

Amostras de tecidos (ex.: pulmão, aorta e tecido cavernoso) dos diferentes grupos animais foram obtidas, pesadas e homogeneizadas (1:10 p/v; 10,000 rpm, 10 min à 40 °C) em tampão fosfato (50mM, pH 7,0). O sobrenadante foi separado e, metade do volume deste, foi reservado em temperatura à 60 °C (durante 2h para inativação da catalase) para os brancos da reação. A seguir, a reação inicial nas amostras foi realizada incubando-se 30 µL de sobrenadante destas (brutas e inativadas) com 500 µL de H₂O₂ 10 mM em temperatura ambiente (durante 2 min para pulmão e aorta, e 10 min para tecido cavernoso). Essa reação foi interrompida pela adição de 500 µL da solução de NaN₃ (1 mM).

Em paralelo, 30 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) foram incubados com H₂O₂ (500 µL nas diferentes concentrações da curva: 8820, 4410, 2205, 1125, 882, 441, 221, 113, 88, 44, 22 e 11 µM) com os respectivos tempos de incubação. Em seguida, a segunda reação consistiu em incubar, em placa de Elisa, o volume de 20 µL do produto da primeira reação com o reagente (200 µL) contendo o-dianisidina (0,167 mg/ml) e HRP (0,095 µg/ml) em tampão fosfato (5 mM, pH 6,0). A monitorização da velocidade de formação do produto de oxidação da o-dianisidina foi realizada registrando-se o aumento da absorbância da mistura a 460 nm, por meio de leituras coletadas em intervalos de 10 s durante 10 min.

A atividade da catalase foi calculada a partir da velocidade máxima por minuto de cada reação e extrapolada na curva de H₂O₂. O resultado foi expresso em U Catalase/mg de proteína, onde uma unidade de catalase foi definida como a quantidade de H₂O₂ (em µmol) degradada por minuto.

3.5.4 Análise da Expressão gênica pela reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa em tempo real (real time RT-PCR)

A expressão gênica das enzimas nNOS, eNOS e iNOS em amostras de tecidos (ex.: cavernoso, aorta e pulmão) dos diferentes grupos animais foi quantificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para isto, as amostras de tecidos foram homogeneizadas em Trizol (1 ml/100 mg de tecido; Gibco BRL, EUA) para extração do RNA total. Após 5 min, adicionou-se às amostras o volume de 200 µL de solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para cada 1 ml de Trizol utilizado. Após agitação vigorosa para extração dos lipídios, os tubos foram deixados em repouso (10 min) e levados à centrifugação (12,000 g; 15 min.; 4 °C). A fase aquosa (sobrenadante; 600 µL) foi separada e o RNA precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol. Após 10 min à temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados (12,000 g, 10 min, 4 °C) e o precipitado (*pellet*) de RNA formado foi lavado em etanol (95%; 500 µL) e novamente centrifugado (7,000 g, 5 min, 4 °C). Esta operação foi repetida utilizando-se etanol 75%. Os precipitados de RNA total resultantes de cada amostra foram dissolvidos em 50 µL de água tratada com DEPC 0,1% (dietilpirocarbonato).

Para a quantificação de RNA total, as amostras foram diluídas 1:500 em água Milli-Q autoclavada e suas absorbâncias medidas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro (Amersham Bioscience, Inglaterra) e as concentrações de RNA total foram calculadas em µg/µl. A integridade do RNA total isolado foi confirmada pelo teste de eletroforese em gel de agarose (1% em TAE (tris acetato EDTA) contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio, GIBCO BRL, EUA) em uma voltagem de 70V durante ~30 min. As bandas foram reveladas sob luz ultravioleta.

Purificação / transcrição reversa (RT) do RNA total e análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real (qPCR)

O RNA total obtido nas amostras foi tratado com Dnase. Para isto, cada amostra de 3 µg de RNA total foi diluído em q.s.p. 9 µL de água DEPC e depois aquecida (à 37 °C; 10 min). A seguir, essas amostras foram aquecidas à 75 °C (5 min) com uma mistura contendo o inibidor de RNases (1 µl ; RiboLockTM Ribonuclease Inhibitor, Fermentas Life Science), DNase (1 µL; Dnase I, Fermentas Life Science), tampão 5X First-Strand Buffer (4 µL), oligo dT (1 µL; 100 µM, Fermentas Life Science), DTT (2

μL ; 0,1M) e dNTPs (1 μL ; 10mM, Fermentas Life Science). As amostras foram reservadas à 37 °C por 10 min.

A transcrição reversa foi realizada incubando-se o RNA tratado com DNase e a enzima transcriptase reversa (1 μL ; RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase, Fermentas Life Science) à 37 °C por 1h, 75 °C por 5 min e 37 °C por 2 min. As amostras de cDNA foram mantidas a -20 °C.

Para a análise da expressão gênica por RT-PCR em tempo real (qPCR), um volume de 3 μL de cDNA diluído (1:10) foi incubado com 3 μL de cada primer (300 nM; forward e reverse; Tabela 2) e 6 μL de PCR Master mix (SYBR Green ROX Mix, LGC Biotecnologia). Após um período de desnaturação (10 min) à 95 °C, as amostras foram submetidas a 40 ciclos de amplificação à 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 1 min. As amostras foram analisadas em duplicatas juntamente com o controle negativo, que avalia a especificidade da reação (Mx3005P[®] qPCR System; Stratagene). Após a amplificação, foram obtidas as curvas de dissociação e os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, para confirmação da especificidade da amplificação da reação.

A análise quantitativa foi realizada com o auxílio do programa MxPro (Stratagene, versão 3.0), o qual estima o limiar (threshold; Ct) para cada amostra. Os resultados foram interpretados empregando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde Ct significa o: número de ciclos necessários para atingir o limiar de fluorescência acima do valor de fundo - background), que relaciona a expressão do gene de interesse comparado àquela do gene do controle negativo (gene HPRT - hipoxantina fosforibosil transferase). Os valores obtidos no grupo veículo foram designados como 1 e os valores do grupo tratado foram normalizados com base nos dados obtidos na mesma corrida.

Tabela 2 - Lista dos *primers* utilizados nos ensaios de qPCR.

<i>Gene</i>		<i>Seqüência</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>Produto (pb)</i>
nNOS	Forward	5'- CACCTGAAGAGCACACTGGA -3'	60	
	Reverse	5'- GGCTAGAGGGAAGAGCTGGT -3'		
eNOS	Forward	5'- AGCATGAGGCCTTGGTATTG -3'	60	
	Reverse	5'- CCCGACATTTCCATCAGC -3'		
Inos	Forward	5'- AAAATGGTTTTCCCCCAGTTC -3'	60	150
	Reverse	5'- GTCGATGGAGTCACATGCAG -3'		
HPRT	Forward	5'- AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA -3'	60	129
	Reverse	5'- TGATTCAAATCCCTGAAGTGC -3'		

3.5.5 Avaliação de expressão protéica por Western Blot

A expressão da isoforma nNOs e de sua variante PnNOS de tecido cavernoso de ratos dos diferentes grupos foi avaliada via técnica de Western blot. Para isto, as amostras foram homogeneizadas em tampão TRIS 50 mM (5 vol / mg; pH 7.4) contendo PMSF (1 mM). Os homogenatos obtidos foram centrifugados (1000g, 5 min) e o conteúdo de proteínas em cada sobrenadante das amostras foi diluído em tampão TRIS (50 mM) a um volume q.s.p. 130 µl. Em seguida, o volume de 30 µL de tampão de Laemmli (62,5 mM de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol) foi adicionado na amostra. Subsequentemente, uma quantidade de 60 µg das proteínas presente nas amostras foi separada por eletroforese em gel de poliacrilamida (7% contendo lauril sulfato de sódio; SDS-PAGE) usando um tampão específico (Tris 25 mM, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS) e intensidade constante de corrente (35 mA; voltagem ≈ 100-180 V), conforme descrito (Laemmli, 1970).

As bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente via sistema submerso para membrana de nitrocelulose (150 mA, ~40 V; 2h), utilizando-se o tampão específico: 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. A eficiência da transferência foi verificada pela coloração das membranas por vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético a 5%). A seguir, as membranas foram incubadas (12h, 18 °C) com anticorpos primários anti-nNOS (policlonal de coelho, 500 ng/ml). Após lavagens apropriadas (6x 10 min com TBS-t), as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina (Cabra anti-

coelho-AP, 1:3000). As membranas foram submetidas a uma nova série de lavagens (6x 10 min) e as bandas imunorreativas foram reveladas mediante um kit de revelação, com emissão de quimioluminescência (LumiPhos, Pierce). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados pela adição da solução de caseína (0,2%) em TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl, pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20).

As imagens foram captadas com o auxílio do sistema de imagens ChemImager (Alpha Innotech, EUA) e as intensidades das bandas foram analisadas por densitometria e normalizadas pela densitometria obtida das respectivas linhas (lanes) após coloração por Ponceau.

3.5.6 Determinação de citocinas no plasma

O sangue periférico dos animais foi coletado pela artéria abdominal após os animais serem anestesiados com a mistura de cetamina e xilazina, e, em seguida, os animais foram mortos por deslocamento cervical. O plasma foi obtido por centrifugação em centrífuga Fanem à uma velocidade de 3.000 rpm por 15 minutos. Após, este foi acondicionado em freezer -20 °C até o momento da dosagem. Para a mensuração da concentração das citocinas interleucina 1 β (IL-1 β) e Fator de necrose tumoral α (TNF- α) no plasma dos animais, placas de ELISA (R&D Systems, EUA) foram sensibilizadas com 100 μ l do anticorpo anti-IL-1 β diluído em tampão carbonato (pH 9,5) ou anti-TNF- α diluído em tampão fosfato (pH 6,5). As placas foram submetidas à incubação por 18h (4 °C) e a reação foi depois bloqueada com a solução tampão (PBS) com gelatina (3%; 200 μ l/poço), por 3h. A seguir, as placas foram lavadas quatro vezes com a solução tampão PBST [PBS + Tween 80 (0,05%)] e, em cada poço, das duas primeiras fileiras, foi adicionado 100 μ l de PBST + BSA (0,1%). Nestes poços foram dispostos, na razão de 1:2, os padrões das citocinas. Após 1h de incubação, a reação foi bloqueada com ácido cítrico (0,2 M) e então a leitura foi feita em leitor de ELISA (DO 450 nm). A concentração das citocinas nas amostras foi calculada a partir das curvas-padrão utilizando-se IL-1 β e TNF- α de rato em concentrações crescentes (15,62; 31,25; 62,50; 125; 250; 500; 1000 e 2000 pg/ml).

3.6 Obtenção e preparo dos poluentes

Os poluentes foram cedidos pelo Prof. Dr. Yoshito Kumagai (Organization for Frontier Research in Preventive Pharmaceutical Sciences, Universidade de Hokuriku, Kanagawa-machi, Kanazawa, Ishikawa 920-1181, Japão; Doctoral Programs in Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Universidade de Tsukuba, Ibaraki, Japão).

As PED foram obtidas em laboratório da engenharia do motor Mod 4JBI (4 cilindros 2,74 l, 10 HP, 1.500 rpm; Isuzu Automobile Co, Japão) via sistema de filtragem (MP<2,5), conforme descrito previamente (SAGAI et al., 1996; CHO et al., 2004). A obtenção e purificação do composto 1,2-NQ foi realizada via cromatografia de camada delgada eluída em diclorometano (CHO et al., 2004).

A suspensão de PED (ex.: estoque 1 mg/ml, m/v; pH 7,4) foi preparada em tampão PBS e Tween 80 (0,05%), enquanto a solução estoque da 1,2-NQ (3 µmol/ml, m/v) foi preparada em DMSO (0,01%), Tween 80 (0,05%) e PBS (99,94%). Quando a mistura de poluentes foi utilizada, optou-se por usar o veículo do 1,2-NQ. Após o preparo da suspensão, esta foi levada ao sonicador (5 min) imediatamente antes da administração.

3.7 Cálculos e análise estatística

Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. de valores absolutos ou porcentagem, onde “n” denota o número de animais usados em cada experimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância de uma única via (ANOVA), seguida pelo teste modificado de Bonferroni ou, quando apropriado, realizou-se o teste t-Student não-pareado. As diferenças entre as médias foram avaliadas com o auxílio do programa estatístico (software Prism 4.0). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

As respostas relaxantes para ACh, GTN e EFS foram expressas como porcentagem do relaxamento relativo à resposta submáxima contrátil à FE (EC 80; 10 µM, RTA e RCC). A Emax e o log negativo para as concentrações dos agonistas produzirem 50% da Emax (Valores de pD2) foram estimados através de análise de regressão não-linear para cada CC-R individual. A força isométrica em resposta à MCh, FE e EFS foi medida em anéis de traquéia, segmentos de brônquios, anéis de aorta e segmentos de corpos cavernosos, de cada um dos grupos experimentais e compararam-se os valores de pD2 e de Emax com grupos controles da mesma idade.

4 RESULTADOS

4.1 Parâmetros inflamatórios

4.1.1 Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre o recrutamento de leucócitos para o pulmão

A figura 5 mostra que o tratamento dos animais com a mistura dos poluentes causa, após 3 horas, um aumento significativo ($P < 0.001$) no número total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) dos animais quando comparado ao grupo controle, que recebeu o veículo dos poluentes. Na contagem diferencial de células no LBA dos animais expostos aos poluentes, nota-se um aumento marcante no conteúdo de células mononucleares ($P < 0.001$), sem nenhum efeito sobre o influxo de polimorfonucleares (neutrófilos e eosinófilos).

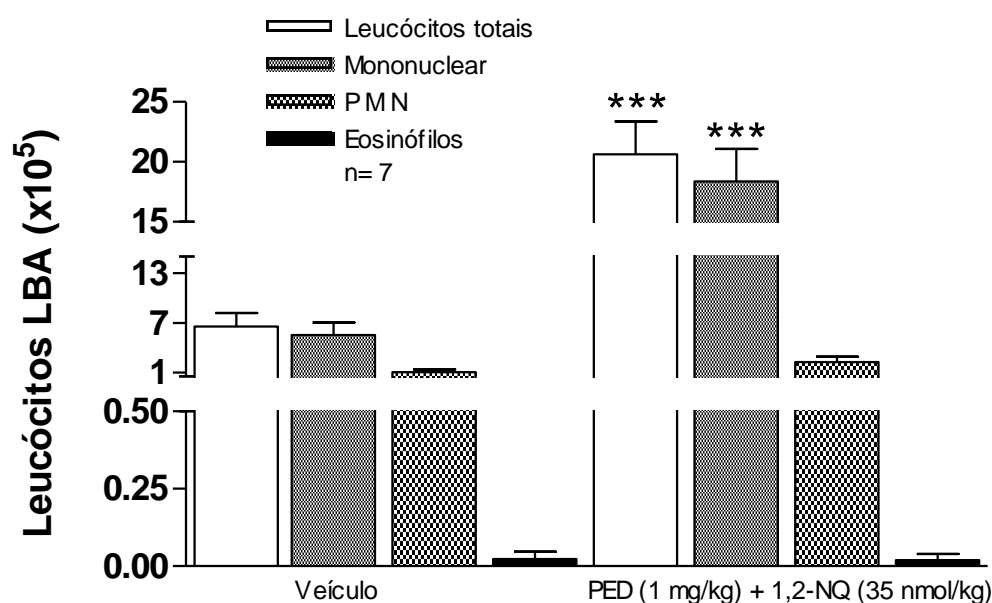


Figura 5. Efeito da instilação i.tr. de poluentes (PED + 1,2-NQ) no recrutamento de leucócitos no pulmão. O gráfico ilustra o efeito da instilação i.tr da mistura de poluentes sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no LBA de animais controles e tratados. Os resultados estão expressos como média \pm EPM para 7 animais. $***P < 0.001$ vs veículo.

4.1.2 Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre a população de células das séries vermelha (eritrograma) e branca (leucograma) no sangue periférico

A figura 6A ilustra que a exposição aos poluentes causou uma diminuição significativa no número de hemácias ($P<0.05$; $n=5$) no sangue circulante dos animais em relação ao grupo controle ($n=6$), que recebeu o veículo dos poluentes.

A instilação i.tr. dos poluentes ($n=5$), após 3h, em ratos promoveu diminuição significativa ($P<0.05$) no número de leucócitos totais no sangue periférico destes em relação ao grupo controle (Figura 6B; $n=6$). Nesse mesmo compartimento, o número de neutrófilos segmentados (Figura 6C) e monócitos (Figura 6E) foi menor quando comparado ao grupo controle, embora de maneira não estatisticamente diferente ($n=5-6$). Por outro lado a população de linfócitos (Figura 6D) mostrou-se significativamente menor ($P<0.05$) no sangue dos animais expostos aos poluentes comparado ao grupo controle. Não foi observado eosinófilos no sangue periférico desses animais.

