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

Papel da exposição à Hidroquinona na artrite reumatoide experimental induzida pelo colágeno

Cíntia Scucuglia Heluany

Tese para obtenção de título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2017

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

Papel da exposição à Hidroquinona na artrite reumatoide experimental induzida pelo colágeno

Cíntia Scucuglia Heluany

Versão Original

Tese para obtenção de título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

S474p

Scucuglia Heluany, Cíntia
Papel da exposição à Hidroquinona na artrite reumatoide experimental induzida pelo colágeno / Cíntia Scucuglia Heluany. - São Paulo, 2017.
154 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Helena Poliselli Farsky, Sandra

1. imunotoxicologia. 2. poluentes ambientais. 3. fumaça do cigarro. 4. membrana sinovial. I. T. II. Helena Poliselli Farsky, Sandra, orientador.

Cíntia Scucuglia Heluany

PAPEL DA EXPOSIÇÃO À HIDROQUINONA NA ARTRITE REUMATOIDE EXPERIMENTAL INDUZIDA PELO COLÁGENO

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky

Oritentadora/Presidente

_____

1º examinador

_____

2º examinador

_____

3º examinador

_____

4º examinador

São Paulo, ___ de _____ de 2017.

À minha mãe Rosane, por ser meu porto seguro e maior incentivadora. Por muitas vezes acreditar mais em mim do que eu mesma. Por me ensinar que o que a vida quer da gente é coragem, e isso nós temos de sobra! Muito obrigada!

Ao meu pai Luís, que não está mais presente nesse plano, mas sei que de onde estiver, estará sentindo muito orgulho da pessoa que me tornei. Por ter me ensinado sobre honestidade e integridade. E muito obrigada por ter me incentivado a seguir em frente, quando mais pensei em desitir. Essa conquista é nossa!

Aos meus irmãos, Marina e “Dodô”, por todo amor, cumplicidade, amizade e força que somente irmãos podem dar! Juntos sempre iremos mais longe! Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer tanta gente, que direta ou indiretamente foram essenciais para a realização deste trabalho. A todos vocês só posso dizer: “Muitíssimo obrigada! A jornada tornou-se mais leve e prazerosa com o apoio e ajuda de vocês!”

Primeiramente, à professora Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky, não só pela orientação, mas pelo incentivo e por todos os ensinamentos que me passou, e até pelos “puxões de orelha” que me deu, os quais contribuíram para meu cresicmento profissional e pessoal, o que me fez ter ainda mais certeza da escolha que fiz para minha vida profissional.

À Agência de Fomento CNPq pelo Auxílio Financeiro e pela Bolsa de Doutorado concedida durante a realização deste trabalho.

À Samantha e à Marilisa, secretárias dos Programas de Pós-graduação em Análises Clínicas, Toxicologia e Fisiopatologia, da FCF/USP, que sempre esclareceram todas as dúvidas e ajudaram da melhor forma possível.

À Dra. Cristina Fernandes e à Ms. Mariana Viana, do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan, pela contribuição no ensinO do modelo desenvolvido neste trabalho e pela ajuda nos protocolos experimentais.

Ao professor Dr. Eduardo Silveira, da FCF/USP, por toda ajuda com o andamento do trabalho, pelo suporte em algumas metodologias e pelas enriquecedoras discussões.

À Dra. Sandra Coccuzzo e à sua aluna de doutorado Luciana Pimenta, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, pela ajuda na reta final com ensaios de cultura celular de fibroblastos.

Ao colega Ms. Leonard V. K. Kupa, pela imensa ajuda na padronização do protocolo experimental e nas coletas das amostras e pela ótima convivência todos esses anos.

Ao Dr. Christiano M. V. Barbosa, pela ajuda nos experimentos reta final, principalmente nos ensaios de Citometria de Fluxo.

Aos pesquisadores, funcionários e colegas do Bloco 13B da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por toda ajuda e disponibilidade que contribuíram para a realização deste trabalho, e também por todo este período de ótima convivência.

Aos amigos do laboratório, que já passaram por aqui e seguiram seus caminhos, por toda amizade dentro e fora do laboratório, pela disponibilidade em me ouvir e ajudar tanto com dúvidas e problemas profissionais, bem como pessoais.

Aos amigos do laboratório: Lorena, Marina, Gustavo, André, Eric, Cristina e Silvana, pela amizade, por todo ensinamento, por todas discussões/provocações filosóficas ou não, e pela imensa ajuda, tantas vezes que precisei.

À vó Célia, meu exemplo de amor, alegria, luz e leveza! “Sem amor, eu nada seria...”

À tia Rúbia, pelas enriquecedoras e desafiadoras conversas sobre ciência e sobre a vida.

Aos amigos e às agregadas Thi, Jacque, Mi, Dri Morena, Dri Loira, Lu Viana, Lu Abud, às Maris, Déia, Bia e Carol) do Laboratório de Farmacologia do Instituto Butantan (minha antiga casa) pela amizade além do laboratório, pelos ótimos momentos de diversão, pelos nossos almoços e bares sempre animados e pelo total apoio sempre. “I get high with a little help from my friends…!”

Às amigas de infância de Guaranésia, Lara, Hortência, Cibele, Betânia e Júlia, por toda amizade, apoio e incentivo que sempre me deram em todas as escolhas que decidi fazer na minha vida. Quem tem amigos, tem tudo!

Às amigas desde o tempo da faculdade, Maraysa e Amanda, que mesmo não tendo um contato tão frequente, sempre estavam disponíveis a me ajudarem, me ouvirem quando necessário e também por mostrarem novas visões sobre nossas escolhas profissionais.

“Se o que eu sou é também o que eu escolhi ser,
aceito a condição...”

Rodrigo Amarante

RESUMO

HELUANY, C. S. Papel da exposição à Hidroquinona na artrite reumatoide experimental induzida pelo colágeno. **2017.** 154f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Artrite reumatoide (AR) é uma doença autoimune, que causa inflamação crônica nas membranas sinoviais de diversas articulações. O modelo experimenal de artrite induzida pelo colágeno (AIC) é empregado para investigar os mecanismos da AR e para identificar potenciais agentes terapêuticos. Embora a etiologia da AR ainda seja desconhecida, há evidências que a AR se desenvolve em indivíduos predispostos geneticamente, após exposição a fatores ambientais, como o tabagismo, que se destaca como maior fator de risco para indução da AR e para o agravamento em pacientes com AR já estabelecida. Porém, o mecanismo efetivo da ação dos diversos componentes do cigarros ainda precisa ser elucidado. A Hidroquinona (HQ) é um composto fenólico, encontrada em concentração elevada no cigarro, com maior ativade pró-oxidativa, além de ser produto da biotransformação do benzeno, também encontrado no cigarro. Neste caso, a HQ é responsável pela imunotoxicidade e mielotoxicidade do benzeno. Devido a alta exposição de fumantes à HQ e a associação do tabagismo com a AR, investigamos se a exposição à HQ teria participação no desenvolvimento da AIC em ratos *Wistar*. Para tanto, animais foram expostos à HQ em diferentes protocolos experimentais, a saber: **A** – por 35 dias consecutivos, durante fase de indução e desenvolvimento da artrite; **B** – por 14 dias consecutivos, até a segunda injeção de colágeno, na fase de sensibilização e indução da AIC; **C** – por 7 dias consecutivos, do 29º ao 35º dia, na fase posterior ao desenvolvimento da AIC. Os resultados obtidos mostraram que a HQ agravou a AR nos 3 grupos experimentais, aumentando os parâmetros clínicos, o número de células no líquido sinovial, a inflamação nas sinóvias, caracterizada por maior influxo de neutrófilos, proliferação de sinoviócitos (histologia por HE e imunohistoquímica), aumento nos níveis de IL-6 e IL-1β (ELISA) no líquido sinovial e rearranjo do colágeno na sinóvia (microscopia por segundo harmônico). No entanto, os efeitos mais acentuados foram observados em animais dos grupos **A** e **C**, que também tiveram perda de peso significativa. Ademais, exposição à HQ, nos 3 grupos experimentais, causou expressão aumentada do receptor aril hidrocarboneto (AhR), um receptor ativado por xenobióticos durante a AR, e aumento nos níveis do fator de transcrição ROR e de IL-17 na sinóvia. Como AhR/ROR/IL-17 em linfócitos e neutrófilos é uma via importante na gênese da AR, ensaios *in vitro* foram realizados para elucidar o papel da HQ nesta via. A incubação com HQ *in vitro* de esplenócitos de animais *naive* elevou a expressão de AhR e de secreção de IL-17 (por citometria de fluxo), as quais foram bloqueadas pelo antagonista de AhR (α-naftoflavona). Em conjunto, os resultados obtidos nos permitem concluir que a HQ, como um importante componente do cigarro agrava a CIA em ratos, e a ativação via AhR/IL-17 é um possível mecanismo da patogênese da artrite.

Palavras-chave: Poluição ambiental, fumaça do cigarro, metabólito do benzeno, membrana sinovial, ratos, AhR.

ABSTRACT

HELUANY, C. S. Role of Hydroquinone exposure on experimental collagen-induced arthritis. **2017.** 154p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease that causes chronic inflammation in the joint synovial membranes. The experimental model of collagen-induced arthritis (CIA) is used to investigate the involved mechanisms in RA and to identify novel therapeutic agents. The genesis of RA is multifactorial, involving interplay of genetic and environmental factors and smoking is the trigger factor in the development or RA and worsens the pre-existing RA but the mechanisms undlerlying are yet to be elucidated. Hydroquinone (HQ) is a phenolic compound, found in high concentrations in cigarette, where HQ is the major oxidative component. Moreover, HQ is benzene metabolite, which is also found in cigarette smoke, being responsible for the myelotoxicity and immunotoxicity detected during benzene exposure. Due to this association, we aimed to investigate the role of HQ exposure on CIA development in *Wistar* rats and the involved mechanisms. Animals were exposed to HQ according to different protocols: **A** – during 35 consecutive days, during the sensitization and devolpment phases of the disease; **B** – during 14 consecutive days, until the second injection of collagen, during the sensitization phase; **C** – during 7 consecutive days, from day 29 to 35, after the development phase of CIA. The results showed that HQ worsened the RA in the 3 experimental protocols, HQ elevated the clinical parameters of CIA development, increased inflammation in the synovial membrane, characterized by increased influx of neutrophis, synoviocytes proliferation (visualized by Immunohistochemistry and Histology analysis), augmented the levels of IL-6 and IL-1β in the synovial fluid (ELISA assay) and led to intense collagen deposition on the synovia. The most pronounced effects where observed in animals from groups **A** and **C**, which also had weight body loss. In addition, in the 3 protocols, HQ exposure also increased the expression of AhR receptor, a receptor activated by xenobiotics during RA, and increased the expression of ROR and levels of IL-17 secretion in the synovial membranes. As AhR/ROR/IL-17 in lymphocytes and neutrophils is an important pathway involved in the genesis of RA, *in vitro* studies have been performed to elucidate the role of HQ exposure in this pathway. The HQ *in vitro* treatment augmented the expression of AhR and secretion of IL-17 by splenocytes (FACS assay) and the administration of an AhR antagonist (α-naphtoflavone) blocked these effects. Taken together, the results obtained here allow us to conclude that HQ, as an important cigarette component, aggravates CIA in rats, and the activation of AhR/IL-17 pathway is a possible mechanism involved in the RA pathogenesis.

Key-words: environmental pollution, cigarette smoke, benzene metabolite, synovial membrane, rats, AhR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da articulação e seus componentes 22

Figura 2: Representação dos dois principais tipos celulares que compõem uma membrana sinovial 23

Figura 3: Representação comparativa entre uma membrana sinovial normal e uma membrana sinovial durante processo inflamatório na AR 25

Figura 4: Processo de citrulinização 31

Figura 5: Via canônica do AhR 38

Figura 6: Estrutura química da Hidroquinona (HQ) 40

Figura 7: Biotransformação do benzeno (BZ) 43

Figura 8: Representação ilustrativa da caixa de exposição acoplada ao nebulizador ultrassônico 51

Figura 9: Delineamento experimental dos grupos experimentais 52

Figura 10: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea 60

Figura 11: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite 61

Figura 12: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue 62

Figura 13: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC . 63

Figura 14: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC 64

Figura 15: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no líquido sinovial de animais com ou sem AIC 65

Figura 16: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC 66

Figura 17: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC 68

Figura 18: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais.....69

Figura 19: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e composição das membranas sinoviais de animais com AIC.....70

Figura 20: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC.....71

Figura 21: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC.....72

Figura 22: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de ROR nas membranas sinoviais de animais com AIC.....73

Figura 23: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre sobre os níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC.....74

Figura 24: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ na co-localização de ROR/IL-17 e AhR/IL-17 nas células das membranas sinoviais de animais com AIC.....75

Figura 25: Efeitos da exposição *in vitro* à HQ na expressão de AhR e na secreção de IL-17 em esplenócitos.....77

Figura 26: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea.....78

Figura 27: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite.....80

Figura 28: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue.....81

Figura 29: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC.....83

Figura 30: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC.....84

Figura 31: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no líquido sinovial de animais com ou sem AIC.....85

Figura 32: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC.....86

Figura 33: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC.....87

Figura 34: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais.....88

Figura 35: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e composição das membranas sinoviais de animais com AIC.....90

Figura 36: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC.....91

Figura 37: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC.....92

Figura 38: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre sobre os níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC.....93

Figura 39: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea 94

Figura 40: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite 96

Figura 41: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue.....97

Figura 42: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC 98

Figura 43: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC 99

Figura 44: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no líquido sinovial de animais com ou sem AIC.....100

Figura 45: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC 102

Figura 46: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC 104

Figura 47: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais.....105

Figura 48: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e composição das membranas sinoviais de animais com AIC..... 106

Figura 49: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC 107

Figura 50: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC 108

Figura 51: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de ROR nas membranas sinoviais de animais com AIC 109

Figura 52: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre sobre os níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC..... 110

Figura 53: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC 112

Figura 54: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC 113

Figura 55: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC 114

Figura 56: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Pontuação clínica de desenvolvimento de AIC 52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ____ *21*

1.1 Artrite reumatoide ____ **22**

1.1.1 AR e fatores autoimunes ____ 31

1.1.2 AR e modelos experimentais ____ 34

1.1.3 Fatores de risco envolvidos na gênese da AR ____ 35

1.1.4 AR, tabagismo e AhR ____ 38

1.2 Hidroquinona ____ **41**

2 OBJETIVO ____ *48*

3 MATERIAIS E MÉTODOS ____ *50*

3.1 Animais ____ **51**

3.3 Exposição à HQ ____ **51**

3.4 Protocolos experimentais ____ **52**

3.5 Avaliação clínica do desenvolvimento da artrite ____ **53**

3.6 Acompanhamento do peso dos animais – Evolução ponderal ____ **54**

3.7 Leucograma total e Leucograma e diferencial ____ **54**

3.8 Análise histológica das membranas sinoviais ____ **54**

3.9 Análise de depósito de colágeno nas membranas sinoviais por Microscopia de Geração de Secundo Harmônico ____ **55**

3.10 Quantificação de mediadores inflamatórios ____ **56**

3.11 Quantificação de anticorpos anti-proteínas/peptídeos citrulinados para diagnóstico de AR. ____ **56**

3.12 Isolamento de esplenócitos e tratamentos ____ **57**

3.13 Análise por citometria de fluxo para quantificar a expressão de AhR e secreção de IL-17 em esplenócitos ____ **57**

3.14 Obtenção e cultivo de sinoviócitos do tipo B (fibroblastos sinoviais) ____ **58**

3.15 Análise estatística ____ **58**

4 RESULTADOS ____ *59*

4.1 Efeitos da exposição contínua à HQ durante a fase de sensibilização, indução e desenvolvimento da AR induzida pelo colágeno. ____ **60**

4.1.1 Evolução ponderal ____ 60

4.1.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite ____ 61

4.1.3 Análise do leucograma total e diferencial ____ 62

4.1.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro. ____ **63**

4.1.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro. ____ 64

4.1.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial ____ 65

4.1.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição das membranas sinoviais ____ 67

4.1.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência ____ 70

4.1.9 Efeitos da exposição *in vitro* à HQ em esplenócitos ____ 77

4.2 Efeitos da exposição contínua à HQ durante a fase de sensibilização e indução da AR induzida pelo colágeno. ____ **78**

4.2.1 Evolução ponderal ____ 79

4.2.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite ____ 79

4.2.3 Análise do leucograma total e diferencial ____ 81

4.2.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro. ____ **82**

4.2.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro. ____ 84

4.2.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial ____ 85

4.2.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais ____ 87

4.2.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência ____ 90

4.3 Efeitos da exposição contínua à HQ após o desenvolvimento da AR induzida pelo colágeno. ____ **94**

4.3.1 Evolução ponderal ____ 95

4.3.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite ____ 96

4.3.3 Análise do leucograma total e diferencial ____ 97

4.3.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro. ____ **98**

4.3.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro. ____ 100

4.3.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial 100
4.3.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais 103
4.3.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência 106
4.3.9 Análise dos efeitos da exposição à HQ nos sinoviócitos 112

5 DISCUSSÃO ***117***

6 CONCLUSÃO ***127***

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ***129***

ANEXOS ***152***

1 INTRODUÇÃO

1.1 Artrite reumatoide

Artrite reumatoide (AR) é uma doença, autoimune, que causa inflamação crônica nas membranas sinoviais de diversas articulações, incluindo mãos, punhos, cotovelos, joelhos, tornozelos, pés, ombros, coluna cervical, podendo também atingir alguns órgãos como pulmões, coração, rins e olhos. Em geral, a AR acomete tanto grandes, bem como pequenas articulações, em associação com manifestações extra-articulares sistêmicas, que incluem rigidez matinal, fadiga e perda de peso. Quando envolve outros órgãos além das articulações, a morbidade e a gravidade da doença são maiores, podendo diminuir a expectativa de vida em até 5 a 10 anos (OLIVERI *et al.*, 2005; CARBONELL *et al.*, 2008; BANSBACK *et al.*, 2009; ALETAHA *et al.*, 2010).

