

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia

Efeito da exposição à hidroquinona na resposta imune adaptativa induzida
pela vacina contra a influenza

André Luis Fabris

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof.^a Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

São Paulo
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Toxicologia

Efeito da exposição à hidroquinona na resposta imune adaptativa induzida
pela vacina contra a influenza

André Luis Fabris

Versão Corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018 de
13/10/2011

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Sandra Helena Poliselli Farsky
Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

São Paulo
Maio - 2019

André Luis Fabris

Efeito da exposição à hidroquinona na resposta imune adaptativa induzida
pela vacina contra a influenza

Comissão julgadora da Dissertação para obtenção de Título de Mestre

Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

FF128e Fabris, André Luis
e Efeito da exposição à hidroquinona na resposta
imune adaptativa induzida pela vacina contra a
influenza / André Luis Fabris. - São Paulo, 2019.
72 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.

Orientador: Farsky, Sandra Helena Poliselli
Coorientador: Silveira, Eduardo Lani Volpe da

1. Imunotoxicologia. 2. Vacina. 3. Influenza. 4.
Fumaça do cigarro. I. T. II. Farsky, Sandra Helena
Poliselli, orientador. III. Silveira, Eduardo Lani
Volpe da, coorientador.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky, por me confiar o trabalho desenvolvido, acreditar na minha capacidade e pelo carinho que recebi. Ao meu Coorientador, Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira, por toda atenção e assistência. Sou muito grato à ambos por todo o conhecimento e experiências que me forneceram.

À FAPESP pelo auxílio financeiro e pela Bolsa de Mestrado concedida durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Paulo Lee Ho pelo fornecimento da vacina, a qual foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Samantha, Edna e Marilisa, secretárias do Programa de Análises Clínicas, e o de Toxicologia e Fisiopatologia da FCF-USP por ajudarem sempre que necessário.

Quero agradecer, também, todos meus colegas de Laboratório, Marina, Gustavo, Cíntia, Cristina, Silvana e Pablo, além daqueles que já seguiram seus caminhos. Muito obrigado por me ajudarem quando precisei, pela paciência e ensinamentos ao longo do Mestrado.

Aos colegas e funcionários do Bloco 13B da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pela ajuda e boa convivência.

Por fim, agradeço a minha família e amigos por todo o apoio e suporte que sempre recebi.

*“Acho que fiz tudo do jeito melhor, meio torto, talvez,
mas tenho tentado da maneira mais bonita que sei.”*

(Caio Fernando Abreu)

RESUMO

FABRIS, A. L. **Efeito da exposição à hidroquinona na resposta imune adaptativa induzida pela vacina contra a influenza.** 2019. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

A gripe é causada pelo vírus *Influenza* e é um problema de saúde pública mundial, que pode levar a problemas sérios em idosos e crianças. O Brasil implantou a vacinação anual contra influenza a partir de 1999, como ação preventiva contra a doença. A vacina é produzida pelo Instituto Butantan e contém três cepas diferentes do vírus *Influenza* fragmentado para induzir resposta imune adaptativa, com produção de anticorpos específicos e neutralizantes. A literatura tem mostrado que a exposição à xenobióticos com potencial imunossupressor pode comprometer a eficácia de imunizações ativas, como a imunização contra a gripe. Nosso grupo de pesquisa tem mostrado que a exposição à hidroquinona (HQ), um composto tóxico presente em altas concentrações na fumaça do cigarro, prejudica a resposta imune inata e adquirida. Assim, este trabalho avaliou o efeito da exposição à HQ sobre a resposta imune à vacinação contra influenza. Camundongos machos da linhagem C57BL/6 foram diariamente expostos à HQ (2500 ppm) ou PBS, por 1 hora, por nebulização, por um período de 8 semanas. Durante este período, foram imunizados nas semanas 6 e 8 do início das exposições, pela injeção i.m. de 100µL da vacina. Os parâmetros tóxicos e imunológicos foram avaliados 7, 35 e 70 dias após a segunda dose da vacina. A exposição à HQ não alterou o peso corpóreo dos animais e nem causou alterações morfológicas no pulmão, fígado e rins (histologia por H&E); reduziu a frequência de hemácias (11%), hematócrito (14%), hemoglobina (14%) e volume celular (4%); causou estresse oxidativo no baço (citometria de fluxo); aumentou a área dos folículos de células B no baço e linfonodomegalia (histologia por H&E). Em conjunto, os dados aqui obtidos mostram que a exposição à HQ afetou mecanismos envolvidos na gênese da imunidade ativa contra influenza. Assim, os dados deste trabalho mostram mecanismos tóxicos ainda não descritos para a HQ, e ressalta a HQ como um poluente ambiental que deve ser considerado nas avaliações de risco.

Palavras-chaves: imunotoxicologia, vacinação, influenza, fumaça do cigarro

ABSTRACT

FABRIS, A. L. **Effects of hydroquinone exposure on the adaptive immune response induced by the influenza vaccine.** 2019. 73f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The flu is a health problem worldwide which is caused by the *Influenza* virus and may result in severe illness in infants and the elderly. The annually vaccination against influenza was implemented in Brazil in 1999 as a preventive measure. The vaccine is produced by Butantan Institute and contains three different strains of the inactivated *Influenza* virus which induce the adaptive immune response along with production of specific and neutralizing antibodies. The literature has shown that exposure to immunosuppressive xenobiotics may compromise the efficacy of active immunizations, such as influenza. Our research group has shown that exposure to hydroquinone (HQ), a toxic constituent of cigarette smoke, impairs both innate and adaptive immune response. Thus, the aim of this work was to evaluate the effects of HQ on the immune response induced by the influenza vaccine. Male C57BL/6 mice were daily exposed to HQ (2500 ppm) or PBS by nebulization, for 1 hour, for 8 weeks. During the exposure period, the animals were vaccinated on weeks 6 and 8 with 100 μ L of the vaccine. Toxicologic and immunological parameters were assessed 7, 35 and 70 days after boost administration. HQ exposure did not alter body weight and did not cause morphological alterations in the lungs, liver and kidneys (H&E staining); reduced the frequency of erythrocytes (11%), hematocrit (14%), hemoglobin (14%) and cellular volume (4%) and caused oxidative stress on the spleen (Flow Cytometry); increased the area of B cell follicles in the spleen and increased the size of draining lymph nodes (H&E staining). Altogether, these data show that HQ exposure affected mechanisms involved in the genesis of the adaptive immune response. Thus, the data presented in this work show toxic mechanisms of HQ that have not yet been described, and it also points out HQ as an environmental pollutant which should be considered on risk assessments.

Keywords: immunotoxicology, vaccine, Influenza, cigarette smoke

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do vírus <i>Influenza A</i>	12
Figura 2. Esquema da interação da hemaglutinina do <i>Influenza A</i> com receptores virais nas células do hospedeiro	13
Figura 3. Distribuição geográfica da gripe.....	15
Figura 4. Reação do centro germinativo	21
Figura 5. Estrutura química da hidroquinona	23
Figura 6. Metabolismo endógeno do Benzeno.....	24
Figura 7. Protocolo de exposição à HQ	31
Figura 8. Efeito da exposição à HQ sobre a evolução ponderal dos animais ao longo do protocolo de exposição à HQ.....	38
Figura 9. Efeito da exposição à HQ sobre o hemograma	39
Figura 10. Efeitos da exposição à HQ sobre marcadores de dano hepático e renal.	40
Figura 11. Efeitos da exposição à HQ sobre a morfologia do pulmão, fígado e rim.....	41
Figura 12. Efeitos da exposição à HQ sobre a morfologia do baço e linfonodos drenantes.....	42
Figura 13. Efeitos da exposição da HQ sobre o número de células secretores de antígenos em órgãos envolvidos na resposta imune à vacina contra Influenza.....	43
Figura 14. Efeitos da exposição da HQ sobre o título e avidéz de IgG séricas.....	44
Figura 15. Efeitos da exposição da HQ sobre a formação de ERO no baço	45

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 O vírus Influenza	12
1.2 A influenza e a importância da imunização	14
1.3 Hidroquinona	22
2. Objetivos	27
3. Materiais e Métodos	29
3.1 Animais	30
3.2 Exposição à HQ	30
3.3 Imunizações	30
3.4 Parâmetros Clínicos	31
3.4.1 Evolução Ponderal	31
3.4.2 Hemograma	31
3.4.3 Marcadores de dano tecidual	31
3.4.4 Histologia	32
3.5 ELISPOT	32
3.6 ELISA de títulos e avidéz de anticorpos	33
3.7 Detecção do estresse oxidativo nos esplenócitos	34
3.8 Análise Estatística	35
4. Resultados	36
4.1 Efeitos da exposição à HQ sobre o peso corporal, hemograma e atividade enzimática do fígado e rins	37
4.2 Efeitos da exposição à HQ sobre a histologia do fígado, pulmão, rins e órgãos linfoides secundários	40
4.3 Avaliação das Células Secretoras de Anticorpos específicos	42
4.4 Títulos e avidéz de IgGs	43
4.5 Análise do estresse oxidativo em esplenócitos	44
5. Discussão	46
6. Conclusão	53
7. Referências Bibliográficas	55
8. Anexos	70
Anexo1	71
Anexo2	72

1. INTRODUÇÃO

1.1 O vírus *Influenza*

O *Influenza* é um vírus envelopado, contém 8 segmentos de RNA, pertence à família *Orthomyxoviridae* e é classificado de acordo com as características antigênicas da matriz proteica e proteínas nucleares (Fig. 1) (HEDESTAM *et al.*, 2008; SHTYRYA *et al.*, 2009). Os vírus do tipo A e B são os mais relevantes para a saúde pública, pois estão associados à maior morbimortalidade. Mais especificamente, o tipo A está associado a 75% das infecções e pode ter caráter pandêmico (GLEZEN *et al.*, 2013; OLSON *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

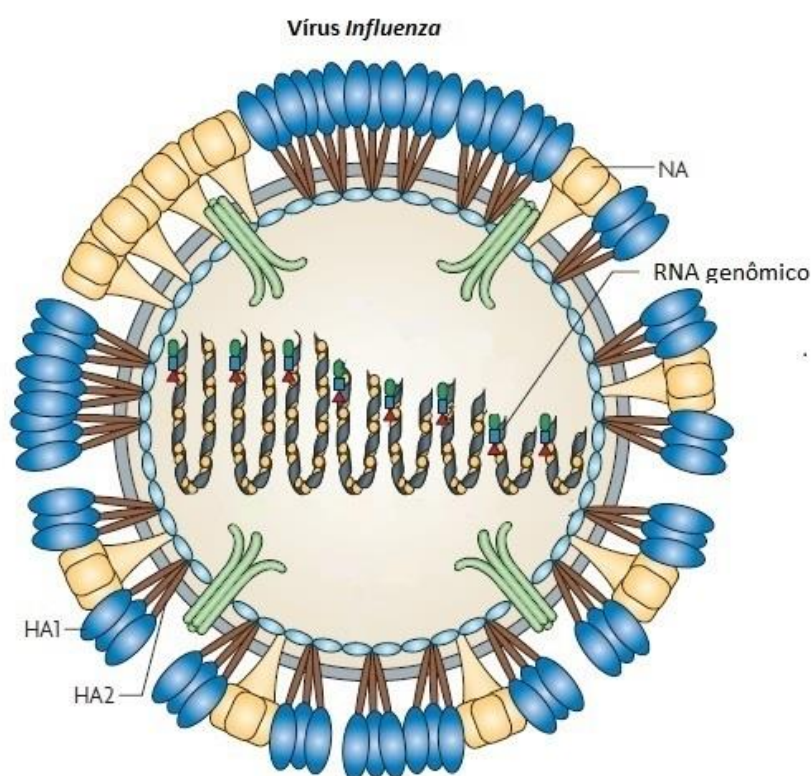


Figura 1. Estrutura do Vírus *Influenza* A. As proteínas estão representadas na parte exterior da membrana: hemaglutinina (HA) e neuroaminidase (NA). A HA forma trímeros e a NA forma tetrâmeros. O material genético consiste em 8 fitas de RNA senso negativo. Fonte: Figura adaptada de HEDESTAM *et al.*, 2008.

O *Influenza* A é subdividido de acordo com o subtipo de hemaglutinina (HA) e neuroaminidase (NA) presente na superfície da membrana viral. Existem vários subtipos de HA e NA e, atualmente, os vírus classificados como H3N2 e H1N1 são os causadores de endemias em humanos. Estas

glicoproteínas são responsáveis por funções importantes na infecção das células do hospedeiro. A HA é dividida estruturalmente em HA1 e HA2 (Fig. 2). A HA1 se liga aos resíduos de ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídeos que estão presentes na membrana das células do hospedeiro e, a partir desta interação ocorre a entrada do vírus na célula (Fig. 3). No interior da célula, o vírus se encontra em endossomas, caracterizados como compartimentos intracelulares com pH baixo, e nesse ambiente ácido, ocorrem alterações irreversíveis na conformação da molécula de HA resultando na exposição da região HA2. Esta porção é responsável pela fusão das membranas e, conseqüentemente, pela liberação do material genético do vírus (CAO *et al.*, 2017; HEDESTAM *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2018).

A NA tem a função de facilitar a aproximação do vírus às células-alvo, clivando o ácido siálico das mucinas do trato respiratório, além de auxiliar na fusão das membranas, amplificando a atividade de clivagem da HA (SHTYRYA *et al.*, 2009). Adicionalmente, estudos relatam que a NA também é estável em níveis de pH baixos (VARGHESE *et al.*, 1983; TAKAHASHI *et al.*, 2003).

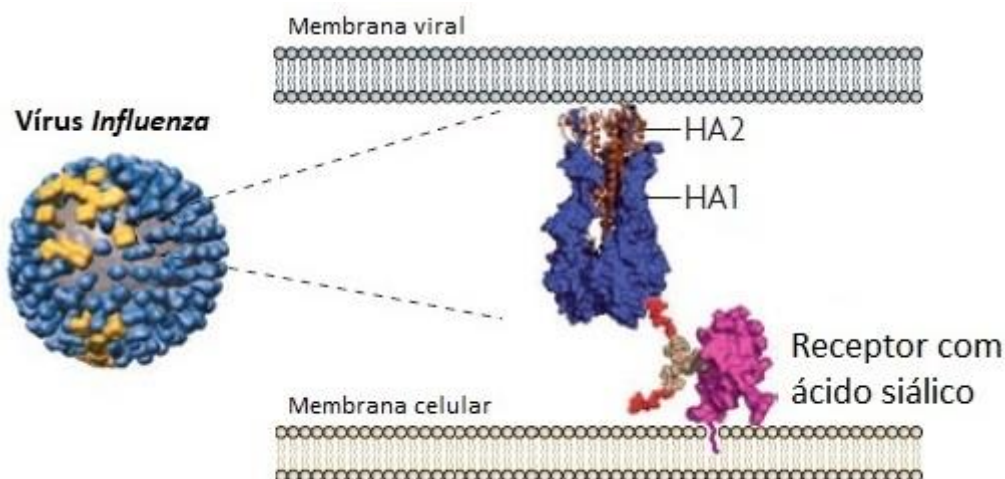


Figura 2. Esquema da interação da hemaglutinina do *Influenza A* com receptores virais nas células do hospedeiro. A imagem mostra um modelo estrutural das glicoproteínas do envelope do vírus e outras proteínas. A porção HA1 liga-se com o ácido siálico dos receptores celulares. Após esta interação, ocorre internalização do vírus em endossomas. Dentro dos endossomas, o pH baixo causa alterações conformacionais na molécula de HA que expõem a porção HA2. A HA2 é responsável pela fusão das membranas e liberação do RNA viral no citosol celular. Fonte: Figura adaptada de HEDESTAM *et al.*, 2008.

Por conta da importância da HA para o ciclo viral, esta hemaglutinina é o maior alvo indutor de anticorpos neutralizantes, os quais interferem com a habilidade do vírus ligar-se à célula do hospedeiro e obter acesso aos endossomos com pH baixo. Para escapar da ação dos anticorpos produzidos pelo hospedeiro e garantir sua sobrevivência, o *Influenza* possui mecanismos para modificar estruturalmente seus antígenos, conhecidos como *antigenic drift* e *antigenic shift*. O *drift* consiste na introdução de mutações pontuais no genoma viral durante a replicação e estas resultam em alterações de epítomos importantes. Muitas destas mutações podem gerar vírus não viáveis, contudo algumas alteram regiões importantes nas proteínas HA e NA. Assim, os vírus que sofreram estas mutações escapam da imunidade pré-existente do hospedeiro e são selecionados, dando origem a uma nova população viral variante (BOTH *et al.*, 1983; CATON *et al.*, 1992; FITCH *et al.*, 1991; KOELLE *et al.*, 2006). Por outro lado, o *shift* compreende a troca completa dos genes da HA e NA, diferentemente das mudanças graduais decorrentes de mutações pontuais. Este evento ocorre apenas entre os tipos A devido ao seu variado reservatório animal, e esta alteração resulta em um novo vírus que possui uma nova molécula de HA acompanhada ou não de uma nova NA. Uma vez que a população possui imunidade limitada a esta novas variantes, podem ocorrer pandemias (NICHOLSON *et al.*, 2003; COX e SUBBARAO, 2000; WEBSTER *et al.*, 1982). A gripe espanhola, que causou aproximadamente 40 milhões de mortes pelo mundo em 1918 foi gerada pela variante do *Influenza A* (H1N1) pelo *antigenic shift* (COX e SUBBARAO, 2000).