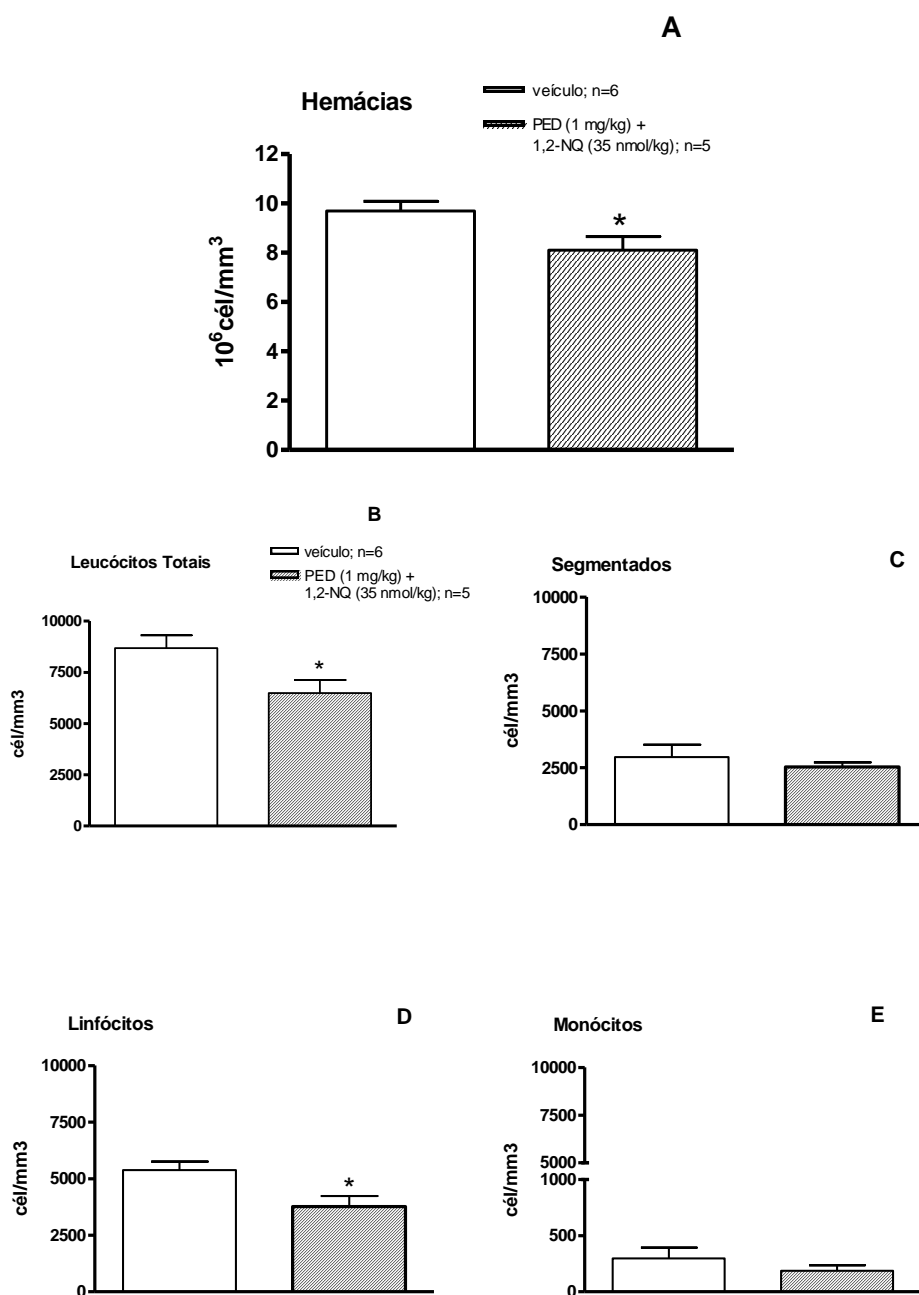


Figura 6. Efeito da instilação i.tr. de poluentes (PED + 1,2-NQ) sobre as séries vermelha e branca no sangue periférico. O painel A ilustra o efeito da instilação i.tr da mistura de poluentes sobre a contagem de hemácias do sangue periférico de animais controles (barras abertas) e tratados (barras fechadas). O painel B mostra o efeito desses poluentes sobre a contagem de leucócitos totais circulantes no sangue periférico. Os painéis C, D e E ilustram a contagem diferencial do número de leucócitos totais. Os resultados estão expressos como média \pm EPM para 5-6 animais. * $P < 0.05$ vs veículo.

4.1.3 Efeito dos poluentes sobre a população de leucócitos na medula óssea e baço

Analisando a demanda de células sanguíneas da série branca na medula óssea dos animais expostos à mistura de poluentes observou-se um aumento significativo ($P < 0.01$) do número de leucócitos totais em relação ao grupo controle (Figura 7A; $n=4$). A contagem diferencial absoluta no mielograma revelou um aumento de vários tipos celulares, a saber: neutrófilos anelados, neutrófilos segmentados, monócitos, macrófagos, eritroblasto jovem (Figura 7B – E; $n=4$) quando comparado ao grupo controle ($n=4$). O número de eritroblasto orto e policromático (Figura 7F), embora aumentado, na medula óssea não foi estatisticamente diferente do grupo controle ($n=4$). Observou-se ainda na medula óssea uma tendência de aumento no número de eosinófilos, mas não de forma significativa ($273,8 \pm 45,34$ cél./mm³ na ausência e $313 \pm 62,27$ cél./mm³ na presença do poluente, respectivamente; $n=4$).

No baço, a figura 8A mostra que a mistura de poluentes causou nos animais ($n=4-5$) uma redução significativa no número de leucócitos totais. Por conseguinte, o número de blastos (B), neutrófilos segmentados (C), linfócitos (F) e EPO + EOC (G; $*P < 0.05$) mostrou-se diminuído. Ao contrário, o mesmo tratamento promoveu no baço dos animais um aumento no número de eosinófilos (D) e monócitos – macrófagos (E) em relação aos animais controle ($n=5$), muito embora esse aumento não foi significativamente diferente do grupo controle.

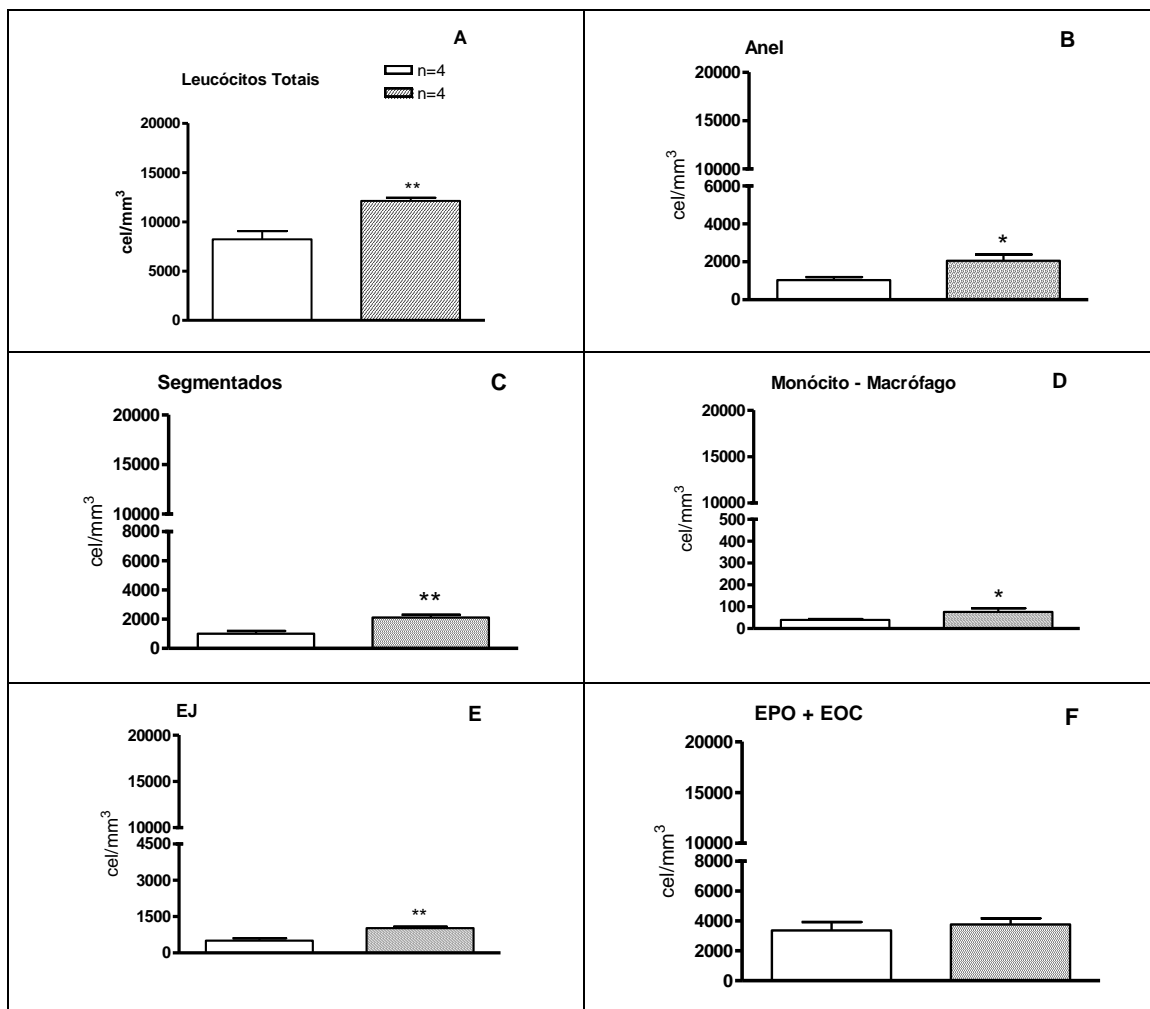


Figura 7. Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre a celularidade da medula óssea. Os painéis A – F ilustram o efeito da instilação i.tr da mistura de poluentes ou veículo sobre a contagem total e diferencial absoluta de leucócitos na medula óssea de animais controles (barras abertas) e tratados (barras listradas). Os resultados estão expressos como média \pm EPM para 4 animais. ** $P < 0.01$ e * $P < 0.05$ em relação aos valores controles.

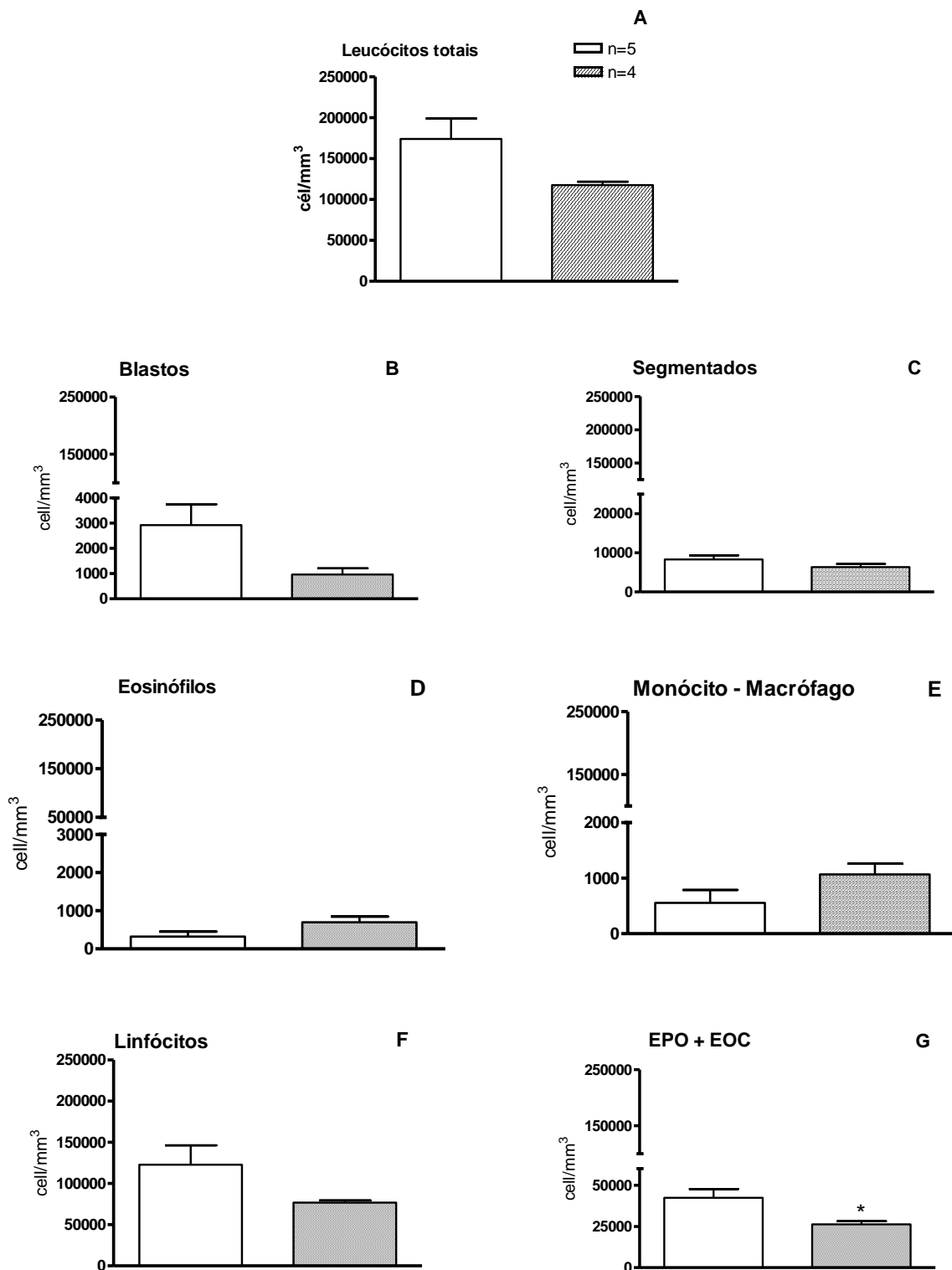


Figura 8. Efeito da instilação i.tr. da mistura dos poluentes sobre o esplenograma. Os painéis A - G ilustram o efeito da instilação i.tr da mistura de poluentes sobre a contagem total e diferencial de leucócitos no baço de animais controles (barras abertas) e tratados (barras fechadas). Os resultados estão expressos como média \pm EPM para 4 - 5 animais.

4.2 Parâmetros funcionais

4.2.1 Efeito dos poluentes sobre a reatividade em traquéia e brônquio principal de ratos

O tratamento de ratos com a mistura dos poluentes (PED 1 mg/kg e 1,2-NQ 35 nmol/kg) reduziu significativamente os valores de E_{max} da CC-R em anéis de traquéia (Figura 9A e B; $6,267 \pm 3,209$ g/100 mg de tecido; n=6) e segmentos de brônquio principal (Figura 9C e D; $1,119 \pm 0,690$ g/100 mg de tecido; n=7) estimulados com a MCh em relação aos valores de E_{max} das CC-Rs dos anéis de traquéia (Figura 9A e B; $14,91 \pm 2,42$ g/100 mg de tecido; n=8) e segmentos de brônquio principal (Figura 9C e D; $6,608 \pm 2,472$ g/100 mg de tecido; n=7) de ratos controle, que receberam somente o veículo dos poluentes.