A AR é caracterizada pela poliartrite periférica, simétrica e a progressão do quadro está associada ao surgimento de deformidades e alterações das articulações, devido a erosões ósseas e da cartilagem, que podem comprometer os movimentos, levar à destruição das articulações e posterior incapacitação dos indivíduos afetados (LIPSKI, 1998; MCINNES e SCHETT, 2011).

A AR afeta aproximadamente 0,5 - 1 % da população, sendo que atinge mais mulheres do que homens, com uma taxa 3 vezes maior no sexo feminino, e sua prevalência aumenta com o avanço da idade, sendo o pico de incidência entre 40 e 70 anos de idade (OLIVERI *et al.*, 2005; PEDERSEN et al., 2009; CROSS *et al.*, 2014). A forma juvenil da AR é conhecida como artrite idiopática juvenil e sua incidência ocorre entre 1 a cada 10.000 crianças com idade abaixo dos 16 anos, porém sua etiologia ainda é desconhecida. Este tipo de artrite acomete um número menor de articulações, mas podem levar a alterações no crescimento, inflamação, deformidades, rigidez articular, fraqueza muscular e diminuição da atividade funcional (PETTY *et al.*, 2001; MANNERS e BOWER, 2002; STANLEY e WARD-SMITH, 2011; SMITH *et al.*, 2015).

A AR acarreta um grande impacto não apenas para o paciente, mas também para a sociedade, uma vez que o indivíduo afetado depara-se com grandes alterações nas condições físicas e psicológicas, que desencadeiam alterações sociais e até mesmo econômicas. Fisicamente, o doente apresenta maior comprometimento para realização de atividades simples. Socialmente, uma porcentagem significativa dos doentes com AR abandonam o posto de trabalho devido à incapacidade de levarem uma vida “normal”, e por fim, economicamente, o tratamento torna-se dispendioso, visto que pessoas com AR necessitam de acompanhamento médico com certa frequência, com custos elevados. Com base no exposto, a AR é considerada um grande problema de saúde pública, principalmente para a população idosa (SYMMONS *et al.*, 2002; OLIVERI *et al.*, 2005; BANSBACK *et al.*, 2009; PEDERSEN *et* al., 2009; SCOTT, WOLFE e HUIZINGA, 2010; SOUBIER *et al.*, 2010).

A articulação sinovial, também conhecida por articulação diartrodial móvel, é uma estrutura complexa, formada por duas superfícies articulares ósseas, cartilagem articular, membrana sinovial (ou sinóvia), cápsula articular, tendões, ligamentos e menisco, além da presença do líquido sinovial que lubrifica e nutre as articulações (Figura 1).

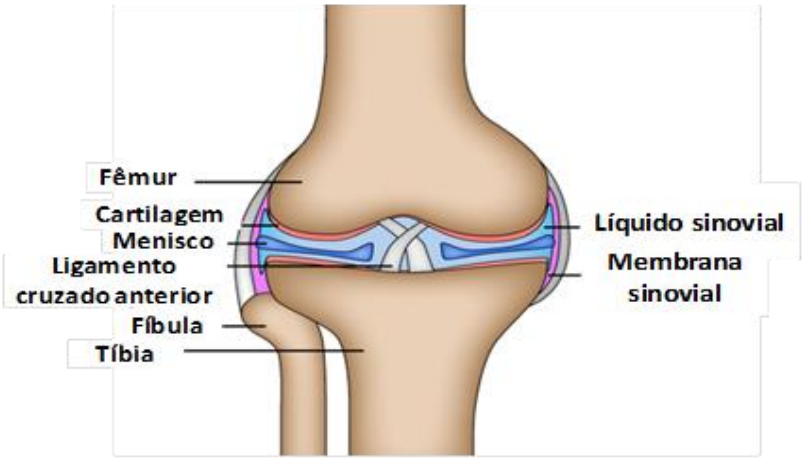

Figura 1: Representação da articulação e seus componentes. Fonte: Figura adaptada de BENNIKE *et al.*, 2014.

As superfícies articulares são camadas especializadas de ossos compactos nas superfícies, que se articulam com outros ossos. A cartilagem articular, que reveste a superfície articular, é composta predominantemente por matriz extracelular, constituída por colágeno, proteoglicanos, ácido hialurônico e por condrócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O ligamento capsular é uma capa fibrosa densa, que reveste a membrana sinovial. Este ligamento pode se espessar em certas áreas para formar os ligamentos extracapsulares que conectam os ossos adjacentes e ajudam a estabilizar as articulações. O líquido sinovial está presente em todas as cavidades articulares e possui função de proteção das superfícies da cartilagem articular, em parte, ao reduzir o atrito. Ademais, o líquido sinovial facilita o transporte de nutrientes e de produtos residuais, incluindo proteínas e metabólitos, entre a membrana sinovial vascularizada e cartilagem avascularizada (SWANN *et al.*, 1981; HUI *et al.*, 2012; MATEOS *et al.*, 2012;JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Muitos componentes do fluido sinovial são derivados do plasma, sendo que ambos possuem muitas semelhanças em termos de suas composições proteicas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As membranas sinoviais envolvem as articulações diartrodiais móveis, bursas e tendões do corpo. A função primária deste tecido vascular especializado é de servir como um sistema de filtro, que lubrifica e nutre as estruturas articulares, bem como possui função de amortecedor. As membranas sinoviais podem ser afetadas por vários distúrbios localizados em uma articulação específica ou distúrbios de natureza sistêmica, como doenças inflamatórias, infecciosas, degenerativas, traumáticas ou neoplásicas (CHUNG, BOUCHER e RESNICK, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A membrana sinovial é um tipo de tecido conectivo, formada por duas camadas principais, a camada sinovial íntima e a camada sinovial sub-íntima. A região sub-íntima é um tipo de tecido conjuntivo flexível, que facilita os movimentos suaves das articulações. Esta contém sangue e vasos linfáticos, fibras nervosas e poucas células, incluindo macrófagos, fibroblastos e adipócitos (TARNER *et al.*, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; LETTIERI *et al.*, 2014). A camada sinovial íntima é composta pelos dois tipos celulares predominantes que compõem a membrana sinovial, os sinoviócitos semelhantes a macrófagos, também chamados de sinoviócitos tipo A, e os sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (SSF), também conhecidos como sinoviócitos tipo B. Estes sinoviócitos receberam estas denominações devido às suas morfologias e à expressão de marcadores de superfície similares a macrófagos e fibroblastos, respectivamente (IWANAGA *et al.*, 2000; BARTOK e FIRESTEIN, 2010; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013) (Figura 2).

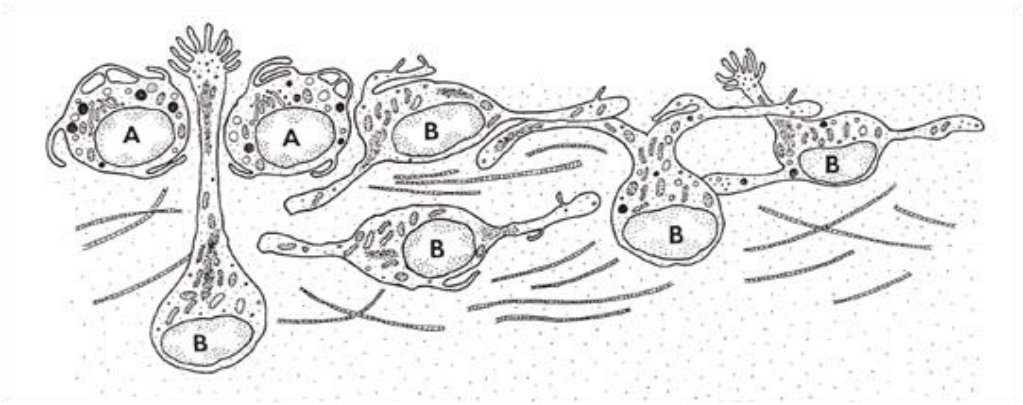

Figura 2: Representação dos dois principais tipos celulares que compõem uma membrana sinovial. Células sinoviais tipo A (indicadas por A) estão localizadas na camada superficial da região íntima sinovial, enquanto que células sinoviais tipo B (indicadas por B) são caracterizadas por processos citoplasmáticos e estão presentes nas regiões mais profundas da camada íntima sinovial. Fonte: IWANAGA, *et al.*, 2000.

Os sinoviócitos tipo A são minoria na sinóvia, e são caracterizados por numerosas invaginações de membrana, as quais são delimitadas por canalículos intracelulares de várias profundidades. Já os sinoviócitos tipo B são predominantes na sinóvia, e são caracterizados por serem células mesenquimais e apresentarem longos processos citoplasmáticos, orientados perpendicularmente na cavidade articular, além de apresentarem núcleo pouco denso, retículo endoplasmático extenso e complexo de Golgi bem desenvolvido (FIRESTEIN, 1997). Análises ultraestruturais demonstraram que, em condições normais, os sinoviócitos tipo B são considerados os elementos constitutivos responsáveis pela estrutura específica do tecido intersticial e pela regulação da composição do líquido sinovial (DELRIO e FADDA, 1990)

Os sinoviócitos tipo B possuem papel importante na homeostasia articular por secretarem compostos essenciais para a lubrificação e manutenção da viscosidade no espaço articular. Estes sinoviócitos também são importantes para manutenção do tecido articular, por produzirem vários componentes do tecido conjuntivo, como fibronectina, colágeno IV e V, laminina, proteoglicanos e metaloproteinases e, estão envolvidos, direta ou indiretamente, no controle da composição proteica do líquido sinovial, bem como expressam integrinas, receptores de integrinas e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) (BOMBARA *et al.*, 1993; FIRESTEIN, 1996).

Muitas das lesões que caracterizam a AR concentram-se nas membranas sinoviais das articulações. A sinóvia normal (Figura 3A), que é composta por um fino revestimento celular, com espessura de uma a três camadas de células e por um interstício subjacente que contém vasos sanguíneos e poucas células. Durante a AR, a sinóvia passa por alterações morfológicas e funcionais e torna-se acentuadamente alterada (Figura 3B), apresentando uma camada de revestimento mais espessa, composta por oito a dez camadas de espessura, constituída por células ativadas e por um interstício altamente inflamatório, repleto de linfócitos B, linfócitos T, influxo de células do sistema imune inato como macrófagos e neutrófilos, além de ocorrerem alterações vasculares, como trombose e neovascularizações. Ainda, no sítio local da inflamação a camada de revestimento sinovial engrossa-se notavelmente, devido principalmente à invasão dos macrófagos e à proliferação dos fibroblastos sinoviais residentes (CROFFORD *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 2002; MIRANDA-CARÚS *et al.*, 2004; CHOY, 2012; BURMESTER, FEIST e DORNER, 2014). Adicionalmente, nos locais onde a sinóvia e a cartilagem são contínuas, o tecido sinovial formado por uma massa de células invasivas e em proliferação invade e destrói a cartilagem, assim como o tecido ósseo adjacente (Figura 3B) (FIRESTEIN, 1996; BURMESTER *et al.*, 1997; FOX, 1997).

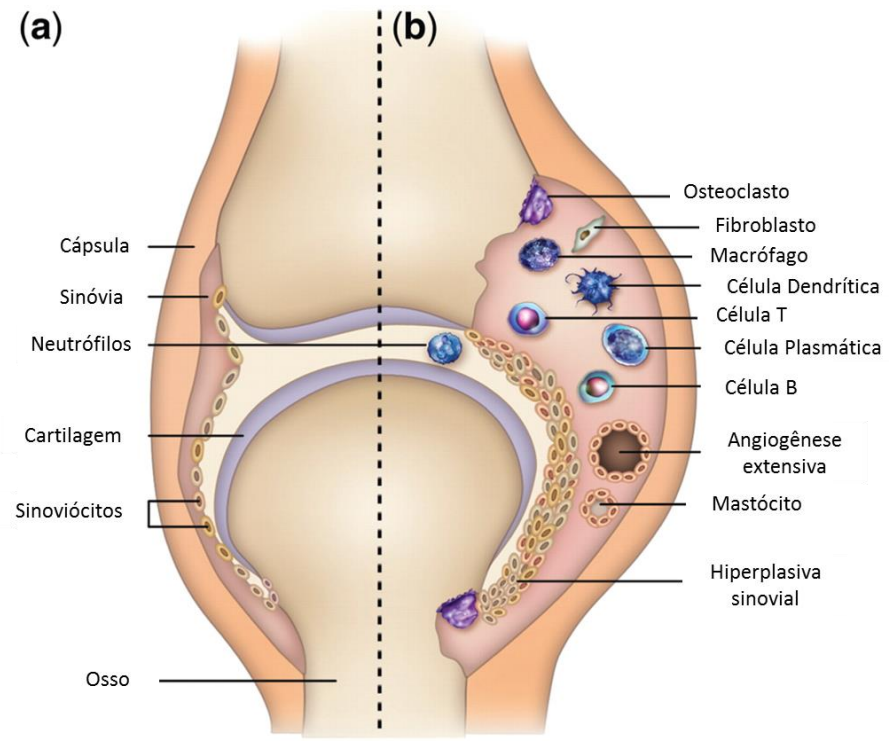

Figura 3: Representação comparativa entre uma membrana sinovial normal e uma membrana sinovial durante processo inflamatório na AR. A: Estrutura de uma articulação normal, saudável; B: Estrutura de uma articulação afetada por AR, onde observa-se influxo de células do sistema imune, infiltração de diversos mediadores inflamatórios, expansão de sinoviócitos tipo B, presença de condrócitos e osteoclastos, e aumento na concentração de células do fluído sinovial, com formação de edema que consequentemente geraam danos na cartilagem e posterior erosão óssea. Fonte: CHOY, 2012.

