

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

Alexandre Ferreira¹, Sandra Manoela Dias Macedo^{1,2}, Ana Paula Ligeiro-Oliveira³, Wothan Tavares de Lima³, Sandra Helena Poliselli Farsky^{1*}, Fernando Rodrigues Coelho³

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

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

Unitermos

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

*Correspondência:

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram empregados ratos Wistar machos, pesando

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

Produtos de Biotransformação do Benzeno e Reagentes Utilizados

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

Protocolo de Exposição aos Agentes Químicos

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

Resposta Inflamatória Induzida pelo LPS

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

Coleta do LBA e quantificação celular

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

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

Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

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

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

Determinação do número de leucócitos circulantes

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

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

Determinação da atividade das transaminases hepáticas e concentração de creatinina sérica

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

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

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

Análise Estatística

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

RESULTADOS

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

Os resultados obtidos na análise diferencial das cé-

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

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

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

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

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

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

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

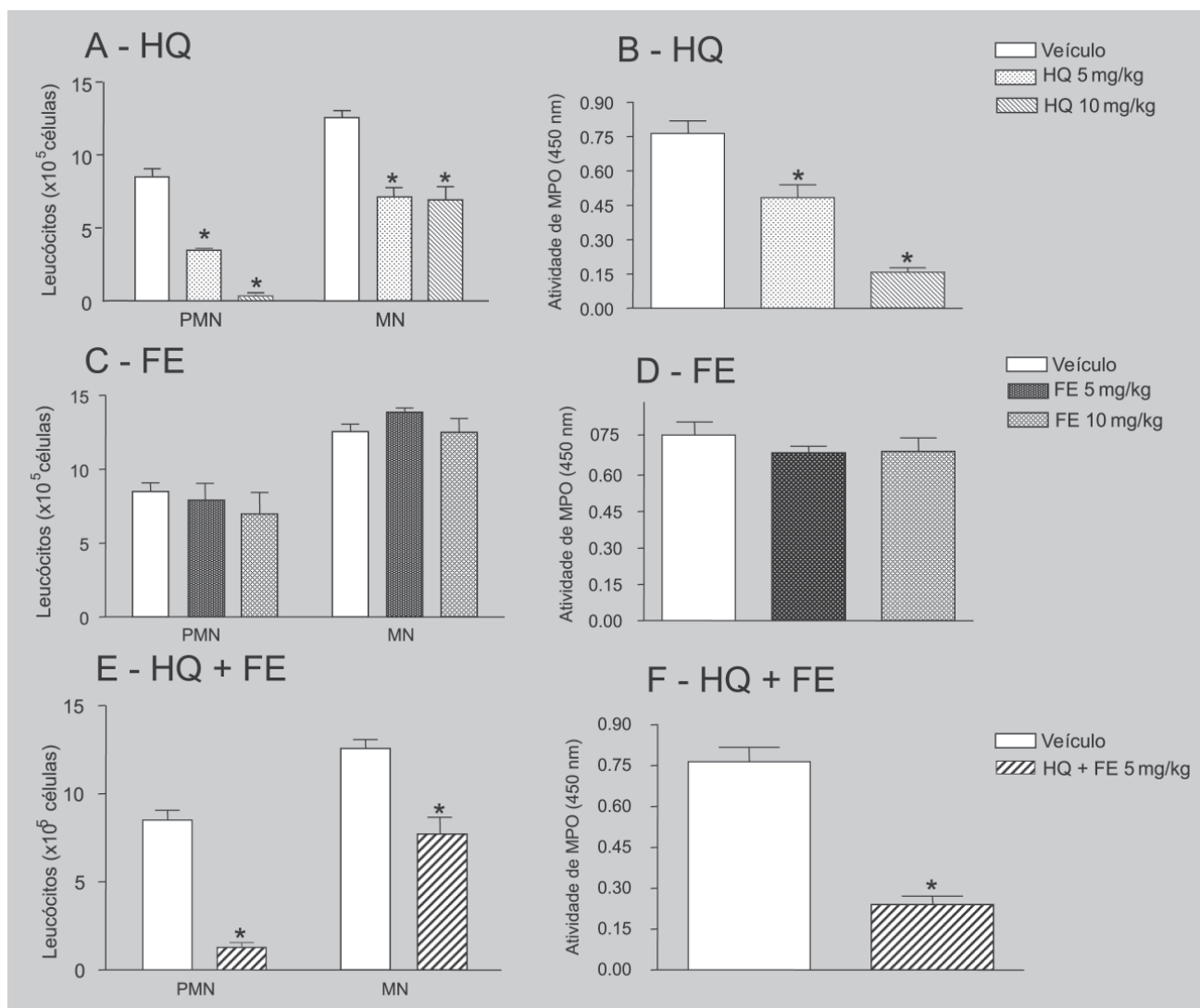


FIGURA 1 - Número de leucócitos no lavado broncolaveolar (A, C e E) e atividade de mieloperoxidase (B, D e F) no tecido pulmonar 24 horas após inalação de LPS em animais previamente expostos à HQ, FE, HQ e FE simultaneamente ou ao veículo. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. de 6 animais em cada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