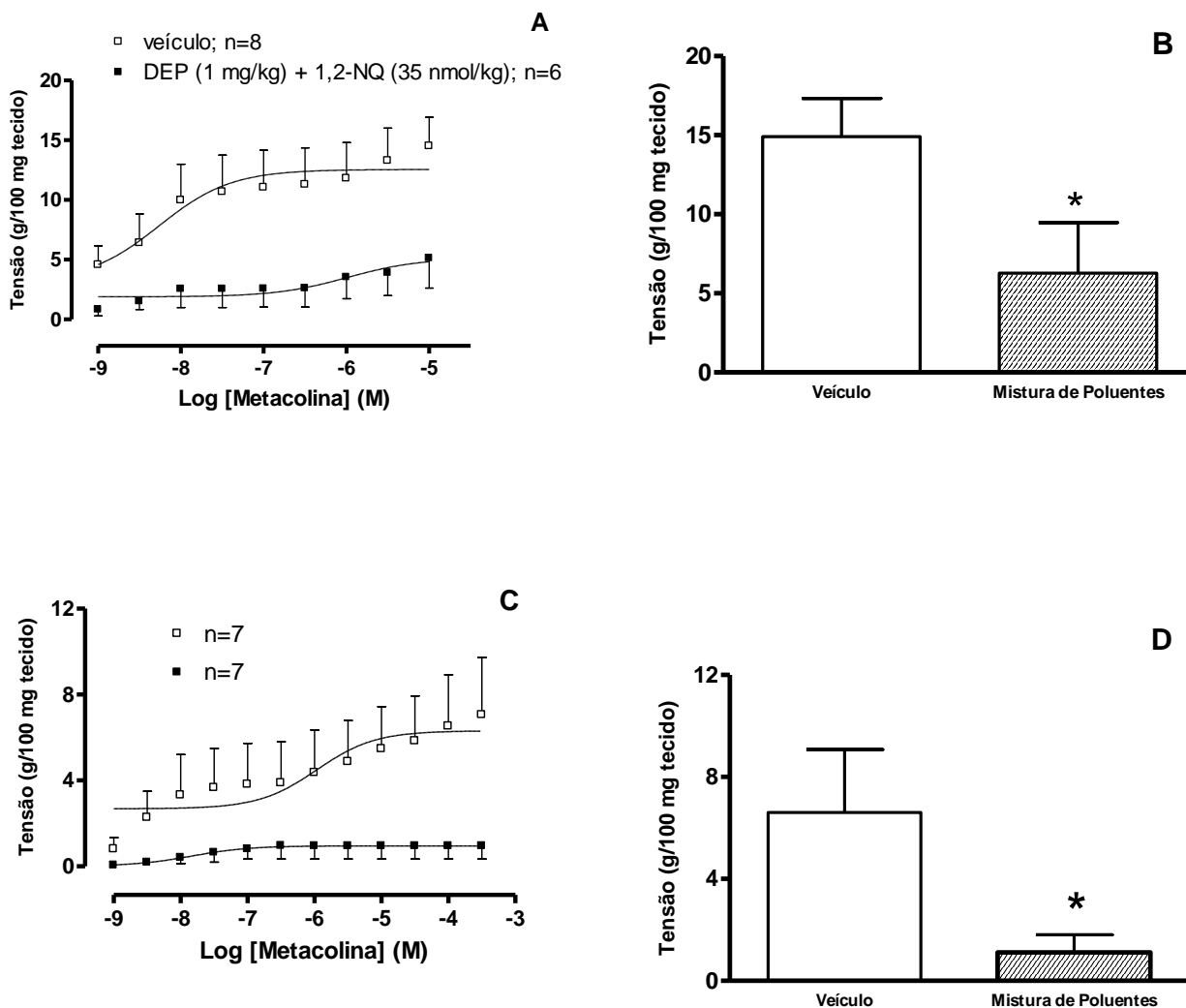


Figura 9. Efeitos da instilação i.tr. da mistura PED e 1,2-NQ sobre as contrações evocadas pela metacolina (MCh 10^{-9} a $10^{-3,5}$ M) em traquéia (Painel A) e brônquio principal (Painel C) de ratos. A curva exibida pelos quadrados abertos ilustra a contração induzida pela MCh em animais tratados com o veículo dos poluentes, enquanto os quadrados escuros ilustram o efeito da MCh em tecidos isolados de ratos tratados com a mistura PED (1 mg/kg) e 1,2-NQ (35 nmol/kg) durante 3h. Os painéis B e D representam a comparação de E_{max} entre ambos os grupos dos diferentes tecidos. Estes são gráficos representativos da média e EPM de 6 a 8 animais. * $P < 0.05$ vs veículo.

4.2.2 Curva concentração-resposta evocada pela fenilefrina (FE) na aorta e corpo cavernoso de ratos expostos aos poluentes

A exposição aguda dos animais aos poluentes não promoveu alteração significativa na CC-R (contração) induzida pela FE na aorta isolada de ratos em relação ao grupo controle (Valores de $E_{\max} = 298,2 \pm 84,03$ na ausência e $219,0 \pm 34,34$ na presença do poluente; Figura 10A).

Da mesma forma, os poluentes não afetaram a contração induzida pela FE no tecido erétil desses animais quando comparado ao grupo controle (Valores de $E_{\max} = 5,84 \pm 1,18$ na ausência e $6,04 \pm 1,63$ na presença do poluente, respectivamente; Figura 10B).

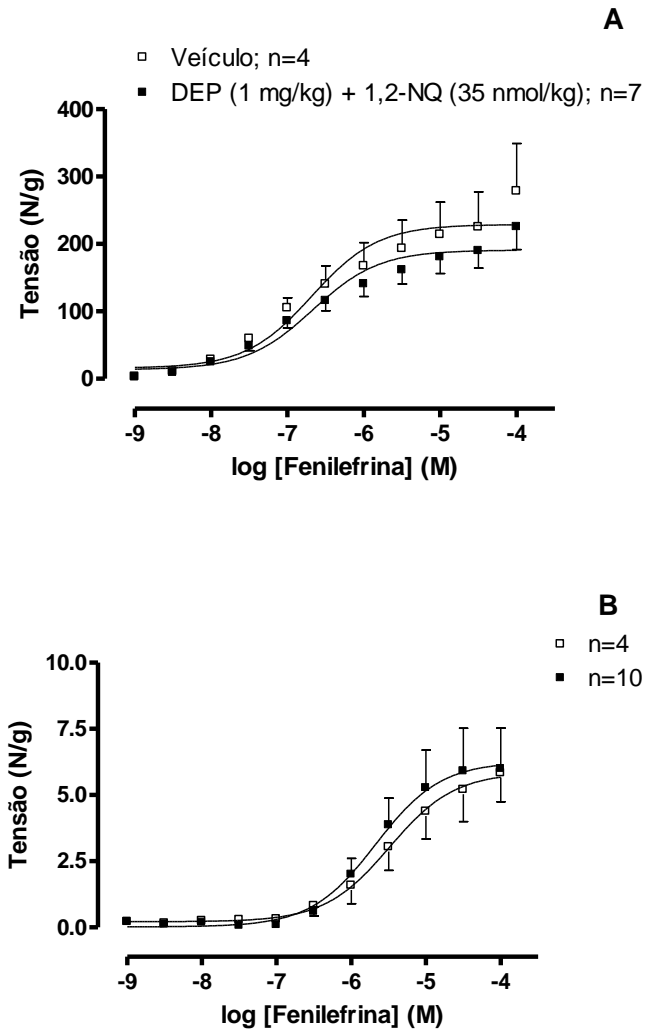
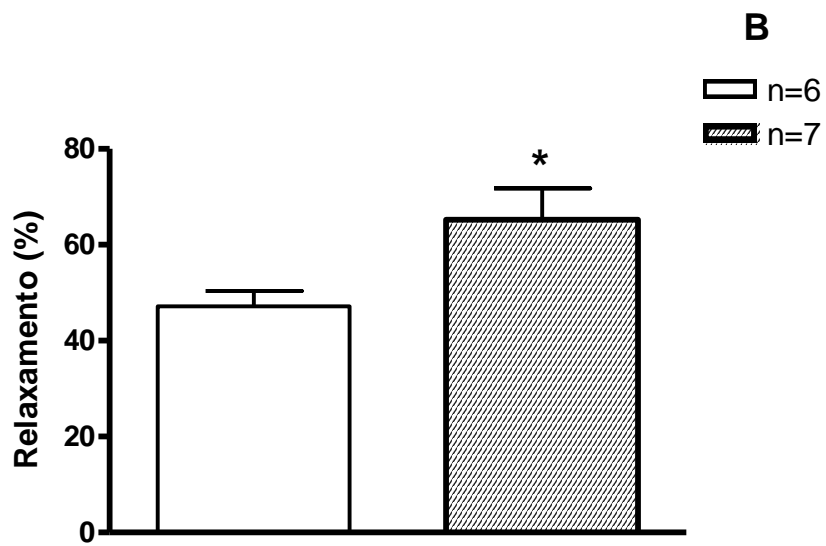
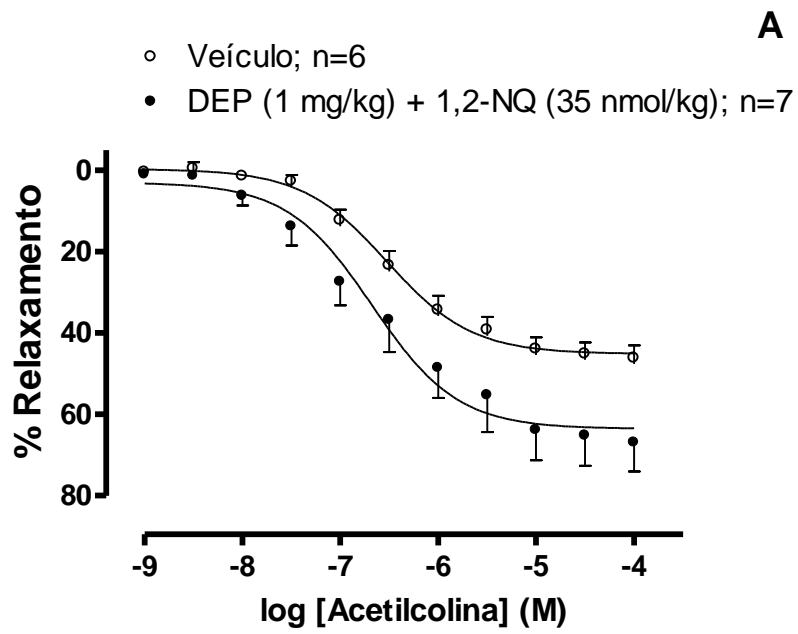


Figura 10. Efeitos da injeção i.tr. da mistura PED e 1,2-NQ sobre a CC-R evocada pela fenilefrina (FE 10^{-9} a 10^{-4} M) em aorta torácica (painel A) e corpo cavernoso de ratos (painel B). A curva exibida pelos quadrados abertos ilustra a contração induzida pela FE em animais tratados com o veículo dos poluentes, enquanto os quadrados escuros ilustram o efeito da FE em ratos tratados pela via i.tr. com a mistura dos poluentes (PED e 1,2-NQ) após 3h. Os gráficos representam a média e EPM de 4 a 10 animais.

4.2.3 Curva concentração-resposta (relaxamento) evocada pela acetilcolina (ACh) na aorta de ratos expostos aos poluentes

O relaxamento concentração-dependente induzido pela ACh (10^{-9} M - 10^{-4} M) em aorta torácica de animais expostos aos poluentes foi mais proeminente do que aquele obtido no grupo de animais controle (Figura 11A). Na figura 11B, esse efeito foi claramente observado quando a E_{\max} da CC-R induzida pela ACh na aorta dos animais expostos aos poluentes apresentou diferença estatística ($P < 0,05$) da CC-R obtida nos animais controles [Valores de $E_{\max} = 47,1 \pm 3,23$ (%) na ausência e $65,2 \pm 6,5$ (%) na presença do poluente].

Os painéis 11C e 11D ilustram os traçados representativos dessas CC-R induzidas pela ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) na aorta torácica de rato exposto ao veículo ou poluentes, respectivamente. Conforme observado nestes traçados bem como pelos valores de média e EPM, a pré-contracção induzida pela FE ($1 \mu\text{M}$) na aorta de rato controle (179.08 ± 4.89 ; $n = 6$; Figura 11E) não foi estatisticamente diferente à de rato exposto aos poluentes (149.9 ± 16.21 ; $n = 7$; Figura 11E).



Continua.

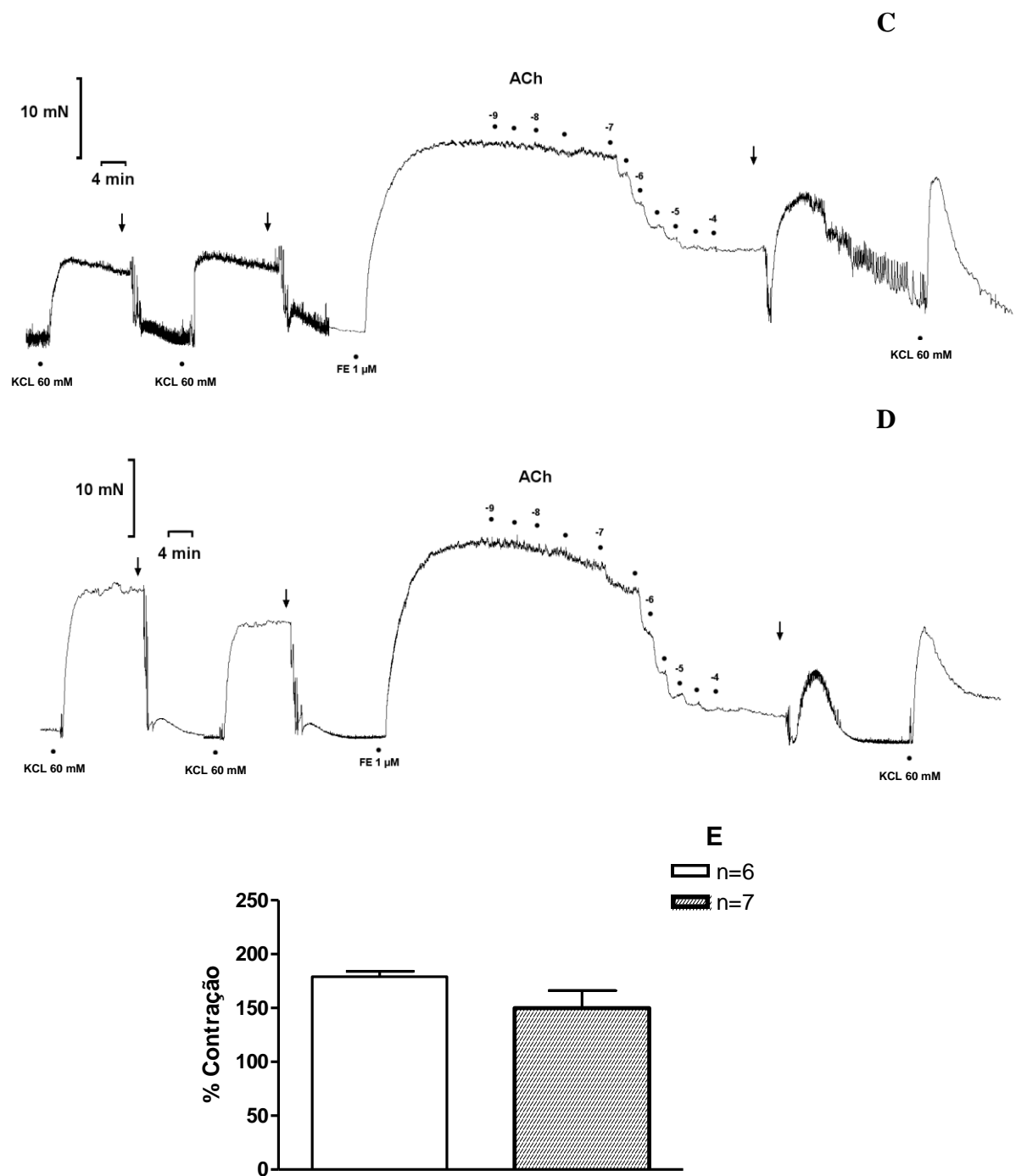


Figura 11. Curva concentração-resposta (CC-R) induzida pela ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) em aorta de animais tratados com os poluentes ou seu respectivo veículo. O painel A mostra o relaxamento produzido pela CC-R frente à ACh na aorta dos animais controle e tratados, enquanto o painel B representa a comparação de E_{max} entre ambos os grupos. Estes são gráficos representativos da média e E.P.M. de 6 a 7 tecidos isolados dos animais. * $P < 0.05$ vs veículo. Os Painéis C – D ilustram os traçados representativos da contração inicial induzida pela adição da solução de KCl ao banho contendo preparação de aorta de ratos controle e exposto aos poluentes, mostrando a integridade desses tecidos. A seguir, observa-se a pré-contração induzida pela FE (1 μ M; painel E), e as curvas concentração-resposta (CC-R) induzidas pela ACh (10^{-9} – 10^{-4} M) em ambos os animais (controle e expostos aos poluentes) após 3h. As setas indicam lavagens das preparações. Estes são traçados representativos de 6-7 experimentos.

4.2.4 Efeitos da exposição aos poluentes sobre a resposta induzida pelo doador de NO, trinitrato de glicerila (GTN), em aorta e corpo cavernoso de ratos

O tratamento i.tr. com a mistura de poluentes não alterou a curva-concentração relaxamento induzido pelo GTN (10^{-9} - 10^{-5} M) em anéis de aorta de ratos em comparação ao grupo de animais tratado com o veículo dos poluentes [Valores de E_{\max} = $83,4 \pm 5,2$ (%) na ausência e $74,4 \pm 7,1$ (%) na presença do poluente; Figura 12A].

Ao contrário, a CC-R induzida pelo GTN (10^{-9} a 10^{-5} M) em corpo cavernoso de ratos expostos aos poluentes foi diferente do grupo controle (Figura 12B), com valores de E_{\max} estatisticamente diferentes da resposta obtida nos animais tratados com o veículo dos poluentes [$P < 0,05$; Valores de E_{\max} = $40 \pm 3,2$ (%) na ausência e $50,4 \pm 2,5$ (%) na presença da mistura de poluentes, respectivamente; Figura 12C].