Em pacientes com AR, a membrana sinovial é caracterizada pela hiperplasia celular das células sinoviais, aumento da permeabilidade vascular, edema e organização de folículos linfóides nas articulações e pela infiltração de células inflamatórias, as quais proliferam invasivamente, evoluindo posteriormente para destruição das cartilagens e ossos adjacentes (DREIER *et al.*, 2001; CASSIM *et al.*, 2002).

A proliferação sinovial, juntamente com eventos de neovascularização e extravasamento leucocitário transformam a sinóvia normalmente acelular em um *"pannus"* sinovial invasivo semelhante a tumores (FEARON *et al.*, 2016). Esse *"pannus"* é caracterizado pelo aumento no espessamento da camada de revestimento, causado pela combinação de proliferação celular *in situ*, influxo de células da circulação e redução da apoptose com aumento da demanda de oxigênio pelos fagócitos, que somados criam consequentemente um microambiente hipóxico. A oxigenação inadequada conduz a uma resposta inflamatória

exacerbada e aos mecanismos de angiogênese (JONGBLOED *et al.,* 2006; MIHALY, NINOMIYA-TSUJI e MORIOKA, 2014). Em conjunto, o desencadeamento destes processos contribui para uma posterior infiltração de células inflamatórias, produção de mediadores inflamatórios e degradação da matriz extracelular (KENNEDY *et al.,* 2010; NG *et al.,* 2010; YANG e KARIN, 2014; REIS *et al.,* 2015).

Adicionalmente, durante a inflamação articular há uma expansão dos sinoviócitos tipo B nas membranas sinoviais. Alguns autores sugerem que esta expansão seja resultante do aumento da proliferação e na redução da apoptose (OSPELT, 2004; FIRESTEIN, 2009; PAP e GAY, 2009; CHOY, 2012). Os sinoviócitos ativados durante a AR contribuem para a hiperplasia celular e medeiam a destruição da cartilagem. Estes sinoviócitos diferem dos sinoviócitos normais, tanto na morfologia, bem como nas suas características biológicas e patológicas, uma vez que durante os processos inflamatórios tornam-se capazes de secretar vários mediadores inflamatórios, tais como citocinas, fatores de crescimento e mediadores lipídicos, como o leucotrieno B4 (LTB_4) e a prostaglandina E2 (PGE_2), que estão envolvidos na progressão da inflamação articular e no desencademaento da dor articular e formação de edemas (CROFFORD *et al.,* 1994; KOJIMA *et al.,* 2002; ROCHA *et al.,* 2002; MARTEL-PELLETIER *et al.,* 2003). Soma-se a estes, o fato de que estas células são as principais responsáveis pela degradação da cartilagem durante o processo inflamatório articular, devido à sua capacidade de secretarem elevadas concentrações de proteases como as metaloproteinases de matriz (MMPs) (CHO *et al.,* 2002; KOJIMA *et al.,*2002; MIRANDA-CARÚS *et al.,* 2004).

A subsequente destruição da cartilagem e dos ossos é também mediada por enzimas secretadas pelas células sinoviais e por células inflamatórias na matriz extracelular, como as MMPs, serinoproteases e agrecanases, que degradam a matriz extracelular, sendo consideradas umas das principais mediadoras de destruição das estruturas articulares (FELDMAN; BRENNAN e MAINI, 1996a; RENGEL, OSPELT e GAY, 2007). Adicionalmente a esta habilidade em degradar diretamente as cartilagens e ossos, estas enzimas são capazes de ativar outras proteases e, assim, iniciar uma cascata de vários fatores de degradação de matriz (OSPELT *et al.,* 2004). Várias citocinas pró-angiogênicas e fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento tecidual (TGF-β), interleucina 8 (IL-8), fator de crescimento granulocítico de macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF), são liberados no líquido sinovial por células inflamatórias recrutadas e pelos sinoviócitos (RITCHLIN, 2000; OSPELT *et al.,* 2004; BRENNAN e MCINNES, 2008) .

Ademais, um papel importante na patogênese da AR tem sido atribuído à desregulação na resposta do sistema imune adaptativo, na qual células T reguladoras (Treg), células T efetoras e células B produtoras de antígenos possuem ação central na doença (BELLUCI *et al.,*

2016). A observação do acúmulo de células T na sinóvia levou à hipótese de que a AR é desencadeada por uma reação inflamatória dependente de células T a antígenos desconhecidos (BURMESTER, FEIST e DORNER, 2014). Além disso, dados da literatura mostraram que houve uma melhora na sintomatologia da doença em pacientes após o tratamento com inibidores da via de co-estimulação de células T, influenciando a intereção entre células apresentadoras de antígenos e células T (FIOCCO *et al.,* 2008). As células B também possuem um papel importante na patogênese da AR, a partir da apresentação de (auto)antígenos, seguido pela produção de autoanticorpos, e na posterior formação de imunocomplexos e na liberação de citocinas (MARTINEZ-GAMBOA *et al.,* 2006).

É sabido que células T efetoras e reguladoras, células B e citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, IL-1β, IL-17, NO, INF-γ, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e TGF-β possuem papel central na patogênese da inflamação sinovial e na destruição das cartilagens e das articulações na AR (TAKEMURA *et al.,* 2001; BUGATTI *et al.,* 2007; BRENNAN e MCINNES, 2008). Paralelamente, macrófagos, linfócitos e fibroblastos ativados podem estimular a angiogênese, essencial para a evolução da inflamação e perpetuação da sinovite (SZEKANECZ e KOCK, 2001; JONGBLOED *et al.,* 2006; MIHALY, NINOMIYA-TSUJI e MORIOKA, 2014).

Os sinoviócitos tipo B e as células inflamatórias produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucina 1 beta (IL-1β), interleucina 6 (IL-6), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), os quais possuem papéis importantes na patogênese da AR, por serem potentes ativadores de sinoviócitos, osteoclastos e condrócitos, além de desempenharem papel importante na comunicação celular nas articulações (FELDMAN, BRENNAN e MAINI, 1996b; MCINNES e SCHETT, 2007).

As citocinas desempenham um papel central tanto para o início, bem como para a progressão e perpetuação da doença, como tem sido demonstrado pelo sucesso dos tratamentos com medicamentos baseados na inibição de TNF-α e do receptor de interleucina-6 (IL-6R) (FIRESTEIN, 2004; 2005; MCINNES e SCHETT, 2007; SMOLEN *et al.,* 2007; CHUNG *et al.,* 2011).

O TNF-α é uma citocina pleiotrópica que exerce várias funçoes na homeostase e patogênese de diversas doenças. É produzida principalmente por monócitos e macrófagos e também por alguns tipos de células T, sendo considerada uma citocina central na patofisiologia da AR (para revisão ver NOACK e MIOSSEC, 2017), uma vez que desepenha função na indução de leucócitos, na ativação endotelial, na ativação e sobrevivência dos sinoviócitos, na angiogênese (MCINNES e SCHETT, 2007; BRENNAN e MCINNES, 2008; KALLIOLIAS e IVASHKIV, 2016). O TNF-α induz a produção de IL-6 por sinoviócitos de pacientes com AR e

possui um papel importante na autoimunidade, atuando principalmente através da inibição de células T reguladoras (LEE *et al.*, 2013; BYSTROM *et al.*, 2016). Além disso, a inibição de TNF em pacientes com AR reduz o tráfico de leucócitos nas articulações (TAYLOR *et al.*, 2000) e, em ação conjunta com outras citocinas pró-inflamatórias, regula a osteoclastogênese via várias mecanismos. Adicionalmente, o TNF-α é um importante fator ativador da formação de osteoclastos, ao mesmo tempo em que inibe a diferenciação e função de osteoblastos, promovendo um desbalanço entre a destruição e formação óssea na AR (LAM *et al.*, 2000; OSTA, BENEDETTI e MIOSSEC, 2014). Ainda, o TNF-α está presente principalmente nas fases iniciais da doença, porém com o avanço da mesma, sua concentração diminui, mas as razões para este perfil de secreção desta citocina ainda são desconhecidas (TAK e BRESNIHAN, 2000).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica, que desempenha diversas atividades, sendo essencial para a regulação do sistema imune, é produzida por quase todas as células estromais e células imunes (HUNTER e JONES, 2015). A IL-6 possui papel importante na patogênese da AR, contribuindo para a progressão e cronificação da doença (HASHIZUME e MIHARA, 2011), uma vez que medeia efeitos similares àqueles observados pela ação do TNF-α no microambiente sinovial. Além disso, a IL-6 está envolvida em várias vias efetoras de inflamação, através da ativação de células imunes, células endoteliais, sinoviócitos e oesteoclastos (HASHIZUME e MIHARA, 2011; YUSOF e EMERY, 2013). Em modelos animais para estudo da artrite, como artrite induzida pelo colágeno (AIC) e artrite induzida por antígeno (AIA), a IL-6 possui papel central no desenvolvimento da doença (ALONZI *et al.*, 1998; OHSHIMA *et al.*, 1998), uma vez que foi visto que a deleção de IL-6 protegeu os animais de desenvolverem AIC (ALONZI *et al.*, 1998). Além disso, em outros trabalhos foi visto que a produção excessiva de IL-6 no líquido sinovial de pacientes com AR correlacionava-se com a maior atividade da doença e maior destruição articular (SACK *et al.*, 1993).

A interleucina 1 beta (IL-1β) também é uma citocina pleiotrópica pró-inflamatória que possui papel central na patogênese da AR. A IL-1β é uma citocina que possui ativadade pró-inflamatória em níveis teciduais, secretada por macrófagos, monócitos, neutrófilos e células dendríticas, é um importante componente de defesa contra infecções e também atua em células T, principalmente na diferenciação de células Th17 (NETEA *et al.*, 2010; AKDIS *et al.*, 2016). Esta citocina exerce papel na inflamação articular, na degradação da cartilagem e destruição óssea, pela ativação da osteoclastogênese (JACQUES *et al.*, 2006). Adicionalmente, foram detectados níveis elevados de IL-1β nas membranas e líquidos sinoviais em pacientes com AR (DAYER e BRESNIHAN, 2002). Além disso, vários estudos com modelos animais mostraram a importância desta citocina na inflamação articular e subsequente dano tecidual, e nestes trabalhos foi visto que a injeção de IL-1β nas articulações do joelho de ratos e coelhos induziu

ao acúmulo de leucócitos no líquido sinovial, à degradação da cartilagem e ao processo de cronificação da artrite (CHANDRASEKHAR *et al.*, 1990; NOACK e MIOSSEC, 2017). Adicionalmente, IL-1β também foi encontrada nas sinóvias inflamadas de camundongos com AIC e AIA (VAN DE LOO *et al.*, 1995; GABAY *et al.*, 2001). Ainda, em humanos, estudos utilizando terapia anti-IL-1 (utilizando Anakinra, que é um antagonista recombinante do receptor de IL-1, o qual exibe um efeito protetivo contra a destruição óssea e da cartilagem), demonstraram uma melhora nos sinais clínicos decorrentes da AR (COHEN *et al.*, 2000; MERTENS e SINGH, 2009).

A interleucina 17 (IL-17) é uma citocina altamente inflamatória, que age em vários tipos celulares que expressam o receptor de IL-17 (IL-17R), incluindo células imunes, como neutrófilos, células epiteliais e fibroblastos. Dentre os membros da família da IL-17, sabe-se que os subtipos IL-17A e IL-17F são regulados principalmente em condições inflamatórias, bem como em células T ativadas, e desta forma estes dois subtipos são candidatos promissores como alvos de terapias na AR (BURMESTER, FEIST e DORNER, 2014). A IL-17 é produzida não somente pelo subconjunto de células Th17, mas também por outras células inflamatórias, como mastócitos, os quais podem desempenhar um papel importante na AR (HUEBER *et al.*, 2010). Além disso, o receptor IL-17R é amplamente expresso em quadros de AR, e a sinalização via IL-17R leva à secreção de citocinas inflamatórias (tais como TNF-α, IL-6, IL-1β e GM-CSF), quimiocinas e prostaglandinas a partir de fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, além de aumentar a expressão de moléculas de adesão, iniciando o recrutamento e ativação de netrófilos, linfócitos e macrófagos, desencadeando a inflamação local e danos teciduais (GAFFEN, 2008; HUEBER *et al.*, 2010). Ainda, a IL-17 possui um importante papel na osteoclastogênese e, portanto, na destruição óssea (SATO *et al.*, 2006; VAN DEN BERG e MIOSSEC, 2007; FISCHER *et al.*, 2015). Diversos trabalhos também têm demonstrado que a expressão de IL-22 está aumentada em tecidos sinoviais de pacientes com AR e que o aumento da sua regulação está correlacionado com o perfil patogênico desta doença (ZHANG *et al.*, 2011; DA ROCHA *et al.*, 2012).

Inúmeros fatores de transcrição nuclear estão envolvidos na ativação de células na proliferação sinovial na AR e a síntese de moléculas efetoras via NF-κB é um dos elementos-chave (MULLER-LADNER *et al.*, 2007). Foi visto que este fator de transcrição nuclear é altamente ativo nas membranas sinoviais de pacientes com AR (MULLER-LADNER *et al.*, 2005). Desta forma, em resposta a estas citocinas ocorre a ativação do NF-κB, que leva à progressão e perpetuação da doença pela habilidade de induzir a secreção de vários mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e MMPs, além de fazer uma conexão entre a inflamação sinovial, hiperplasia celular e a degradação da matriz extracelular

(VINCENTI, COON e BRINCKERHOFF, 1998; KOCH, 2005; MULLER-LADNER *et al.*, 2005; MCINNES e SCHETT, 2007).

Em resposta a todos estes mediadores inflamatórios citados acima, há a interação de leucócitos às células vasculares. Dentre outras células imunes, linfócitos T (incluindo os tipos Th1, Th17, Treg e possivelmente Th22) iniciam uma cascata serial de rolamento, adesão e transmigração e extravasamento dos vasos sanguíneos para as articulações inflamadas adjacentes (MELADO *et al.*, 2015). Ainda, várias quimiocinas induzíveis, produzidas principalmente pelas células sinovais ativadas e pelos leucócitos infiltrantes, são fortemente expressas nas articulações inflamadas (WEHRENS, PRAKKEN e VAN WIJK, 2013).

1.1.1 AR e fatores autoimunes

Doenças autoimunes, como a AR, são induzidas pelo ataque do sistema imune aos seus próprios tecidos. Normalmente, o sistema imune não reage contra seus autoantígenos, devido a processos centrais e periféricos de tolerância imunológica. Em indivíduos predispostos, a tolerância imunológica pode ser desativada por meio de modificações pós-traducionais, uma vez que estes processos podem gerar novos epítopos, provocando, assim, a formação de novos autoantígenos, diferentes daqueles quais o organismo tinha aprendido a ser tolerante. Dentre estes eventos, podemos destacar a citrulinação, devido ao seu papel na indução de anticorpos anti-proteínas citrulinadas (ACPAs), uma classe de autoanticorpos que são utilizados para diagnóstico preditivo e valor prognóstico para a AR. O processo de citrulinação ocorre pela modificação pós-traducional, na qual o aminoácido citrulina é derivado do aminoácido arginina, pela ação da enzima peptidilargina deaminase (PAD) (GYORGI *et al.*, 2011; VALESINI *et al.*, 2015).

De uma maneira geral, a citrulina, que é um aminoácido pouco frequente, é formada a partir de uma desaminação de um resíduo de arginina (que é um aminoácido polar carregado positivamente). Esta desaminação ocorre na presença da enzima PAD que age sobre o grupo NH_2 da arginina (Figura 4).