Do exposto, fica evidente que, embora o vírus *Influenza* seja bem conhecido cientificamente, ele possui regiões importantes de mutações que levam ao desafio imunológico constante do organismo para a produção de anticorpos específicos.

1.2 A influenza e a importância da imunização

A gripe é uma infecção aguda do sistema respiratório causada pelo vírus *Influenza* e é altamente transmissível, causando epidemias sazonais e até mesmo pandemias. As manifestações clínicas mais comuns da doença

são aparecimento abrupto de febre, dor de garganta, tosse, mialgia, cefaleia e astenia, as quais podem evoluir para quadros mais graves, como pneumonia e complicações cardíacas, que, se agravadas, podem levar ao óbito (FALLEIROS e BRICKS, 2016; PADDOCK *et al.*, 2012; CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2018). A gripe é considerada um problema de Saúde Pública mundial visto que acomete todos os continentes anualmente (Fig. 3). Estima-se que as epidemias de gripe sazonais estão relacionadas a um aumento anual de 24,7 óbitos por 100.000 habitantes, sendo que 90% destes indivíduos tem idade maior ou igual a 65 anos (NUNES *et al.*, 2011).

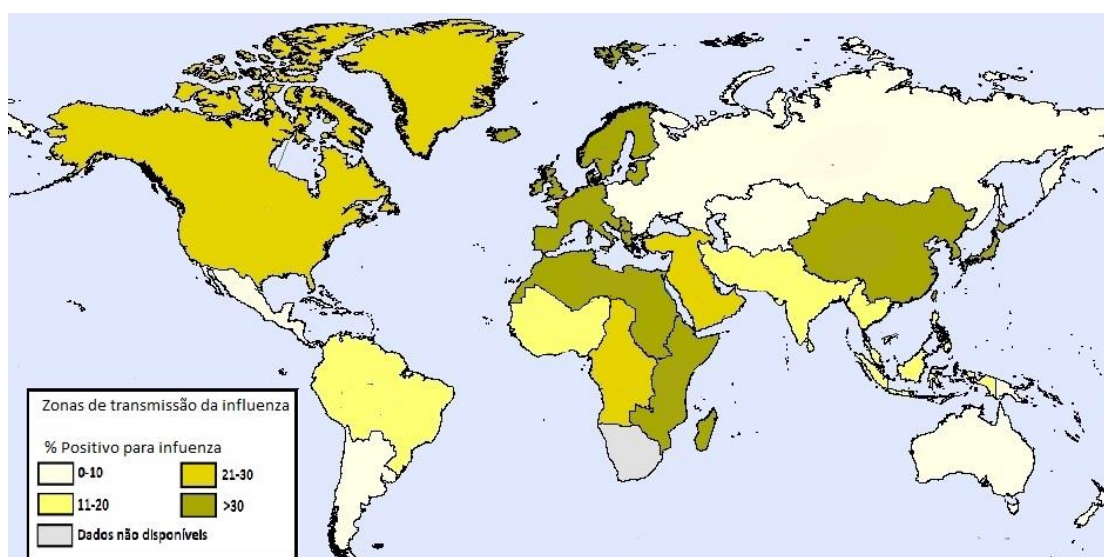


Figura 3. Distribuição geográfica da gripe. O mapa mostra as regiões onde amostras testadas foram positivas para a influenza em 2018. Fonte: Figura adaptada da OMS, 2018.

No Brasil, as epidemias de gripe recorrentes causam grande impacto na saúde pública. Cerca de 14,9% das síndromes respiratórias agudas graves registradas no Brasil em 2017 foram causadas pelo vírus *Influenza* e o total de óbitos decorrentes desta complicação é de 15,2% (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO, 2018). Por este motivo, a vacinação contra a influenza foi implementada no Programa Nacional de Imunizações em 1999 (SANTOS e OLIVEIRA, 2010). No ano inicial, a indicação de vacinação foi apenas para indivíduos maiores de 65 anos de idade e, houve incremento crescente no número de indivíduos vacinados nos anos subsequentes, passando de 7,5 milhões em 1999 para 19,7 milhões de doses em 2017. Este aumento foi devido a maior adesão da população idosa

à vacinação e ao aumento populacional do grupo de risco (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2018). Além disso, o Ministério da Saúde (2009) relatou que após a implantação da campanha de vacinação aos grupos de risco, a morbimortalidade, absenteísmo no trabalho e gastos com tratamentos de complicações oriundas da infecção viral foram reduzidos, e diversos estudos mostram que a imunização é a forma mais eficaz para combater a doença (FRANCISCO *et al.*, 2005; VILARINO *et al.*, 2004; KRAMARZ *et al.*, 2009; GÓIS e VERAS, 2010). A campanha de vacinação contra a gripe acontece em épocas anteriores as de maior circulação do vírus, como no inverno, e a proteção adequada ocorre com a vacinação anual (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Embora a resposta imune à vacina contra a influenza possui eficácia de 70 a 90% nos adultos jovens e de 40% nos idosos, devido às diferenças imunológicas características da idade (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2000; SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DE SÃO PAULO, 2001), a vacinação reduz a disseminação da doença e previne complicações mais sérias (GROSS *et al.*, 1995; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001).

A vacina da influenza utilizada no Brasil é produzida no Instituto Butantan, localizado na cidade de São Paulo, que utiliza a tecnologia desenvolvida pelo Instituto Sanofi-Pasteur. A produção consiste em inocular cepas do vírus, que foram previamente escolhidas pela Organização Mundial da Saúde, na cavidade alantóica de ovos de galinha da linhagem Hysex. Após inoculados, os ovos são levados à incubadora para que ocorra a replicação viral e, então, os ovos são incubados em câmara fria para a morte dos embriões e retirada do líquido alantóico, que agora contém o vírus replicado. O líquido é purificado, diluído e o vírus presente é fragmentado pela adição de detergente. A suspensão viral é, então, inativada com formaldeído para que não haja a capacidade de replicação e infecção. O material produzido é testado e, se aprovado, é rotulado e embalado para ser entregue ao Ministério da Saúde (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2016; INSTITUTO BUTANTAN, 2016).

O processo de vacinação contra o *Influenza* é caracterizado como uma imunização ativa, pois consiste na administração de antígenos para estimular

uma resposta específica e proteger contra infecções futuras. A vacina produzida pelo Instituto Butantan é composta por três cepas do vírus, A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09; A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2); e B/Brisbane/60/2008. Estas são definidas de acordo com levantamento de dados sobre as cepas circulantes na população e é coordenado pela Organização Mundial da Saúde meses antes da produção da vacina (KITLER *et al.*, 2002). O *Influenza* causa novos casos de infecção anualmente, pois a imunidade adquirida durante cada infecção poderá não ser efetiva em uma próxima devido às constantes mutações na estrutura antigenica do vírus, como descrito anteriormente. Por este motivo, a vacinação anual com reformulação das cepas constituintes é fundamental para proteção da população. Uma vez administrados no tecido muscular, os antígenos presentes na vacina são reconhecidos por células residentes, como as células dendríticas, que são células apresentadoras de antígenos. Após reconhecerem estes antígenos via receptores de membrana, como os receptores do tipo Toll, estas células são ativadas e realizam a fagocitose dos antígenos e, no seu citoplasma estes são fragmentados em moléculas menores, com cerca de 11 aminoácidos (SI *et al.*, 2015). As células dendríticas, então, migram para os órgãos linfoides secundários, como os linfonodos e o baço, com a finalidade de realizar o processo de apresentação de antígenos para os linfócitos T, que serão ativados. O recrutamento das células dendríticas para os órgãos linfoides secundários é essencial para o desenvolvimento da resposta adaptativa e depende da expressão do receptor CCR7 por estas células (CAO *et al.*, 2017; KATO e SCHLEIMER, 2007). Uma vez nos tecidos linfoides secundários, os peptídeos derivados de antígenos proteicos são apresentados para as células T via MHC-II, uma molécula presente na membrana celular das células dendríticas, que se liga ao receptor das células T. No entanto, o processo é mais complexo, e necessita de outros sinais co-estimulatórios para sinalização intracelular efetiva destes linfócitos, como estimulação dos receptores de membrana CD40, ICOS e CD28 (CHEN e FLIES, 2013). Depois de ativados, os linfócitos T proliferam e estimulam outras células, como o linfócito B. A interação entre os linfócitos T e B nos órgãos linfoides secundários resulta na diferenciação em linfócitos T foliculares (T_F) e na formação dos centros germinativos (Fig. 4). Nestas

estruturas, ocorre intensa proliferação dos linfócitos B com diferenciação em células secretoras de anticorpos associada a troca de classe do anticorpo e aumento da sua afinidade pelo antígeno (KRISHNASWAMY *et al.*, 2018; STEBEGG *et al.*, 2018).

A troca de classe das imunoglobulinas é induzida após vacinação ou infecção de forma específica para diferentes tipos de patógenos. O *Influenza*, por exemplo, é reconhecido por receptores citoplasmáticos, como o RIG-I e o receptor do tipo Toll 7, e as sinalizações intracelulares desencadeadas pela ativação destes receptores direcionam a resposta humoral para a produção de anticorpos mais apropriados para neutralizar vírus (CHEN *et al.*, 2018; TAUBENBERGER e MORENS, 2008). Este mecanismo consiste na deleção de determinadas regiões do gene que codifica a cadeia pesada das imunoglobulinas, resultando na codificação e expressão de uma cadeia diferente à que estava sendo expressada anteriormente. Além disso, este mecanismo necessita que divisões celulares subsequentes ocorram para ser fixado, o que é propício no microambiente dos centros germinativos, onde ocorre intensa proliferação celular. Diferentemente, a alteração na afinidade dos anticorpos ocorre por meio da hipermutação somática, processo no qual intensas mutações pontuais são inseridas no segmento V(D)J e VJ dos genes que codificam a região variável das cadeias pesadas e leves, respectivamente. Com isso, estes genes mutados codificarão proteínas com mudanças estruturais que resultam em alterações na afinidade do anticorpo pelo antígeno. Estas mudanças, por sua vez, podem ser positivas ou negativas e as células que sofreram mutações positivas, ou seja, que geraram anticorpos com boa afinidade, são selecionadas no próprio centro germinativo. Ambos os mecanismos ocorrem principalmente pela ação da enzima Desaminase Induzida por Ativação (AID) que atua realizando deleção de bases e quebra das fitas de DNA (HWANG *et al.*, 2015; STAVNEZER *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2012).

Após as células B passarem por vários ciclos de divisão celular, pelo mecanismo de hipermutação somática, troca de classe das imunoglobulinas e seleção da afinidade, estas podem se diferenciar em células secretoras de anticorpos (Fig. 4). Esta diferenciação induzida pela vacinação ou pela

própria infecção viral ocorre dentro dos centros germinativos e depende da presença de citocinas, como a CXCL13, interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 21 (IL-21). Na presença destas citocinas, os linfócitos B migram para os centros germinativos e passam a expressar fatores de transcrição que direcionam sua diferenciação em plasmablastos e, por outro lado, inibem fatores que conferem a identidade das células B. A expressão do fator de transcrição BLIMP1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*) é estimulada e este, por sua vez, suprime o PAX5 (*Paired box protein Pax-5*) e BCL-6 (*B6 lymphoma 6 protein*) resultando na expressão de XBP1 (*X-box binding protein 1*) e IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*). Em conjunto, a modulação destes fatores induz a formação do perfil da célula secretora de anticorpos, como aumento do tamanho celular, secreção da imunoglobulina anteriormente fixa na membrana celular, biogênese de organelas, aumento na frequência do dobramento de proteínas e degradação de proteínas malformadas (RADBRUCH *et al.*, 2006; SHAPIRO-SHELEF e CALAME, 2005). Um único clone de célula B é capaz de originar mais de 5 mil células secretoras de anticorpos em cerca de uma semana. Essa expansão celular é necessária e importante para acompanhar a divisão rápida dos micro-organismos (KUMAR *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que os linfócitos B recebem assistência de outras células durante as reações que ocorrem dentro dos centros germinativos. Os linfócitos T_F, por exemplo, auxiliam na seleção positiva das células B que apresentam boa afinidade contra o antígeno após a hipermutação somática. Esta seleção ocorre por meio de estímulos, como secreção de IL-6 e BAFF (*B-cell activating fator*). As células dendríticas também têm importância crucial na reação do centro germinativo, pois se diferenciam em células dendríticas foliculares nos órgãos linfoides secundários na presença de fator de necrose tumoral (TNF) e, juntamente com as células T_F, auxiliam na seleção positiva de células B após ciclos de hipermutação somática, além de serem responsáveis por manter a estrutura do centro germinativo (Fig. 4) (DE SILVA e KLEIN, 2015; HEESTERS *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011).

Por fim, após diferenciadas em plasmablastos, estas células passam a expressar o receptor CXCR4 que medeia a migração para a medula óssea, onde se diferenciarão terminalmente em plasmócitos (HARGREAVES *et al.*, 2001; O'CONNOR *et al.*, 2004). Estas células sobrevivem e residem nos nichos da medula óssea, pois recebem estímulos de sobrevivência deste microambiente, enquanto secretam quantidades constantes de anticorpos para garantir proteção ao mesmo antígeno por vários anos e, portanto, são classificadas como células de vida longa (NUTT *et al.*, 2015). Os elementos e condições necessárias para a sobrevivência das células secretoras de anticorpos nos nichos da medula óssea ainda não estão elucidados, mas há relatos que células, como eosinófilos, basófilos e células dendríticas, e citocinas, como IL-6 (Interleucina 6), CXCL12 (*Stromal cell-derived factor 1 precursor*), APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) e BLyS (*B Lymphocyte Stimulator*) são importantes neste contexto (CHU *et al.*, 2011; DILOSA *et al.*, 1991; HARGREAVES *et al.*, 2001; MINGES *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2010; ROLDÁN *et al.*, 1992; ROZANSKI *et al.*, 2011).

Além das células secretoras de anticorpos, a reação do centro germinativo gera as células B de memória que tem como característica circularem na corrente sanguínea ou residirem nos órgãos linfoides secundários de forma quiescente, até serem novamente ativadas e passar pela reação de centro germinativo (DE SILVA E KLEIN, 2015).