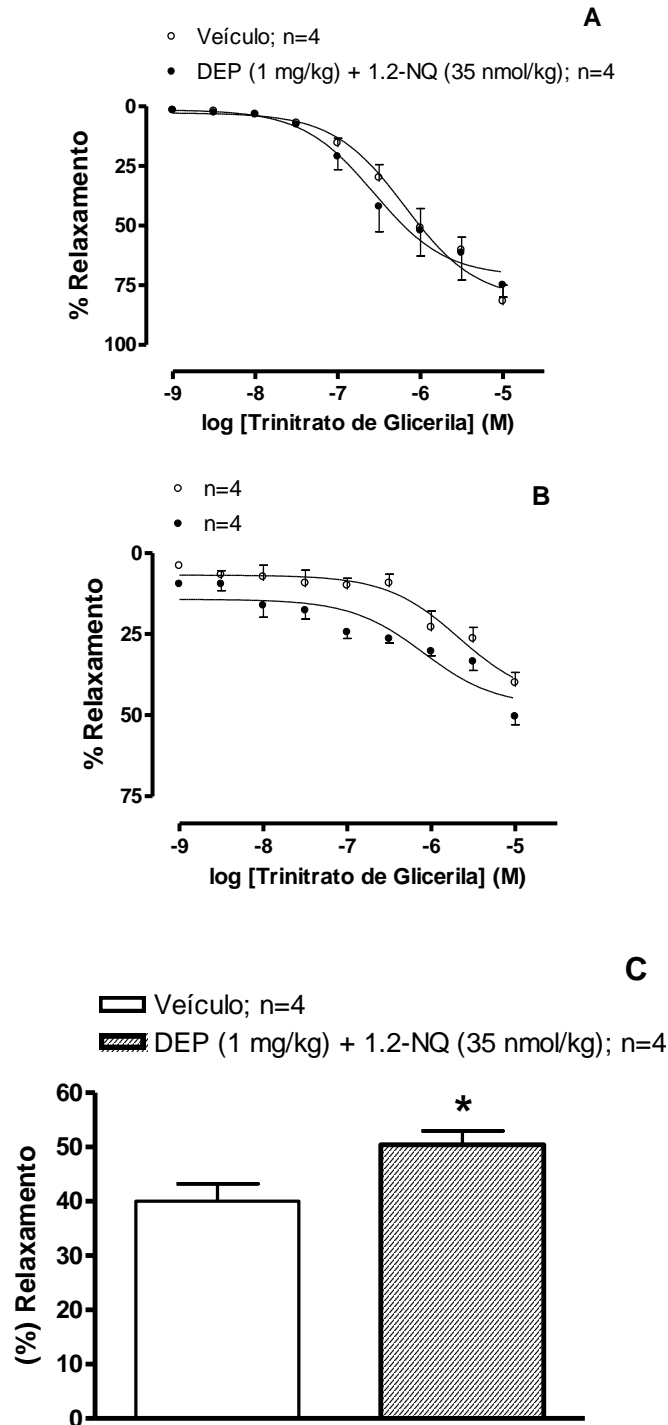


Figura 12. Curva concentração-resposta (CC-R) induzida pelo GTN (10^{-9} – 10^{-5} M) em aorta (A) e corpo cavernoso de ratos (B) expostos aos poluentes e veículo dos poluentes. Comparação de E_{max} em corpo cavernoso de ratos (Painel C). Estes são gráficos representativos da média e E.P.M. de 4 animais. * $P < 0.05$ vs veículo.

4.2.5 Efeito da exposição aos poluentes sobre a estimulação elétrica em corpo cavernoso

A estimulação elétrica (EFS: 1-32 Hz; 20 V; 0.5 ms duração de cada pulso; 0.2 ms intervalo entre cada pulso) dos segmentos de corpo cavernoso de ratos tratados com o veículo dos poluentes causou relaxamento transitório e de rápido desenvolvimento, de modo dependente da frequência (n=5; Figuras 13A, 14A, 15; Tabela 3). Na vigência da exposição dos animais aos poluentes, a estimulação elétrica (menores frequências: 1, 2 e 4 Hz; Figuras 13A, 14B, 15; Tabela 3) dos segmentos de corpo cavernoso promoveu maior relaxamento de modo dependente da frequência. Neste caso, contudo, o perfil transitório desta resposta foi de maior amplitude e retorno ao *tonus* basal bem mais demorado do que o do grupo controle (n=7).

O estímulo elétrico (EFS: 1-32 Hz) causou contrações dos segmentos de corpo cavernoso de ratos tratados com o veículo dos poluentes, de modo dependente da frequência, (n=6), tais respostas não foram diferentes daquelas observadas nos animais que foram tratados i.tr. com a mistura dos poluentes (Figura 13B).

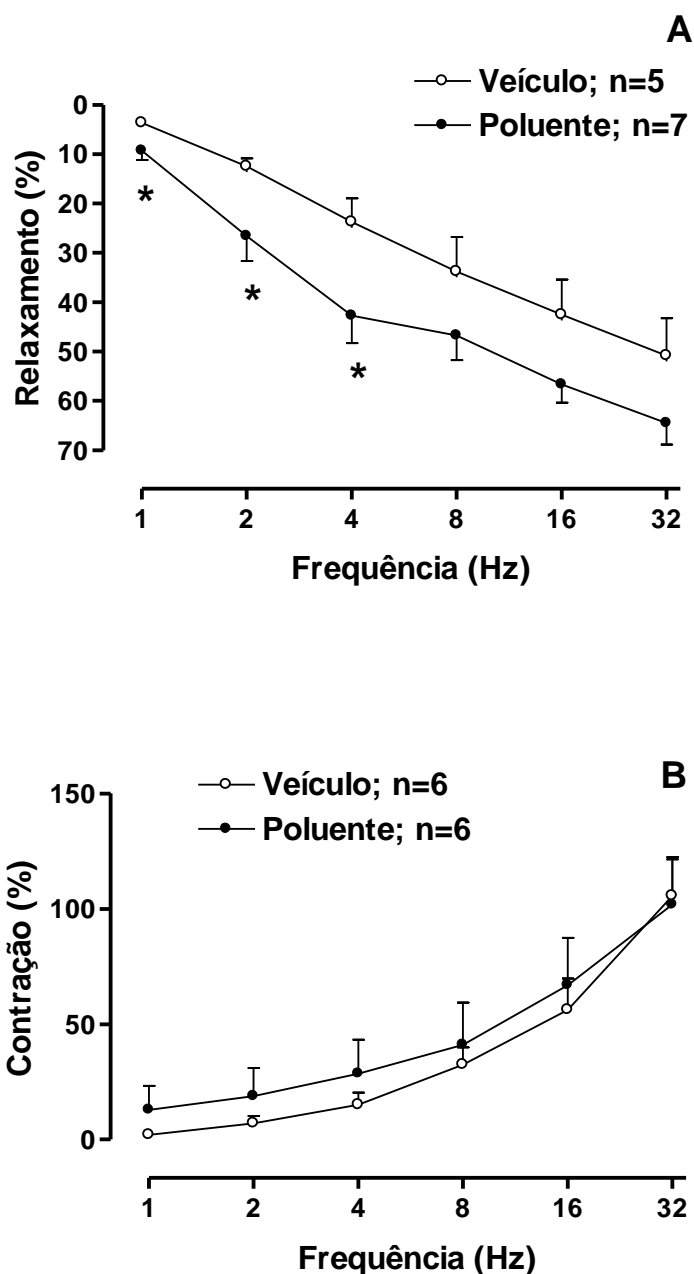


Figura 13. Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre os relaxamentos (A) ou contrações (B) induzidos pela EFS (1 – 32 Hz) em corpo cavernoso de rato. Painel A - Os dados representam médias \pm erro padrão das médias de relaxamento calculadas em relação à contração induzida pela FE (10 μ M). Painel B - Contrações dos segmentos de corpo cavernoso de ratos induzidas por EFS. *P<0.05 em relação aos respectivos controles.

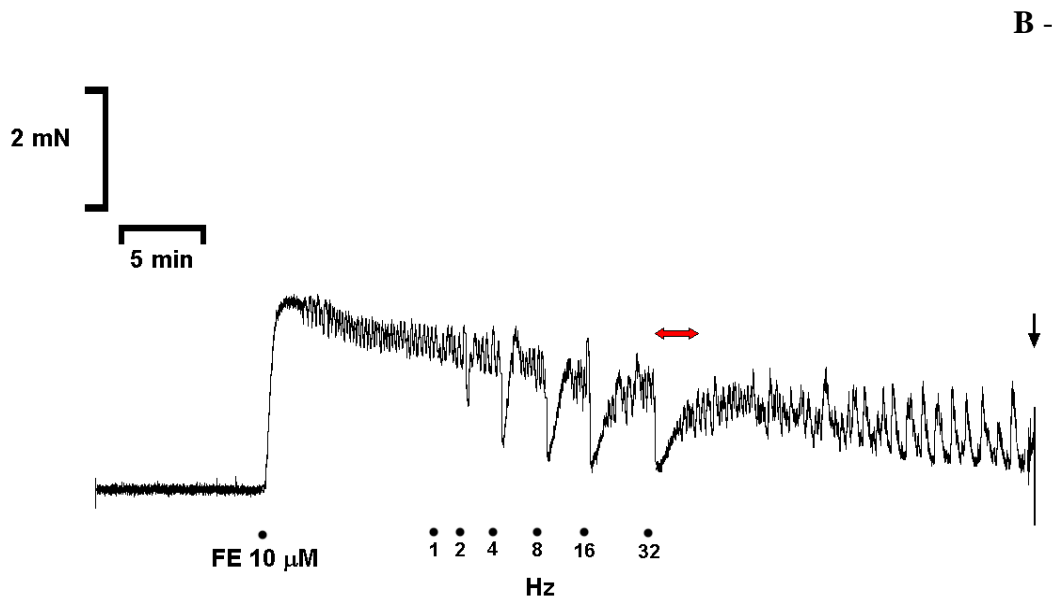
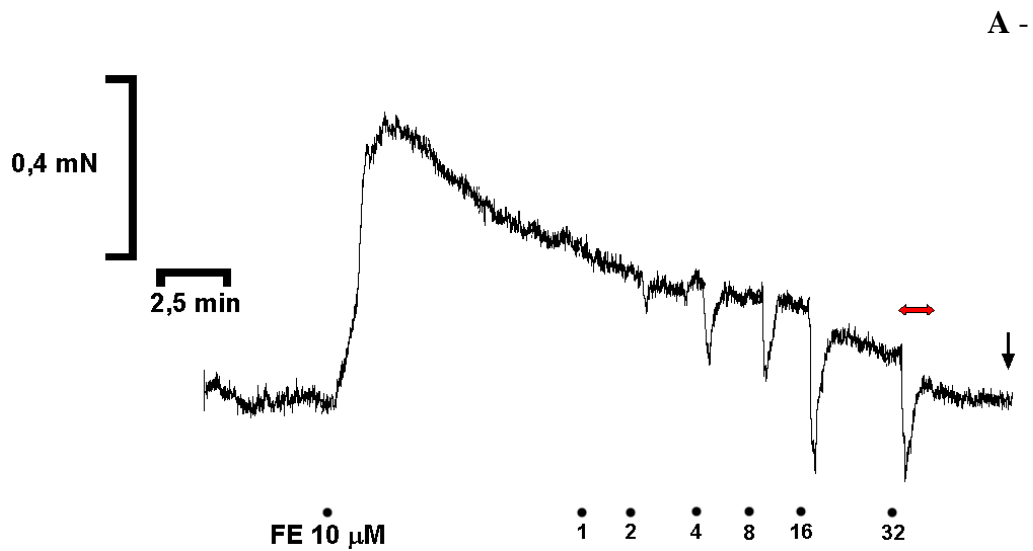


Figura 14. Latência da resposta obtida com a estimulação elétrica (EFS: 1 - 32 Hz) em corpo cavernoso de ratos (RCC) expostos aos poluentes. O painel A representa um traçado típico de preparação de animais submetidos ao veículo dos poluentes enquanto o painel B representa um traçado típico de preparação de animais submetidos aos poluentes. As setas pretas indicam lavagem da preparação. As setas vermelhas demonstram a duração do retorno ao tônus pré-contraído pela FE (10 μ M).

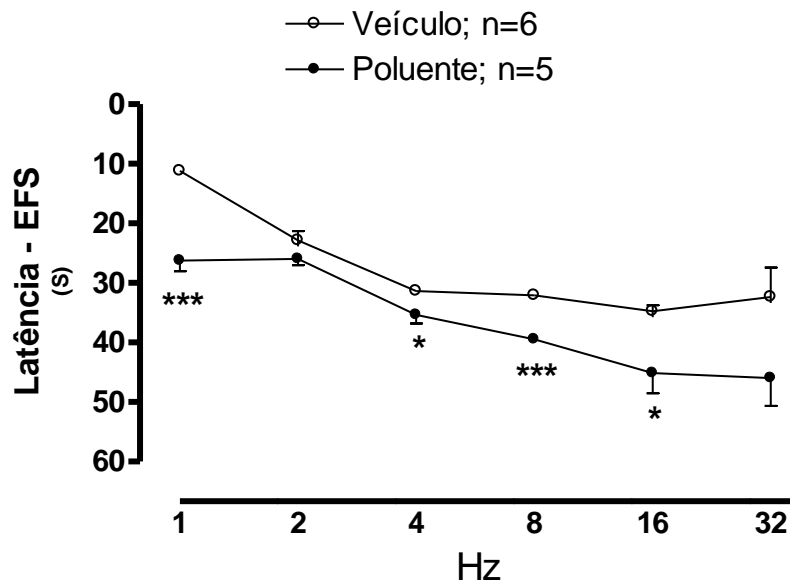


Figura 15. Efeito dos poluentes sobre a latência da resposta no corpo cavernoso de ratos (RCC) estimulado eletricamente (EFS: 1 - 32 Hz). Os círculos abertos representam as diferentes freqüências de estímulo elétrico em preparação de animais submetidos ao veículo dos poluentes. Os círculos fechados representam as diferentes freqüências de estímulo elétrico em preparação de animais submetidos aos poluentes. Os resultados estão expressos como média \pm EPM para 5-6 animais. *** $P < 0.0001$ e * $P < 0.05$ em relação aos valores controles.

Tabela 3 - Efeito da instilação i.tr. de poluentes sobre o relaxamento de corpo cavernoso de rato induzidos por EFS (1-32 Hz) e pré-contraídos por fenilefrina (FE, 10 µM). Os resultados estão expressos como média ± EPM de 5 a 7 animais; *P<0,05 vs controle.

Relaxamento						
<i>EFS</i>	Controle			Tratado		
	Média	EPM	n	Média	EPM	n
<i>1 Hz</i>	3,63	0,75	5	9,31*	1,89	7
<i>2 Hz</i>	12,47	1,63	5	26,51*	5,08	7
<i>4 Hz</i>	23,76	4,79	5	42,71*	5,58	7
<i>8 Hz</i>	33,82	6,99	5	46,77	4,97	7
<i>16 Hz</i>	42,56	7,15	5	56,69	3,69	7
<i>32 Hz</i>	50,85	7,62	5	64,52	4,32	7

4.3 Parâmetros bioquímicos

4.3.1 Concentração de nitrato total (NO_x^-) no plasma de ratos expostos aos poluentes

O tratamento i.tr. de ratos saudáveis com a mistura de poluentes não promoveu alteração significativa na concentração basal de nitrato total no plasma desses animais quando comparado ao grupo controle, que recebeu o veículo dos poluentes (Figura 16).

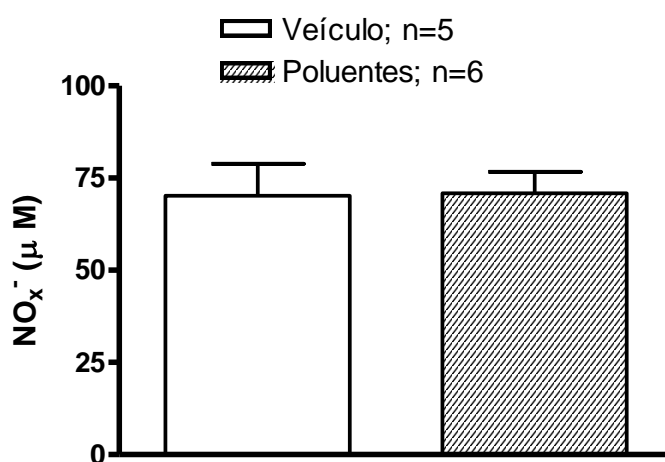


Figura 16. Concentração de nitrato total (NO_x^-) em plasma de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes. Os dados estão expressos como a média \pm E.P.M. de 5 a 6 animais.

4.3.2 Determinação do conteúdo tecidual de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) em diferentes tecidos

O tratamento dos animais com a mistura de poluentes diminuiu significativamente a concentração de produtos de reação do ácido tiobarbitúrico (TBARs) na aorta (RTA; Figura 17A; n=4) e pulmão (Figura 17B; n=4) desses animais em relação ao grupo controle. Nesses animais, o mesmo tratamento aumentou significativamente a concentração tecidual de TBARs na traquéia (Figura 17C; n=4) em relação ao grupo controle.