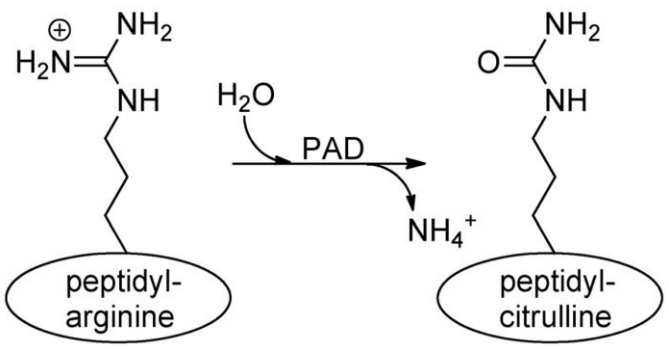

Figura 4: Processo de citrulinização. Conversão de argina em citrulina, pela ação direta da enzima peptidil arginina deiminase (PAD). Fonte: Rohrbach *et al.*, 2012.

Existem várias isoformas de PADs, sendo que as isoformas PAD2 e PAD4 são expressas nos sinoviócitos tipo A e tipo B, respectivamente, em quadros de AR. Foi visto que a PAD4 altera fisiologicamente a função de quimiocinas e está implicada na geração de autoantígenos na AR. Soma-se a estes, o fato de que anticorpos anti-PAD4 mostraram valores preditivos e prognósticos em pacientes em AR (ZHAO *et al.*, 2008; VALESINI *et al.*, 2015).

Sabe-se que os ACPAs são detectáveis em mais de 80 % dos pacientes com AR, e muitos estudos mostraram que esses autoanticorpos estão presentes muitos anos antes da AR se manifestar, além de estarem associados a manifestações extra-articulares severas e maior quantidade de erosões ósseas (NIELEN *et al.* 2006; LÓPEZ-LONGO, SANCHEZ-RAMÓN, e CARREÑO, 2009; PAYET *et al.*, 2014).

Na AR, quando mecanismos de tolerância são desregulados ou oprimidos, ocorre a produção de autoanticorpos característicos, como o fator reumatóide (FR) e os ACPAs, sendo que os ACPAs apresentam uma especificidade e sensibilidade superior ao FR para o diagnóstico da AR (NISHIMURA *et al.*, 2007; SAKKAS *et al.*, 2014). Assim, pacientes com AR podem ser divididos em 2 subconjuntos principais, caracterizados pela presença *versus* ausência de anticorpos anti-proteínas citrulinadas e fator reumatóide. O subconjunto da doença positiva para autoanticorpos, também conhecido como AR seropositiva constitui aproximadamente dois terços dos casos de AR e geralmente apresentam uma evolução mais grave da doença. Os ACPAs e FR estão presentes no sangue muito tempo antes do aparecimento das inflamações articulares, o que sugere que o aparecimento da autoimunidade pode ocorrer em outros sítios locais, como por exemplo, nos pulmões (MALMSTROM, CATRINA e KLARESKOG, 2016).

Até o presente momento, a etiopatogenia da AR ainda é desconhecida (CHOY e PANAYI, 2001; ROWAN *et al.*, 2008), e o diagnóstico para esta doença autoimune é feito

baseado nos critérios do Colégio Americano de Reumatologia. Dentre estes critérios, está a detecção e presença de proteínas e autoanticorpos no soro dos pacientes, uma vez que diversos grupos de pesquisa já relataram que há um período de desenvolvimento de AR soropositiva, durante o qual há uma elevação nos níveis de autoanticorpos e, a produção de autoanticorpos ocorre na ausência de sinovite nas articulações (AHO *et al.,* 1997; NIELEN *et al.,* 2004; DEMORUELLE *et al.,* 2013).

Os ACPAs estão presentes na maioria dos pacientes com AR e são dirigidos contra diferentes proteínas citrulinadas, tais como vimentina, histona, enolase-α, fibrinogênio, fibronectina, filagrina e colágeno tipo II, entre outros. Os ACPAs também são capazes de reconhecer peptídeos citrulinados virais, tais como peptídeos citrulinados derivados do vírus *Epstein-Barr* (SNIR *et al.,* 2010; PRATESI *et al.,* 2013; MULLER e RADIC, 2014).

Ainda, os ACPAs são os melhores preditores da progressão radiográfica em estágios iniciais de AR, bem como marcadores de prognóstico para AR, pois podem ser detectados mesmo na ausência de sintomas clínicos, até mesmo vários anos antes da AR se manifestar (MEYER *et al.,* 2010). A literatura mostra também que imunocomplexos contendo ACPAs e antígenos citrulinados exibem imunogecididade e artritogenicidade elevados (KIDD *et al.,* 2008). Os ACPAs aumentam injúria tecidual em modelos de AIC, e também podem induzir osteoclastogênese e perda óssea (KUHN *et al.,* 2006; WILLIS *et al.,* 2011). Além disso, foram observados autoantígenos citrulinados extracelulares nas articulações de pacientes com AR (VAN BEERS *et al.,* 2013) e foi observado também que as enzimas PAD2 e PAD4, que são superexpressadas em neutrófilos, também foram detectadas nas sinóvias de pacientes com AR, em uma associação direta com o influxo de neutrófilos (FOULQUIER *et al.,* 2007; JONES *et al.,* 2009; SPENGLER *et al.,* 2015). Níveis elevados de colágeno tipo II citrulinado nas membranas sinoviais de pacientes com AR sugerem que modificações na cartilagem mediada pela enzima PAD nas articulações com AR podem contribuir diretamente para a indução de autoanticorpos (HAAG *et al.,* 2014).

Adicionalmente, foi observada uma redução na gravidade da AIC em murinos, pela administração de um inibidor da enzima PAD, o que dá suporte para um papel artritogênico para os eventos de citrulinação e para produção desses autoanticorpos ACPAs na AR (HARRE *et al.,* 2012). ACPAs podem ser produzidos em órgãos linfóides ou localmente nas articulações. De acordo com SNIR e colaboradores (2010), os níveis dos ACPAs estão aumentados no líquido sinovial em comparação com o soro, sugerindo a produção local nas articulações, e proteínas citrulinadas intercelulares foram detectadas nas membranas sinoviais durante AR. Outro sítio local para os ACPAs são os pulmões, sendo que foram observados altos níveis de ACPAs no lavado broncoalveolar em comparação com o soro de pacientes em estágios iniciais de AR (DE RYCKE *et al.,* 2005; REYNISDOTTIR *et al.,* 2014).

A identificação de autoanticorpos e citocinas no soro muitos anos antes do diagnóstico da AR mostra a cinética do desenvolvimento da AR (MAJKA *et al.*, 2008; DEANE, NORRIS e HOLERS, 2010; KOKKONEN *et al.*, 2010), onde há um período assintomático, no qual provavelmente houve exposição a fatores ambientais como a exposição ao cigarro, seguido de uma fase de ativação imune assintomática, na qual anticorpos IgG e marcadores inflamatórios são encontrados. Estes são seguidos por uma fase com a presença de sintomas articulares, mas ainda na ausência da artrite claramente definida, a qual é finalmente seguida de uma fase com os sinais de artrite inflamatória (AI), e que ao longo do tempo evolui para o quadro sintomático em que é classificada como AR, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia de 1987 e pelos critérios da Liga Europeia contra o Reumatismo de 2010 (ARNETT *et al.*, 1988; ALETAHA *et al.*, 2010). Fases similares de desenvolvimento foram propostas em outras doenças autoimunes, tais como diabetes tipo I e lúpus eritematoso sistêmico (LESLIE, LIPSKY e NOTKINS, 2001; ARBUCKLE *et al.*, 2003). Este padrão sugere que há uma série complexa de eventos, em que pessoas geneticamente susceptíveis são expostas a fatores de risco ambientais, os quais desencadeiam a autoimunidade com a produção de autoanticorpos, e um segundo ou mais eventos ou exposições que podem conduzir à desregulação da imunidade, levando ao desenvolvimento da AR sintomática (MCINNES e SCHETT, 2007; 2011). Assim, um diagnóstico precoce e imediato, além de terapias eficazes são cruciais para evitar a deterioração das articulações, a incapacidade funcional e a evolução desfavorável da doença.

1.1.2 AR e modelos experimentais

Até o presente, os processos inflamatórios articulares foram bem caracterizados em modelos experimentais que mimetizam a AR humana. O desenvolvimento da AR vem sido bem descrito em uma ampla variedade de modelos animais com utilização de diversos estímulos, como colágeno, adjuvante de Freund, proteoglicanos, pristanos, avridinas, antígenos entre outros, que são capazes de simular/desencadear respostas celulares, bioquímicas, imunológicas e alterações histológicas que mimetizam em grande parte as condições patológicas da AR humana (DURIE, FAVA e NOELLE, 1994; BRAND *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2015; BESSIS *et al.*, 2017).

Neste contexto, o modelo experimental de artrite induzida por colágeno (AIC) apresenta características fisiopatológicas semelhantes à AR humana, além de ser amplamente utilizado para ilustrar os mecanismos patológicos relevantes na AR humana e para identificar potenciais agentes terapêuticos (DURIE, FAVA e NOELLE, 1994, ZHANG *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2015; BESSIS *et al.*, 2017). Em ambos tipos de artrite, células do sistema imune e dos tecidos sinoviais produzem uma série de citocinas inflamatórias e outros mediadores solúveis

em uma cascata inflamatória. Estas reações inflamatórias estão relacionadas com a gravidade da lesão óssea e destruição da cartilagem durante a progressão da AR (LUBBERTS e VAN DEN BERG, 2003).

Em roedores, AIC pode ser induzida pela imunização com emulsão de colágeno tipo II em adjuvante completo de Freund, que leva à produção de anticorpos específicos para colágeno tipo II (BRAND *et al.*, 1996; BEVAART, VERVOORDELDONK e TAK, 2010; SONG *et al.*, 2015). Fenotipicamente, animais com AIC apresentam proliferação incontrolada de sinoviócitos tipo B, infiltração de leucócitos nas articulações e elevada expressão local de NF-kB. A expressão aumentada de NF-kB é uma das principais características fisiopatológicas da AIC, pois a inibição farmacológica de NF-kB está correlacionada com a diminuição da resposta inflamatória na AR (AYA *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006; HSU *et al.*, 2013).

1.1.3 Fatores de risco envolvidos na gênese da AR

Um corpo crescente de evidências sugere que a AR se desenvolve em indivíduos predispostos geneticamente, após exposição a fatores ambientais. As interações entre fatores de pré-disposição genética e fatores ambientais têm sido identificados como sendo importantes para a determinação do risco de se desenvolver AR (KASANTSEVA *et al.*, 2012; KURKÓ *et al.*, 2013). Desta forma, a interação entre fatores genéticos e ambientais, como a exposição ao cigarro fornecem pistas para a patogênese da doença, mas a complexidade da etiopatogenia da AR ainda precisa ser mais aprofundada (KARLSON e DEANE, 2012).

Assim, o "triângulo das Bermudas" para a indução da AR consiste em fatores autoimunes, mencionados previamente, fatores genéticos e fatores ambientais, que desencadeiam o aparecimento e a perpetuação de sinovite subjacente à AR (KLARESKOG, PADYUKOV e ALFREDSSON, 2007; SZODORAY *et al.*, 2010; de VRIES, 2011; KURKÓ *et al.*, 2013).

Atualmente, ainda não se tem um conhecimento claro de como fatores genéticos e ambientais levam à perda de auto-tolerância das células B, porém é sabido que certos alelos presentes no MHC classe II, particularmente os alelos do tipo antígeno leucocitário humano (*HLA – Human Leukocyte Antigen*) e o tabagismo representa importante fator de risco (KLARESKOG *et al.*, 2008).

Em relação aos fatores genéticos, investigadores demonstraram, através de experimentos de sorotipagem, que a susceptibilidade à AR está relacionada com a presença de genes no locus HLA (VIATTE, PLANT e RAYCHAUDHURI, 2013). Estudos de caracterização do locus HLA identificaram vários alelos de risco para AR presentes na porção HLA-DRB1 e mostraram que moléculas HLA, que possuem determinada sequência conservada

de 5 aminoácidos e que são codificadas por epítopos compartilhados, estão associdadas com a produção de ACPAs e principalmente com a incidência de AR soropositiva (VIATTE, PLANT e RAYCHAUDHURI, 2013).

Estudos com modelos animais de AR, que têm explorado o papel de fatores de risco ambientais, como o tabagismo, na patogênese da AI, tem fornecido poucas informações sobre os mecanismos específicos pelos quais as exposições ambientais podem desencadear a AR. Pela utilização do modelo de AIC em murinos, OKAMOTO e colaboradores (2011) induziram uma artrite inflamatória, expondo os animais à inalação da fumaça condensada do cigarro. Diferentemente, outro estudo mostrou que a exposição à fumaça do cigarro retarda o desenvolvimento de AIC em camundongos, decorrente, provavelmente, da presença de diversos constituintes imunossupressores da fumaça do cigarro (LINDBLAD *et al.,* 2009). Desta forma, é necessário a realização de estudos mais aprofundados para elucidar os mecanismos fisiopatológicos pelos quais a exposição a fatores ambientais desencadeam a AR, em especial o cigarro, por ser o principal fator ambiental que contribui para o desenvolvimento de AR.

O uso do tabaco constitui a causa mais importante de morbidade e mortalidade no mundo. Muitas doenças relacionadas ao tabaco são originadas de alterações biológicas decorrentes de exposições inalatórias repetidas aos constituintes tóxicos produzidos pela pirossíntese ou pela combustão do cigarro (IARC, 1986; HUSGAVFEL-PURSIAINEN, 2004; VINEIS *et al.,* 2004). A fumaça do cigarro tem propriedades tóxicas, genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas (HUSGAVFEL-PURSIAINEN, 2004). Neste contexto, vários estudos epidemiológicos mostraram que o tabagismo é o fator de risco ambiental mais forte ligado à AR (VESSEY, VILLARD-MACKINTOSH e YEATES, 1987; KARLSON *et al.,* 1999; STOLT *et al.,* 2003; COSTENBADER et *al.,* 2006). Um possível mecanismo seria um aumento na expressão de autoantígenos citrulinados nos pulmões, e este fato, em indivíduos geneticamente susceptíveis, desencadeia uma sequência de eventos imunológicos que conduzem para a quebra de tolerância imunológica aos antígenos citrulinados endógenos (KARLSON e DEANE, 2012). Ao encontro com esta informação, outros trabalhos mostram que o cigarro aumenta em 30 % o risco de desenvolvimento de uma AR positiva para ACPAs (KLARESKOG, GREGERSEN e HUIZINGA, 2010) e que o tabagismo aumenta a expressão de proteínas citrulinadas nos pulmões de fumantes saudáveis (MAKRYGIANNAKIS *et al.,* 2008), e em pacientes em estágios iniciais de AR (REYNISDOTTIR *et al.,* 2014). Adicionalmente, lesões articulares decorrentes do uso do tabaco são atribuídas principalmente à presença e produção dos ACPAs nos pulmões (de ROOY *et al.,* 2014).

Evidências clínicas sugerem que a exposição ao cigarro pode agravar a AR já estabelecida, contribuindo para sua gravidade (SAAG *et al.,* 1997; STOLT *et al.,* 2003).

Adicionalmente, pacientes com AR, e que mantém o tabagismo, apresentam maior atividade da doença e maiores riscos de adquirirem invalidez (SAAG *et al.*, 1997; PAPADOULOS *et al.*, 2005; MASDOTTIR *et al.*, 2000; MANFREDSDOTTIR *et al.*, 2006).