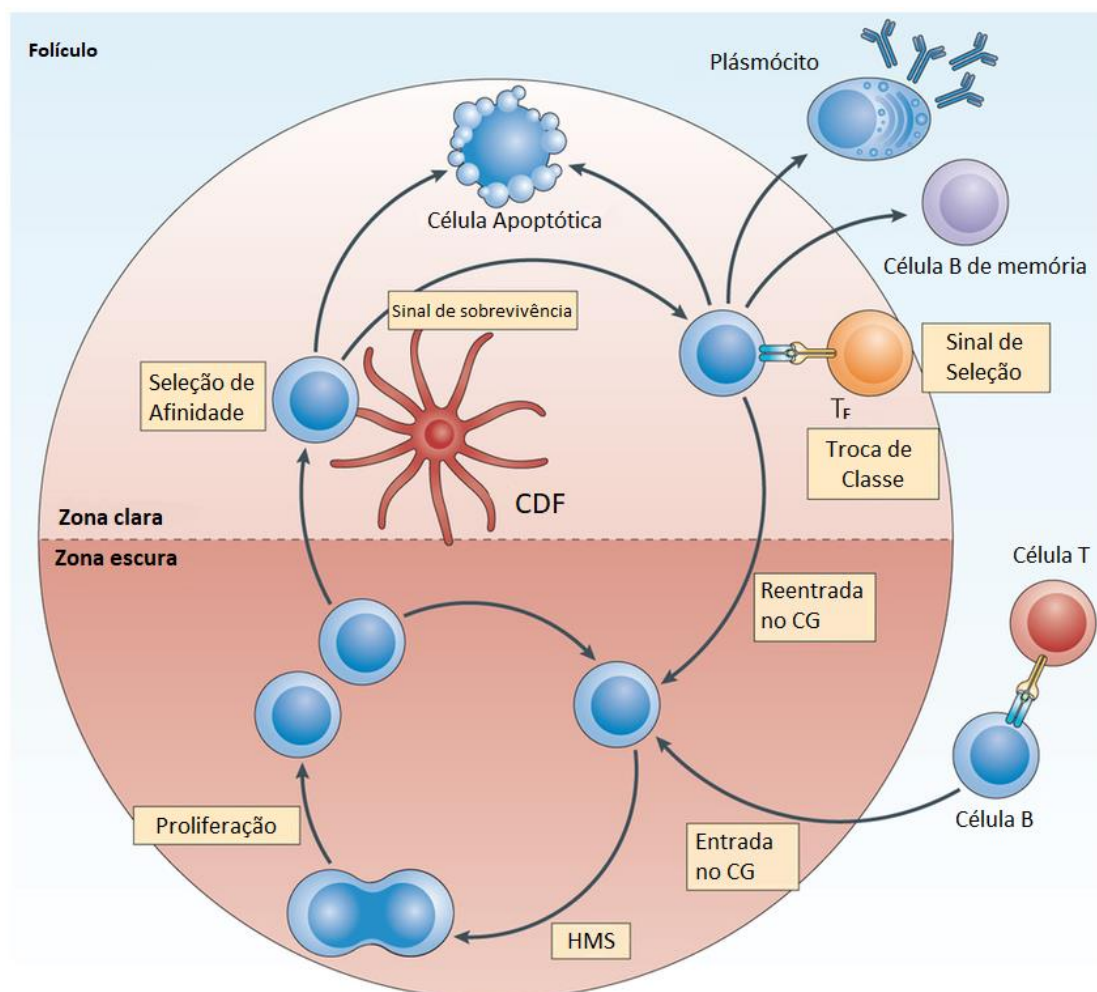


Figura 4. Reação do centro germinativo. Simplificadamente, as células B apresentam antígenos para as células T e recebem sinalização co-estimulatória. As células então são ativadas e entram na zona escura do centro germinativo (CG). Nesta região, ocorre hipermutação somática (HMS) e proliferação celular. Após alguns ciclos destes eventos, as células migram para a zona clara. Nesta zona, as células B mutadas por conta da HMS são expostas à antígenos pelas células dendríticas foliculares (CDF). As células com baixa afinidade pelos antígenos não recebem estímulos de sobrevivência e entram em apoptose. As que possuem alta afinidade são estimuladas pelas células T foliculares (T_F). Estas células que sobrevivem podem voltar à zona escura e passar novamente pela HMS e proliferação, deixar o CG como plasmócitos ou células B de memória. Além disso, pode ocorrer a troca de classe das imunoglobulinas, formando anticorpos mais específicos ao tipo de patógeno que reentrarão na zona escura para proliferação e HMS. Fonte: Figura adaptada de HEESTERS *et al.*, 2014.

É importante salientar que o processo de imunização ativa induz uma resposta imune adaptativa específica, que tem característica de ser mais lenta na primeira exposição ao antígeno. A lentidão do processo ocorre porque o clone celular que é ativado não está expandido para que mais células filhas sejam geradas rapidamente. Porém, a exposição subsequente ao mesmo antígeno, conhecida como desafio, leva à ativação das células B de memória e a resposta é mais intensa, rápida e efetiva (KUMAR *et al.*, 2005).

O intuito da imunização ativa contra o *Influenza* é estimular o sistema imune dos indivíduos com cepas inativadas dos vírus circulantes, as quais não apresentam risco de causar a doença, mas são capazes de produzir uma resposta específica que protegerá a população de uma eventual infecção viral e, mais importante, as complicações que podem ser causadas pelo vírus serão evitadas. Desta forma, a imunização deve ser efetiva e os fatores que comprometem este processo devem ser conhecidos para que possam ser prevenidos ou contornados.

1.3 Hidroquinona

As características do sistema imune, como brevemente descritas anteriormente, são determinantes para a imunização preventiva, portanto, a exposição à fatores ambientais que modificam o sistema imune pode comprometer esta eficácia (MEDICI *et al.*, 2015). Neste contexto, tem sido mostrado que a exposição à poluentes ambientais, como metais e bifenilas policloradas, prejudica várias funções do sistema imunológico inato e adaptativo, resultando em resposta inflamatória reduzida e diminuição nos títulos de anticorpos (TODD *et al.*, 2016; XINJIANG *et al.*, 2016). Além destes, a fumaça do cigarro é fonte de exposição de diversos compostos tóxicos que também são poluentes ambientais. A literatura mostra a toxicidade da exposição à fumaça do cigarro sobre o sistema imune, como diminuição da resposta de anticorpos de forma duradoura, supressão da secreção de citocinas, como IL-1 β , IL-2, IFN- γ e TNF- α , além de redução da viabilidade celular de leucócitos (NGUYEN, 2004; OUYANG *et al.*, 2000; STABBERT *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2012). Embora a vacinação tenha eficácia comprovada como medida profilática, há relatos na literatura de que a vacinação contra a influenza em fumantes passivos, ativos e ex-fumantes pode estar comprometida (FINKELA *et al.*, 1971; GODOY *et al.*, 2017; GRUIJIFF *et al.*, 1999; LUGADE *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2013).

A fumaça do cigarro pode ser dividida em fase particulada e fase de vapor e, dentre todos os compostos tóxicos presentes, a hidroquinona (HQ) tem especial relevância tóxica e imunológica. Cada cigarro é capaz de liberar de 50-114 μ g de HQ (BODNAR *et al.*, 2012), e ensaios *in vitro* mostram que a

HQ presente na fase particulada do cigarro é responsável por 10% da toxicidade celular *in vitro* (STABBERT *et al.*, 2017). Além disso, cada cigarro contém cerca de 42-91µg de benzeno (BZ), o qual consiste em outra forma de exposição à HQ, pois quando absorvido é biotransformado em HQ. Por estes e outros motivos, a HQ vem recebendo atenção crescente nas ultimas décadas.

A HQ (Fig. 5) é um composto fenólico que já foi amplamente utilizado comercialmente na indústria cosmética, nas indústrias envolvidas na produção de borracha e na revelação de material fotográfico, além de ser liberada na atmosfera por outros meios antropogênicos. Contudo, a forma mais importante de exposição à HQ atualmente é pela fumaça do cigarro de tabaco que, além da própria HQ, contém BZ. É importante ressaltar que a HQ é um dos principais produtos da metabolização endógena do BZ, com comprovada toxicidade ao sistema imune e hematológico. Uma vez absorvido pela via respiratória, oral ou pele, o BZ é metabolizado pela enzima citocromo P450 2E1, em especial nos pulmões e no fígado, e gera metabólitos tóxicos, como o catecol, HQ e 1,4-benzoquinona (Fig. 6) (MCGREGOR, 2008).

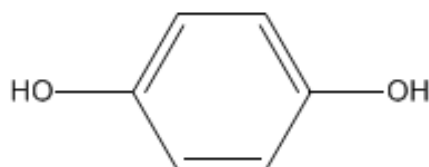


Figura 5. Estrutura química da hidroquinona. A estrutura da HQ consiste em 2 grupos hidroxila (-OH) na posição *para* de um anel benzênico.

Uma forte linha de evidências mostra que a toxicidade da HQ é consequência do seu elevado poder oxidativo. Nos tecidos, como hepático e pulmonar, a HQ é rapidamente oxidada em outros metabólitos, dos quais destaca-se a 1,4-benzoquinona e semiquinonas. Este processo pode ocorrer espontaneamente ou via ação enzimática, como pelas enzimas da família citocromo P450, mieloperoxidase e prostaglandina H sintetase. Após ser oxidada, a molécula passa a possuir um centro eletrofílico forte, que é altamente reativo e capaz de se ligar covalentemente a macromoléculas, como proteínas e DNA (Fig. 6). Além dos metabólitos altamente reativos, a oxidação da HQ gera espécies reativas de oxigênio (EROs) que também são

responsáveis por interagir com macromoléculas e, em excesso, causam estresse oxidativo (DECAPRIO, 1999; MCGREGOR, 2008; SNYDER, 2007; SUBRAHMANYAM *et al.*, 1991). Essas interações com moléculas biológicas podem levar a formação de adutos de DNA, peroxidação lipídica de membranas celulares e fragmentação de proteínas. Com isso, a toxicidade da HQ é decorrente, pelo menos em parte, do intenso estresse oxidativo e da complexação dos seus metabólitos com biomoléculas, que resultam em mutações, carcinogênese, interferência em mecanismos celulares e morte celular (ABPLANALP *et al.*, 2018; AMIN *et al.*, 2018; BAHADAR *et al.*, 2015; GAO *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2017; XIONG *et al.*, 2016).

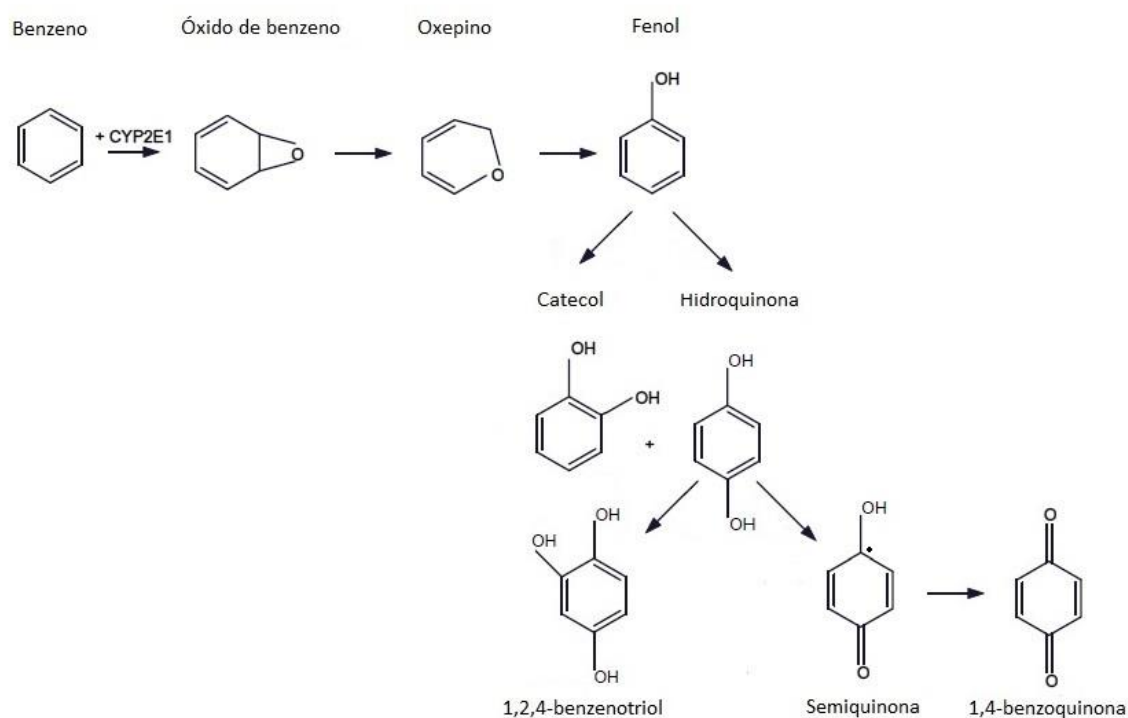


Figura 6. Metabolismo endógeno do benzeno. Resumidamente, o BZ é enzimaticamente metabolizado em óxido de benzeno, que é transformado em fenol por rearranjo não-enzimático. Por sua vez, o fenol é biotransformado em catecol e HQ. A HQ é posteriormente oxidada em 1,2,4-benzenotriol e semiquinona, a qual é novamente oxidada em 1,4-benzoquinona. O ponto na molécula de semiquinona representa o forte núcleo eletrofílico.

Estudos *in vitro* mostram que a HQ causa supressão da secreção de mediadores inflamatórios, como interferon (IFN) do tipo I e II, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 e TNF, além de reduzir a viabilidade celular de leucócitos, inibir a função fagocítica de fagócitos e a proliferação e maturação dos linfócitos B e T (CHOI *et al.*, 2008; FRAZER-ABEL *et al.*, 2007; HUANG *et al.*, 2015; KIM *et*

al., 2009; KIM *et al.*, 2017; KING *et al.*, 1987; LEE *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2002; LEWIS *et al.*, 1988; PENG *et al.*, 2012; PYATT *et al.*, 1998; PYATT *et al.*, 2000; OUYANG *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2011). Após exposição *in vivo*, foi evidenciado que a exposição à HQ causa leucemia de células mononucleares, compromete a resposta inata por comprometer a migração leucocitária, prejudica funções importantes para os neutrófilos, causa genotoxicidade em esplenócitos e apoptose de leucócitos (HEBEDA *et al.*, 2012; JAGETIA *et al.*, 2000; MACEDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a; SHIMADA *et al.*, 2012b).

Algumas doenças em humanos ligadas à exposição ao cigarro têm sido associadas à exposição à HQ. Neste caso, foi mostrado que fumantes possuem maior incidência de degeneração da mácula associada à idade (SMITH *et al.*, 2001; DHUBHGHAILL *et al.*, 2010; THORNTON *et al.*, 2005; KLEIN *et al.*, 2008), que é um processo degenerativo do epitélio pigmentado da retina e é a principal causa de cegueira não tratada dentre os idosos. A etiologia ainda não é totalmente compreendida, não existe cura, meios de prevenção e as formas de tratamento são escassas (SHARMA *et al.*, 2012; AUGOOD *et al.*, 2006; KLEIN *et al.*, 2004). São diagnosticados mais de 300.000 novos casos por ano só nos Estados Unidos e, ao menos que algum modo de tratamento preventivo seja descoberto, é esperado que este número aumente para proporções epidêmicas (FRIEDMAN *et al.*, 2004; REIN *et al.*, 2009). Estudos experimentais mais recentes têm mostrado que a HQ presente no cigarro é um dos responsáveis pela doença e os mecanismos envolvem ação via receptor AGE (*advanced glycation endproduct*), desregulação da produção de citocinas e fatores de crescimento pelo epitélio ocular (BERTRAM *et al.*, 2009; PONS *et al.*, 2010; PONS *et al.*, 2011; TSUJINAKA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2009). Ademais, a exposição à fumaça do cigarro está envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, uma vez que a incidência de artrite é maior em fumantes (OLIVER e SILMAN, 2006; KLARESKOG *et al.*, 2007). Nosso grupo de pesquisa mostrou, recentemente, que quando ratos são expostos à HQ, ocorre aumento dos sintomas da doença, como edema nas articulações, aumento no infiltrado celular e produção de IL-6, IL-1 β e IL-17

no local da inflamação, resultando na piora do quadro clínico da doença (HELUANY *et al.*, 2018a; HELUANY *et al.*, 2018b). Em conjunto, estes dados recentes confirmam que a HQ é um importante componente do cigarro e que seus efeitos tóxicos não podem ser negligenciados.

Embora a literatura mostre que a exposição ao cigarro interfere negativamente com o sistema imunológico resultando em resposta deficiente à imunização, não há dados sobre quais componentes do cigarro são os responsáveis por este efeito. Sabe-se que o cigarro possui mais de 8000 substâncias (STABBERT *et al.*, 2017) e que muitas delas são altamente tóxicas. No entanto, nenhuma delas ainda foi descrita como interferente da resposta humoral frente a vacinação contra o *Influenza*. Como existe demonstração recente que a HQ é um componente importante do cigarro e que sua ação tóxica desencadeia doenças de maior incidência em fumantes, é importante investigar se a exposição à HQ prejudica a resposta imune na vacinação contra influenza.

2. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da exposição à HQ *in vivo* sobre parâmetros da imunização ativa induzida pela vacina contra o vírus causador da influenza.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, de 6 a 8 semanas de idade e com peso entre 20-25g, foram fornecidos pelo Biotério da FCF-USP e do Instituto de Química (IQ) da USP. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério até o início dos experimentos. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CEUA no. 561).

3.2 Exposição à HQ

O protocolo de exposição foi feito por meio da nebulização de solução de HQ (99%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) na concentração de 2500 ppm, na frequência de 1mL/minuto, por 1 hora, diariamente, por um total de 8 semanas (Fig. 7). Animais controles receberam volumes equivalentes do veículo (Tampão Fosfato de Sódio (PBS) pela mesma via. Para tanto, 5 animais de cada vez foram acondicionados em uma caixa de volume total de 29L dotada de 3 orifícios. Pelo primeiro orifício, as soluções de HQ ou PBS foram nebulizadas utilizando um inalador ultrassônico (NS®, São Paulo, BR). Os outros dois orifícios permitiram a saída dos vapores da caixa de acondicionamento. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão. Vale salientar que os animais não sofreram durante este procedimento, o qual já foi realizado diversas vezes no laboratório da Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Poliselli Farsky (HELUANY *et al.*, 2018a; HELUANY *et al.*, 2018b; MACEDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a; SHIMADA *et al.*, 2012b).