Esse mesmo tratamento não aumentou ou diminuiu, de maneira significativa, a produção de TBARS em amostras de corpo cavernoso dos animais ($13,31 \pm 0,58$ nmol aldeído/g; n=4) quando comparado ao corpo cavernoso do grupo controle, tratado com o veículo dos poluentes, ($12,13 \pm 0,91$ nmol aldeído/g; n=4). Da mesma forma, a exposição dos animais aos poluentes não afetou a produção basal de TBARs em outros órgão e tecidos, quando comparado ao grupo controle (Tabela 4).

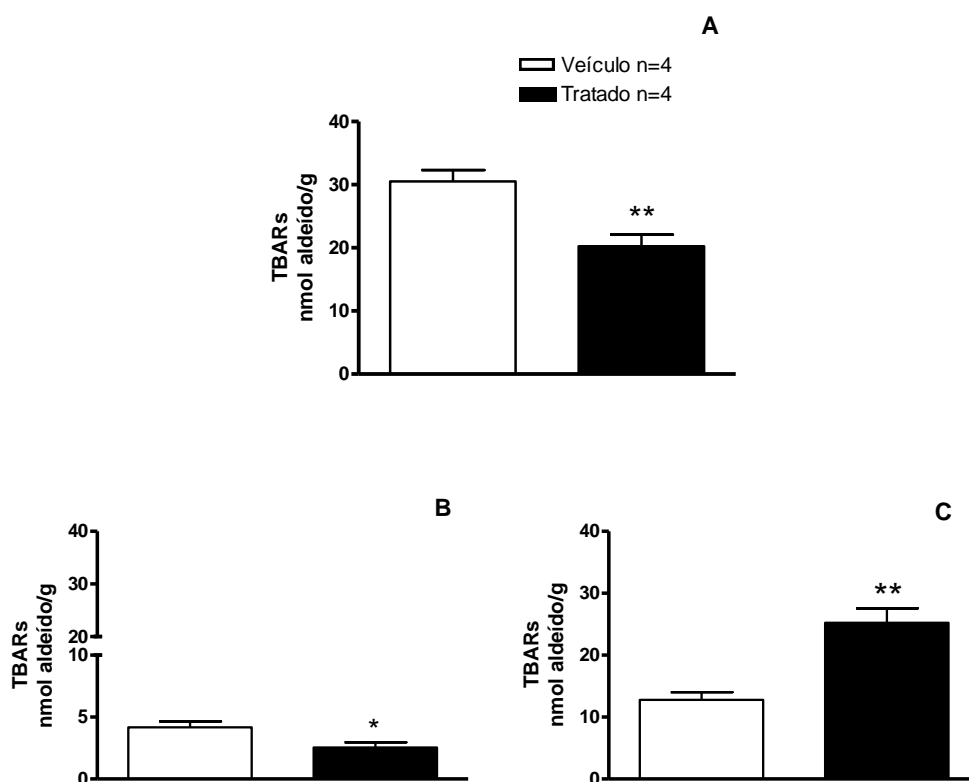


Figura 17. Concentração de TBARS em amostras de tecidos / órgãos de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes. O gráfico A ilustra os valores obtidos na aorta, enquanto os gráficos B e C mostram os valores mensurados no pulmão e traquéia, respectivamente. Os resultados estão expressos como nmol de aldeído formado por grama de tecido. Os dados estão expressos como a média \pm E.P.M. 4 animais.

Tabela 4 - Produção de TBARS em amostras de órgãos de ratos tratados com o veículo ou a mistura dos poluentes. Os resultados estão expressos como média \pm EPM para n animais.

TBARS (nmol aldeído/g)	VEÍCULO	TRATADO
FÍGADO	2,70 \pm 0,33 n=5	2,57 \pm 0,23 n=7
RIM	3,46 \pm 0,33 n=5	2,99 \pm 0,19 n=7
CORAÇÃO	3,15 \pm 0,51 n=5	3,15 \pm 0,34 n=5

4.3.3 Determinação da concentração de catalase em diferentes tecidos

O pré-tratamento dos ratos com a mistura de poluentes não aumentou a concentração de catalase (U Cat/ mg prot) na aorta (Figura 18A) ou tecido cavernoso (Figura 18B) destes em relação ao grupo controle. Da mesma forma, esse tratamento não aumentou a concentração de catalase (U Cat/ mg prot) no pulmão dos animais em relação ao grupo controle ($6,62 \pm 1,10$ U Cat/ mg prot grupo controle; $n=5$, e $7,45 \pm 0,87$ U Cat/ mg prot grupo tratado; $n=4$).

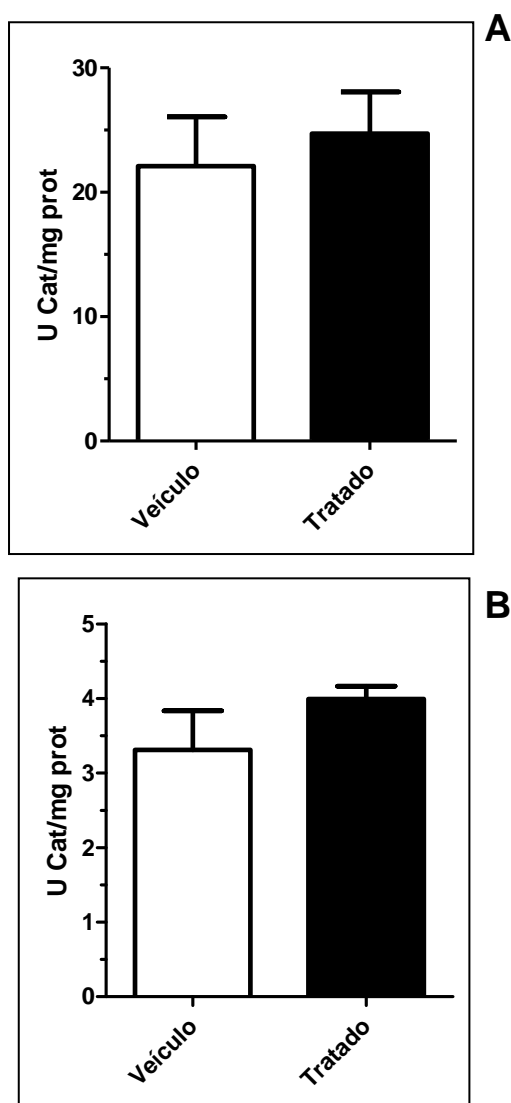


Figura 18. Concentração de catalase em amostras (A - Aorta; B - Corpo Cavernoso) de animais que receberam o veículo ou a mistura dos poluentes. Os resultados foram expressos como U Catalase por mg de proteína. Os dados estão expressos como a média \pm E.P.M. de 3 a 5 animais.

4.3.4 Efeito da exposição de ratos aos poluentes sobre a expressão gênica (RT-PCR em tempo real) das isoformas de NOS na aorta e corpo cavernoso

A taxa de expressão gênica das isoformas eNOS (Figura 19A) e iNOS (Figura 19B) na aorta de ratos tratados com a mistura de poluentes foi reduzida marcadamente quando comparado ao grupo controle.

Da mesma forma, a exposição dos animais aos poluentes reduziu de forma significativa a taxa de expressão gênica da eNOS (Figura 20A) e iNOS (Figura 20B) no corpo cavernoso destes mas, ao contrário, não afetou a taxa de expressão gênica da isoforma nNOS (Figura 20C), muito embora observou-se discreto aumento.

O tratamento dos ratos com a mistura de poluentes também reduziu significativamente a taxa de expressão gênica da eNOS no pulmão desses animais para $0,325 \pm 0,163$ (n=4, $P < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (n=5). A taxa de expressão gênica da iNOS no pulmão de ratos expostos aos poluentes foi reduzida para $0,520 \pm 0,249$ (n=4) quando comparado ao grupo controle (n=5) muito embora essa diferença não foi estatisticamente significativa.

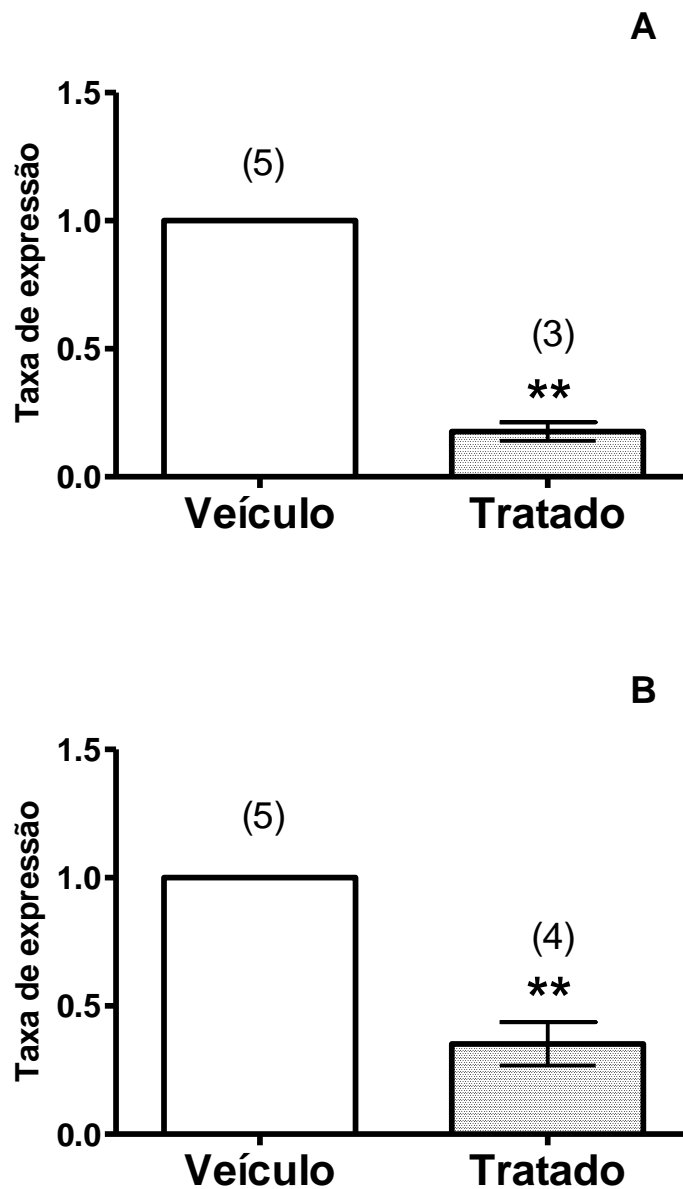


Figura 19. Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre as taxas de expressão gênica da eNOS e iNOS em aorta de ratos. A expressão relativa foi obtida comparando a expressão dos genes das isoformas de NOS do grupo tratado com o grupo controle obtida quando normalizadas pela expressão do gene HPRT. Os valores obtidos no grupo controle foram designados como 1 e os valores do grupo tratado foram normalizados com os dados obtidos na mesma corrida. **P<0.01 em relação ao respectivo controle.

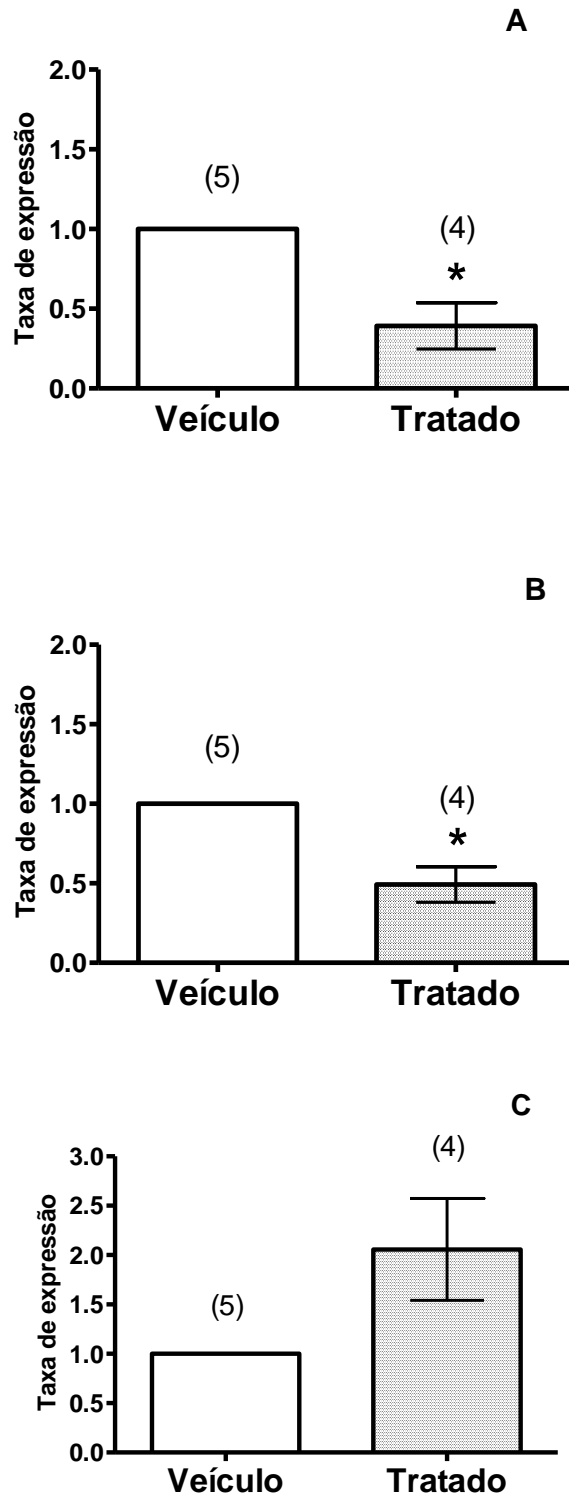


Figura 20. Efeitos do tratamento agudo com poluentes ou veículo sobre as taxas de expressão da eNOS, iNOS e nNOS em corpo cavernoso de ratos. A expressão relativa foi obtida comparando a expressão dos genes das isoformas de NOS do grupo tratado com o grupo controle obtida quando normalizadas pela expressão do gene HPRT. Os valores obtidos no grupo controle foram designados como 1 e os valores do grupo tratado foram normalizados com os dados obtidos na mesma corrida. * $P < 0.05$ em relação ao respectivo controle.

4.3.5 Avaliação de expressão protéica da nNOS (via Western Blot) no corpo cavernoso

O pré-tratamento dos animais com a mistura de poluentes aumentou discretamente, embora não de forma significativa, a expressão protéica da nNOS em homogenatos de tecido do corpo cavernoso dos animais (Figura 21A). Essa resposta foi semelhante ao demonstrado na amostra de glândulas pituitária (Figura 21B). A figura 21C demonstra o Western blot representativo de nNOS e PnNOS (controle positivo: amostra de pituitária) em homogenatos de tecido cavernoso de animais veículo e tratado com poluentes.

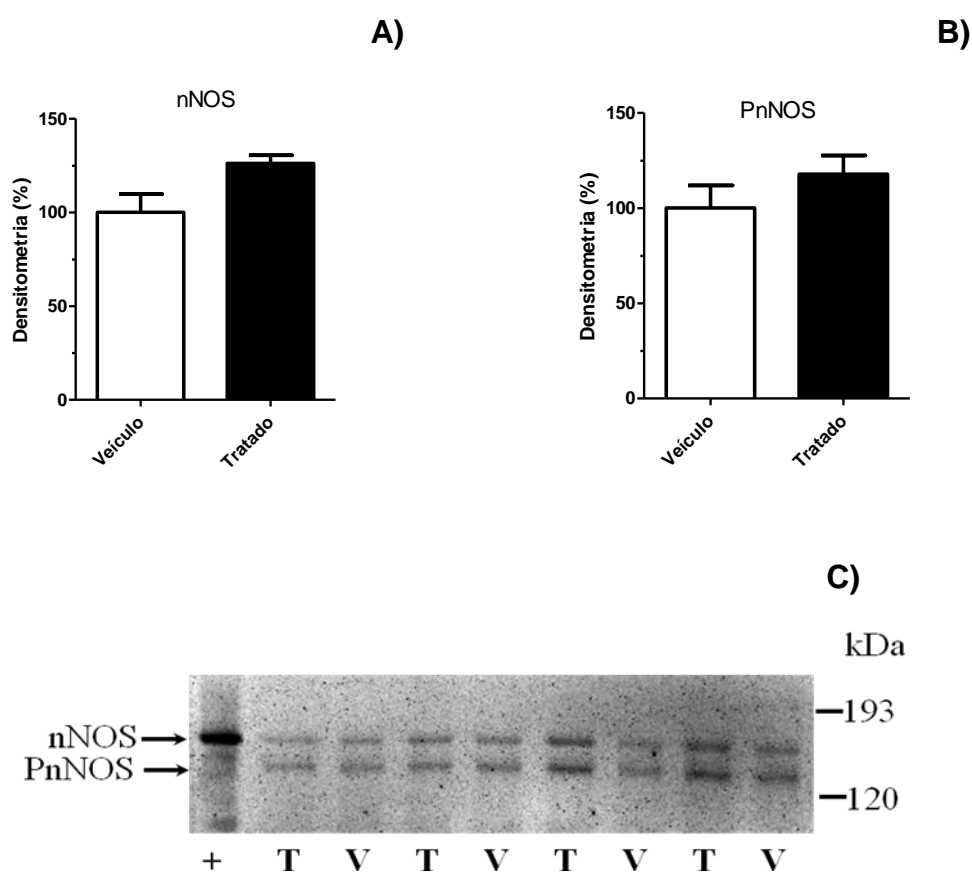


Figura 21. Avaliação de expressão protéica da isoforma da nNOS (Western Blot) no tecido cavernoso de animais veículo e tratado com poluentes. De acordo com a análise densitométrica (Painéis A e B) das bandas imunorreativas, nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos. O Painel C ilustra a membrana de Western blot representativo de nNOS e PnNOS (controle positivo: amostra de pituitária) em homogenatos de tecido cavernoso de animais veículo e tratado com poluentes (n=8).