Estas evidências foram corroboradas pela maior prevalência de AR em mulheres caucasianas com predisposição genética e fumantes do que naquelas com predisposição genética, mas que não eram fumantes (CRISWELL *et al.*, 2006). Ainda, estudos mostraram que a exposição ao cigarro evitou o ganho de peso normal e induziu a atrofia músculo-esquelética em ratos com artrite induzida por colágeno (MOREIRA *et al.*, 2011) e que o tabagismo está associado com a progressão radiográfica na AR (SAAG *et al.*, 1997; RUIZ-ESQUIDE *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo preciso pelo qual o cigarro e seus diversos componentes tóxicos afetam a progressão radiográfica e a importância do cigarro nos demais efeitos da AR não estão totalmente elucidados.

A fumaça do cigarro fornece muitos carcinógenos orgânicos para os pulmões, além de outros elementos tóxicos (CHIB e MASIRONI, 1992). Alguns dos metais tóxicos como cádmio, níquel e chumbo (Cd, Ni e Pb) passam prontamente do fumo inalado para a corrente sanguínea e podem se acumular em órgãos específicos, tais como fígado e rins (CSALARI e SZANTAI, 2002). De acordo com AFRIDI e colaboradores (2015), as exposições elevadas ao Cd, Ni e PB provenientes do consumo do cigarro são sinérgicas aos fatores de risco associadas à AR. Soma-se a isso o fato de que as folhas de tabaco acumulam naturalmente e concentram elevados níveis de Cd, Ni, Pb, Fe, Cu e, consequentemente, o tabaco tornou-se uma fonte importante de exposição a estes metais tóxicos para os fumantes (KAZI *et al.*, 2009).

A quantidade total de carcinógenos varia de uma escala de 0 a 3 μg por cigarro (CSALARI e SZANTAI, 2002). Foi visto que um pacote de cigarro libera 2–4 μg de Cd, 1–2 μg de Pb e Ni nos pulmões de uma pessoa fumante, e uma certa quantidade dos constituintes do cigarro é liberado no ar que é inalado igualmente por pessoas fumantes e não fumantes (HECHT, 2003).

O benzo[a]pireno (B[a]P) juntamente com a 3-metil-colantreno e 2,3,7,8-tetra-clorodibenzo-p-dioxina (TCDD) são hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) e uns dos principais componentes tóxicos da fumaça do cigarro. KOBAYASHI e colaboradores (2008) mostraram que a exposição *in vitro* ao TCDD induz a expressão das citocinas IL-1, IL-6 e IL-8 em sinoviócitos tipo B na AR.

A nicotina, também é um dos mais importantes componentes do cigarro e, de acordo com YU e colaboradores (2011) o pré-tratamento com nicotina agrava a AR induzida por adjuvantes em modelos animais, além de modular os níveis dos autoanticorpos ACPAs. Estudo recente mostrou que a nicotina pode exacerbar a AIC, uma vez que a nicotina possui papel na

indução da formação de NETs, levando à ativação imune e posterior liberação de autoantígenos, através de eventos de netose. (LEE *et al.*, 2017). Por outro lado, outros trabalhos mostraram que a nicotina possui efeitos antiinflamatórios em modelos animais de AR, nos quais foi visto, por ensaios de avaliação clínica, quea exposição à nicotina retarda o desenvolvimento e não agrava a artrite em modelos de AIC em camundongos (LINDBLAD *et al.*, 2009; VAN MAANEN *et al.*, 2009). ZHOU e colaboradores (2012) observaram que o tratamento com nicotina bloqueou a secreção de TNF-α, IL-6 e IL-8, de maneira dose-dependente, e bloqueou a subsequente ativação da cascata de sinalização mediada pelo NFκB em sinoviócitos tipo B isolados de pacientes com AR. O efeito supressor da nicotina na AR também foi observado por YU e colaboradores (2011), porém apenas quando a nicotina foi administrada depois do desenvolvimento da AR, mas, ainda não está claro porque a nicotina induziu a supressão de artrite neste modelos estudados. Ainda, foi observado por estudo epidemiológico que em casos de AR seropositiva em fumantes, a patogenicidade não é decorrente da ação da nicotina, uma vez que não foi observada associação entre o uso da nicotina e o risco da formação de ACPAs (JIANG *et al.*, 2014).

Em conjunto, fica claro que são necessárias novas investigações para elucidar quais os constituintes da fumaça do cigarro contribuem para o fenótipo patogênico da artrite e para geração de autoimunidade, em qual fase cada composto está atuando e os mecanismos envolvidos.

Do exposto, ressalta-se que a gênese da AR é muito complexa e, como já salientado anteriormente, os fatores indutores estão associados à pre-disposição genética, autoimunidade e à exposição a fatores ambientais. Dentre os fatores ambientais, é claramente evidenciado que o tabagismo contribui para a gênese e para o agravamento da doença. No entanto, existem controvérsias quanto aos mecanismos de ação do cigarro e quais componentes deste poderiam ser o agente envolvido na etiologia e patogenia da AR.

1.1.4 AR, tabagismo e AhR

A fumaça condensada do cigarro possui inúmeros constituintes capazes de ativarem o receptor Aril Hidrocarboneto (*Aryl hydrocarbon receptor* – AhR), como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), incluindo o benzo[a]pireno e o TCDD. Este receptor também conhecido como receptor de dioxina, é um fator de transcrição induzido por ligantes, principalmente por xenobióticos e pertence à família *PER-ARNT-SIM helix-loop-helix* (BURBACH *et al.*, 1992; EMA *et al.*, 1992; FUJII-KURIYAMA *et al.*, 1994). O AhR está localizado no citoplasma e mantém-se em sua forma inativa na ausência de seus ligantes. Na vigência de ligação do receptor a agonistas, ocorrem alterações conformacionais com o

desacoplamento de proteínas chaperonas, e o complexo formado receptor-ligante transloca-se para o núcleo e dimeriza-se com o translocador nuclear do AhR (Arnt). Na porção nuclear, o heterodímero Ahr/Arnt liga-se a uma sequência específica de DNA, denominada elemento responsivo a xenobióticos (*XRE – xenobiotic responsive element*), desencadeando assim a síntese de proteínas que levam à toxicidade (para revisão ver STOCKINGER *et al.*, 2014). (Figura 5)

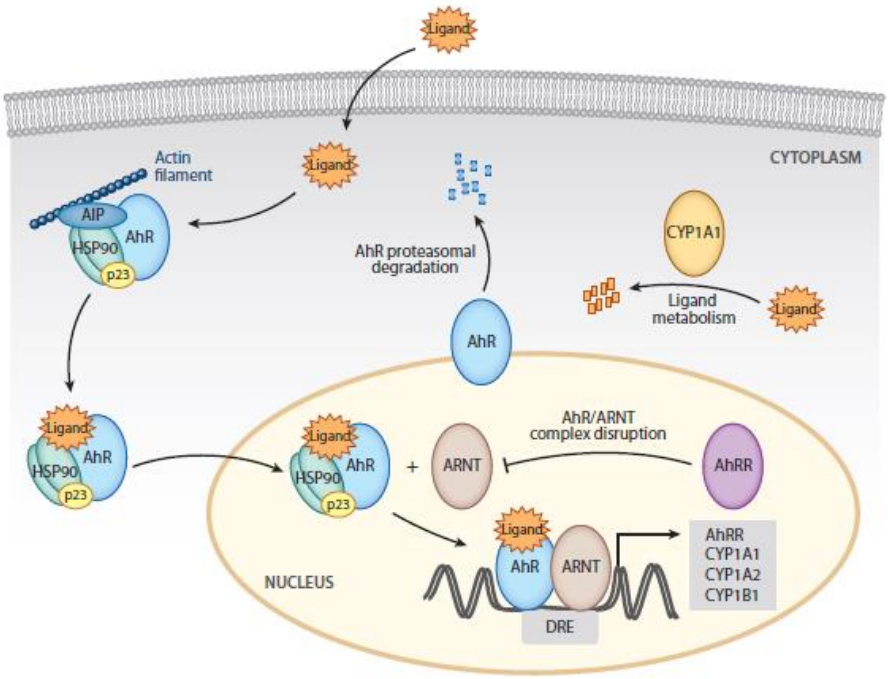

Figura 5: Via canônica do AhR. Na ausência de um ligante, AhR está presente no citoplasma, ligado a filamentos de actina em um complexo inativo com várias proteínas chaperonas. Após ligar-se a um ligante, AhR se transloca para o núcleo, onde é liberado do complexo e se heterodimeriza com o translocador nuclear de AhR (ARNT), e finalmente na porção nuclear o heterodímero AhR/ARNT liga-se a regiões genômicas que contém sequências específicas denominadas DRE (elemento responsivo a dioxinas – dioxin response element), induzindo a transcrição de vários genes, tais como CYP1A1, CYP1A2, entre outros, desencadeando uma variedade de efeitos toxicológicos. Fonte: Stockinger *et al.*, 2014.

O receptor AhR medeia a hematoxicidade induzida pelo BZ ao induzir a ação da enzima hepática CYP2E1, a qual é crítica para a biotransformação do BZ em seus metabólitos fenólicos, como a HQ (YOON *et al.*, 2002). Além disso, a ativação de AhR por agonistas, tais

como os diversos hidrocarbonetos aromáticos cíclicos provenientes do cigarro, tem sido associada com alterações na proliferação celular, apoptose, promoção de tumores, e desenvolvimento e reprodução (PUGA *et al.,* 2000.2005;. SHIMIZU *et al.,* 2000; BONNESEN *et al.,* 2001).

Ainda, um número crescente de estudos tem relatado os diversos efeitos do AhR no sistema imune, ao regular a geração de células Treg, modular o balanço Th1/Th2 (FUNATAKE *et al.,* 2005; NEGISHI *et al.,* 2005), além de exercer um papel central na diferenciação e no desenvolvimento de células Th17 e Treg, que estão relacionadas com o desenvolvimento de diversas doenças autoimunes, como a AR (KIMURA *et al.,* 2008; QUINTANA *et al.,* 2008; NGUYEN *et al.,* 2013; CHENG *et al.,* 2017). Ademais, KIMURA e colaboradores (2009) mostraram que o receptor AhR regula diferencialmente a ativação do gene STAT e atividade do fator de transcrição NFkB em células T e macrófagos, respectivamente, sugerindo que AhR controla várias respostas imunes através da regulação destes fatores de transcrição.

Sabe-se que a ativação do AhR tem um papel central na AR, uma vez que este contribui para o fenótipo inflmatório e destrutivo da doença (LAHOTI *et al.,* 2014). Tem sido demonstrado que compostos presentes na fumaça do cigarro ativam o AhR, e este tem sido um dos principais mecanismos sugeridos para o agravamento da AR em fumantes (ADACHI *et al.,* 2013; NGUYEN *et al.,* 2015). Estudos que mostraram a expressão elevada de AhR em membranas sinoviais de fumantes (KAZANTSEVA et al., 2012), e que a ativação de AhR por poluentes ambientais induz a ativação e diferenciação de células Th17 na gênese da AR, corroboram com essa hipótese (NAKAHAMA *et al.,* 2011; NGUYEN *et al.,* 2015; CHENG *et al.,* 2017). Ainda, a ação de AhR em células T contribui para o desenvolvimento da AIC em camundongos (NGUYEN *et al.,* 2015). Adicionalmente, foi mostrado que a fumaça condensada do cigarro e outros ligantes puros do AhR exacerbaram a AR, alterando o metabolismo ósseo e induzindo respostas pró-inflamatórias em sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (TAMAKI *et al.,* 2004; ADACHI *et al.,* 2013; TONG *et al.,* 2017). Adicionalmente, sob condições de inflamação, o AhR ativa/induz a expressão de vários fatores de crescimento e migração dos sinoviócitos tipo B. Ainda, AhR ativado induz a expressão de IL-1β, IL-6 e COX-2 em sinoviócitos tipo B isolados de pacientes com AR, e tratamento com um antagonista deste receptor inibiu fatores de crescimento de fibroblastos e diminuiu o fenótipo invasivo de sinoviócitos tipo B (TAMAKI *et al.,* 2004; KOBAYASHI *et al.,* 2008; NAKAHAMA *et al.,* 2011; NGUYEN *et al.,* 2015).

Embora sejam conhecidos muitos dos ligantes de AhR presentes na fumaça do cigarro, ainda não são entendidos os mecanismos pelos quais essas moléculas contribuem para o desenvolvimento e agravamento da AR.

1.2 Hidroquinona

A Hidroquinona (HQ – 1,4-dihidroxibenzeno, Figura 6) é um produto derivado da hidrólise da arbutina (4-Hidroxifenil-β-D-glicopiranosídeo), que é um composto fenólico encontrado amplamente em plantas, além de estar presente em frutas como *berries*, pera e maçã, além de seus derivados tais como sucos e geléias. A arbutina é facilmente hidrolisada no estômago em HQ livre, a qual é amplamente absorvida pelo trato gastrointestinal (MCDONALD *et al.*, 2001). Além da composição de arbutina em plantas, a HQ livre também está presente naturalmente em alguns alimentos e bebidas, tais como brócolis (0,1 ppm), vinho tinto (0,5 ppm) e café (40 mg/Kg no grão seco; 0,5 µg/mL no produto pronto para o consumo) (IARC, 1987; JIN e SATO, 2003; DIMITROVA *et al.*, 2005; THAVARAJAH e LOW, 2006).

Figura 6: Estrutura química da Hidroquinona (HQ).

A HQ possui peso molecular de 110,11, é solúvel em água (70 g/L a 25 ºC) e etanol, apresenta ponto de fusão 172,3 ºC, ponto de ebulição 287 ºC, pressão de vapor $2,4 \times 10^{-3}$ Pa ($1,8 \times 10^{-5}$ mm Hg) a 25 ºC, além de ser um agente redutor com potencial eletroquímico de +286 mV para o par redox benzoquinona/hidroquinona, a 25 ºC e pH 7,0 (IARC, 1987; MCGREGOR, 2007). A HQ é uma substância cristalina branca, e se em contato com o ar ou luz ocorre oxidação e escurecimento da cor.

A HQ é utilizada na indústria cosmética, sendo um dos tratamentos mais indicados por dermatologistas para o clareamento da pele, com finalidades estéticas ou terapêuticas, além de ser usada em tinturas de cabelo e em esmaltes para pintar as unhas e clinicamente é aplicada topicamente para o tratamento de hipermelanose (WESTER *et al.*, 1996). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) permite a comercialização de cremes à base de HQ, utilizando a concentração de até 2 % de HQ, porém formulações com concentrações que variam de 4 a 10 % de HQ são encontradas em formulações manipuladas (DECAPRIO, 1999; ANVISA, 2000; WESTERHOF e KOOYERS, 2005). O uso cosmético da HQ, com finalidades de claraemento de pele, foi banido nos países da União Européia e no Reino Unido, devido ao potencial risco carcinogênico da HQ (Regulação número 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho em produtos cosméticos, 2009).

As ocorrências antropogênicas da HQ provêm principalmente da atividade industrial, onde a HQ é importante para a indústria química, usada principalmente como um antioxidante na indústria produtora de borracha, visto que a HQ é utilizada como inibidor da polimerização da mesma, além do seu uso nas indústrias petroquímicas, na purificação do petróleo, na formulação de soluções reveladoras de fotografias preto e branco, entre outras inúmeras linhas industriais (IARC, 1987; WESTER *et al.*, 1997; MCGREGOR, 2007). A literatura estima que a produção industrial de HQ seja em torno de 35.000 a 40.000 toneladas por ano (DECAPRIO, 1999; WESTERHOF e KOOYERS, 2005).

Há registros que mostram que a HQ dispersa no ar pode estar conjugada a poeira em concentrações de 0,1 a 6,0 mg/m^3 em indústrias que manipulam a mesma ou seus precursores, e este é um número muito elevado, visto que o *National Institute of Occupational Safety & Health* (NIOSH) e a *American Conference of Industrial Hygienists* (ACGIH) alertam para um limite de 2,0 mg/m^3 no qual trabalhadores podem permanecer em contato com a HQ por um período limitado de 8 horas por dia (TLV-TWA). Já a ACGIH vai mais longe, permitindo que um indivíduo em seu ambiente de trabalho esteja em contato com a HQ nesta concentração por no máximo 15 minutos por dia (TLV-C) (NIOSH, 1994; PIFER *et al.*,1995). No Brasil não há legislação vigente que determine o tempo máximo de contato que uma pessoa pode ter com a HQ no ambiente de trabalho. Ainda, no Brasil são adotados os limites de exposição estabelecidos pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e *National Institute Of Occupational Safety and Health* (NIOSH), agências do governo dos Estados Unidos, trazidos pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), ligada à Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (NIOSH, 1994; CETESB).