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

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

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

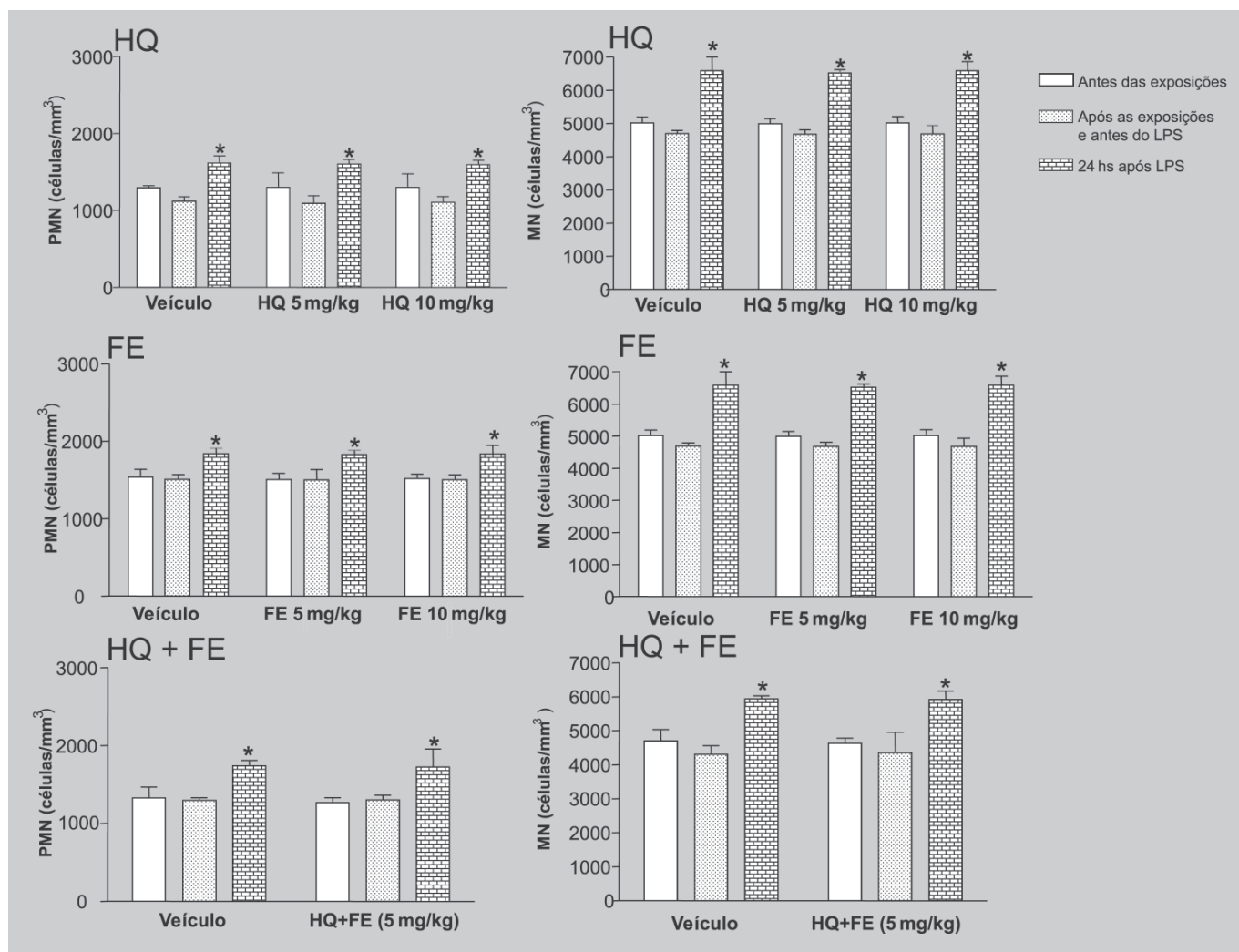


FIGURA 2 - Número de leucócitos no sangue periférico de animais expostos a HQ, FE, HQ e FE simultaneamente ou ao veículo. As quantificações foram realizadas antes do início das exposições, imediatamente antes e 24 horas após instilação de LPS. O sangue foi coleta do plexo orbital. Os resultados expressam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

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

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

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

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

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

DISCUSSÃO

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

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

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

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

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

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

ABSTRACT

Hydroquinone and phenol exposure on pulmonary inflammatory response induced by bacteria

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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