3.3 Imunizações

Cada animal foi imunizado 2 vezes, via intramuscular, nas semanas 6 e 8 durante do período de exposição, com um total de 100uL, metade deste volume em cada coxa por dose, conforme esquematizado na Figura 7. Esse volume contém 3,75µg de vacina trivalente e fragmentada, sendo 1,25µg referentes a cada um dos 3 vírus: A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 - A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) - B/ Brisbane/60/2008. Esta vacina foi gentilmente cedida pelo Dr. Paulo Lee Ho, do Instituto Butantan.

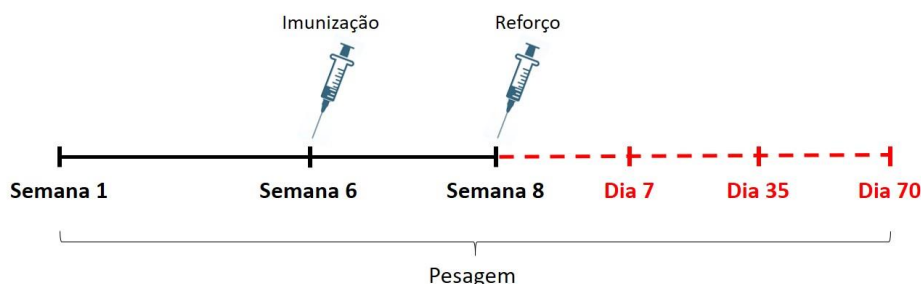


Figura 7. Protocolo de exposição à HQ. Os animais foram expostos às soluções de HQ e seu veículo (PBS) por um total de 8 semanas (linha preta) e observados durante as semanas subsequentes com coleta de amostras quando necessário (linha tracejada vermelha). Os animais receberam a primeira dose da vacina na semana 6, e a segunda dose na semana 8.

3.4 Parâmetros Clínicos

3.4.1 Evolução ponderal

Os animais foram pesados semanalmente durante o período de exposição e nas semanas subsequentes ao término das mesmas, como ilustrado na Figura 7.

3.4.2 Hemograma

Os parâmetros hematológicos foram avaliados por meio de hemograma realizado com sangue periférico coletado com anticoagulante (EDTA 10% tamponado - Sigma-Aldrich Cód. 114). O ensaio foi realizado no Contador de Células Sanguíneas automatizado (ABX Vetpack). A contagem diferencial das subpopulações de leucócitos circulantes no sangue foi realizada por meio de esfregaços do sangue coletado em lâminas de vidro, que foram coradas com o kit Panótico Rápido (Laborclin). Depois de coradas, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e o número de células foram contadas de acordo com a morfologia. Os resultados estão apresentados em porcentagem de células.

3.4.3 Marcadores do dano tecidual

As atividades das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), além do nível de creatinina sérica, foram determinadas utilizando kits comerciais (Labtest Ref.: 109; 108; e 35, respectivamente) e a absorbância foi obtida em espectrofotômetro Molecular Devices SpectraMAX 190.

3.4.4 Histologia

Catorze dias após a segunda imunização, os animais expostos foram eutanasiados e o baço, linfonodos inguinais, pulmão, fígado e rins foram coletados para preparação de cortes histológicos. Os órgãos removidos foram fixados em paraformaldeído 4% tamponado e processados para inclusão em blocos de parafina. Em seguida, as amostras foram seccionadas a 3µm e corados com Hematoxilina-Eosina para posterior análise em microscópio óptico Nikon E 200.

3.5 ELISPOT

O ensaio de ELISPOT para quantificação de células secretoras de antígenos totais e específicas ao antígeno da vacina foi realizado conforme desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Silveira da FCF-USP, com modificações. Para o *coating*, foram utilizados 100µL de vacina diluída por poço, que contém 3µg/mL de cada antígeno, conforme descrito no item 3.3, e 100µL por poço do anticorpo anti-IgG, IgM e IgA (H + L) murino (Invitrogen A-10666) diluído, que contém 5µg/mL de proteína. Estas soluções foram adicionadas às placas de ELISPOT (Millipore MSHAN4B50) e foram incubadas *overnight* a 4°C. Após a etapa de *coating*, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T20 0.05%) e 4 vezes com PBS estéril. Em seguida, os poços foram bloqueados por 2 horas usando meio de cultura RPMI suplementado com 10% de FBS (RPMI-FBS10%). Após o bloqueio, o meio de cultura foi removido das placas e 1x10⁶ células (esplenócitos, linfonodos drenantes e lavado de medula óssea), diluídas em RPMI-FBS10%, foram adicionadas nos primeiros poços da placa. Diluições seriadas de 3 vezes foram realizadas nos poços das linhas seguintes das placas, as quais foram incubadas *overnight* a 37°C em estufa de 5% de CO₂. Em seguida, as células foram removidas e as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T20 0.05%. Posteriormente, uma solução de anticorpo secundário biotilado específico à IgG (ThermoFisher Scientific - B2763), diluído 1:1000 em solução de PBS contendo 0.05% de Tween 20 e 2% de FBS (PBS-T20 0.05%-FBS2%), foi incubada por 120 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente por 4 vezes com

solução PBS-T20 0.05%, receberam solução de Avidin D - HRP (Vector labs), diluída 1:1000 em PBS-T20 0.05%-FBS2% e foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente, na ausência de luz. Por fim, o ensaio foi revelado a partir da adição do substrato filtrado 3-amino 9-etilcarbazol (AEC; BD Biosciences - 551951). Após a revelação, as placas foram mantidas à temperatura ambiente para secar e, após secas, os *spots* foram contados no Laboratório do Prof. Dr. Esper George Kallas, da Faculdade de Medicina da USP, usando o equipamento AID Reader.

3.6 ELISA de títulos e avidéz de anticorpos

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi realizado para detecção dos títulos e avidéz de anticorpos IgG específicos à vacina a partir de amostras de soro de camundongos que foram expostos à HQ ou PBS e imunizados.

Para determinação dos títulos foi realizado o seguinte procedimento experimental: primeiramente, 100µL da vacina diluída, que corresponde a 3µg/mL de cada antígeno, conforme já descrito no ensaio de ELISPOT (item 3.6), foi diluída em PBS e adicionado a cada poço da placa de ELISA (Costar high-binding) para a sensibilização. Após incubação *overnight* a 4°C, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de PBS contendo 0.5% de Tween 20 (PBS-T20 0.5%) e bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com solução de PBS-FBS10% (Solução de Bloqueio). Em seguida, diluições seriadas das amostras de soro coletadas nos dias 7, 35 e 70 após o termino das exposições à HQ ou veículo foram realizadas em solução de bloqueio e adicionadas às placas. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 4 vezes com solução PBS-T20 0.5% e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG murino, diluído 1:3000 (Sinapse Biotecnologia – 04-18-06), anti-IgG1 murino, diluído 1:16000 (SouthernBiotech – 1970-05), anti-IgG2a murino, diluído 1:4000 (SouthernBiotech – 1080-05) ou anti-IgG2b murino, diluído 1:16000 (SouthernBiotech – 1090-05). Todos os anticorpos secundários estavam conjugados à peroxidase e foram diluídos em solução de bloqueio. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 4

vezes com solução PBS-T20 0.5% e reveladas com solução contendo o substrato *o-phenylenediamine* (OPD - 1 mg/mL) diluído em tampão fosfato-citrato (pH 5.2) contendo 0,003% de peróxido de hidrogênio. Para finalizar a revelação do ensaio, foi adicionado ácido sulfúrico a 2M às placas de ELISA (protocolo adaptado de DE ALMEIDA *et al.*, 2008 e ZELNIK *et al.*, 2004). Em seguida, as placas foram lidas em leitor de ELISA (Awareness Technology, model Stat Fax 3200, EUA) sob densidade óptica de 492nm.

Para determinação da avidéz foi realizado o seguinte protocolo: o ensaio foi realizado exatamente como o ELISA descrito, mas com uma etapa adicional na qual as placas foram incubadas com solução de ureia 6M. Para realização do ensaio, duas placas foram feitas simultaneamente contendo as mesmas amostras nas mesmas diluições. Portanto, após as amostras terem sido adicionadas nas placas, incubadas por 90 minutos e as placas serem lavadas 4x com PBS-T20 0.5%, uma das placas, correspondente ao ensaio de avidéz, recebeu 100µL de solução de ureia 6M preparada em solução de bloqueio por poço e foi incubada por 30 minutos. A outra placa contendo as mesmas amostras foi mantida com 100µL de solução de bloqueio. Após a incubação simultânea das duas placas, estas foram lavadas 4x com PBS-T20 0.5% e a continuidade do experimento para as duas placas foi realizado exatamente como o descrito para determinação dos títulos. Para avaliar o índice de avidéz, que é expresso em porcentagem, a absorbância das placas que foram tratadas com ureia foi dividida pela absorbância das placas que não receberam o tratamento com ureia e o resultado foi multiplicado por 100.

3.7 Detecção do estresse oxidativo nos esplenócitos

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi avaliada nos esplenócitos de animais expostos à HQ, usando o substrato 2' 7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (ELBIM e LIZARD, 2009, com modificações). Baço dos camundongos foi coletado, macerado, filtrado em Cell Strainer (70µm; Falcon® - 352350), e lisado com (NH₄Cl 0,15M) para eliminar as hemácias. 1x10⁶ células foram incubadas com DCFH-DA (340 µM solubilizado em PBS) e incubadas por 30 min à 37°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS para retirar o excesso de substrato,

centrifugadas por 5 minutos à 1,5G e ressuspendidas em PBS. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD Accuri™ C6. Os resultados estão expressos em frequência de células (%) e intensidade média de fluorescência (MFI) de 50 mil eventos analisados.

3.8 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média $\pm$ DP e foram analisados estatisticamente pelo Teste “t” de Student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey ou Kruskal-Wallis, quando necessário. Para tanto, foi utilizado o *software* estatístico *GraphPad Prism*® 7.0. Os valores obtidos foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Efeitos da exposição à HQ sobre o peso corporal, hemograma e atividade enzimática do fígado e rins

A variação de peso corpóreo e a quantificação de enzimas de atividade hepática e renal são parâmetros de toxicidade em estudos experimentais de longa exposição. Ainda, é conhecido que a HQ causa mielotoxicidade (MCGREGOR, 2008). Assim, estes parâmetros foram avaliados como indicadores da intensidade de intoxicação por nós induzida neste estudo.

Para tanto, o peso corpóreo, parâmetros hematológicos e marcadores de atividade hepática e renal dos animais foram quantificados. Observamos que não houve perda de peso corpóreo nos animais expostos à HQ em relação aos animais do grupo controle (expostos ao PBS) (Fig. 8A).

Ademais, o hemograma foi realizado na sexta semana após o início da exposição e antes da primeira imunização. Notamos que houve diminuição significativa, porém discreta, do número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM) nos animais expostos à HQ em relação àqueles que receberam PBS (Fig. 9A, B, C, D e E). Contudo, não houve diferença na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), nas subpopulações de leucócitos circulantes e nas plaquetas (Fig. 9F, G, H e I).

Para avaliar se a exposição à HQ causaria toxicidade no fígado e rins, órgãos de metabolização e excreção do xenobiótico, respectivamente, nós avaliamos a atividade das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) e os níveis de creatinina sérica durante a exposição. Não foram observadas alterações significativas nos níveis destes marcadores de dano tecidual (Fig. 10A, B e C).

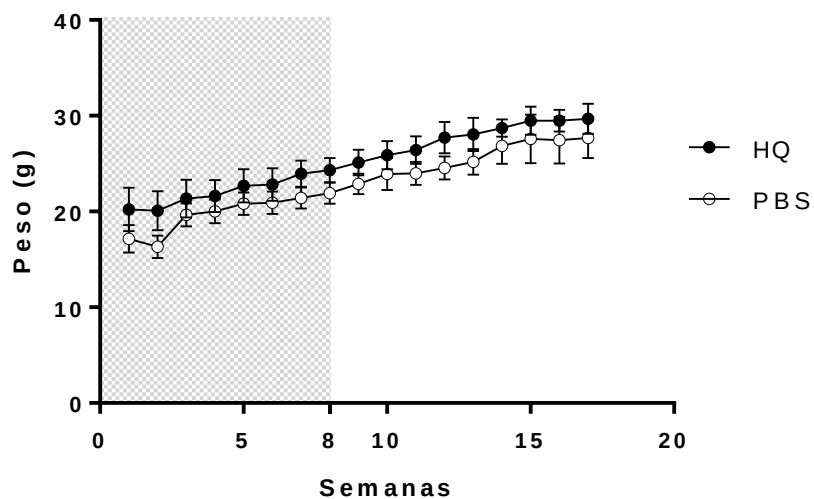


Figura 8. Efeito da exposição à HQ sobre a evolução ponderal dos animais ao longo do protocolo de exposição à HQ. Peso obtido semanalmente no período de 8 semanas (caixa cinza) e nas semanas após o termino da exposição à HQ até a eutanásia (A). Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 10 animais por grupo (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

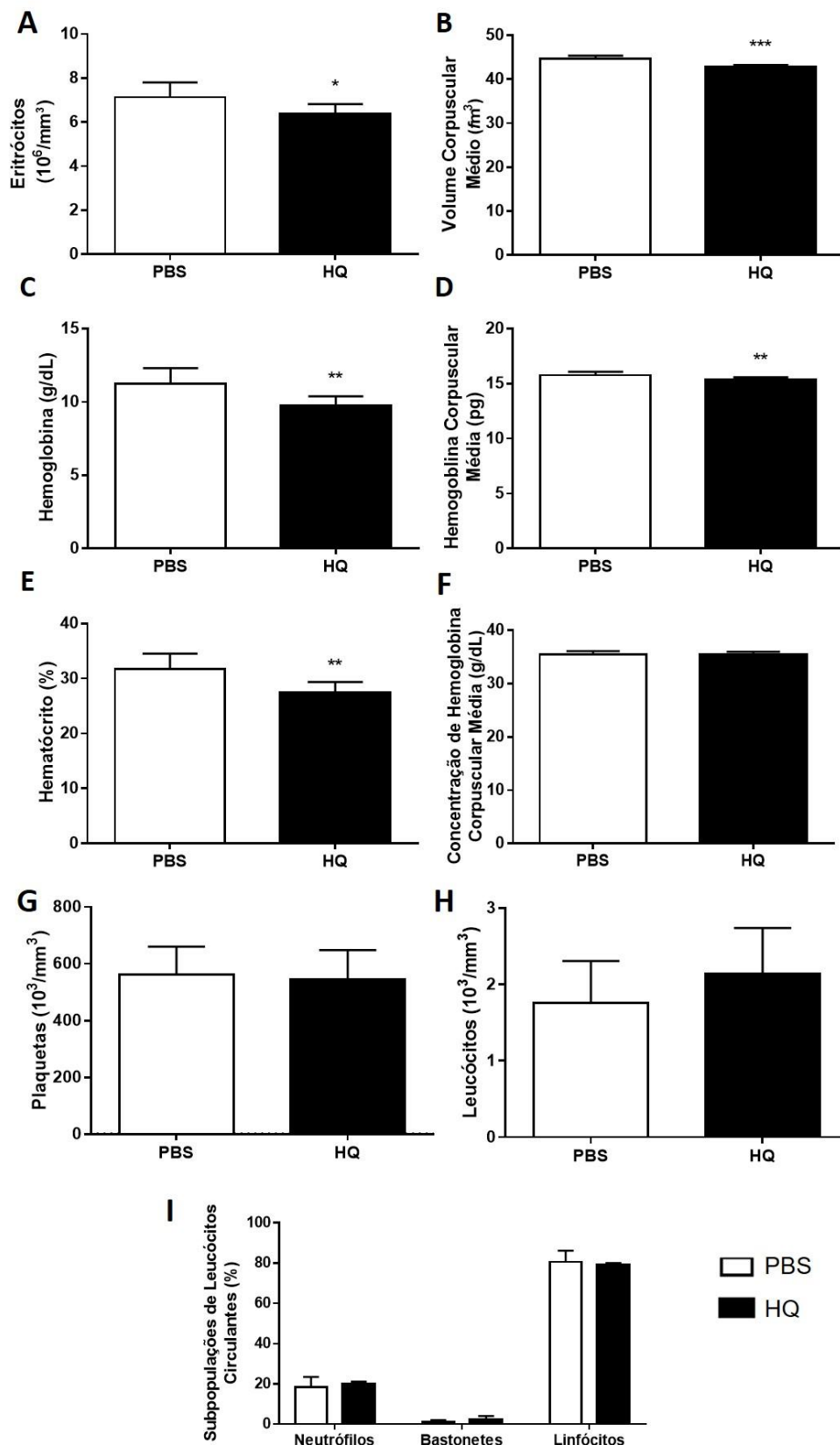


Figura 9. Efeitos da exposição à HQ sobre o hemograma . As análises foram realizadas com o sangue obtido na sexta semana após o início das exposições e previamente a administração da primeira dose da vacina. Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 10 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (Teste t de Student).