A HQ é produzida endogenamente durante a biotransformação do benzeno (BZ), principalmente no fígado, medula óssea e pulmões, e é também responsável pela mielotoxicidade e imunossupressão detectadas durante a toxicidade do benzeno (SNYDER, 2004; MCGREGOR, 2007). O BZ, um composto orgânico volátil, é um dos componentes químicos industriais mais utilizados. O BZ é liberado no ambiente a partir de várias fontes, como combustão do carvão e óleo, gasolina, da exaustão de veículos a motor, esgotos industriais, na extração e refinamento do petróleo, na fumaça de cigarro e lenha, entre outras fontes (MINCIULLO *et al.*, 2014; BAHADAR *et al.*, 2015). O BZ foi utilizado como aditivo na gasolina até a década de 1970, quando sua utilização foi proibida devido a sua alta toxicidade. Entre 1972 e 1991 a média de concentração de BZ na gasolina americana foi de 0,8 a 3,18 %, enquanto que atualmente a gasolina americana contém cerca de 1 % de BZ. No Brasil, a Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) preconiza a concentração máxima de 1 % de BZ na gasolina comum, mas dados públicos mostram até 8 %

de BZ em combustíveis adulterados (ANP, 2001; AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTICIAS, 2005).

A exposição humana ao BZ ocorre via inalação, absorção dérmica, ingestão de alimentos contaminados e água, e fumaça do cigarro em fumantes ativos e passivos (WILBUR *et al.*, 2008; ARNOLD *et al.*, 2013). A maior exposição ao BZ se dá no ambiente de trabalho, por trabalhadores de indústrias químicas e petroquímicas, uma vez que o BZ é liberado durante os processos de produção, refinamento, transporte e armazenamento do petróleo. Contudo, a exposição também ocorre no ambiente poluído, em especial pela queima de combustível. Por estes motivos, populações que moram ao redor de indústrias petroquímicas estão mais expostas ao BZ pela poluição do ar.

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer* - IARC*)*, o Programa Toxicológico Nacional (NTP) e a Agencia de Proteção Ambiental (EPA) classificam o BZ como agente carcinógeno do grupo 1, devendo assim, haver regulamentação especifíca para este composto. Além disso, tem sido demonstrado que a exposição ao BZ está correlacionada com a incidência de leucemia, em particular leucemia aguda mielóide em humanos e induz tumores sólidos em animais (IARC, 1987; 2012; BAAN *et al.*, 2009; MCHALE, ZHANG e SMITH, 2012). Estudos indicam o BZ como um disruptor endócrino, podendo alterar a forma natural de regulação hormonal do organismo (KIM *et al.*, 2013), além de indutores de alterações numéricas e estruturais nos cromossomos em humanos expostos ocupacionalmente ao BZ (EASTMOND *et al.*, 2001; MORO *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014).

O BZ absorvido pela pele ou pelas vias aéreas sofre epoxidação no fígado ou nos pulmões, mediada pela enzima citocromo P450 2E1 (CYP2E1). O óxido de BZ resultante estabelece equilíbrio entre sua forma oxepina ou pode rearranjar-se não enzimaticamente a fenol. Este último, pela ação da CYP2E1, é hidroxilado, via dihidrodiol desidrogenase, aos compostos reativos da HQ, o catecol ou o 1,2,4-benzenotriol, gerando assim substratos para enzimas de fase II de biotransformação, os conjugados fenólicos encontrados na urina, o ácido fenilmercaptúrico e o ácido trans, trans-mucônico, ou ainda, são transportados pelo sangue para a medula óssea, onde são biotransformados pela mieloperoxidase (MPO) e prostaglandina H sintetase gerando os compostos 1,4 e 1,2-benzoquinonas, compostos estes mais tóxicos, que contribuem para a mielotoxicidade (Figura 7) (para revisões ver DE CAPRIO, 1999; SNYDER, 2004; JOHNSON, LANGÅRD e LIN, 2007; HARTWIG, 2010).

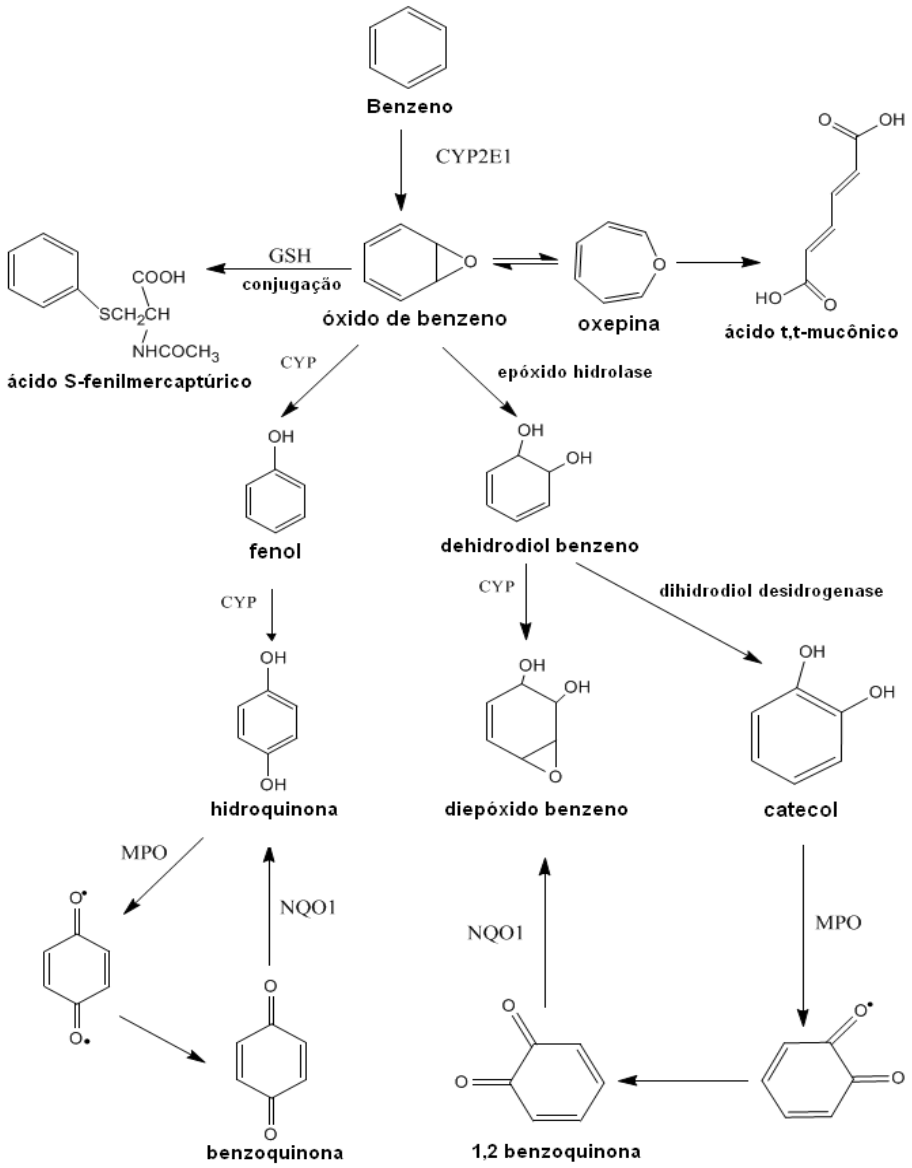

Figura 7: Biotransformação do benzeno (BZ). Fonte: figura adaptada de JOHNSON; LANGÅRD e LIN, 2007. (GSH: glutationa; CYP: enzimas do complexo citocromo p450; MPO: mieloperoxidase; NQ01: quinona oxido-redutase 1).

A comprovação da importância da metabolização do BZ para sua toxicidade é bastante evidenciada em estudos com animais geneticamente modificados para as enzimas CYP2E1 e MPO, uma vez que a mielotoxicidade é bastante reduzida nestes animais (KETTLE e WINTERBOURN, 1992; MEDINSKY, KENYON e SCHLOSSER, 1995; SNYDER, 2002; SNYDER, 2004).

Dados da literatura mostram que a HQ é trasnportada para a medula óssea, onde pode ser oxidada em quinonas altamente tóxicas pela auto-oxidação e pela enzima MPO, contribuindo significantemente para a toxicidade do BZ (SMITH, 1996; GASKELL, MCLUCKIE e FARMER, 2005; SCHNATTER *et al.*, 2012). Porém, apesar dos diversos estudos abordando os efeitos do BZ e dos seus metabólitos, os mecanismos envolvidos na toxicidade do BZ e da HQ são complexos, afetando diversas vias (para revisões ver DE CAPRIO, 1999; SNYDER, 2004; JOHNSON, LANGÅRD e LIN, 2007; HARTWIG, 2010; HUANG *et al.*,2015), as quais ainda não estão completamente elucidadas, necessitando-se estudos mais aprofundados.

A HQ e o BZ desempenham um papel importante tanto na poluição do meio ambiente, tanto *out-door* quanto *in-door*, e ambos estão presentes em altas concentrações na fumaça do cigarro, onde a HQ é o composto com maior atividade oxidativa (MCGREGOR, 2007; DOMAGALA-KULAWIK, 2008; PATEL, RYU e VASSALLO, 2008).

A HQ, bem como o BZ, integram os mais de 8.700 compostos presentes no cigarro, sendo a HQ presente em uma porcentagem elevada, em torno de 10 % de todo material de fase particulada (RODGMAN e PERFETTI, 2013; STABBERT *et al.*, 2017). Monografias da IARC descrevem que um cigarro pode conter até 100 µg de HQ e 72,2 µg de BZ em sua composição. Já as quantidades liberadas pela fumaça deste cigarro podem chegar até 70 µg a 183,5 µg de HQ e 46,3 µg a 272 µg de BZ pela corrente primária e secundária, respectivamente, levando a uma exposição significativa, tanto para fumantes ativos quanto fumantes passivos (IARC, 1987; ANVISA, 2001; KIM, KANG e KIM, 2005).

A HQ é um composto com alta capacidade de gerar estresse oxidativo em sistemas endógenos, além de ligar-se tanto ao DNA e às proteínas, desencadeando diferentes efeitos tóxicos (GASKELL, MCLUCKIE e FARMER, 2005; NORTH et *al.*, 2011).

Por ser um componente do cigarro e por ser um contaminante industrial, a HQ tem chamado a atenção por seus potenciais efeitos adversos em vários sistemas e órgãos. Neste contexto, a HQ tem sido associada a um aumento da incidência da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) em humanos. Esta doença, que possui elevada incidência em fumantes, é caracterizada pela atrofia celular da retina, podendo evoluir para uma neovascularização coroidal da mácula, levando à posterior perda parcial ou total da visão. A HQ é a principal responsável por causar DMRI, uma vez que esta doença é desencadeada principalmente por danos oxidativos, que resultam na formação de depósitos nas células epiteliais pigmentares da retina (EPR), com possível destruição destas células EPR e de fotoreceptores. Além disso, a exposição à HQ altera a expressão das citocinas IL-12, IL-10, do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e induz mudanças na expressão de genes associados às funções de apoptose, inflamação e angiogênese nas células EPR de pacientes

fumantes com DMRI (ESPINOSA-HEIDMANN *et al.*, 2006; PONS e MARIN-CASTAÑO, 2011; CAO *et al.*, 2013; CHEN *et al*., 2014; RIM *et al.*, 2017).

Os dados da literatura, na maioria com estudos *in vitro*, mostram que a exposição à HQ compromete a função de células do sistema imune (TAYSSE *et al.*, 1995; KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; CHO, 2008; CHOI *et al.*, 2008; PENG *et al.*, 2012; LEE, YANG e KIM, 2012; LI *et al.*, 2014).

Os dados da literatura sobre o papel da HQ em macrófagos (MΦs) compreendem demonstrações de estudos *in vitro*, que indicam a diminuição da produção de peroxinitrito, sequestro do mesmo ou pela diminuição da produção do óxido nítrico (NO) pela inibição da expressão da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (THOMAS *et al.*, 2001; KIM *et al.*, 2005; CHO, 2008; HEBEDA *et al.*, 2012); além de prejuízos na secreção de mediadores inflamatórios, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12 e NO, por mecanismos mediados via fator de transcrição NF-κB (MILLER *et al.*, 1994; ROSS *et al.*, 1996; KIM *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2007; CHO, 2008); e danos ao DNA em MΦs alveolares de ratos, dependente de estresse oxidativo em exposição à HQ obtida de amostras de cigarro (PRYOR *et al.*, 1998). Já CHOI e colaboradores (2008) mostraram a supressão da fagocitose por dextran em MΦs tratados com HQ *in vitro*, sugerindo um bloqueio da resposta inicial da ativação destas células. Ainda, de acordo com HEBEDA e colaboradores (2012), a exposição *in vitro* à HQ inibiu a produção de TNF-α por células mononucleares humanas e por células polimorfonucleares de ratos. A maioria dos trabalhos da literatura citados acima, embora conduzidos em diferentes condições de exposição à HQ *in vitro*, corroboram para um efeito inibitório da HQ sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias e sobre a produção de NO.

Nosso grupo de pesquisa relatou que a exposição de animais de experimentação à HQ, em condições onde não há comprometimento medular e do perfil de leucócitos na circulação, causa inibição da resposta do organismo a agentes inflamatórios, quantificado pelo menor influxo leucocitário, no pulmão, durante inflamação alérgica ou bacteriana (MACEDO *et al.*, 2006, 2007; FERREIRA *et al.*, 2007 SHIMADA *et al.*, 2012a). No entanto, os mecanismos envolvidos neste efeito inibitório da HQ não estão esclarecidos. Ainda, apesar da exposição *in vivo* à HQ em baixas concentrações não ter alterado o número de macrófagos residentes, a análise do seu perfil secretor mostrou que a exposição à HQ diminuiu a secreção basal das citocinas proinflamatórias IL-1β, TNF-α, IL-6 e do NO pelos diferentes tipos de células presentes no pulmão na vigência de resposta inflamatória aguda (SHIMADA *et al.*, 2012a,b). Porém, esta exposição inalatória à HQ afetou a homeostasia do tecido pulmonar e prejudicou a defesa imunológica ao reduzir a expressão da proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) (SHIMADA *et al.*, 2012a,b). Este mecanismo mostrando a toxicidade *in vivo* da HQ, o qual poderia afetar o aparecimento e a resolução de doenças pulmonares infecciosas em pessoas

fumantes e moradores de regiões poluídas reforça a relevância dos poluentes ambientais e doenças das vias respiratórias como um problema de saúde pública.

Os dados do nosso grupo de pesquisa, somados a outros da literatura, têm demonstrado que a HQ é um dos principais componentes tóxicos do cigarro, que leva à imunotoxicidade e que pode estar envolvido na gênese de diversas doenças incidentes em fumantes. Como fumantes possuem maior índice de incidência de desenvolvimento, bem como agravamento da artrite reumatoide, hipotetizamos que a exposição à HQ, presente em concentrações elevadas na fumaça do cigarro, possa ter algum envolvimento na maior incidência, bem como no agravamento da AR em humanos. No entanto, até o presente momento, não há dados na literatura que suportem esta possível evidência.

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel da exposição *in vivo* à HQ no desenvolvimento e no agravamento da AR induzida pelo colágeno em ratos *Wistar*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar*, machos, adultos (6-8 semanas), com peso entre 180-230 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química e pelo Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em condições normais de biotério, com livre acesso a água e ração, por todo período experimental. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), protocolo CEUA/USP número 435.