4.3.6 Avaliação da concentração de citocinas no plasma

O pré-tratamento de animais com poluentes não alterou de maneira significativa a concentração da citocina IL-1 β ($79,64 \pm 63,84$ pg/ml; n=4) no plasma dos animais quando comparado ao valor do grupo controle tratados com o veículo dos poluentes ($61,98 \pm 47,01$ pg/ml; n=4). No plasma dos animais controle ou tratados não foi mensurado níveis detectáveis de TNF- α (n=5).

5 DISCUSSÃO

Devido à posição anatômica e ao papel funcional do trato respiratório, a qualidade do ar inspirado pode, muitas vezes, comprometer a função desse sistema e desencadear reações inflamatórias locais ou sistêmicas, como a asma e hipertensão (RUSZNAK et al., 1994; NEL et al., 1998; PEDEN, 1997; para revisão: WIDDICOMBE e LEE, 2001; PANDYA et al., 2002). Nesse sentido, cabe ressaltar que o extravasamento plasmático, um dos sinais clássicos da inflamação (e asma) nas vias aéreas (BURNETT et al., 1999), é altamente influenciado por vários componentes da poluição atmosférica, incluindo as PEDs (Mc CONNELL et al., 1999; HAJAT et al. 1999). Além do efeito das PED sobre a cascata imunológica (alergia / asma), estas atuam diretamente como agente irritante ou citotóxico no trato respiratório via mecanismo distinto daquele sugerido para a asma (BOLAND et al., 1999; PANDYA et al., 2002).

Um dos primeiros aspectos do presente estudo consistiu em investigar se o aumento na permeabilidade vascular e conseqüente extravasamento plasmático nas vias aéreas de ratos tratados agudamente, via i.tr., com a mistura de PED e 1,2-NQ (TELES et al., 2010) desencadearia, após 3h, alterações sistêmicas em outros compartimentos, incluindo a musculatura lisa vascular e do corpo cavernoso. Este estudo também avaliou possíveis mecanismos moleculares pelos quais as PED promoveriam essas alterações.

Ao investigar o efeito direto desse tratamento no pulmão constatou-se um aumento significativo do recrutamento de leucócitos mononucleares, mas não PMN, no espaço alveolar desses animais. Sabe-se que, tradicionalmente, o acúmulo de monócitos ocorre mais tardiamente do que o de neutrófilos; no entanto, evidências recentes demonstram que o influxo de células mononucleares pode ocorrer precocemente e / ou paralelamente às células PMN (HENDERSON et al., 2003; COSTA et al., 2006) em virtude da liberação de MCP-1 de macrófagos. Por outro lado, NEMMAR et al. (2003) observaram que a administração i.tr. de PED, numa dose inferior à utilizada neste estudo, causou influxo de neutrófilos no pulmão de cobaias. A discrepância entre esse e o presente estudo está, provavelmente, relacionada aos diversos fatores experimentais, incluindo volume e dose administrada, tempo de tratamento e espécie animal.

Em continuidade ao estudo, é de conhecimento que o sangue contém um meio intercelular (plasma) e três tipos celulares: séries vermelha (eritrócitos), branca (leucócitos) e plaquetária. No sangue periférico dos mesmos animais expostos à mistura

de poluentes observou-se diminuição significativa das células sanguíneas da série branca, caracterizada pelos linfócitos e, em menor proporção, neutrófilos segmentados e monócitos. Tais achados indicam uma possível mobilização dessas células do espaço intravascular para o foco inflamatório (pulmão). De forma semelhante, o esplenograma dos animais revelou redução significativa no número de leucócitos totais, a qual foi refletida na população de blastos, neutrófilos segmentados, linfócitos e EPO + EOC. Em contrapartida, uma leucocitose significativa foi observada na medula óssea desses ratos, a qual compreendeu neutrófilos (anelados e segmentados), monócitos, macrófagos e eritroblastos jovens. Conclui-se, portanto, que o aumento da população celular (série branca) no compartimento de reserva (medula óssea) ocorreu em paralelo com a maior mobilização necessária de leucócitos para o foco inflamatório (pulmão) de ratos tratados com os poluentes. Corroborando estes achados, Nemmar e Inuwa (2008) observaram que a administração endovenosa de baixas doses de PED (0.02 and 0.1mg/kg) causou, após 48h, inflamação sistêmica caracterizada por aumento na população de monócitos e granulócitos.

Por seu turno, a análise celular da série vermelha do sangue periférico dos animais expostos à mistura de poluentes revelou uma queda significativa da concentração de hemácias em relação ao grupo controle, reforçando o fato de que apesar do tratamento agudo, pela via i.tr., foi possível observar alterações em outros compartimentos, incluindo no tecido hematopoiético. Curiosamente, evidências anteriores suportam tais achados e mostram que animais tratados com PED ou outros MP exibiram aumento da agregação plaquetária, formação de trombo e conseqüente infarto agudo do miocárdio (NEMMAR et al., 2002; VERMYLEN et al., 2005).

Os aspectos celular, bioquímico e molecular responsáveis pelo acúmulo de leucócitos no foco inflamatório são fenômenos complexos, que dependem grandemente da interação leucócito-endotélio, moléculas de adesão (caderinas, selectinas, imunoglobulinas e integrinas) e geração local de mediadores químicos, como as citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL-1 β e IL-6. De fato, dados anteriores do grupo mostram que no homogenato do brônquio de ratos expostos às PED e 1,2NQ, observou-se um aumento significativo da concentração de TNF α , IL-1 β e IL-6 (TELES et al., 2007). Dentre essas citocinas, o TNF- α possui um papel de destaque nas vias aéreas, pois além de recrutar leucócitos para o pulmão (THOMMESEN et al., 1998), causa hiperreatividade brônquica (KIPS et al., 1992; YATES et al., 1993). É importante

salientar que, em contraste, a exposição dos animais à mistura de poluentes causou hiporreatividade brônquica e de anéis de traquéia em relação às respostas contráteis induzidas pela MCh na traquéia e brônquio principal de animais controle, sugerindo um possível efeito tóxico desses poluentes sobre a musculatura dessas estruturas. Nesse sentido, dados de Franco-Lino et al. (2006) mostram resultados semelhantes, nos quais o brônquio principal de rato exposto ao formaldeído também exibiu aspecto hiporreativo à MCh. Segundo esses autores, tal resposta deve-se ao envolvimento de mecanismos dependentes de NO, que parecem controlar o tônus bronquial, de neuropeptídeos e mediadores celulares liberados de mastócitos, responsáveis pelo processo inflamatório.

Com relação aos efeitos sistêmicos resultantes da exposição de animais a poluentes, tais como PED, alguns estudos sugerem que esses ocorrem como consequência da liberação de citocinas e quimiocinas do pulmão inflamado para a circulação (ARIMOTO et al., 2007; DONALDSON e MACNEE 2001). Em contrapartida, uma forte linha de evidências indica que o MP de pequeno diâmetro pode ser translocado do pulmão para outros compartimentos via circulação sistêmica e, como consequência, afetam outros órgãos e estruturas (TAKENAKA et al., 2001; POPE et al., 2002; NEMMAR et al., 2001, 2002, 2004, 2007, 2008, 2010). Neste estudo, o fato da aorta, mas não o tecido cavernoso, isolado dos animais expostos aos poluentes responder de forma mais intensa ao efeito relaxante, mas não contrátil (FE), induzido pela ACh mostra, pela primeira vez, que o tratamento dos animais com a mistura de poluentes, mesmo por curto período de tempo, causou efeito (direto ou indireto) em outros compartimentos e, neste caso, afetou o mecanismo de relaxamento dos vasos. É pouco provável que o aumento de relaxamento da aorta desses animais seja consequência do aumento de citocinas pró-inflamatórias circulantes, visto que as concentrações séricas de TNF α e IL-1 β não diferiram significativamente dos valores basais de animais controle, ou foram indetectáveis. Por outro lado, e apesar do diâmetro das PED não podemos excluir totalmente uma possível translocação desse material do pulmão para a corrente sanguínea.

Confirmado que a via de relaxamento dependente de NO na aorta, mas não no tecido cavernoso, foi afetada pelo tratamento dos animais com a mistura dos poluentes, a seguir fomos averiguar se no tecido cavernoso e anéis de aorta isolados desses mesmos animais as respostas induzidas pelo GTN, um doador de NO, estariam afetadas. Os resultados destes experimentos não revelaram alterações significativas nos anéis

isolados de aorta, reforçando o achado anterior e sugerindo que a intensificação do efeito relaxante inclui mecanismos dependentes do endotélio. É importante ressaltar que a aplicação sistêmica de PED *per se* reduziu a pressão arterial e a frequência cardíaca de ratos, bem como promoveu alterações morfológicas no pulmão e outros órgãos desses animais (NEMMAR et al., 2008, 2010). Ademais, em preparação de aorta de ratos *in vitro* outros estudos mostraram que a aplicação de MP coletado de diversas fontes, tais como de zonas urbanas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e PED de motor de motocicletas, promoveu o relaxamento desse tecido (BAGATE et al., 2004; KNAAPEN et al., 2001; KANG e CHENG, 1997). Em contrapartida, no tecido cavernoso dos animais expostos à mistura dos poluentes deste estudo, foi curioso observar que o relaxamento (E_{max}) frente ao GTN foi significativamente maior quando comparado aos animais controles. Tais resultados mostram que, ao contrário da aorta, a exposição aguda dos animais aos poluentes favoreceu o relaxamento do tecido cavernoso via mecanismo independente do endotélio, uma vez que o óxido nítrico liberado nestes tecidos tem origem em fibras não adrenérgicas e não colinérgicas.

A fim de compreender melhor o efeito observado no tecido cavernoso, investigou-se adiante a resposta induzida por estimulação elétrica (EFS) nesse mesmo órgão. Antes, porém, convém ressaltar que o bloqueio de receptores muscarínicos não inibe o relaxamento induzido por EFS (KLINGE e SJÖSTRAND, 1977; ANDERSSON et al., 1983; HOLMQUIST et al., 1992). Ademais, está bem estabelecido que a ACh endógena liberada das fibras colinérgicas não atua como um fator majoritário na geração de NO em tecido erétil. Já as terminações NANC do tecido cavernoso produzem e liberam altas concentrações de NO (SJÖSTRAND e KLINGE, 1979; ANDERSSON e WAGNER, 1995). Corroborando tais evidências, Oliveira et al. (2003) demonstraram que o relaxamento causado pela EFS ou por ativadores de canal de sódio (sítios 2, 3, 4, 5) foi inibido por bloqueadores de canais de sódio (atuantes no sítio 1), tais como a tetrodotoxina e saxitoxina, confirmando uma resposta essencialmente dependente das fibras NANC. Neste estudo, observou-se que a EFS, em menores frequências, do tecido cavernoso dos animais expostos aos poluentes promoveu o relaxamento maior desse tecido em comparação aos animais controle, cujo perfil de resposta foi caracterizado por amplitude mais ampla e um retorno mais demorado à linha de base. Tais resultados indicam que, assim como os achados descritos por Oliveira et al. (2003), o relaxamento induzido por EFS no tecido cavernoso de ratos expostos aos poluentes ocorre dependentemente da liberação de NO de fibras NANC.

Sabendo da complexa composição das PED, torna-se inviável sugerir os principais componentes químicos causadores desses efeitos e seus possíveis mecanismos de ações, muito embora evidências nossas e de outros autores mostram que as quinonas, tais como a 1,2-NQ, representam um dos principais componentes lesivos das PED (OHTOSHI, et al. 1998; YANG et al. 1999; TELES et al., 2010). Vale acrescentar que o excesso de EROs e ERN causa efeitos prejudiciais ao organismo, tais como peroxidação dos lipídios da membrana celular, inativação de enzimas e das proteínas dos tecidos e DNA. Assim, atuam como fatores causais ou agravantes de várias doenças (PIETTA, 2000). Nesse sentido, dados interessantes de Liu e Meng (2005) demonstram que a administração i.tr. do MP_{2,5}, em doses elevadas, aumentou significativamente os níveis de peroxidação lipídica nos pulmões e testículos dos animais. Esses mesmos autores observaram redução das atividades da SOD, CAT e glutathiona peroxidase (GPx) e, ainda, concentrações reduzidas de glutathiona redutase (GSH) nos pulmões, fígado, rins e cérebro dos animais. Neste estudo, ao contrário, a avaliação dos indicadores de estresse oxidativo nos diversos órgãos e tecidos dos ratos expostos à mistura de poluentes mostrou redução (\cong 60%) significativa do conteúdo basal de TBARs (peroxidação lipídica basal) na aorta e pulmão, mas não nos demais tecidos dos animais expostos aos poluentes; um efeito este sugestivo de ação antioxidante ou de efeito independente de alterações oxidativas. Curiosamente, na traquéia desses mesmos animais observou-se um aumento significativo do conteúdo de TBARs. Assim, é possível que esta discrepância nos níveis de peroxidação lipídica na traquéia e demais tecidos pode ser consequência do efeito direto da administração i.tr. dos poluentes. De fato, estudos anteriores sugerem que a exposição de camundongos às PEDs aumenta a atividade da P450 redutase, uma enzima que aumenta a produção de superóxido. Assim fornece um possível mecanismo pelo qual as PEDs podem estimular a produção de superóxido (LIM et al., 1998). Embora levando a uma crescente produção de superóxido as PEDs podem também reduzir a atividade de *scavenging* da superóxido dismutase (SOD) e glutathiona in vitro, por exemplo quando a catalase antioxidante foi exposta ao estresse oxidativo do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na presença de PEDs e clorina, a atividade da catalase foi inibida dependentemente da dose (MORI et al., 1996).

Por outro lado, vale ressaltar que o tratamento dos animais com a mistura de poluentes não afetou a atividade da enzima CAT na aorta, tecido cavernoso ou pulmões dos animais, indicando que a dose e tempo de tratamentos efetuados com a mistura de

poluentes não foram capazes de afetar o estado redox nesses órgãos e tecidos. Isto é curioso, pois é sabido que alguns compostos orgânicos (ex.: quinona) possuem a capacidade de inibir as atividades da SOD e da CAT e, conseqüentemente, bloqueiam suas ações antioxidantes (KUMAGAI et al., 1995; MORI et al., 1996).

No intuito de esclarecer melhor as atividades antioxidante / oxidante contrastantes do tratamento *in vivo* com a mistura de poluentes sobre o tecido vascular, tecido cavernoso e outros tecidos, investigou-se *in vitro*, via determinação da atividade do *scavenger* do radical DPPH, o efeito antioxidante da 1,2-NQ. No range de concentração utilizado da 1,2-NQ, o resultado da análise não revelou qualquer potencial antioxidante para a 1,2-NQ (concentração eficaz $CE_{50} > 1000$ mmol / mol DPPH) frente ao radical DPPH. Em vista destes resultados, é possível especular que o mecanismo pelo qual a mistura de poluentes reduziu a concentração de TBARs (peroxidação lipídica) na aorta e pulmão dos animais depende da capacidade da 1,2-NQ e / ou outros compostos químicos presentes nas PED estimularem *de novo* outras defesas antioxidantes.