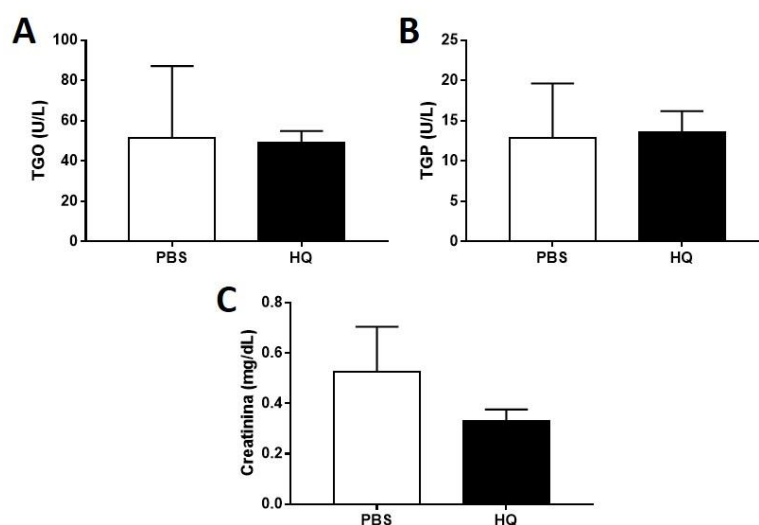


Figura 10. Efeitos da exposição à HQ sobre marcadores de dano hepático e renal. Análise dos níveis plasmáticos das enzimas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) (A) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) (B), e da creatinina (C) na sexta semana de exposição. Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 4 animais por grupo (Teste t de Student).

4.2 Efeitos da exposição à HQ sobre a histologia do fígado, pulmão, rins e órgãos linfoides secundários

Com o intuito de realizar uma avaliação complementar da toxicidade da exposição à HQ em órgãos de metabolização e excreção, bem como no pulmão, órgão de absorção da HQ no nosso modelo experimental, cortes histológicos destes tecidos foram feitos para verificar alterações morfológicas na estrutura destes tecidos. Contudo, alterações significativas não foram observadas (Fig. 11).

Além disso, o baço e linfonodos drenantes, órgãos linfoides secundários importantes para a resposta imune frente à vacinação, também foram analisados histologicamente a fim de verificar alterações morfológicas decorrentes da toxicidade da HQ. Foi observado que o baço de animais expostos à HQ apresentou desorganização de estruturas morfológicas, com aumento no tamanho da área destas estruturas em relação ao órgão total, mas sem aumento do tamanho do baço (Fig. 12A, B, E e G). Por outro lado, foi observado linfonodomegalia nos animais expostos à HQ, mas alterações nas estruturas internas destes linfonodos não foram detectadas (Fig. 12C, D e F).

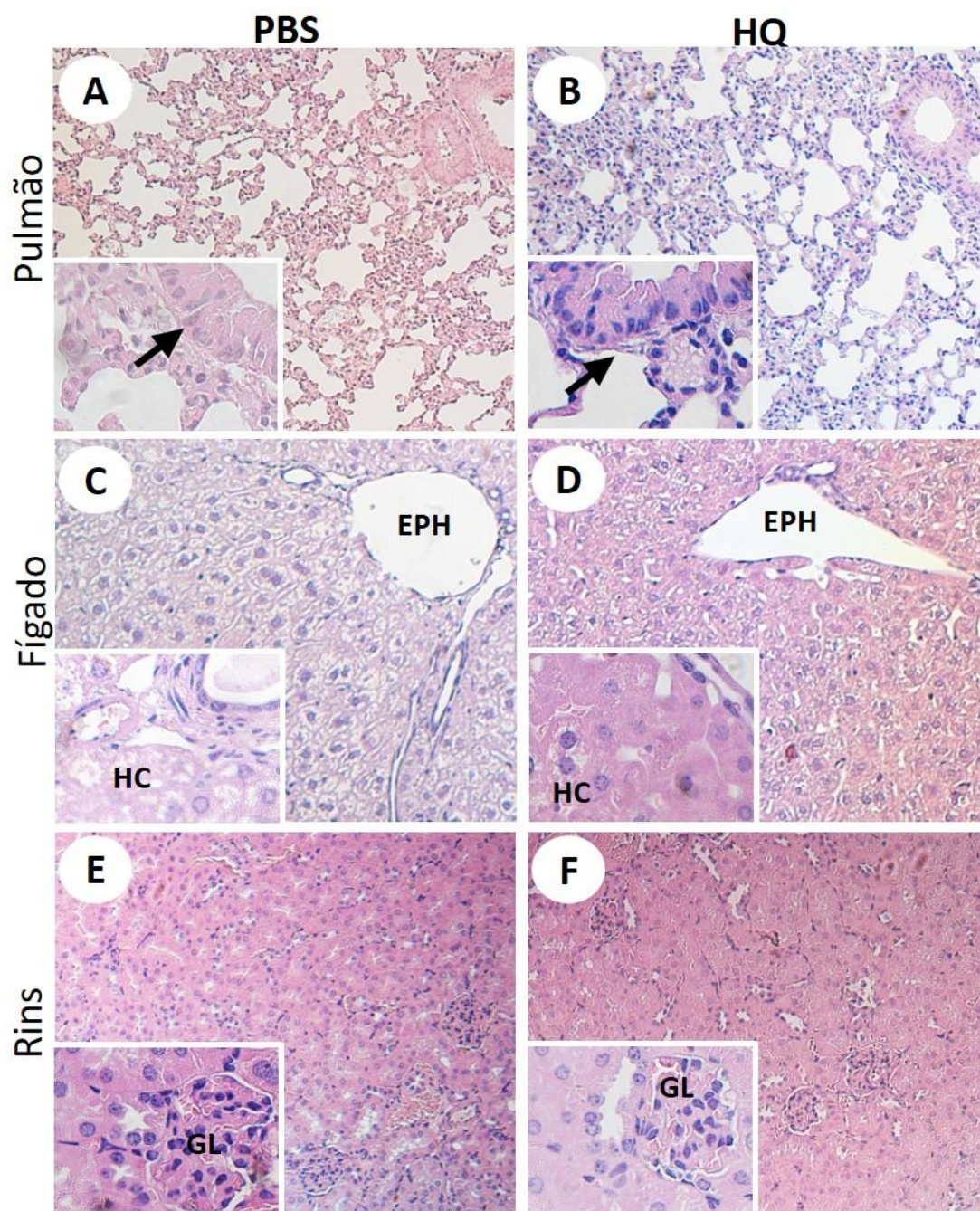


Figura 11. Efeitos da exposição à HQ sobre a morfologia do pulmão, fígado e rim. A morfologia do pulmão (A e B), fígado (C e D) e rins (E e F) está sendo mostrada de forma representativa. Foram analisadas amostras coletadas de 3 animais em cada grupo. Flechas: alvéolos; HC: hepatócitos; EPH: espaço porta hepático; GL: glomérulo. Corte longitudinal, 3µm, corado com Hematoxilina-Eosina.

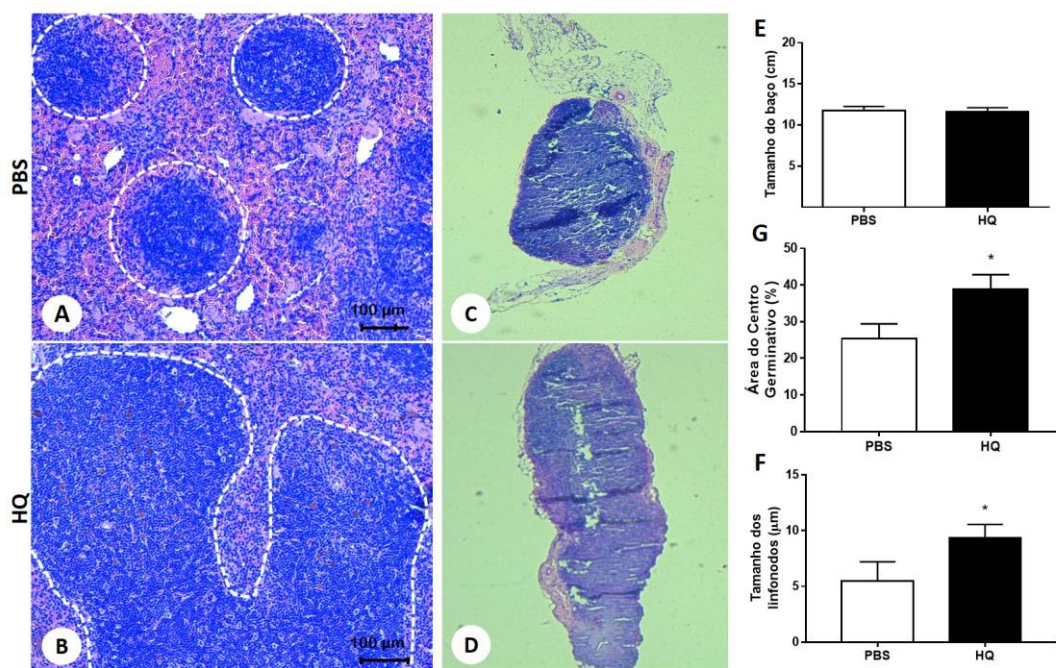


Figura 12. Efeitos da exposição à HQ sobre a morfologia do baço e linfonodos drenantes. Os órgãos foram coletados 70 dias após 8 semanas de exposição e administração do reforço da vacina. Alterações morfológicas correspondentes a área dos centros germinativos no baço (A, B, e G), tamanho do baço (E) e dos linfonodos (C, D e F). Limite do centro germinativo (tracejado). A lâmina foi corrida por completo e a imagem é representativa de toda a extensão do órgão. Corte longitudinal, 3µm, corado com Hematoxilina-Eosina. Os resultados expressam a Média ± DP de 3 animais por grupo. * $p < 0,05$ (Teste t de Student).

4.3 Avaliação das Células Secretoras de Anticorpos específicos

Um dos parâmetros usados para avaliar a resposta imunológica dos animais expostos à HQ foi a quantificação das células secretoras de antígeno específicas à vacina em compartimentos importantes para esta resposta. Portanto, estas células foram quantificadas no baço, linfonodos e medula óssea por ELISPOT. Nenhuma alteração no número de células secretoras de anticorpos foi observada no baço e na medula óssea em até 70 dias após o término da exposição e administração do reforço da vacina (Fig. 13A, B e C).

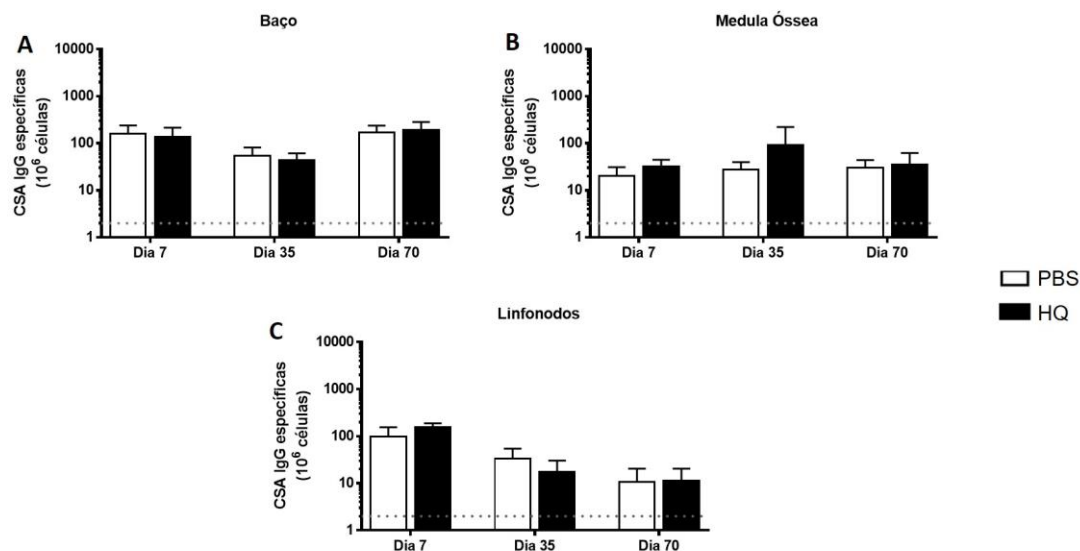


Figura 13. Efeitos da exposição da HQ sobre o número de células secretoras de antígenos em órgãos envolvidos na resposta imune à vacina contra Influenza. As células secretoras de antígenos específicas à vacina foram quantificadas no baço (A), medula óssea (B) e linfonodos drenantes (C), 7, 35 e 70 dias após o término da exposição à HQ e administração do reforço da vacina. Tracejado corresponde ao limite de detecção do ensaio. Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 4 animais por grupo. ** $p < 0,01$ (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Kruskal-Wallis).

4.4 Títulos e avides de IgGs

Outro parâmetro usado para avaliar a resposta induzida pela imunização foi dosar os títulos de anticorpos específicos à vacina e verificar sua avides. Não foi detectado diferença nos títulos nem na avides de IgG específicas em até 70 dias após a administração da segunda dose da vacina (Fig. 14A e B). Além disso, uma análise posterior das subclasses de IgG mostrou que também não houve diferença nos títulos de IgG1, IgG2b e IgG2c em até 70 dias após término da exposição e administração do reforço da vacina (Fig. 14C, D e E).

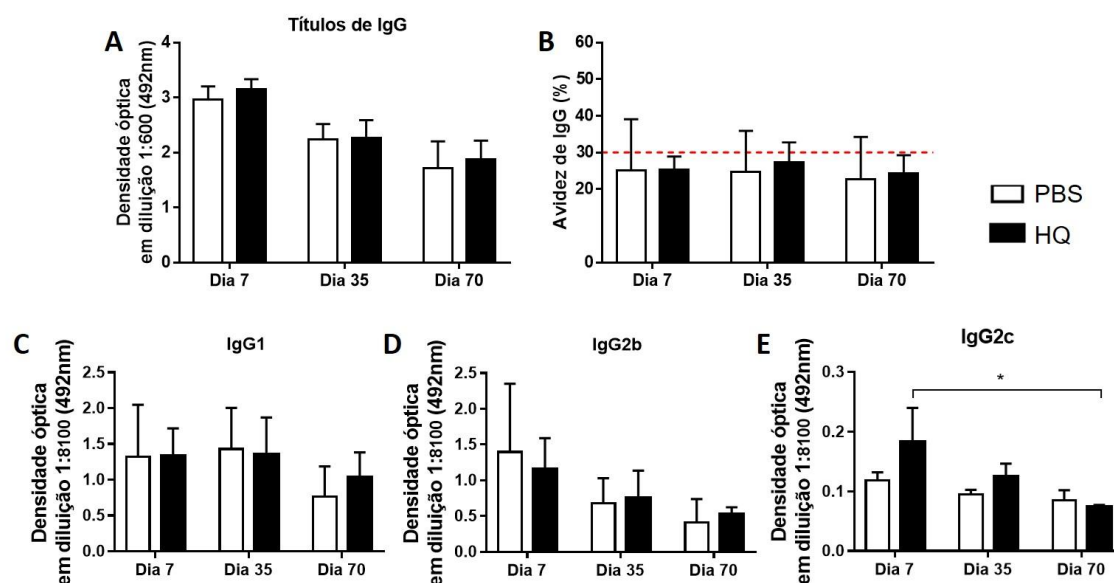


Figura 14. Efeitos da exposição da HQ sobre o título e avidéz de IgG séricas. Os títulos (A) e avidéz (B) de anticorpos específicos à vacina e subclasses (C, D e E) foram avaliados 7, 35 e 70 dias após o término da exposição e administração do reforço da vacina. Soro com valores de avidéz >50% é considerado alta avidéz, de 30 a 50% é considerado avidéz intermediária, e <30% representa avidéz baixa (tracejado vermelho). Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 4 animais por grupo. (Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey).