3.2 Indução da artrite por colágeno

A indução da artrite por colágeno em ratos *Wistar* machos foi baseada na metodologia descrita por Brand, Latham e Rosloniec (2007) e por Backstrom e Dahlgren (2008). Colágeno bovino tipo II (Chondrex, Inc., Redmond, WA, EUA) foi solubilizado em ácido acético 0,1 M a 2 mg/mL. Um volume igual de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionado à emulsão do colágeno tipo II. Os animais foram imunizados (imunização primária), com injeções subcutâneas (s.c.) na base da cauda, com volumes 200 µL desta emulsão no 7º dia dos protocolos experimentais. Os animais receberam injeções de reforço desta emulsão (100 µL), 7 dias após a imunização primária, no 14º dia. Os animais foram eutanasiados no 35º dia, 28 dias após a imunização primária de colágeno, por excesso de anestésico (solução de Quetamina/Xilasina 80:8 mg/Kg, i. p.). Para comparação e controle dos experimentos, foram utilizados animais que não tiveram indução de artrite por colágeno.

O delineamento experimental dos protocolos de exposições e tratamentos segue abaixo. Os animais foram divididos em 3 condições experimentais (A, B, C) e foram expostos a 3 tipos de soluções - solução salina, solução solvente da HQ (5 % de etanol em salina) ou HQ.

3.3 Exposição à HQ

O esquema de exposição compreendeu a nebulização de solução de HQ (HQ 99 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 25 ppm (1,5 mg/60 mL), na frequência de 1mL/minuto, por 1 hora, uma vez ao dia, durante o decurso temporal, que variou de acordo com cada protocolo experimental (grupos A, B ou C). Para comparação, animais controle foram expostos a volumes equivalentes de solução salina ou ao veículo da HQ (5 % de etanol em solução salina) pelo mesmo tipo de nebulização e pelos mesmos períodos. Para tanto, foram acondicionados 4 animais de cada vez em uma caixa de exposição dotada de 3 orifícios, um deles em um dos lados da caixa e os outros dois na extremidade oposta (Figura 8). Pelo primeiro orifício, as soluções salina, solvente HQ ou HQ foram nebulizadas, utilizando-se um

inalador ultrassônico (NS®, São Paulo, SP, Brasil) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 e 10,0 μm^3. Os outros dois orifícios permitiam a saída de gases da caixa de acondicionamento. Todos os procedimentos de exposição inalatória foram realizados em capela de exaustão.

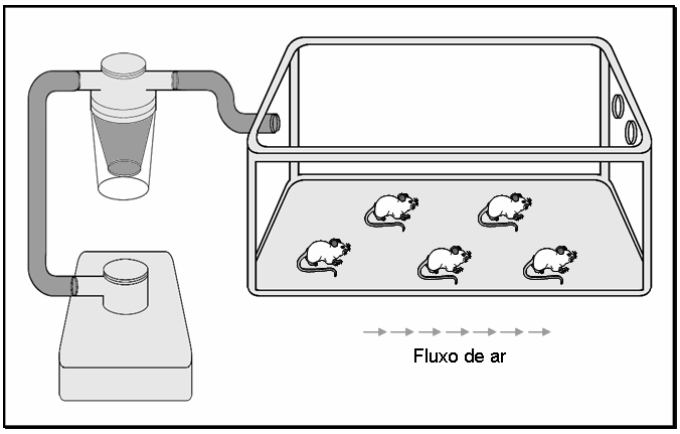

Figura 8: **Representação ilustrativa da caixa de exposição acoplada ao nebulizador ultrassônico.**

3.4 Protocolos experimentais

O delineamento experimental dos grupos de exposições e tratamentos segue ilustrado abaixo (Figura 9). Os animais foram divididos em 3 protocolos (grupos) experimentais (A, B e C), sendo expostos, por nebulização, a 3 tipos de soluções - solução salina (controle), solvente HQ (5 % de etanol em solução salina) ou HQ 25 ppm.

O período de exposição variou de acordo com cada protocolo experimental. No grupo experimental A, os animais foram expostos por 35 dias consecutivos, durante período de sensibilização, indução e desenvolvimento da AIC (Figura 9). No grupo experimental B, os animais foram expostos por 14 dias consecutivos, do 1º até o 14º dia (até o dia da segunda injeção de colágeno), ou seja, pelo período de sensibilização da AIC (Figura 9). Já no grupo experimental C, os animais foram expostos por 07 dias até a primeira injeção de colágeno e depois por 07 dias consecutivos (do 29º dia até o 35º dia), ou seja, depois que a doença já havia sido estabelecida (Figura 9). Em todos os protocolos experimentais, a indução da artrite foi feita pela injeção de colágeno, solubilizado em adjuvante completo de Freund, realizada no 7º e no 14º dia.

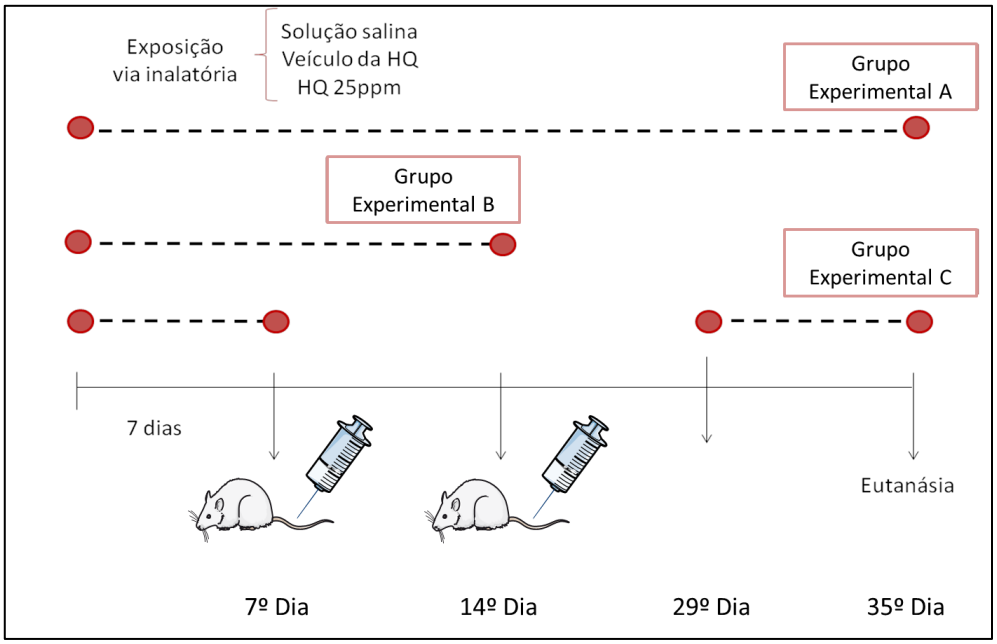

Figura 9: Delineamento experimental dos grupos experimentais.

3.5 Avaliação clínica do desenvolvimento da artrite

O desenvolvimento de AIC é considerado clinicamente significativo quando observa-se edema em pelo menos um dígito ou pata. Desta forma, a incidência e gravidade da AIC foram avaliadas cada 3 dias, a partir do 21° dia até o 35º dia, por exame visual de cada dígito e/ou pata de cada animal. O desenvolvimento e agravemento foram pontuados em valores entre 0 a 4, de acordo com uma escla de *score* clínico baseado no trabalho de Backstrom e Dahlgren (2008) (Tabela 1).

Score clínico	Aspectos clínicos
0	Dígitos e patas normais – sem desenvolvimento de artrite
1	Leve inchaço ou vermelhidão
2	Vermelhidão moderada, inchaço no tornozelo e/ou pulso
3	Inchaço e vermelhidão graves de toda a pata, incluindo dígitos
4	Máxima inflamação das patas, com envolvimento de múltiplas articulações

Tabela 1: **Pontuação clínica de desenvolvimento de AIC.**

3.6 Acompanhamento do peso dos animais – Evolução ponderal

Devido ao fato de que uma das manifestações sistêmicas da AR é a perda de peso dos indivíduos acometidos por esta doença, foi feita uma avaliação da variação corpórea dos animais no início do período das exposições inalatórias (1º dia) e no último dia de exposição, no dia em que os animais foram eutanasiados (35º dia).

3.7 Leucograma total e Leucograma e diferencial

No 35º dia experimental, os animais foram previamente anestesiados (com solução de Quetamina:Xilasina), e foram coletadas alíquotas de sangue pela veia aorta abdominal para determinação de leucometria total. Para tanto, o sangue coletado foi armazendo em tubo de plástico que continha heparina (15 µl de heparina para 525 µl de sangue) e uma alíquota de 10 µl do sangue foi retirada e colocada em outro tubo plástico, acrescentado 190 µl do corante de Turkey (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para posterior contagem dos leucócitos em Câmara de Neubauer em microscópio de luz (Cálculo: número encontrado na soma dos 4 quadrantes ÷ 4 (número de quadrantes) x 20 (fator de diluição).

Ainda, foram coletadas alíquotas de sangue da aorta abdominal para realização do leucograma diferencial, através da contagem pelo método de extensão sanguínea. Para realizar este protocolo, a alíquota de sangue coletada foi colocada sobre uma lâmina de vidro e com uma lâmina extensora, a gota de sangue foi pressionada, com um ângulo de 45º em relação à extremidade da lâmina, e assim foi feito o esfregaço. Após as lâminas estarem secas, foi feita a coloração, seguido de leitura das lâminas em microscópio de luz, utilizando uma objetiva de imersão, com óleo de imersão. Para a leitura do leucograma diferencial foi contado um total de 100 leucócitos por lâmina e o resultado expressa o número diferencial dos tipos de leucócitos (neutrófilos, linfócitos e monócitos) em valores absolutos.

3.8 Análise histológica das membranas sinoviais

Após os períodos de exposições inalatórias, de acordo com cada protocolo experimental, os animais foram eutansiados no 35º dia e foram coletadas as membranas sinoviais presentes nas articulações dos joelhos dos animais para realização de análise histológica. Para tanto, após serem coletados, estes materiais foram embebidos em formalina 4 % (para fixação), após isto foi feita a inclusão das amostras coletadas em parafina, seguida do processo de microtomia (cortes sucessivos, delgados e uniformes de 5 µm de espessura, dos blocos de parafina com as peças incluídas , seguido da montagem das lâminas histológicas). Após a montagem das lâminas foi feita a coloração, utilizando os corantes Hematoxilina e

Eosina (HE), para posterior leitura das lâminas em Microscópio óptico Axio Imager A2 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

Além disso, as membranas sinoviais coletadas foram analisadas pela técnica de Imunofluorescência para a presença de células marcadas para Ly6G (1:100, eBioscience, San Diego, CA, EUA), caracterização de sinoviócitos positivos para CD90 (1:100, BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), expressão intracelular de AhR (1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido), expressão do receptor nuclear retinóico (RORγt) (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), e secreção de IL-17 (1:100, eBioscience, San Diego, CA, EUA) e em todos os ensaios, foi empregado o marcador DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) como controle positivo para marcação dos núcleos celulares. Os ensaios de Imunofluorescência foram feitos de acordo com as instruções dos fabricantes e as imagens foram obtidas no Microscópio Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e analisadas no software Zen Blue (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

3.9 Análise de depósito de colágeno nas membranas sinoviais por Microscopia de Geração de Secundo Harmônico

Com o objetivo de estudar a modulação da trama das fibras de colágeno frente à exposição à HQ e à indução de artrite pelo colágeno, as lâminas histológicas geradas pelos cortes das membrana sinoviais, incluídas em parafina histológica e coradas com Hematoxilina e Eosina, foram analisadas através da Microscopia Confocal Multifotônica, pela técnica de Geração de Segundo Harmônico, utilizando Microscópio Zeiss LSM 780 system (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Núcleo de Instalações de Apoio à Pesquisa (CEFAP - Centro de Facilidades para Pesquisa, ICB-USP). As imagens foram adquiridas através de objetiva de 20x e analisadas pelo software Zen (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Com este tipo de microscopia é possível realizar a leitura do material de forma tridimensional, em profundidade, devido à capacidade de penetração das ondas de excitação no comprimento infravermelho (BÉLISLE *et al.*, 2010). Além disso, devido à baixa carga energética das ondas nessa região do espectro, a microscopia multifóton apresenta pouco esmaecimento ("photobleaching") do tecido e é pouco fototóxica ao material analisado (KOEHLER *et al.*, 2006). Um dos recursos da microscopia multifotônica é a técnica de microscopia por geração de luz em segundo harmônico (SHG – do inglês: *Second Harmonic Generation*), que utiliza espalhamento não-linear de fótons, causado pela trama assimétrica do colágeno para recriar sua imagem. A microscopia por SHG funciona como uma sonda óptica de alta seletividade e excelente contraste de imagem para análise de colágeno, e a imagem por SHG resulta da tripla-hélice não centro-simétrica das três cadeias polipeptídicas da molécula de colágeno (TANAKA *et al.*, 2013).

Após obtidas as imagens por SHG, foi feita uma análise matemática da alteração de padrão de arranjo das fibras colagênicas das membranas sinoviais entre os grupos experimentais e entre as condições com ou sem AIC. Para tanto, aplicou-se o conceito de coeficiente de variação, que possui a capacidade de quantificar variações de intensidade de cor em uma dada região das imagens. As imagens foram analisadas no software CellProfiler (Broad Institute, Boston, MA, EUA) e foram quantificadas em relação à area coberta pelo colágeno, área ocupada pelo colágeno, perímetro e intensidade média.

3.10 Quantificação de mediadores inflamatórios

No 35º dia, após eutanásia dos animais, foram coletados líquido sinovial e soro, os quais foram utilizados para posterior quantificação dos mediadores inflamatórios TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10 e NO.

A quantificação da concentração das citocinas no líquido sinovial e no soro foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais e de acordo com a metodologia fornecida por cada fabricante destes kits (BD Biosciences, R&D Systems e eBioscienscе). Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas produzidas por mililitro.

A concentração de NO foi determinada no líquido sinovial utilizando a reação de Griess. Em resumo, 50 μL das amostras de líquido sinovial foram adicionados a 50 μL do reagente de Griess (1 % de sulfanilamida com 0,1 % de α-naftil etilenodiamina; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, a absorbância de cada amostra foi determinada em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) com comprimento de onda de 550 nm. A concentração de NO das amostras foi determinada a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio ($NaNO_2$) (0,2-200 μM).

3.11 Quantificação de anticorpos anti-proteínas/peptídeos citrulinados para diagnóstico de AR.

O soro de pacientes com AR contém uma variedade de autoanticorpos direcionados contra autoantígenos. Entre eles, teste com o anticorpo anti-peptídeo citrulinado cíclico (anti-CCP) é um teste sorológico que baseia-se na presença de autoanticorpos com afinidade para a citrulina no soro de pacientes com AR. Desta forma, este anticorpo foi utilizado para estabelecer o diagnóstico para confirmação da presença de AR nos animais. Para tanto, no 35º dia foram coletadas amostras de sangue dos animais. Em seguida, foi feita uma centrifugação (3.500 g por 10 min) e o soro foi isolado. Posteriormente, a quantificação da concentração de anti-CCP foi

feita por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kit comercial, de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante (MyBiosource, San Diego, CA, EUA).

3.12 Isolamento de esplenócitos e tratamentos

Animais *naive* foram eutanasiados por excesso de anestésico (solução de Quetamina:Xilasina) e os baços foram coletados. Em seguida, os baços foram colocados em placas de Petri contendo solução de PBS (Tampão Fosfato salino) e 5 % de soro fetal bovino (SFB) e posteriormente foram macerados, utilizando-se o êmbolo de seringas de 10 mL. Após esta etapa, foi feita a lise das hemácias, utilizando-se tampão de lise (solução de NH4Cl 0,13M estéril). Em seguida, os esplenócitos isolados foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10 % de SFB, e foi feita contagem dos esplenócitos em Câmara de Neubauer. Após contagem, os esplenócitos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços, na concentração de 1 x 10^6 células por poço.