Por outro lado, achados experimentais de Kang et al. (2006) mostram que análogos da naftoquinona provocaram disfunção vascular importante na aorta isolada de ratos bem como em cultura de células do cordão umbilical humano por um mecanismo dependente do aumento na geração do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e de alterações na biossíntese de NO proveniente do endotélio. Dentre os efeitos biológicos do NO, está bem estabelecido que o relaxamento do músculo liso (vasodilatação) e a broncodilatação são alguns deles. Considerado um importante sinalizador intracelular / extracelular altamente lipofílico, o NO é sintetizado por uma grande variedade de células (ex.: células endoteliais, macrófagos, alguns tipos de neurônios e outras) via ações de enzimas específicas (eNOS, nNOS e iNOS). Neste estudo, a determinação da concentração de nitrato total, via método de Griess, não demonstrou qualquer alteração na concentração basal sérica desta molécula nos animais expostos aos poluentes. Porém, observou-se baixa taxa de expressão gênica das enzimas eNOS e iNOS na aorta dos animais tratados com os poluentes quando comparado ao valor basal do grupo controle. Isto é curioso, pois o estudo funcional da aorta *in vitro* mostrou exacerbação da resposta relaxante desse tecido frente à ACh. Poderíamos explicar tal efeito devido a uma maior biodisponibilidade de NO, o que levaria a célula a diminuir a produção de enzima, diminuindo a transcrição ou aumentando a degradação de RNA. Corroborando nossos achados, outros autores demonstraram que a incubação de anéis de aorta *in vitro* com

suspensão de PED em diferentes concentrações (1 - 100 pg/ml) por 60 min e brônquio isolado (100 pg/ml / 60 min) inibiu a geração de NO desses tecidos (MUTO et al.; 1996). Em contrapartida, outras evidências revelaram que níveis elevados de isoformas iNOS e eNOS foram detectados nas vias aéreas de animais expostos às PED (0,1% de 1 ou 2 mg/ml) via i.tr., uma vez por semana durante 10 semanas (LIM et al., 1998).

De forma semelhante, observamos que a taxa de expressão gênica das isoformas eNOS e iNOS mostrou-se significativamente reduzida no tecido cavernoso (eNOS somente no pulmão) dos animais expostos aos poluentes. Esse mesmo tratamento elevou, embora não de forma significativa, a taxa de expressão gênica e protéica da nNOS nesse mesmo tecido. Tais resultados são indicativos que, no tecido cavernoso, o aumento das taxas de expressão gênica e protéica da enzima nNOS (e possível aumento na geração de NO) contribui para aumentar a resposta relaxante frente ao GTN e EFS.

Por fim, sabe-se que além do NO, outras substâncias possuem a capacidade de relaxar e/ou contrair a musculatura lisa, o que poderia explicar este paradoxo. Dentre elas, as prostaglandinas (PGs) formadas a partir do ácido araquidônico via ação enzimática das ciclooxigenases (COX), têm demonstrado um papel relevante nas respostas residuais (ZHANG et al., 2006), bem como alguns neuropeptídeos liberados de terminais nervosos sensoriais (ex.: CGRP) ou de fibras NANC (ANDERSSON, 2000). A possibilidade de que as PGs ou o CGRP estejam envolvidos na ampliação do efeito relaxante no tecido cavernoso é pouco plausível, visto que os tecidos foram incubados com indometacina, um inibidor inespecífico de COX, e, ainda, alguns animais foram pré-tratados com capsaicina (dados não apresentados), um agente capaz de depletar estoques de neuropeptídeos das fibras sensoriais, nestes animais as respostas não foram significativamente diferentes das obtidas em animais controles.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem-nos concluir que:

1. A administração i.tr. da mistura de poluentes (PED e 1,2-NQ) causa, após 3h., inflamação pulmonar associada à disfunção (hiporreatividade) brônquica e traqueal, e efeitos sistêmicos em outros compartimentos, tais como aumento da população de leucócitos na medula óssea e diminuição no sangue periférico; ampliação do efeito relaxante no tecido vascular (frente a ACh) e cavernoso (frente ao GTN e EFS);
2. Estes efeitos sistêmicos ocorreram independentemente do aumento da gênese (local e sistêmica) de citocinas pró-inflamatórias parecendo estar mais relacionado à redução do conteúdo basal de TBARs (peroxidação lipídica basal) na aorta e pulmão; um efeito este sugestivo de ação antioxidante ou de efeito independente de alterações oxidativas;
3. A ampliação do efeito relaxante (frente ao GTN e EFS) no tecido cavernoso deve-se, ao aumento na produção de NO de origem neuronal. Em contrapartida, apesar da redução significativa na expressão gênica de eNOS no tecido liso vascular (aorta) desses animais, o aumento do efeito relaxante frente a ACh indica fortemente um efeito dependente do endotélio.
4. Concluimos que as alterações sistêmicas (aorta e corpo cavernoso) resultantes do tratamento agudo i. tr. com a mistura de PED e 1,2-NQ não dependem de mecanismos pró-oxidativos desses poluentes; no entanto, é possível que estas ocorram pela capacidade da 1,2-NQ e / ou outros compostos químicos presentes nas PED estimularem *de novo* outras defesas antioxidantes.

REFERÊNCIAS*

ANDERSSON, K. E.; HEDLUND, P. New directions for erectile dysfunction therapies. **Int. J. Impot. Res.**, v. 14, n. 1, p. 82-92, 2002.

ANDERSSON, K. E. Pharmacology of penile erection. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, n. 3, p. 417-50, 2001.

ANDERSSON, K. E. Neurotransmitters: central and peripheral mechanisms. **Int. J. Impot. Res.**, v. 12, n. 4, p. 26-33, 2000.

ANDERSSON, K. E.; WAGNER, G. Physiology of penile erection. **Physiol. Rev.**, v. 75, p. 191-236, 1995.

ANDERSSON, K. E.; HEDLUND, H.; MATTIASSON, A.; SJÖGREN, C.; SUNDLER, F. Relaxation of isolated human corpus spongiosum induced by vasoactive intestinal polypeptide, substance P, carbachol and electrical field stimulation. **Wor. J. Urol.**, v. 1, p. 203-208, 1983.

ARIMOTO, T.; TAKANO, H.; INOUE, K.; YANAGISAWA, R.; YOSHINO, S.; YAMAKI, K.; YOSHIKAWA, T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particle components enhances circulatory chemokines during lung inflammation. **Int. J. Immunopathol. Pharmacol.**, v. 20, n. 1, p. 197-201, 2007.

ARMANI, C.; LANDINI, L. J. R.; LEONE A. Molecular and biochemical changes of the cardiovascular system due to smoking exposure. **Curr. Pharm. Des.**, v. 15, n. 10, p. 1038-53, 2009.

BAGATE, K.; MEIRING, J. J.; CASSEE, F. R.; BORM, P. J. The effect of particulate matter on resistance and conductance vessels in the rat. **Inhal. Toxicol.**, v. 16, n. 6-7, p. 431-6, 2004.

BASU, R. High ambient temperature and mortality: a review of epidemiologic studies from 2001 to 2008. **Environ. Health**, v. 16, p. 8-40, 2009.

BASU, A.; RYDER, R. E. New treatment options for erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus. **Drugs**, v. 64, n. 23, p. 2667-88, 2004.

BECKER, S.; SOUKUP, J. M.; GILMOUR, M. I.; DEVLIN, R. B. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: Effects on oxidant radical generation and cytokine production. **Toxic. Appl. Pharm.**, v. 141, p. 637-648, 1996.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELL, M. L.; DAVIS, D. L.; GOUVEIA, N.; BORJA-ABURTO, V. H.; CIFUENTES, L. A. The avoidable health effects of air pollution in three Latin American cities: Santiago, Sao Paulo, and Mexico City. **Environ. Res.**, v. 100, n. 3, p. 431-40, 2006.

BERNSTEIN, J. A.; ALEXIS, N.; BARNES, C.; BERNSTEIN, I. L.; BERNSTEIN, J. A.; NEL, A.; PEDEN, D.; DIAZ-SANCHEZ, D.; TARLO, S. M, WILLIAMS, P. B. Health effects of air pollution. **J. All. Clin. Immunol.**, v. 114, n. 5, p. 1116-23, 2004.

BIVALACQUA, T. J.; CHAMPION, H. C.; ABDEL-MAGEED, A. B.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Gene transfer of prepro-calcitonin gene-related peptide restores erectile function in the aged rat. **Biol. Reprod.**, v. 65, n. 5, p. 1371-7, 2001.

BOLAND, S.; BAEZA-SQUIBAN A.; FOURNIER, T.; HOUCINE, O.; GENDRON, M. C.; CHEVRIER, M.; JOUVENOT, G.; COSTE, A.; AUBIERM MARANO F. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, v. 276, n. 4, p. L604-L613, 1999.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. **Brit. Jour. Nutr.**, v. 97, p. 307-314, 2007.

BOSE, R.; SUTHERLAND, G. R.; PINSKY, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. **Neurochem. Res.**, v. 14, n. 3, p. 217-20, 1989.

BROOK, R. D.; FRANKLIN, B.; CASCIO, W.; HONG, Y.; HOWARD, G.; LIPSETT, M.; LUEPKER, R.; et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. **Circulation**, v. 109, n. 21, p. 2655-2671, 2004.

BRUNEKREEF, B.; BEELEN, R.; HOEK, G.; SCHOUTEN, L.; BAUSCH-GOLDBOHM, S.; FISCHER P.; ARMSTRONG, B.; HUGHES, E.; JERRETT, M.; VAN DEN BRANDT P. Effects of long-term exposure to traffic-related air pollution on respiratory and cardiovascular mortality in the Netherlands: the NLCS-AIR study. **Res. Rep. Heal. Eff. Inst.**, v. 139, n. 5, p. 73-89, 2009.

BURNETT, R. T.; SMITH-DOIRON, M.; STIEB, D.; CAKMAK, S.; BROOK, J. R. Effects of particulate and gaseous air pollution on cardio respiratory hospitalizations. **Arch. of Environm. Heal.**, v. 54, p. 130-139, 1999.

CADENAS, E.; HOCHSTEIN, P.; ERNSTER, L. Pro- and antioxidant functions of quinones and quinone reductases in mammalian cells. **Adv. Enzymol. Relat. Are. Mol. Biol.**, v. 65, p. 97-146, 1992.

CHAMPION, H. C.; WANG, R.; SANTIAGO, J. A.; MURPHY, W. A.; COY, D. H.; KADOWITZ, P. J.; HELLSTROM, W. J. Comparison of responses to adrenomedullin and calcitonin gene-related peptide in the feline erection model. **J. Androl.**, v. 18, n. 5, p. 513-21, 1997.

CHEN, J. C.; SCHWARTZ, J. Metabolic syndrome and inflammatory responses to long-term particulate air pollutants. **Environ. Healt. Perspect.**, v. 116, n. 5, p. 612-7, 2008.

CHO, A. K.; DI STEFANO, E.; YOU, Y.; RODRIGUEZ, C. E.; SCHMITZ, D. A.; KUMAGAI, Y.; MIGUEL, A. H.; EIGUREN-FERNANDEZ, A.; KOBAYASHI, T.; AVOL E. and FROINES J. R. Determination of Four Quinones in Diesel Exhaust Particles, SRM 1649a, and Atmospheric PM_{2.5}. **Aeros. Sci. Technol.**, v. 38, n. 1, p. 1-14, 2004.

COSTA S. K.; YSHII L. M.; POSTONR N.; MUSCARA M. N.; BRAIN S. D. Pivotal role of endogenous tachykinins and the nk1 receptor in mediating leukocyte accumulation, in the absence of oedema formation, in response to TNF alpha in the cutaneous microvasculature. **J. Neuroimmunol.**, v. 171, n. 1-2, p. 99-109, 2006.

DELFINO, R. J.; ZEIGER, R. S.; SELTZER, J. M.; STREET, D. H.; MCLAREN, C. E. Association of asthma symptoms with peak particulate air pollution and effect modification by anti-inflammatory medication use. **Environm. Healt. Perspect.**, v. 110, p. A607-A617, 2002.

DONALDSON, K.; STONE, V.; CLOUTER, A.; RENWICK, L.; MACNEE, W. Ultrafine particles. **Occup. Environ. Med.** v. 58, n. 3, p. 211-6, 2001.

DONALDSON, K.; MACNEE W. Ultrafine particle, oxidative stress and lung inflammation. Biomedicine Research Group School of Life Sciences, Napier University and ELEGI Colt Laboratory, **Medic. School.**, University of Edinburgh, Edinburgh, Scotland. 2001.

FAZIO, L.; BROCK, G. Erectile dysfunction: management update **C.M.A.J.**, v. 27, n. 170(9), p. 1429-37, 2004.

FRANCO LINO DOS SANTOS, A.; DAMAZO, A. S.; BERALDO DE SOUZA, H. R.; DOMINGOS, H. V.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.; OLIANI, S. M., COSTA, S. K., TAVARES DE LIMA, W. Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 214, p. 35-42, 2006.

FOURNIER, G. R. JR.; JUENEMANN, K. P.; LUE T. F.; TANAGHO, E. A. Mechanisms of venous occlusion during canine penile erection: an anatomic demonstration. **J. Urol.**, v. 137, n. 1, p. 163-7, 1987.

GARG, B. D.; CADLE, S. H.; MULAWA, P. A.; GROBLICKI, P. J.; LAROO, C.; AND PARR, G. A. Brake wear particulate matter emissions. **Environ. Sci. Technol.**, v. 34, n.21, p. 4463-4469, 2000.

GOLDBERG, M. S.; BURNETT, R. T.; BAILAR, J. C. 3RD; TAMBLYN, R.; ERNST, P.; FLEGEL, K.; BROOK, J.; BONVALOT, Y.; SINGH, R.; VALOIS, M. F.; VINCENT, R. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n. 4, p. 487-94, 2001.

GOLDSTEIN, A. M. B.; MEEHAN, J. P.; ZAKHARY, R.; BUCKLEY, P. A. e ROGERS, F. A. New observations on microarchitecture of corpora cavernosa in man and possible relationship to mechanism of erection. **Urology**, v. 3, p. 259-266, 1982.

HAJAT, S.; HAINES A, GOUBET S. A.; ATKINSON, R. W.; ANDERSON H. R. Association of air pollution with daily GP consultations for asthma and other lower respiratory conditions in London. **Thorax**, v. 54, p. 597–605, 1999.

HAMOIR, J.; NEMMAR, A.; HALLOY, D.; WIRTH, D.; VINCKE, G.; VANDERPLASSCHEN, A.; NEMERY, B.; GUSTIN, P. Effect of polystyrene particles on lung microvascular permeability in isolated perfused rabbit lungs: role of size and surface properties. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 190, n. 3, p. 278-285, 2003.

HENDERSON, R. B.; HOBBS J. A.; MATHIES M.; HOGG N. Rapid recruitment of inflammatory monocytes is independent of neutrophil migration. **Blood**, v. 102, p. 328-335, 2003.

HOEK, G.; BRUNEKREEF, B.; FISCHER, P.; VAN WIJNEN, J. The association between air pollution and heart failure, arrhythmia, embolism, thrombosis, and other cardiovascular causes of death in a time series study. **Epidemiology**, v. 12, n. 3, p. 355-7, 2001.

HOLMQUIST, F.; HEDLUND, H.; ANDERSSON K. E. Characterization of inhibitory neurotransmission in the isolated corpus cavernosum from rabbit and man. **J. Physiol.**, v. 449, p. 295-311, 1992.

IGNARRO, L. J.; BUSH, P. A; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; FUKUTO, J. M.; RAJFER, J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 170, p. 843-850, 1990.

IGNARRO, L. J.; BYRNS, R. E.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; CHAUDHURI, G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 244, n. 1, p. 181-9, 1988.

KANG, J. J.; LEE, P. J.; CHEN, Y. J.; LEE, C. C.; LI, C. H.; CHENG, H. W.; CHENG, Y. W. Naphthazarin and methylnaphthazarin cause vascular dysfunction by impairment of endothelium-derived nitric oxide and increased superoxide anion generation. **Toxicol. In Vitro**, v. 20, n. 1, p. 43-51, 2006.

KANG, J. J.; CHENG, Y. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons-induced vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelium of rat aorta. **Toxicol. Lett.**, v. 19, n. 93(1), p. 39-45, 1997.

KARAKATSANI, A.; KAPITSIMADIS, F.; PIPIKOU, M.; CHALBOT, M. C.; KAVOURAS I. G.; ORPHANIDOU, D.; PAPIRIS, S.; KATSOUYANNI, K. Ambient air pollution and respiratory health effects in mail carriers. **Environ. Res.**, v. 110, n. 3, p. 278-85, 2010.

KIKUNO, A. S.; TAGUCHIB, K.; IWAMOTOB, N.; YAMANOC, S.; CHOD, A. K.; FROINESD, J. R.; KUMAGAI B. Y. 1,2-Naphthoquinone Activates Vanilloid Receptor 1 Through Increased Protein Tyrosine Phosphorylation, Leading To Contraction Of Guinea Pig Trachea **Toxic. Applied Pharmac.**, v. 210, p. 47-54, 2006.

KIM, N.; VARDI, Y; PADMA-NATHAN, H.; DALEY, J.; GOLSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA, I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway: physiological role in penile erection. **J. Clin. Invest.**, v. 91, p. 437-442, 1993.

KLINGE, E.; SJÖSTRAND, N. O. Suppression of the excitatory adrenergic neurotransmission: a possible role of cholinergic nerves in the refractor penis muscle. **Acta Physiol. Scand.**, v. 100, p. 368-376, 1977.

KNAAPEN, A. M.; DEN HARTOG, G. J.; BAST, A.; BORM, P. J. Ambient particulate matter induces relaxation of rat aortic rings in vitro. **Hum. Exp. Toxicol.**, v. 20, n. 5, p. 259-65, 2001.