4.5 Análise do estresse oxidativo em esplenócitos

Sabe-se que um dos mecanismos de toxicidade da HQ é via indução de estresse oxidativo (SNYDER, 2012). Por este motivo, a formação de ERO, que é possível correlacionar com o estresse oxidativo gerado, foi avaliada no baço por meio do marcador DCFH. Observamos que a quantidade de células positivas para DCFH (DCFH⁺) e a mediana da intensidade de fluorescência (MFI) estavam aumentadas nos esplenócitos de animais expostos à HQ (Fig.15).

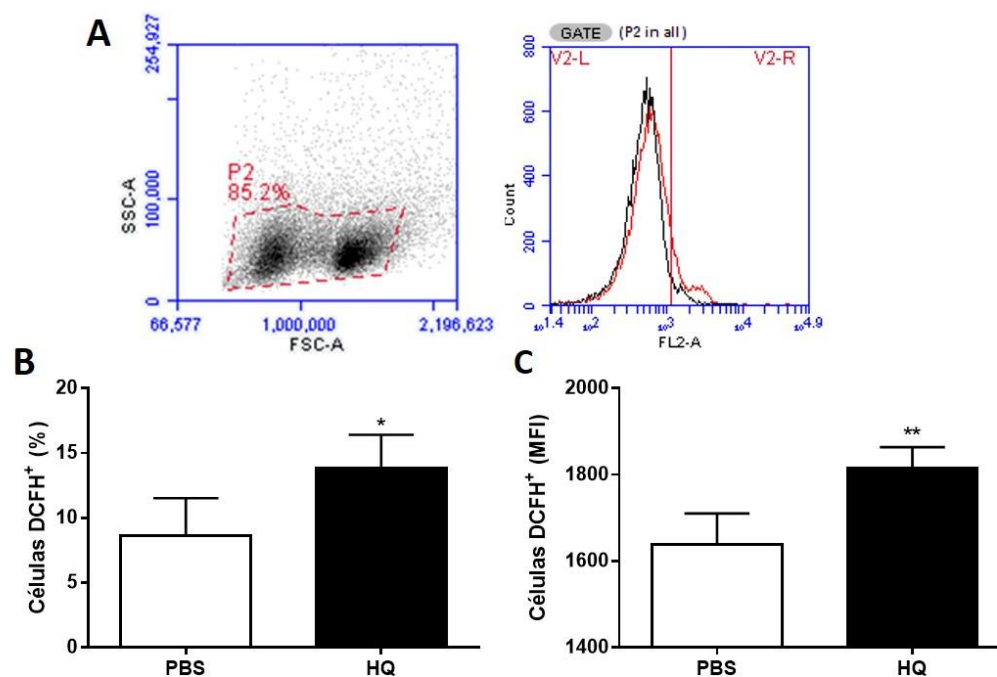


Figura 15. Efeitos da exposição da HQ sobre a formação de ERO no baço. Estratégia de *gating* usado para (A). Porcentagem de células DCFH⁺ (B). Mediana da intensidade de fluorescência (MFI) das células DCFH⁺ (C). Os resultados expressam a Média $\pm$ DP de 4 animais por grupo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (Teste t de Student).

5. DISCUSSÃO

O presente trabalho foi delineado para investigar a toxicidade da HQ sobre o sistema imune, que poderia causar prejuízos nas imunizações ativas, como no caso da vacina da gripe. A fundamentação do mesmo está pautada na menor efetividade da vacinação em fumantes (FINKELA *et al.*, 1971; GODOY *et al.*, 2017; GRUIJIFF *et al.*, 1999; LUGADE *et al.*, 2014; WILSON *et al.*, 2013); na grande quantidade de HQ, bem como de benzeno, em cigarros (STABBERT *et al.*, 2017); na atividade imunossupressora da HQ detectada *in vivo* (HEBEDA *et al.*, 2012; JAGETIA *et al.*, 2000; MACEDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012b); e na importância da influenza para a saúde pública (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2018; FALLEIROS e BRICKS, 2016). Ademais, considerando que o vírus *Influenza* causa principalmente infecção das vias aéreas (KATO e SCHLEIMER, 2007) e que o cigarro causa o comprometimento das células deste tecido (SHI *et al.*, 2018), os tabagistas apresentam maior susceptibilidade a infecções respiratórias, sendo assim, um grupo de risco em pandemias.

Os resultados obtidos mostram que a exposição crônica à HQ não alterou marcadores importantes de intoxicação ao solvente, mas altera processos que possam ser relevantes na imunização. O protocolo de exposição foi baseado em modelos empregados em nosso laboratório, e concentração e tempos de exposição foram realizados de acordo com trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa (HELUANY *et al.*, 2018a; HELUANY *et al.*, 2018b; MACEDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a; SHIMADA *et al.*, 2012b). No entanto, o tempo de exposição e concentração de HQ aqui empregados foram muito superiores aos usados anteriormente. O maior tempo de exposição foi empregado com base na literatura em estudos de exposição à fumaça de cigarro para avaliação da toxicidade ao sistema imune e pulmonar, que variaram de 4 semanas ou mais de exposição (LIANG *et al.*, 2018; SINZATO *et al.*, 2018; VAZ *et al.*, 2015; ZHOU *et al.*, 2018). O emprego da concentração elevada de HQ foi possível, uma vez que houve mudança no veículo empregado para dissolução da HQ. Exposições realizadas anteriormente empregaram o etanol a 0,5% como veículo, e no presente trabalho usamos solução salina, que diminui marcadamente a toxicidade da exposição. Vale ressaltar que

estudos de dose e tempo/efeito foram realizados para padronização do protocolo experimental.

A análise do peso dos animais é um índice relevante em estudos experimentais de toxicologia, uma vez que ganho ou perda de peso pode refletir toxicidade nas áreas de saciedade ou locomoção no sistema nervoso central, ou em vias de metabolismos e excreção (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2010). Nossos dados mostraram que o protocolo de exposição à HQ usado neste trabalho não comprometeu a evolução ponderal, indicando que não houve toxicidade aparente nestes sistemas descritos. Adicionalmente, os níveis plasmáticos de creatinina e a atividade das enzimas TGO e TGP não foram alterados devido as exposições diárias à HQ, corroborando o não comprometimento de vias de metabolismos e excreção. Por fim, a exposição à HQ também não causou alterações histológicas no pulmão, fígado e rins, órgãos de absorção, metabolização e excreção da HQ, respectivamente. Desta forma, supomos que a exposição à HQ não causou toxicidade aparente aos animais. Além disso, a exposição à HQ poderia não ser um dos principais contribuintes para o aumento da suscetibilidade à infecção pelo *Influenza* das células do sistema respiratório, visto que não causou comprometimento morfológico do pulmão.

Como já salientado na Introdução e amplamente descrito na literatura, o BZ absorvido é metabolizado e resulta em mielotoxicidade (MCGREGOR, 2008; SNYDER, 2012; STABBERT *et al.*, 2017). Considerando que a HQ é um dos principais produtos desta metabolização e estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que a HQ inibe a proliferação de linfócitos, induz apoptose e causa genotoxicidade nas células da medula óssea, tem sido atribuído que a HQ seja o metabólito do BZ responsável pela toxicidade na medula (CHEN *et al.*, 2017; LAU *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 1994; MORAN *et al.*, 1996; RUIZ-RAMOS *et al.*, 2017). Os dados aqui obtidos mostraram que a exposição à HQ reduziu a série eritrocítica, embora em pequena magnitude, após poucas semanas de exposição. Além destas, as células secretoras de anticorpos à vacina também não sofreram alterações detectáveis. Estes últimos dados associados aos já descritos anteriormente, confirmam que o protocolo de exposição aqui realizado não causou toxicidade intensa aos animais.

Considerando que o processo de imunização ativa é dependente da migração de plasmablastos para a medula óssea, onde se alojam para diferenciarem-se em plasmócitos (HARGREAVES *et al.*, 2001; O'CONNOR *et al.*, 2004), investigamos as células secretoras de anticorpos específicas que residem neste compartimento. Os dados obtidos mostraram que a quantidade destas células não foi alterada pela exposição à HQ em todos os tempos avaliados. Assim, inferimos que a exposição à HQ não afetou a capacidade de migração das células secretoras de anticorpos para os nichos da medula óssea, nem causou efeitos tóxicos sobre os fatores necessários para a sobrevivência das células secretoras de anticorpos no microambiente medular.

A morfologia dos órgãos linfoides secundários foi analisada no presente trabalho, uma vez que alterações estruturais e funcionais podem resultar em prejuízos para a resposta imune humoral. Nestes compartimentos, as células B residem e circulam até entrarem em contato com antígenos e serem ativadas com o auxílio das células T. Esta interação resulta na formação dos centros germinativos, onde ocorre intensa proliferação celular e as células mais específicas ao antígeno se diferenciam em secretoras de anticorpos (plasmablastos e plasmócitos) (KUMAR *et al.*, 2005). Nossos dados mostraram que a exposição à HQ causou desestruturação dos centros germinativos no baço e aumento na área destes folículos, mas sem alteração no tamanho do órgão e na quantidade de células secretoras de anticorpos. Além disso, os linfonodos parecem ser alvos da HQ, pois a exposição à HQ causou aumento no tamanho destes órgãos associado a redução no número de células secretoras de anticorpos. Há relatos que a HQ e a 1,4-benzoquinona, um de seus metabólitos, podem funcionar como haptenos e sensibilizar os linfonodos aumentando a quantidade de células neste tecido, majoritariamente células B e T (EWENS *et al.*, 1999), além de causar alterações histopatológicas nos órgãos linfoides de animais (RAO *et al.*, 1988; WARD *et al.*, 1985). Associados, estes dados sugerem que a HQ, quando administrada *in vivo*, é capaz de interferir com vias de sinalização nos tecidos linfoides e, desta forma, modular a resposta imunológica.

Estudos descrevem que alterações na estrutura dos centros germinativos do baço são observadas em diferentes doenças, como toxoplasmose, enfisema, e em infecções bacterianas e virais, levam a diminuição na produção de anticorpos (ODERMATT *et al.*, 1991; RACINE *et al.*, 2010; TAKAHASHI, 2004; ZARETSKY *et al.*, 2018). Dentre as causas responsáveis por esta diminuição, pode-se destacar a atividade irregular das células T nos folículos linfoides que acabam por causar a morte de outros tipos celulares do microambiente e prejudicando a estrutura do tecido, diminuição da produção de CXCL13 pelas células dendríticas foliculares e comprometimento da sinalização da via do TNF, o qual é essencial para a organização dos centros germinativos (MUELLER e AHMED, 2008). Com base nestes estudos, poder-se-ia supor que a produção de anticorpos frente a imunização à influenza estaria reduzida nos animais que foram expostos à HQ. À primeira vista, os títulos de IgG, bem como sua avidéz ao antígeno, não foram alterados pela exposição à HQ, mas uma análise dos títulos das subclasses destes anticorpos mostrou diminuição da IgG2c a longo prazo. Trabalhos relacionam a importância desta subclasse de IgG na proteção contra o *Influenza A*, onde vacinas que a induzem tem maior eficiência em proteger camundongos contra a infecção e, ainda, animais que possuem menores títulos de IgG2c tem maior perda de peso e mortalidade frente ao desafio imunológico (BALDWIN *et al.*, 2018; JIAN *et al.*, 2013; JIANG *et al.*, 2016; KANG *et al.*, 2004; KOPECKY-BROMBERG *et al.*, 2009; WELDON *et al.*, 2012). Van Den Hoecke e colaboradores (2017) corroboraram recentemente a importância da IgG2c contra o *Influenza* pela comparação da eficácia de IgG1 e IgG2c, de mesma especificidade, em animais de experimentação. Neste estudo, animais tratados com a subclasse IgG2c e posteriormente desafiados apresentaram melhor capacidade de neutralizar o vírus e foram protegidos quando comparado aos que foram tratados com IgG1 e aos animais controles. Com base nestes estudos é possível afirmar que a IgG2c desempenha papel fundamental na proteção contra a infecção causada pelo *Influenza*. Portanto, nossos dados sugerem que a HQ pode tornar a resposta imune específica à vacina menos duradoura por causar a diminuição de IgG2c a longo prazo e resultar em susceptibilidade à infecção viral.

O mecanismo de toxicidade da HQ está relacionado, pelo menos em parte, pela sua capacidade de gerar estresse oxidativo (IARC, 1987; JURICA *et al.*, 2017; MCGREGOR, 2008; SYDER, 2007; SUBRAHMANYAM *et al.*, 1991). Assim, é possível que o estresse oxidativo possa ser o mecanismo responsável por causar as alterações morfológicas observadas, a diminuição das células secretoras de anticorpos nos linfonodos drenantes e, conseqüentemente, a queda dos títulos de anticorpos específicos a longo prazo observado em animais expostos à HQ. Nossos dados mostraram que esplenócitos de animais que foram expostos à HQ apresentaram aumento na quantidade de células em estresse oxidativo e aumento na intensidade deste processo, mesmo 7 dias após o término das exposições. Embora seja possível que o aumento de estresse oxidativo seja o mecanismo da toxicidade da HQ em esplenócitos, sabe-se que a concentração das espécies de oxigênio formada é fator relevante para efeitos imunossupressores ou imunoestimulantes. ERO estão envolvidas no *burst* oxidativo de fagócitos e na atividade de linfócitos na imunidade adaptativa (BAUER e DE LA FUENTE, 2016; DE LA FUENTE *et al.*, 2011). O peróxido de hidrogênio é fator importante para a ativação e diferenciação das células B, onde células na ausência deste composto apresentam prejuízo nestes processos celulares (BERTOLOTTI *et al.*, 2016; POLIKOWSKY *et al.*, 2015); As células T, assim como as B, necessitam das ERO para serem ativadas, expandidas e exercerem sua função (CEMERSKI *et al.*, 2002; DEVADAS *et al.*, 2002; GELDERMAN *et al.*, 2006; JACKSON *et al.*, 2004). Diferentemente, altas concentrações de ERO levam a ativação de mecanismos de morte celular, o que é bem descrito para os efeitos tóxicos da HQ (BELIKOV *et al.*, 2015; CHO, 2008; GELDERMAN *et al.*, 2006). Assim, o real papel do aumento do estresse oxidativo nos esplenócitos pela exposição à HQ ainda não pode ser estabelecido. É possível que este seja ativado para reestabelecer a resposta adaptativa ineficiente pela exposição à HQ, como mediador em diversas etapas do processo, ou se é um indutor de ações tóxicas que levam a modificações estruturais do tecido e conseqüentemente da função.

Em conjunto, os dados obtidos mostram que o protocolo de exposição aqui realizado não causou um quadro de intoxicação grave, mas descrevem efeitos tóxicos da HQ ainda não descritos. Ademais, os dados apontam que a

exposição à HQ é um problema de saúde pública, visto que causa toxicidade em mecanismos ligados à resposta humoral na vacinação contra Influenza. A vacina da gripe demanda intenso trabalho e investimento financeiro para ser produzida anualmente (PEASAH *et al.*, 2013). Assim, a identificação de agentes que interfiram na eficácia da mesma é relevante para identificação de grupos de risco das graves complicações decorrentes da infecção viral.

6. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que a exposição por tempo prolongado à HQ não causou intoxicação aparente nos animais, porém a resposta imune adaptativa frente à vacinação foi prejudicada, visto que a exposição à HQ causou alterações morfológicas no baço e linfonodos drenantes.

Estes resultados são inéditos, pois mostram alterações nos órgãos linfoides secundários resultantes da exposição à HQ que ainda não foram descritas em casos de exposição ao BZ ou à própria HQ.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abplanalp W, Wickramasinghe NS, Sithu SD, Conklin DJ, Xie Z, Bhatnagar A, Srivastava S, O'Toole TE. Benzene exposure induces insulin resistance in mice. *Toxicol Sci*. 2018 Oct 22.

Academia Brasileira de Ciências.
<http://www.abc.org.br/article.php3?id_article=3151> Acesso em: 24 de outubro de 2016.

Amin MM, Rafiei N, Poursafa P, Ebrahimpour K, Mozafarian N, Shoshtari-Yeganeh B, Hashemi M, Kelishadi R. Association of benzene exposure with insulin resistance, SOD, and MDA as markers of oxidative stress in children and adolescents. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Dec;25(34):34046-34052.

Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, Soubrane G, Tomazzoli L, Topouzis F, Bentham G, Rahu M, Vioque J, Young IS, Fletcher AE. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch Ophthalmol* 2006. 124: 529–535.

Bahadar H, Maqbool F, Mostafalou S, Baeeri M, Gholami M, Ghafour-Boroujerdi E, Abdollahi M. The molecular mechanisms of liver and islets of Langerhans toxicity by benzene and its metabolite hydroquinone in vivo and in vitro. *Toxicol Mech Methods*. 2015;25(8):628-36.

Baldwin SL, Hsu FC, Van Hoeven N, Gage E, Granger B, Guderian JA, Larsen SE, Lorenzo EC, Haynes L, Reed SG, Coler RN. Improved Immune Responses in Young and Aged Mice with Adjuvanted Vaccines against H1N1 Influenza Infection. *Front Immunol*. 2018 Feb 19;9:295.

Bauer ME, Fuente M de L. The role of oxidative and inflammatory stress and persistent viral infections in immunosenescence. *Mech Ageing Dev*. 2016 Sep;158:27-37.

Belikov AV, Schraven B, Simeoni L. T cells and reactive oxygen species. *J Biomed Sci* (2015) 22:85.

Bertolotti M, Farinelli G, Galli M, Aiuti A, Sitia R. AQP8 transports NOX2-generated H₂O₂ across the plasma membrane to promote signaling in B cells. *J Leukoc Biol*. 2016 Nov;100(5):1071-1079. Epub 2016 Jun 2.

Bertram KM, Baglole CJ, Phipps RP, Libby RT. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2009. 297: C1200–1210.

Both GW, Sleight MJ, Cox NJ, Kendal AP. Antigenic drift in influenza virus H3 hemagglutinin from 1968 to 1980: multiple evolutionary pathways and sequential amino acid changes at key antigenic sites. *J Virol*. 1983;48(1):52-60.

Cao Y, Huang Y, Xu K, Liu Y, Li X, Xu Y, Zhong W, Hao P. Differential responses of innate immunity triggered by different subtypes of influenza A viruses in human and avian hosts. *BMC Med Genomics*. 2017; 10 (Suppl 4): 70.

Cao Y, Zhu X, Hossen MN, Kakar P, Zhao Y, Chen X. Augmentation of vaccine-induced humoral and cellular immunity by a physical radiofrequency adjuvant. *Nat Commun*. 2018 Sep 12;9(1):3695.

Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*. 1982 Dec;31(2 Pt 1):417-27.

Cemerski S, Cantagrel A, Van Meerwijk JP, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptorsignaling pathways. *J Biol Chem* (2002) 277(22):19585–93.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and Control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morbidity Mortality Weekly Report* 49(RR03): 1-38, 2000.

Centro de Vigilância Epidemiológica, Informe Técnico. Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza. Brasília, abril de 2018.

Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013 Apr;13(4):227-42. doi: 10.1038/nri3405. Epub 2013 Mar 8.

Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL. Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. *Front Immunol*. 2018;9:320. Published 2018 Mar 5. doi:10.3389/fimmu.2018.00320

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

Chen YJ, Liu WH, Chang LS. Hydroquinone-induced FOXP3-ADAM17-Lyn-Akt-p21 signaling axis promotes malignant progression of human leukemia U937 cells. *Arch Toxicol*. 2017 Feb;91(2):983-997.

Choi JM1, Cho YC, Cho WJ, Kim TS, Kang BY. Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces IFN-gamma production in antigen-primed lymphocytes. *Arch Pharm Res*. 2008 Mar;31(3):337-41.

Chu VT, Fröhlich A, Steinhauser G, Scheel T, Roch T, Fillatreau S, Lee JJ, Löhning M, Berek C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol*. 2011 Feb;12(2):151-9.

Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med*. 2000;51:407-21.

de Almeida CM, da Silva CL, Couto HP, Escocard Rde C, da Rocha DG, Sentinelli Lde P, Kipnis TL, da Silva WD. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. *Toxicon*. 2008 Aug 1;52(2):293-301.

de la Fuente M, Cruces J, Hernandez O, Ortega E. Strategies to improve the functions and redox state of the immune system in aged subjects. *Curr Pharm Des*. 2011 Dec 1;17(36):3966-93.

de Silva, N. S; Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat Rev Immunol*. 2015 March ; 15(3): 137–148.

DeCaprio AP. The toxicology of hydroquinone--relevance to occupational and environmental exposure. *Crit Rev Toxicol*. 1999 May;29(3):283-330.

Devadas S, Zaritskaya L, Rhee SG, Oberley L, Williams MS. Discrete generation of superoxide and hydrogen peroxide by T cell receptor stimulation: selective regulation of mitogen-activated protein kinase activation and fas ligand expression. *J Exp Med* (2002) 195(1):59–70.

Dilosa RM, Maeda K, Masuda A, Szakal AK, Tew JG. Germinal center B cells and antibody production in the bone marrow. *J Immunol*. 1991 Jun 15;146(12):4071-7.

Dhubhghaill SS, Cahill MT, Campbell M, Cassidy L, Humphries MM, Humphries P. The pathophysiology of cigarette smoking and age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 2010. 664: 437–446.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY – EMA. Guideline on repeated dose toxicity - CPMP/SWP/1042/99 Rev 1 Corr. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/guideline-repeated-dose-toxicity-revision-1_en.pdf> Acesso em: 01 jan. 2019.

Elbim C, Lizard G. Flow cytometric investigation of neutrophil oxidative burst and apoptosis in physiological and pathological situations. *Cytometry A*, 75 (2009), pp. 475-48.

Ewens S, Wulferink M, Goebel C, Gleichmann E. T cell-dependent immune reactions to reactive benzene metabolites in mice. *Arch Toxicol*. 1999 Apr-May;73(3):159-67.

Falleiros Arlant LH, Bricks LF: Influenza B Burden in Latin America and Potential Benefits of the New Quadrivalent Vaccines. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, Oxford, v.5, n.1, doi: 10.1093/jpids/piv107, 2016.

Fitch WM, Leiter JM, Li XQ, Palese P. Positive Darwinian evolution in human influenza A viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(10):4270-4.

Francisco PMSB, Donalisio MRC, Lattorre MRDO. Impacto da vacinação contra influenza na mortalidade por doenças respiratórias em idosos. *Rev Saude Publica* 2005; 39(1):75-81.

Frazer-Abel AA, McCue JM, Lazis S, Portas M, Lambert C, Freed BM. Cigarette tar phenols impede T cell cycle progression by inhibiting cyclin-dependent kinases. *Mol Immunol.* 2007 Jan;44(4):488-93.

Friedman DS, O'Colmain BJ, Munoz B, Tomany SC, McCarty C, de Jong PT, Nemesure B, Mitchell P, Kempen J. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004. 122: 564–572.

Gao Y, Tang H, Xiong L, Zou L, Dai W, Liu H, Hu G. Protective Effects of Aqueous Extracts of Flos *Ionicerae Japonicae* against Hydroquinone-Induced Toxicity in Hepatic L02 Cells. *Oxid Med Cell Longev.* 2018 Nov 18;2018:4528581.

Gelderman KA, Hultqvist M, Holmberg J, Olofsson P, Holmdahl R. T cell surface redox levels determine T cell reactivity and arthritis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) 103(34):12831–6.

Godoy P, Castilla J, Soldevila N, Mayoral JM, Toledo D, Martín V, Astray J, Egurrola M, Morales-Suarez-Varela M, Domínguez A. Smoking may increase the risk of influenza hospitalization and reduce influenza vaccine effectiveness in the elderly. *European Journal of Public Health*, Volume 28, Issue 1, 1 February 2018, Pages 150–155.

Góis ALB, Veras RP: Informações sobre a morbidade hospitalar em idosos nas internações do Sistema Único de Saúde do Brasil. *Cien Saude Colet* 2010; 15(6):2859-2869.

Glezen WP, Schmier JK, Kuehn CM, Ryan KJ, Oxford J: The burden of influenza B: a structured literature review. *American Journal of Public Health*, Washington, v.103, n.3, p. 43-51, 2013.

Gross PA, Hermogenes AW, Sacks HS, Levandowski RA. The efficacy of influenza vaccine in elderly persons. A meta-analysis and review of the literature. *Annals of Internal Medicine* 123:518-527, 1995.

Hebeda CB, Pinedo FJ, Bolonheis SM, Ferreira ZF, Muscará MN, Teixeira SA, Farsky SH. Intracellular mechanisms of hydroquinone toxicity on endotoxin-activated neutrophils. *Arch Toxicol.* 2012 Nov;86(11):1773-81.

Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul;14(7):495-504.

Heluany CS, Kupa LVK, Viana MN, Fernandes CM, Silveira ELV, Farsky SHP. In vivo exposure to hydroquinone during the early phase of collagen-induced arthritis aggravates the disease. *Toxicology.* 2018 Sep 1;408:22-30.

Heluany CS, Kupa LVK, Viana MN, Fernandes CM, Farsky SHP. Hydroquinone exposure worsens the symptomatology of rheumatoid arthritis. *Chem Biol Interact.* 2018 Aug 1;291:120-127.

Huang J, Zhao M, Li X, Ma L, Zhang J, Shi J, Li B, Fan W, Zhou Y. The Cytotoxic Effect of the Benzene Metabolite Hydroquinone is Mediated by the Modulation of MDR1 Expression via the NF- κ B Signaling Pathway. *Cell Physiol. Biochem.* v.37, n. 2, p. 592-602, 2015.

Hydroquinone. IARC Monographs.1987

Hwang JK, Alt FW, Yeap LS. Related Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Microbiol Spectr.* 2015 Feb;3(1):MDNA3-0037-2014.

Instituto Butantan.
<<http://www.butantan.gov.br/producao/produtos/Paginas/default.aspx>>
Acesso em: 24 de outubro de 2016.

Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* (2004) 5(8):818–27.

Jagetia GC, Menon KSL, Jain V. Genotoxic effect of hydroquinone on the cultured mouse spleenocytes. *Toxicol Letters.* Vol 121, Issue 1, 8 April 2001, Pages 15-20.

Jian YR, Chang SY, Lin PY, Yang YH, Chuang YH. Inactivated influenza virus vaccine is efficient and reduces IL-4 and IL-6 in allergic asthma mice. *Influenza Other Respir Viruses.* 2013;7(6):1210-7.

Jiang J, Fisher EM, Concannon M, Lustigman S, Shen H, Murasko DM. Enhanced humoral response to influenza vaccine in aged mice with a novel adjuvant, rOv-ASP-1. *Vaccine.* 2016 Feb 10;34(7):887-92.

Jurica K, Karačonji IB, Benković V, Kopjar N. In vitro assessment of the cytotoxic, DNA damaging, and cytogenetic effects of hydroquinone in human peripheral blood lymphocytes. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2017 Dec 20;68(4):322-335.

Hargreaves DC, Hyman PL, Lu TT, et al. A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med.* 2001;194(1):45-56.

Hedestam GBK1, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol.* 2008 Feb;6(2):143-55.

Kalyanaraman B, Darley-USmar V, Davies KJ, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.* 2011;52(1):1-6.

Kang SM, Guo L, Yao Q, Skountzou I, Compans RW. Intranasal immunization with inactivated influenza virus enhances immune responses to coadministered simian-human immunodeficiency virus-like particle antigens. *J Virol*. 2004;78(18):9624-32.

Kato A, Schleimer RP. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 2007 Dec;19(6):711-20. Epub 2007 Oct 24.

Kim H, Webster RG, Webby RJ. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. *Viral Immunol*. 2018 Jan 26.

Kim Y, Kim HG, Han SY, Jeong D, Yang WS, Kim JI, Kim JH, Yi YS, Cho JY. Hydroquinone suppresses IFN- β expression by targeting AKT/IRF3 pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2017 Sep;21(5):547-554.

Kim YJ, Woo HD, Kim BM, Lee YJ, Kang SJ, Cho YH, Chung HW. Risk assessment of hydroquinone: differential responses of cell growth and lethality correlated to hydroquinone concentration. *J Toxicol Environ Health A*. 2009;72(21-22):1272-8.

King AG, Landreth KS, Wierda D. Hydroquinone inhibits bone marrow pre-B cell maturation in vitro. *Mol Pharmacol*. 1987 Dec;32(6):807-12.

Kitler ME, Gavinio P, Lavanchy D. Influenza and the work of the World Health Organization. *Vaccine*. 2002 May 15;20 Suppl 2:S5-14.

Klareskog L, Padyukov L, Alfredsson L: Smoking as a trigger for inflammatory rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v. 19, n. 1, p. 49–54, 2007.

Klein R, Knudtson MD, Cruickshanks KJ, Klein BE. Further observations on the association between smoking and the long-term incidence and progression of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol*. 2008 Jan;126(1):115-21.

Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2004 Mar;137(3):486-95.

Koelle K1, Cobey S, Grenfell B, Pascual M. Epochal evolution shapes the phylodynamics of interpandemic influenza A (H3N2) in humans. *Science*. 2006 Dec 22;314(5807):1898-903.

Kopecky-Bromberg SA, Fraser KA, Pica N, et al. Alpha-Galactosylceramide as an adjuvant for a live attenuated influenza virus vaccine. *Vaccine*. 2009;27(28):3766-74.

Krishnaswamy JK, Alsén S, Yrlid U, Eisenbarth SC, Williams A. Determination of T Follicular Helper Cell Fate by Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2018 Sep 27;9:2169.

Kramarz P, Ciancio B, Nicoll A. Seasonal and pandemic influenza vaccines for the elderly and other risk groups: a review of available data. *Pol Arch Med Wewn.* 2009 Oct;119(10):654-9.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N: Robbins e Contran Patologia - Bases Patológicas das Doenças. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Lau SS, Kuhlman CL, Bratton SB, Monks TJ. Role of hydroquinone-thiol conjugates in benzene-mediated toxicity. *Chem Biol Interact.* 2010 Mar 19;184(1-2):212-7.

Lee JS, Yang EJ, Kim IS. Hydroquinone-induced apoptosis of human lymphocytes through caspase 9/3 pathway. *Mol Biol Rep.* 2012 Jun;39(6):6737-43.

Lee MH, Chung SW, Kang BY, Kim KM, Kim TS. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, enhances interleukin-4 production in CD4+ T cells and increases immunoglobulin E levels in antigen-primed mice. *Immunology.* 2002 Aug;106(4):496-502.

Lewis JG, Odom B, Adams DO. Toxic effects of benzene and benzene metabolites on mononuclear phagocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 Feb;92(2):246-54.

Liang Y, Shen Y, Kuang L, Zhou G, Zhang L, Zhong X, Zhang J, Liu J. Cigarette smoke exposure promotes differentiation of CD4+ T cells toward Th17 cells by CD40-CD40L costimulatory pathway in mice. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2018 Mar 21;13:959-968.

Lugade AA, Bogner PN, Thatcher TH, Sime PJ, Phipps RP, Thanavala Y. Cigarette smoke exposure exacerbates lung inflammation and compromises immunity to bacterial infection. *J Immunol.* 2014 Jun 1;192(11):5226-35.

Macedo SM, Vaz SC, Lourenço EL, De Sousa M da G, Ligeiro-Oliveira, AP, Ferreira JM Jr, Almeida SR, De Lima WT, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicology*, 241(1-2):47-57, 2007.

Macedo SM, Lourenço EL, Borelli P, Fock RA, Ferreira JM Jr, Farsky SH. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. *Toxicology.* 2006 Mar 15;220(2-3):126-35. Epub 2006 Jan 19.

Martínez-Rodríguez JL, Gutiérrez-Hernández R, Reyes-Estrada CA, Granados-López AJ, Arcos-Ortega T, López JA. Quantitative measurement of oxidative damage in erythrocytes as indicator in benzene intoxications. *Toxicol Mech Methods.* 2018 Jul;28(6):450-460.

McGregor D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. *Critic. Rev. Toxicol.*, v. 37, p. 887–914, 2008.

Medici NP, Del Poeta M. New insights on the development of fungal vaccines: from immunity to recent challenges. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Dec;110(8):966-73. doi: 10.1590/0074-02760150335. Epub 2015 Nov 24. Review. PubMed PMID: 26602871; PubMed Central PMCID: PMC4708015.

Mesin L, Ersching 1, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):471-482.

Miller AC, Schattenberg DG, Malkinson AM, Ross D. Decreased content of the IL1 alpha processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone. *Toxicol Lett*. 1994 Nov;74(2):177-84.

Ministério da Saúde. Programa de Saúde do Idoso. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/programas/idoso/programa.num>>, Brasília, 2001.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol*. 2002 Oct 15;169(8):4213-21.

Moran JL, Siegel D, Sun XM, Ross D. Induction of apoptosis by benzene metabolites in HL60 and CD34+ human bone marrow progenitor cells. *Mol Pharmacol*. 1996 Sep;50(3):610-5.

Mueller SN, Ahmed R. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:284-94.