KIPS, J.C.; TAVERNIER, J.; PAUWELS, R.A. Tumor necrosis factor causes bronchial hyperresponsiveness in rats. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 145, n. 2 (Pt 1), p. 332-336, 1992.

KRANE, R. J.; GOLDSTEIN, I.; SAENZ DE TEJADA I. Impotence. **N. Engl. J. Med.**, v. 321, p. 1648-1659, 1989.

KREYLING, W. G.; SEMMLER-BEHNKE, M.; SEITZ, J.; SCYMCZAK, W.; WENK, A.; MAYER, P.; TAKENAKA, S.; OBERDÖRSTER, G. Size dependence of the translocation of inhaled iridium and carbon nanoparticle aggregates from the lung of rats to the blood and secondary target organs. **Inhal. Toxicol.**, v. 21, n. 1, p. 55-60, 2009.

KUMAGAI Y.; TAIRA J.; SAGAI M. Apparent inhibition of superoxide dismutase activity in vitro by diesel exhaust particles. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 365-371, 1995.

LEWIS, M.; MOLLISON, P.; WEATHERALL, D. Sir John Vivian Dacie: 20 July 1912 - 12 February 2005. **Biogr. Mem. Fellows R. Soc.** v. 52, p. 67-82, 2006.

LICHTENFELS A. J.; GOMES J. B.; PIERI P. C.; EL KHOURI MIRAGLIA S. G.; HALLAK J.; SALDIVA P. H. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, **Brazil. Fertil. Steril.**, v. 87, n. 1, p. 230-2, 2007.

LIM H. B.; ICHINOSE T.; MIYABARA Y.; TAKANO H.; KUMAGAI Y.; SHIMOJYO N.; DEVALIA J. L.; SAGAI M. Involvement of super-oxide and nitric oxide on airway inflammation and hyper-responsiveness induced by diesel exhaust particles in mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 25, n. 6, p. 635-644, 1998.

LIU, X.; MEN, G. Z. Effects of airborne fine particulate matter on antioxidant capacity and lipid peroxidation in multiple organs of rats. **Inhal. Toxicol.**, v. 17, n. 9, p. 467-73, 2005.

LUCAS, K. A.; PITARI, G. M.; KAZEROUNIAN, S; RUIZ-STEWART, I; PARK, J.; SCHULZ, S; CHEPENIK, K. P. e WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, p. 375-414, 2000.

LUE, T. F. Erectile Dysfunction. **Drug Ther.**, v. 342, p. 1802-1813, 2000.

MATSUMOTO, G.; NAKAGAWA, N. K.; VIEIRA R. P.; MAUAD, T.; DA SILVA L. F.; DE ANDRÉ C. D.; CARVALHO-OLIVEIRA R., SALDIVA P. H.; GARCIA M. L. The time course of vasoconstriction and endothelin receptor A expression in pulmonary arterioles of mice continuously exposed to ambient urban levels of air pollution. **Environ. Res.**, v. 110, n. 3, p. 237-43, 2010.

Mc CONNELL, R.; BERHANE, K.; GILLILAND, F.; LONDON, S.J.; VORA, H.; AVOL E.; GAUDERMAN, W.J.; MARGOLIS, H. G.; LURMANN, F.; THOMAS, D. C.; et al. Air pollution and bronchitic symptoms in southern California children with asthma. **Environ. Health Perspect.**, v. 107, n. 9, p. 1-9, 1999.

MIRAGLIA, S. G.; SALDIVA, P. H.; BOHM, G. M. An evaluation of air pollution health impacts and costs in Sao Paulo, Brazil. **Environ. Manage**, v. 35, n. 5, p. 667-76, 2005.

MONKS, T. J.; JONES, D. C. The metabolism and toxicity of quinones, quinonimines, quinone methides, and quinone-thioethers. **Curr. Drug Metab.**, v. 3, n. 4, p. 425-38, 2002.

MORI, Y.; MURAKAMI, S.; SAGAI, T.; HAYASHI, H.; SAKATA, M.; SAGAI, M.; KUMAGAI, Y.; SAGAE, T. Inhibition of catalase activity in vitro by diesel exhaust particles. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 47, p. 125-134, 1996.

MUTO, E.; HAYASHI, T.; YAMADA, K.; ESAKI, T.; SAGAI M.; IGUCHI, A. Endothelial-constitutive nitric oxide synthase exists in airways and diesel exhaust particulates inhibit the effect of nitric oxide. **Life Sci.**, v. 59, n. 18, p. 1563–1570, 1996.

NASCIMENTO, L. F.; PEREIRA, L. A.; BRAGA, A. L.; MÓDOLO, M. C.; CARVALHO, J. A. JR. Effects of air pollution on children's health in a city in Southeastern Brazil. **Rev. Saúde Pub.**, v. 40, n. 1, p. 77-82, 2006.

NEL, A. E.; DIAZ-SANCHEZ, D. N. G. G.; HIURA, T.; SAXON, A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 102, n. 4 (pt 1), p. 539–554, 1998.

NEMMAR, A.; AL-SALAM, S.; ZIA S.; DHANASEKARAN, S.; SHUDADEVI, M.; ALI, B. H. Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. **Toxicol. Lett.**, v. 4, n. 194 (3), p. 58-65, 2010.

NEMMAR, A. e INUWA, M. B. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. **Toxicol. Lett.**, v. 4, n. 176 (1), p. 20-30, 2008.

NEMMAR, A.; AL-MASKARI, S.; ALI, B. H.; AL-AMRI, I. S. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 292, p. L664-L670, 2007.

NEMMAR, A.; HOYLAERTS, M. F.; HOET, P. H.; NEMERY, B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. **Toxicol. Lett.** v. 1, n. 149 (1-3), p. 243-53, 2004.

NEMMAR A.; NEMERY B.; HOET P.H.; VERMYLEN J.; HOYLAERTS M.F. Pulmonary inflammation and thrombogenicity caused by diesel particles in hamsters: role of histamine. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 168, n. 11, p. 1366-1372, 2003.

NEMMAR, A.; HOET, P. H.; VANQUICKENBORNE, B.; DINSDALE, D.; THOMEER, M.; HOYLAERTS M. F.; VANBILLOEN, H.; MORTELMANS, L.; NEMERY, B.; Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. **Circulation**, v. 29, n. 105 (4), p. 411-4, 2002.

NEMMAR, A.; VANBILLOEN, H.; HOYLAERTS, M. F.; HOET, P. H.; VERBRUGGEN, A.; NEMERY, B. Passage of intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the systemic circulation in hamster. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v. 1, n. 164 (9), p. 1665-8, 2001.

NEVES, G.; RATES, S. M. K.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Dopaminergic agents and erectile dysfunction treatment. **Quim. Nova**, v. 27, n. 6, p. 949-957, 2004.

OBERDORSTER, G.; SHARP, Z.; ATUDOREI, V.; ELDER, A.; GELEIN, R.; LUNTS, A.; KREYLING, W.; AND COX, C.. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v. 65, n. 20, p. 1531–1543, 2002.

OLIVEIRA, J. F.; TEIXEIRA, C. E.; ARANTES, E. C.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Relaxation of rabbit corpus cavernosum by selective activators of voltage-gated sodium channels: role of nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway. **Urology**, v. 62, p. 581–588, 2003.

O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chem. Biol. Interact.**, v. 80, n. 1, p. 1-41, 1991. Erratum in: *Chem. Biol. Interact.* v. 81, n. 1-2, p. 219, 1992.

OHTOSHI, T.; TAKIZAWA, H.; OKAZAKI, H.; KAWASAKI, S.; TAKEUCHI, N.; OHTA, K.; ITO K. Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro. **J. Allergy Clin. Immunol.** v. 101, n. 6 (pt 1), p. 778–785, 1998.

PANDYA, R. J.; SOLOMON, G.; KINNER, A.; BALMES, J. R. Diesel Exhaust and Asthma: Hypotheses and Molecular Mechanisms of Action. **Environ. Health Perspect.** v. 110, n. 1, p. 103–112, 2002.

PEDEN, D. B. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. **Allergy**, v. 52, n. 38, p. 37–44, 1997.

PEREIRA, P.; SALDIVA, P. H.; SAKAE, R. S.; BOHM, G. M.; MARTINS, M. A. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. **Environ. Res.**, v. 69, n. 2, p. 96-101, 1995.

PETERS, A.; LIU, E.; VERRIER, R. L.; SCHWARTZ, J.; GOLD, D. R.; MITTLEMAN, M.; BALIFF, J., et al.. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. **Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 11–17, 2000.

PETERS, A.; DOCKERY, D. W.; MULLER, J. E.; AND MITTLEMAN, M. A. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. **Circulation**, v. 103, n. 23, p. 2810–2815, 2001.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 7, p. 1035-42, 2000.

POPE, C. A. III. What do epidemiologic findings tell us about health effects of environmental aerosols? **J. Aerosol Med.**, v. 13, n. 4, p. 335-54, 2000.

POPE, C. A. III; BURNETT, R. T.; THUN, M. J.; CALLE, E. E.; KREWSKI, D.; ITO, K.; THURSTON, G. D. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. **Jama-Journ. Amer. Med. Assoc.**, v. 287, p. 1132-1141, 2002.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. **Circ. Res.**, v. 52, p. 352-357, 1983.

RIEDIKER, M. Cardiovascular effects of fine particulate matter components in highway patrol officers. **Inhal. Toxicol.**, v. 19, n. 1, p. 99-105, 2007.

ROSENFELD, W. D. Anaerobic Oxidation of Hydrocarbons by Sulfate-reducing Bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 54, n. 5, p. 664-5, 1947.

RUMEL, D.; RIEDEL, L. F.; LATORRE, M. D. D. O.; DUNCAN, B. B. Myocardial Infarcts and Cerebral-Vascular Accidents Associated with High-Temperature and Carbon-Monoxide in A Metropolitan-Area of Southeastern Brazil. **Rev. Saúde Pú.**, v. 27, p. 15-22, 1993.

RUSZNAK, C.; DEVALIA, J. L.; DAVIES, R. J. The impact of air pollution on allergic disease. **Allergy**, v. 49, p. 21-27, 1994.

SACHS, B.D. e MEISEL, R.I. Spinal transection accelerates the developmental expression of penile reflexes in male rats. **Physiol. Behav.**, v. 24, n. 2, p. 289-92, 1980.

SAFARINEJAD, M.R.; HOSSEINI, S. Erectile dysfunction: clinical guidelines (1). **Urol. J. Summer**, v. 1, n. 3, p. 133-47, 2004a.

SAFARINEJAD, M. R.; HOSSEINI, S. Erectile dysfunction: clinical guidelines (2). **Urol. J. Fall**, v. 1, n. 4, p. 227-39, 2004b.

SAGAI, M.; FURUYAMA, A.; ICHINOSE, T. Biological effects of diesel exhaust particles (DEP). III. Pathogenesis of asthma like symptoms in mice. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 21, n. 2, p. 199-209, 1996.

SANTOS, B. O.; VIEIRA, A. L. A review of the electromyographic criteria in sexual performance. **Electromyogr. Clin. Neurophysiol.** .v. 39, n 5, p. 273-84, 1999. Disponível em:<<http://www.bayard.med.br>>. Acesso em: 25 mar. 2006. Publicado em: 03 mar. 2006.

SANTOS K. T. **Contribuição farmacológica do estudo da exposição de camundongos na fase neonatal ao poluente 1,2-naftoquinona (1,2-nq) e sua repercussão na resposta inflamatória na fase adulta.** 142 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SATTAR, A. A.; WESPES, E.; SCHULMAN, C. C. Computerized measurement of penile elastic fibers in potent and impotent men. **Eur. Urol.**, v. 25, p. 142-144, 1994.
SCHWARTZ, B. G.; KLONER, R. A. How to save a life during a clinic visit for erectile dysfunction by modifying cardiovascular risk factors. **Int. J. Impot. Res.** v. 21, n. 6, p. 327-35, 2009.

SCOTT-BURDEN, T.; VANHOUTTE, P. M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. **Circulation**, v. 87, n. 5, p. 51-5, 1993.

SEATON, A.; MACNEE, W.; DONALDSON, K.; GODDEN, D. Particulate Air-Pollution and Acute Health-Effects. **Lancet**, v. 345, p. 176-178, 1995.

SHEPHERD, J. T.; VANHOUTTE, P. M. **The Human Cardiovascular System**. New York: Raven Press, 1979.

SJÖSTRAND, N.O.; KLINGE, E. Principal mechanisms controlling penile retraction and protrusion in rabbits. **Acta Physiol. Scand.**, v. 106, n. 2, p. 199-214, 1979.

SULLIVAN, J.; SHEPPARD, L.; SCHREUDER, A.; ISHIKAWA, N.; SISCOVICK, D.; KAUFMAN, J. Relation between short-term fine-particulate matter exposure and onset of myocardial infarction. **Epidemiology**, v. 16, n. 1, p. 41-8, 2005.

TAKENAKA, S.; KARG, E.; ROTH, C.; SCHULZ, H.; ZIESENIS, A.; HEINZMANN, U.; SCHRAMEL, P.; HEYDER, J. Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n. 4, p. 547-51, 2001.

TATTERSFIELD, A. E. Air pollution: brown skies research. **Thorax**, v. 51, n. 1, p. 13-22, 1996.

TELES, A. M.; KUMAGAI, Y.; BRAIN S. D.; TEIXEIRA, S. A.; VARRIANO A. A.; BARRETO M. A.; de LIMA W. T.; ANTUNES E., MUSCARÁ, M. N.; COSTA, S. K. P. 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.**, n. 28, 2010.

TELES, A. M.; LIMA C.; BOLETINI-SANTOS D.; TEIXEIRA A. S.; MUSCARA, M. N.; KUMAGAI, Y.; COSTA, S. K. P. Diesel exhaust particles exert acute effects on airways inflammation. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, 2007, Rio de Janeiro. **Abstract**. Rio de Janeiro: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE IMUNOLOGIA, 2007. p.42.

TELES, A. M. **Contribuição farmacológica à gênese da inflamação neurogênica em vias aéreas de ratos frente a dois poluentes:** Partículas eliminadas na exaustão do diesel (PED) e 1,2-naftoquinona (1,2-NQ). 148 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

TIMOTHY, E.; O'TOOLE, A.; YU-TING Z.; JASON H.; DANIEL, J. C.; OLEG B.; ARUNI B. Acrolein activates matrix metalloproteinases by increasing reactive oxygen species in macrophages. **Toxic. and App. Pharmac.**, v. 236, n. 2 (15), p 194-201, 2009.

THOMAS, J.A. Pharmacological aspects of erectile dysfunction. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 89, n. 2, p. 101-12, 2002.

THOMMESEN, L.; SJURSEN, W.; GASVIK, K.; HANSSEN, W.; BREKKE, O.L.; SKATTEBOL L.; HOLMEIDE, A.K.; ESPEVI, T.; JOHANSEN, B.; LAEGREID, A. Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A2 block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. **J. Immunol.**, v. 161, n. 7, p. 3421-3430, 1998.

VAN EEDEN, S. F; HOGG, J. C. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: The importance of bone-marrow stimulation. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v. 65, n. 20, p. 1597-1613, 2002.

VERMYLEN, J.; NEMMAR, A.; NEMERY, B.; HOYLAERTS, M. F. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. **J. Thromb. Haemost.** v. 3, n. 9, p. 1955-61, 2005.

VERONESI, B.; OORTGIESEN M.; ROY, J.; CARTER, J. D.; SIMON, S. A.; GAVETT, S. H. Vanilloid (capsaicin) receptors influence inflammatory sensitivity in response to particulate matter. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 169, n. 1, p. 66-76, 2000.

WIDDICOMBE, J.; LEE, L.Y. Airway reflexes, autonomic function, and cardiovascular responses. **Environ. Health Perspect.**, v. 109, n. 4, p. 579-584, 2001.

WINTROBE, M.W. A hematological odyssey, 1936-1966. Johns Hopkins **Med. J.** v. 120, n. 5, p. 287-309, 1967.

YANG, H. M.; BARGER, M. W.; CASTRANOVA, V.; MA, J.K. H.; YANG, J. J.; MA, J. Y. C. Effects of diesel exhaust particles (DEP), carbon black, and silica on macrophage responses to lipopolysaccharide: evidence of DEP suppression of macrophage activity. **J. Toxicol. Environ. Health**, v. 58, ptA, p. 261-278, 1999.

YATES, D.H.; BARNES, P. J.; THOMAS, P. S. Tumor necrosis factor α alters human bronchial reactivity and induces inflammatory cell influx. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 147, p. A1001, 1993.

ZANOBETTI, A.; SCHWARTZ, J. Cardiovascular damage by airborne particles: Are diabetics more susceptible? **Epidemiology**, v. 13, p. 588-592, 2002.

ZHANG, J. Y.; CAO, Y. X.; XU, C. B.; EDVINSSON, L. Lipid-soluble smoke particles damage endothelial cells and reduce endothelium-dependent dilatation in rat and man. **BMC Cardiovasc. Disord.**, v. 19, n. 6, p. 3, 2006.