Nicholson KG, Wood JM, Zambon M. Influenza. *Lancet*. 2003 Nov 22;362(9397):1733-45.

Nguyen Van Binh P, Zhou D, Baudouin F, Martin C, Radionoff M, Dutertre H, Marchand V, Thevenin M, Warnet JM, Thien Duc H: Modulation of the primary and the secondary antibody response by tobacco smoke condensates. *Biomed Pharmacother* 2004, 58:527-530.

Nunes B, Viboud C, Machado A, Ringholz C, Rebelo-de-Andrade H, Nogueira P, Miller M. Excess mortality associated with influenza epidemics in portugal, 1980 to 2004. *PLoS One* 2011; 6 (6): e20661.

Nutt SL, Hodgkin PD, Tarlinton DM, Corcoran LM. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar;15(3):160-71.

O'Connor BP, Raman VS, Erickson LD, Cook WJ, Weaver LK, Ahonen C, Lin LL, Mantchev GT, Bram RJ, Noelle RJ. BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):91-8.

Odermatt B, Eppler M, Leist TP, Hengartner H, Zinkernagel RM. Virus-triggered acquired immunodeficiency by cytotoxic T-cell-dependent destruction of antigen-presenting cells and lymph follicle structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Sep 15;88(18):8252-6.

Oliver JE, Silman AJ: Risk factors for the development of rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, v. 35, p. 169-74, 2006.

Olson DR, Heffernan RT, Paladini M, Konty K, Weiss D, Mostashari F: Monitoring the impact of influenza by age: emergency department fever and respiratory complaint surveillance in New York City. *PLoS Medicine*, São Francisco, v.4, n. 8, p. 1349-1361, 2007. *Ophthalmology* 108: 697–704.

Ouyang Y, Virasch N, Hao P, Aubrey MT, Mukerjee N, Bierer BE, Freed BM: Suppression of human IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and TNF- α production by cigarette smoke extracts. *J Allergy Clin Immunol* 2000, 106:280-287.

Paddock CD, Liu L, Denison AM, Bartlett JH, Holman RC, DeLeon-Carne, M, Emery SL, Drew CP, Shieh WJ, Uyeki TM, Zaki SR: Myocardial injury and bacterial pneumonia contribute to the pathogenesis of fatal influenza B virus infection. *The Journal of Infectious Disease*, Chicago, v. 205, n. 6, p. 895-905, 2012.

Peasah SK, Azziz-Baumgartner E, Breese J, Meltzer MI, Widdowson MA. Influenza cost and cost-effectiveness studies globally--a review. *Vaccine*. 2013 Nov 4;31(46):5339-48.

Peng D, Jiaying W, Chunhui H, Weiyi P, Xiaomin W. Study on the cytogenetic changes induced by benzene and hydroquinone in human lymphocytes. *Hum. Exp. Toxicol.*, v. 31, n.4, p. 322-335, 2012.

Polikowsky HG, Wogslund CE, Diggins KE, Huse K, Irish JM. Cutting Edge: Redox Signaling Hypersensitivity Distinguishes Human Germinal Center B Cells. *J Immunol*. 2015 Aug 15;195(4):1364-1367.

Pons M, Cousins SW, Csaky KG, Striker G, Marin-Castaño ME. Cigarette smoke-related hydroquinone induces filamentous actin reorganization and heat shock protein 27 phosphorylation through p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1198-213.

Pons M, Marin-Castaño ME. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2011 Feb 28;6(2):e16722.

Pyatt DW, Yang Y, Stillman WS, Cano LL, Irons RD. Hydroquinone inhibits PMA-induced activation of NF κ B in primary human CD19+ B lymphocytes. *Cell Biol Toxicol*. 2000;16(1):41-51.

Pyatt DW, Stillman WS, Irons RD. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Apr;149(2):178-84.

Racine R, Jones DD, Chatterjee M, McLaughlin M, Macnamara KC, Winslow GM. Impaired germinal center responses and suppression of local IgG production during intracellular bacterial infection. *J Immunol*. 2010 May 1;184(9):5085-93.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO, Inamine A, Smith KG, Dörner T, Hiepe F. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):741-50. Epub 2006 Sep 15.

Rao GS, Siddiqui SM, Pandya KP, Shanker R. Relative toxicity of metabolites of benzene in mice. *Vet Hum Toxicol*. 1988 Dec;30(6):517-20.

Rein DB, Wittenborn JS, Zhang X, Honeycutt AA, Lesesne SB, Saaddine J. Forecasting age-related macular degeneration through the year 2050: the potential impact of new treatments. *Arch Ophthalmol* 2009. 127: 533–540.

Ribeiro AL, Shimada AL, Hebeda CB, De Oliveira TF, De Melo Loureiro AP, Filho W dos R, Santos AM, De Lima WT, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. *Toxicology*, 288(1-3):1-7, 2011.

Rodriguez Gomez M, Talke Y, Goebel N, Hermann F, Reich B, Mack M. Basophils support the survival of plasma cells in mice. *J Immunol*. 2010 Dec 15;185(12):7180-5.

Roldán E, García-Pardo A, Brieva JA. VLA-4-fibronectin interaction is required for the terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high rate immunoglobulin secretion. *J Exp Med*. 1992 Jun 1;175(6):1739-47.

Rozanski CH, Arens R, Carlson LM, Nair J, Boise LH, Chanan-Khan AA, Schoenberger SP, Lee KP. Sustained antibody responses depend on CD28 function in bone marrow-resident plasma cells. *J Exp Med*. 2011 Jul 4;208(7):1435-46.

Ruiz-Ramos R, Cebrian ME, Garrido E. Benzoquinone activates the ERK/MAPK signaling pathway via ROS production in HL-60 cells. *Toxicology*. 2005 May 5;209(3):279-87.

Santos ZMG, Oliveira MLC. Avaliação dos conhecimentos, atitudes e práticas de idosos sobre a vacina contra a Influenza, na UBS, Taguatinga, DF, 2009. *Epidmiol Serv Saúde* 2010; 19(3):205-216.

Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo (SES/SP). Campanha Nacional de Vacinação para o Idoso. Centro de Vigilância Epidemiológica, Informe Técnico. São Paulo, 2001.

Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica, Informe Técnico. 20ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza 23 de abril a 1 de junho de 2018 Dia “D” 12 de maio. 2018.

Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol*. 2005 Mar;5(3):230-42.

Sharma A, Patil JA, Gramajo AL, Seigel GM, Kuppermann BD, Kenney CM. Effects of hydroquinone on retinal and vascular cells in vitro. *Indian J Ophthalmol*. 2012 May-Jun;60(3):189-93.

Shi J, Li H, Yuan C, Luo M, Wei J, Liu X. Cigarette Smoke-Induced Acquired Dysfunction of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in the Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2018; 2018: 6567578.

Shimada AL, Lino-dos-Santos-Franco A, Bolonheis SM, Nakasato A, Damazo AS, Tavares-de-Lima W, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure causes tracheal hyperresponsiveness due to TNF secretion by epithelial cells. *Toxicol Lett*, 211(1): 10-7, 2012.

Shimada AL, Ribeiro AL, Bolonheis SM, Ferraz-de-Paula V, Hebeda CB, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. *Toxicology*. 2012 Jun 14;296(1-3):20-6.

Shtyrya YA, Mochalova LV, Bovincorresponding NV. Influenza Virus Neuraminidase: Structure and Function. *Acta Naturae*. 2009 Jul; 1(2): 26–32.

Si VK, Overkleeft H, Ovaa H, Neefjes J. Chemical biology of antigen presentation by MHC molecules. *Curr Opin Immunol*. 2014 Feb;26:21-31.

Sinzato YK, Bevilacqua EM, Volpato GT, Hernandez-Pando RE, Rudge MVC, Damasceno DC. Maternal Oxidative Stress, Placental Morphometry, and Fetal Growth in Diabetic Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Reprod Sci*. 2018 Dec 6:1933719118815589.

Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, Klaver CC, Klein BE, Hofman A, Jensen S, Wang JJ, de Jong PT. Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye (Lond)* 2001. 19: 935–944.

Snyder R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Metab Rev*. 2007 Oct;36(3-4):531-47.

Snyder R. Leukemia and benzene. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(8):2875-93.

Stabbert R, Dempsey R, Diekmann J, Euchenhofer C, Hagemeister T, Haussmann HJ, Knorr A, Mueller BP, Pospisil P, Reininghaus W, Roemer E, Tewes FJ, Veltel DJ. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicology in Vitro*. Volume 42, August 2017, Pages 222-246.

Stavnezer J, Guikema JE, Schrader CE. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:261-92.

Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the Germinal Center Response. *Front Immunol*. 2018 Oct 25;9:2469.

Subrahmanyam VV, Ross D, Eastmond DA, Smith MT. Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukemia. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(5):495-515.

Sun R, Zhang J, Wei H, Meng X, Ding Q, Sun F, Cao M, Yin L, Pu Y. Acetyl-L-carnitine partially prevents benzene-induced hematotoxicity and oxidative stress in C3H/He mice. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2017 Apr;51:108-113.

Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*. 2008;3:499-522.

Takahashi M. Importance of Splenic Architecture for Systemic Immunity after Oral Immunization. Vol 3 (2004) Issue 2 Pages 99-104

Takahashi T, Suzuki T, Hidari KI, Miyamoto D, Suzuki Y. A molecular mechanism for the low-pH stability of sialidase activity of influenza A virus N2 neuraminidases. *FEBS Lett*. 2003 May 22;543(1-3):71-5.

Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye (Lond)*. 2005 Sep;19(9):935-44. 2005.

Tsujinaka H, Itaya-Hironaka A, Yamauchi A, Sakuramoto-Tsuchida S, Ota H, Takeda M, Fujimura T, Takasawa S, Ogata N. Human retinal pigment epithelial cell proliferation by the combined stimulation of hydroquinone and advanced glycation end-products via up-regulation of VEGF gene. *Biochem Biophys Rep*. 2015 May 29;2:123-131.

Van den Hoecke S, Ehrhardt K, Kolpe A, El Bakkouri K, Deng L, Grootaert H, Schoonooghe S, Smet A, Bentahir M, Roose K, Schotsaert M, Schepens B, Callewaert N, Nimmerjahn F, Staeheli P, Hengel H, Saelens X. Hierarchical and Redundant Roles of Activating Fc γ Rs in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies. *J Virol*. 2017 Mar 13;91(7). pii: e02500-16.

Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature*. 1983 May 5-11;303(5912):35-40.

Vaz M, Rajasekaran S, Potteti HR, Reddy SP. Myeloid-specific Fos-related antigen-1 regulates cigarette smoke-induced lung inflammation, not emphysema, in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015 Jul;53(1):125-34.

Vilarino MAM, Lopes MJM, Bueno ALM, Brito MRV. Idosos vacinados e não vacinados contra a influenza: morbidade relatada e aspectos sociodemográficos, Porto Alegre (RS, Brasil), 2004. *Cien Saude Colet* 2010; 15(6):2879-2886.

Wang AL, Lukas TJ, Yuan M, Du N, Handa JT, Neufeld AH. Changes in retinal pigment epithelium related to cigarette smoke: possible relevance to smoking as a risk factor for age-related macular degeneration. *PLoS One* 2009. 4: e5304.

Wang X, Cho B, Suzuki K, Xu Y, Green JA, An J, Cyster JG. Follicular dendritic cells help establish follicle identity and promote B cell retention in germinal centers. *J Exp Med*. 2011 Nov 21;208(12):2497-510.

Ward CO, Kuna RA, Snyder NK, Alsaker RD, Coate WB, Craig PH. Subchronic inhalation toxicity of benzene in rats and mice. *Am J Ind Med*. 1985;7(5-6):457-73.

Webster RG, Laver WG, Air GM, Schild GC. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. *Nature*. 1982 Mar 11;296(5853):115-21.

Weldon WC, Zarnitsyn VG, Esser ES, et al. Effect of adjuvants on responses to skin immunization by microneedles coated with influenza subunit vaccine. *PLoS One*. 2012;7(7):e41501.

Wilson KM, Wesgate SC, Pier J, Weis E, Love T, Evans K, Chhibber A. Secondhand smoke exposure and serum cytokine levels in healthy children. *Cytokine*. 2012 Oct;60(1):34-7.

Wilson KM, Pier JC, Wesgate SC, Cohen JM, Blumkin AK. Secondhand tobacco smoke exposure and severity of influenza in hospitalized children. *J Pediatr*. 2013 Jan;162(1):16-21.

Xiong F, Li Q, Zhou B, Huang J, Liang G, Zhang L, Ma S, Qing L, Liang L, Su J, Peng X, Li Q, Zou Y. Oxidative Stress and Genotoxicity of Long-Term Occupational Exposure to Low Levels of BTEX in Gas Station Workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2016 Dec 6;13(12).

Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class-switch DNA recombination: induction, targeting and beyond. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jun 25;12(7):517-31.

Yang EJ, Lee JS, Yun CY, Kim IS. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicol In Vitro*. 2011 Feb;25(1):131-7.

Zaretsky AG, Silver JS, Siwicki M, Durham A, Ware CF, Hunter CA. Infection with *Toxoplasma gondii* Alters Lymphotoxin Expression Associated with Changes in Splenic Architecture. *Infect Immun*. 2012 Oct; 80(10): 3602–3610.

Zelnik V, Harlin O, Fehler F, Kaspers B, Göbel TW, Nair VK, Osterrieder N. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004 Mar;51(2):61-7.

Zhou L, Le Y, Tian J, Yang X, Jin R, Gai X, Sun Y. Cigarette smoke-induced RANKL expression enhances MMP-9 production by alveolar macrophages. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2018 Dec 20;14:81-91.

ANEXOS

Anexo 1. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/FCF-USP):



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CEUA/FCF 032.2018-P561

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Influência da hidroquinona no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral contra vacinas virais**, registrada com o nº **561**, sob a responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Eduardo Lani Volpe da Silveira**, sob orientação do(a) – que envolve produção ou manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto Federal nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e das normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), em reunião de **11 de maio de 2018**.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	15/05/2018 a 31/12/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Mus musculus – C57Bl/6
Número de animais	264
Sexo / Macho	132
Sexo / Fêmea	132
Peso/Idade	20-25g – 6-8 semanas
Origem	Biotério - USP

Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento do projeto de pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 11 de maio de 2018.


Profa. Dra. Neuza Mariko Aymoto Hassimotto
Coordenadora da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

Observação: O presente trabalho **“Efeito da exposição à hidroquinona sobre as respostas humoral e celular induzidas com a imunização com a vacina contra o vírus Influenza”** está anexo ao trabalho **“Influência da hidroquinona no desenvolvimento da resposta imune celular e humoral contra o envelope do vírus da Dengue em um contexto de imunização”** no protocolo nº 561 do CEUA/FCF/USP, sob responsabilidade do Coorientador deste trabalho, **Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira**.

Anexo 2. Ficha do Aluno

01/11/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 10189521/1 - André Luis Fabris

Email: afabris@usp.br
Data de Nascimento: 05/11/1993
Cédula de Identidade: RG - 10.008.914-9 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Paraná - Brasil - 2016

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Toxicologia
Data de Matrícula: 13/01/2017
Início da Contagem de Prazo: 13/01/2017
Data Limite para o Depósito: 15/07/2019
Orientador: Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 13/01/2017 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/03/2018
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 13/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 01/11/2018 13:12:58

01/11/2018

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9143 - 10189521/1 - André Luis Fabris

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5881-5/1	Regulação da Resposta Imune (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/03/2017	03/05/2017	120	8	95	A	N	Concluída
ICB5711-3/1	Redação de Trabalhos Científicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/03/2017	10/04/2017	45	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	89	B	N	Concluída
FBC5747-2/2	Toxicologia Forense	15/05/2017	18/06/2017	60	4	100	A	N	Concluída
BMF5888-1/2	Farmacologia da Resposta Inflamatória (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/06/2017	03/07/2017	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/4	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	03/08/2017	11/10/2017	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5806-1/2	As Diferentes Faces da Inflamação na Resposta à Agressão	26/09/2017	06/11/2017	90	0	-	-	N	Turma cancelada
SAS5706-1/5	Toxicologia Ambiental (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	04/10/2017	24/11/2017	60	4	93	A	N	Concluída
BMF5885-1/4	Da Administração ao Sítio de Ação: Princípios de ADME e Farmacocinética (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/08/2018	09/09/2018	30	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
BMI5877-3/1	Imunogenética de Caracteres Complexos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	10/09/2018	30/09/2018	75	5	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	31
Estágios:			
Total:	0	25	31

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula Regular em 16/07/2018

Impresso em: 01/11/2018 13:12:58