Com o objetivo de quantificar a expressão do receptor AhR, os esplenócitos isolados foram incubados *in vitro* com meio de cultura R10 (RPMI 1640, suplementado com 10 % de SFB), solvente HQ (5 % de etanol), HQ (1, 10 ou 100 µM), solvente do PCB 126 (1 % de DMSO) ou PCB 126 (1, 100 or 1000 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ou ainda incubados com alfa-naftoflavona (10, 100 ou 1000 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que é um antagonista de AhR, durante 30 minutos. Adicionalmente, com o intuito de quantificar a secreção de IL-17, os esplenócitos foram incubados *in vitro* com meio de cultura R10 (RPMI 1640 suplementado com 10 % de SFB), solvente HQ (5 % de etanol) ou HQ (1, 10 ou 100 µM) durante 24 horas.

3.13 Análise por citometria de fluxo para quantificar a expressão de AhR e secreção de IL-17 em esplenócitos

Após os esplenócitos terem sidos tratados *in vitro*, como descrito no tópico anterior, eles foram coletados e então fixados com tampão Cytofix/Perm (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), permeabilizados utilizando kit Perm/Fix (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e marcados intracelularmente com anti-AhR (1:100, Abcam, Cambridge, Reino Unido) e posteriormente com anticorpo secundário anti-camundongo Alexa Fluor 488 (1:400, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) ou com anti-IL-17 conjugado com FITC (1:100, eBioscience, San Diego, CA, EUA). O ensaio de citometria de fluxo foi realizado, utilizando o citômetro de fluxo Accuri (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), e foram coletados 50.000

eventos por amostra. Os dados coletados foram analisados no software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

3.14 Obtenção e cultivo de sinoviócitos do tipo B (fibroblastos sinoviais)

A obtenção dos sinoviócitos foi realizada de acordo com o método descrito por WANG e colaboradores (1994). No final das exposições realizadas de acordo com o protocolo experimental do grupo C, os animais foram eutanasiados e posteriormente foi feita a dissecação das articulações fêmoro-tibio-patelares e retirada das membranas sinoviais da região dorso-mediana de cada articulação, com auxílio de lâmina cirúrgica, em condições assépticas. Estas membranas foram incubadas com colagenase do tipo IV (4 mg/mL), diluída em meio de cultura RPMI 1640, durante 4 horas a 37 ºC. A seguir os homegantos foram centrifugados a 200 x g, por 5 minutos. Os sobrenandantes foram coletados para posterior quantificação de mediadores inflamatórios por ELISA, e as células obtidas foram ressuspendidas em RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM) e gentamicina (40 µg/mL) (meio de cultura RPMI completo) e depositadas em microplacas de cultura de 12 poços com fundo chato. Após incubação, durante 18 horas, em estufa a 37 ºC e 5 % de CO_2, os sobrenadantes das culturas foram coletados, para exclusão das células não aderentes, seguido da adição de meio de cultura RPMI completo e incubação por 24 horas, a 37 ºC e 5 % de CO_2. Para subcultivo, os sinoviócitos foram descolados das microplacas, por tratamento com solução de tripsina 0,05 %. Para expansão da cultura, foi realizado um subcultivo, em frasco de 25 cm², mantido em condições semelhantes até a obtenção da confluência das células. Após esta passagem, as células foram subcultivadas e mantidas em frascos de 75 cm² e 175 cm² e utilizadas até a quinta passagem. Os sobrenanadantes foram coletados a cada passagem para quantificação de mediadores inflamatórios pelo ensaio de ELISA.

3.15 Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados como média ± E.P.M. e foram analisados estatisticamente pelo Teste “t” de Student ou pela Análise de Variância com comparações múltiplas (ANOVA), seguido do teste de Tukey-Kramer, quando necessário. Para tanto, foi utilizado o programa estatístico Graphpad Prism 5.0 (La Jolla, CA, EUA). Os valores obtidos foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos da exposição contínua à HQ durante a fase de sensibilização, indução e desenvolvimento da AR induzida pelo colágeno.

Com o objetivo de mimetizarmos os efeitos decorrentes da poluição ambiental e ocupacional e dos efeitos desencadeados pelo tabagismo em um fumante ativo, delineamos um protocolo de exposição inalatória à HQ no qual os animais foram expostos diariamente ao longo de todo decurso temporal necessário para o desenvolvimento da AR induzida pelo colágeno. Para tanto, os animais analisados no Grupo Experimental **A** foram expostos diariamente, por nebulização, às soluções salina, solvente da HQ ou HQ, durante 1 hora por dia, pelo período de 35 dias consecutivos, conforme o esquema de exposição mostrado previamente (Figura 9).

4.1.1 Evolução ponderal

O primeiro parâmetro clínico avaliado foi a variação de massa corpórea do início até o final dos protocolos experimentais. Analisando a variação de massa corpórea no primeiro e no último dia de exposição (35º dia), verificamos que nos animais que não receberam imunizações de colágeno (animais SEM AIC), a exposição ao veículo HQ e à HQ não causaram alteração no ganho de peso corporal, uma vez que a evolução ponderal foi semelhante nestes animais e nos animais expostos à solução salina (Figura 10A).

Diferentemente, nos animais que foram imunizados com colágeno (animais COM AIC) e expostos às mesmas condições experimentais, ao solvente da HQ e a HQ verificamos alteração de peso corporal nestes animais, desencadeada pelo processo inflamatório decorrente da doença. Desta forma, houve ganho de peso de 14,92 % nos animais expostos à solução salina (controle), e decréscimo de peso de 3,53 % nos animais expostos à solução solvente HQ e decréscimo de 9,66 % nos animais expostos à HQ (Figura 10B). Ainda, observamos que o ganho de peso foi similar entre os animais com ou sem AIC e expostos à solução salina (Figura 10A,B).

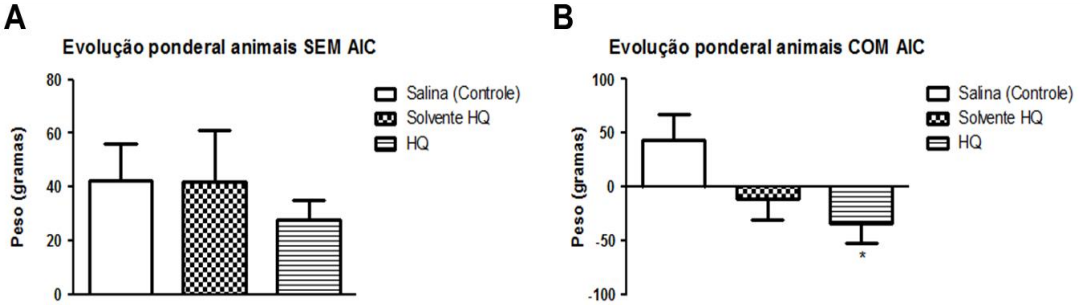

Figura 10: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea. Evolução ponderal foi realizada no 1º e no 35º dia, durante as diferentes exposições inalatórias, que ocorreram por 35 dias consecutivos, em animais sem AIC (A) ou com AIC (B). Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. Grupo Controle. HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite

A incidência e a gravidade da artrite foram avaliadas a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (21º dia) até o dia da eutanásia dos animais (35º dia), e a pontuação foi feita de acordo com uma escala de 0 a 4, segundo apresentado na Tabela 1.

Todos os animais que não receberam as imunizações com colágeno (animais SEM AIC) tiveram pontuação igual a 0, indicando que as diferentes exposições inalatórias não causaram nenhuma alteração clínica e que estes animais não desenvolveram artrite (Figura 11A).

Em todos os animais COM AIC observou-se artrite, porém a incidência e gravidade foram diferentes após os 3 tipos de exposição inalatória. Os animais que foram expostos à solução salina (controle) obtiveram pontuação entre 1 a 2 (Figura 11B,C), os animais expostos à solução solvente HQ receberam pontuação entre 2 a 3 (Figura 11B,C), e os animais expostos à HQ obtiveram pontuação entre 3 a 4 (Figura 11B,C).

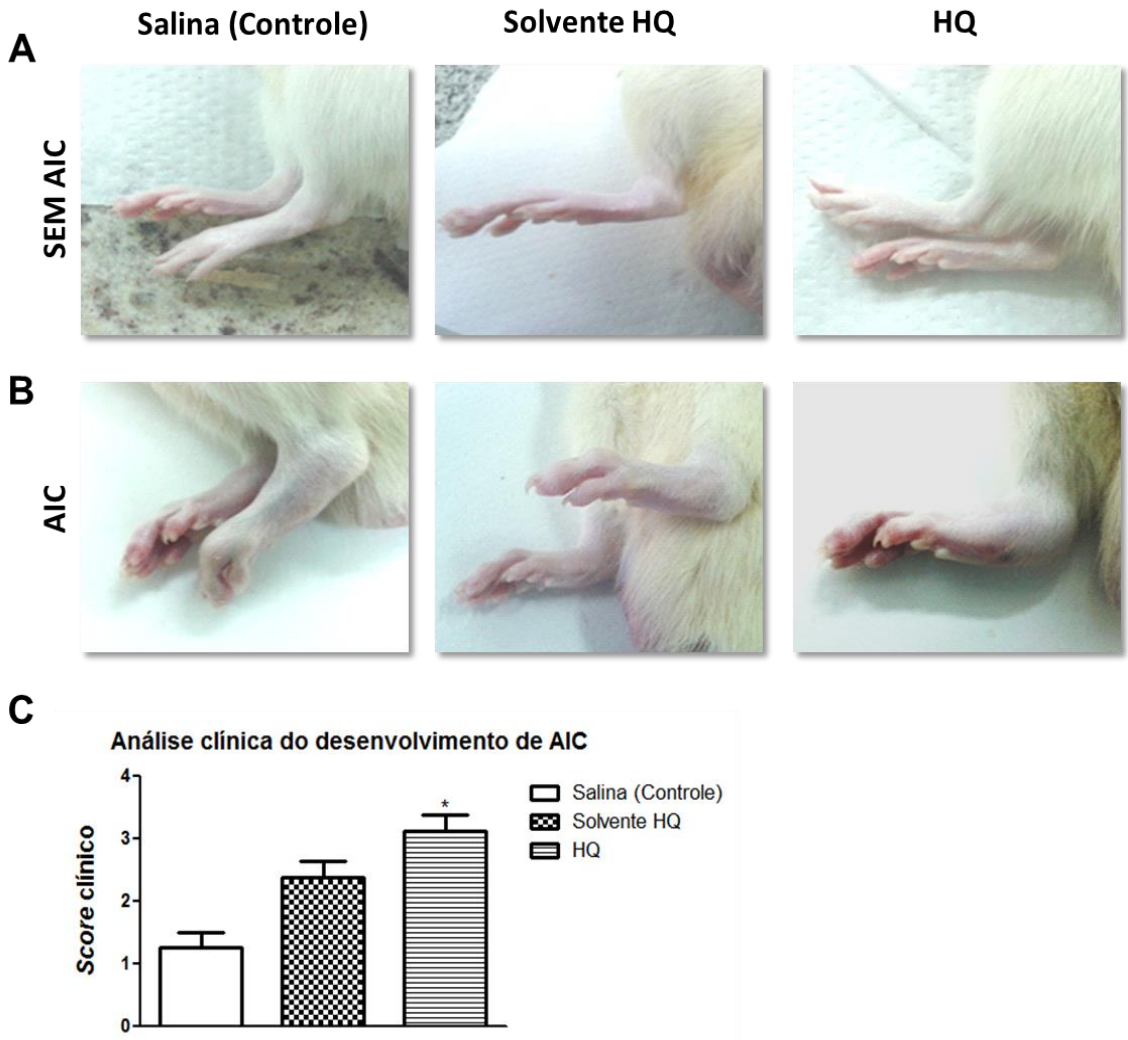

Figura 11: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite. A avaliação clínica foi feita a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (21º dia) até o 35º dia. A: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, SEM AIC. B: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, COM AIC. C: Pontuação clínica do desenvolvimento de artrite após as diferentes exposições inalatórias. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. Grupo Controle. HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.3 Análise do leucograma total e diferencial

A contagem de leucócitos totais do sangue de todos os animais mostrou que não houve diferença estatística significante após as diferentes exposições inalatórias dentre os animais sem AIC e com AIC (Figura 12A).

A contagem diferencial de leucócitos em animais expostos à solução salina (controle) e solvente HQ com AIC mostrou aumento na porcentagem de neutrófilos e monócitos em relação aos respectivos grupos nos animais sem AIC (Figura 12B). Já nos animais expostos à HQ, houve aumento no número de neutrófilos circulantes nos animais com AIC em relação à respectiva exposição nos animais sem AIC, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 12B).

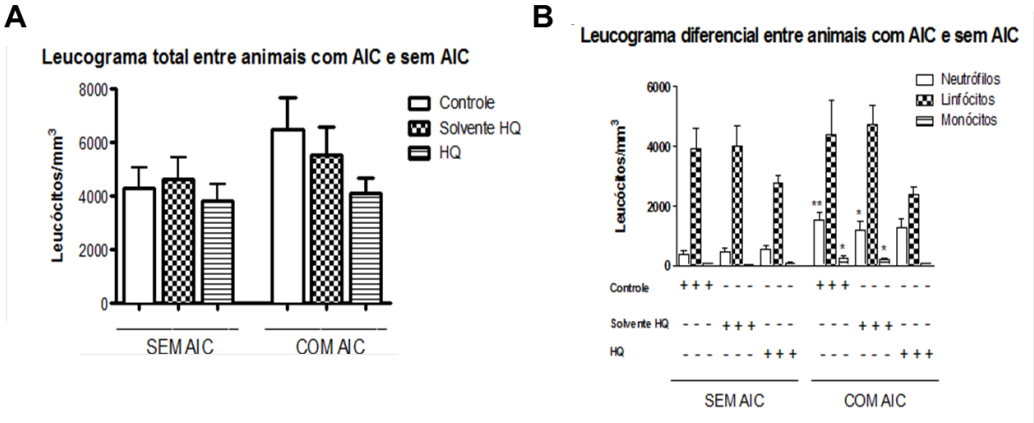

Figura 12: **Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue.** A: Contagem de leucócitos totais do sangue de grupos de animais com ou sem AIC, expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. B: Contagem de leucócitos diferenciais (neutrófilos, linfócitos e monócitos) no sangue de animais com e sem AIC expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células brancas diferenciais presentes no sangue, obtidos de 8 animais em cada grupo *P<0,05 vs. respectivos grupos sem AIC; **P<0,01 vs. respectivo grupo de exposição à salina sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro.

A concentração de IL-6 no soro dos animais não foi alterada em animais expostos à solução salina, veículo da HQ ou HQ eSEM AIC. E na vigência de AIC não houve aumento da concentração desta citocina no soro dos animais expostos à salina, ao solvente HQ ou à HQ, em relação aos respectivos animais sem AIC (Figura 13A).

A concentração de IL-1β no soro, na ausência de AIC, não foi alterada em nenhum animal, após as diferentes exposições. Já nos animais com AIC, houve aumento na concentração de IL-1β no soro dos animais após as exposições à salina, solvente HQ e HQ frente as respectivas exposições inalatórias em animais sem AIC. Dos aumentos observados, somente a

exposição à HQ levou a um aumento estatisticamente significativo na concentração de IL-1β (Figura 13B).

Os resultados apresentados na Figura 13C mostram que tanto na ausência de artrite, bem como na vigência da doença, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no soro dos animais. Não foram detectáveis níveis de TNF-α em nenhuma amostra de soro coletados dos animais após as diferentes exposições inalatórias.

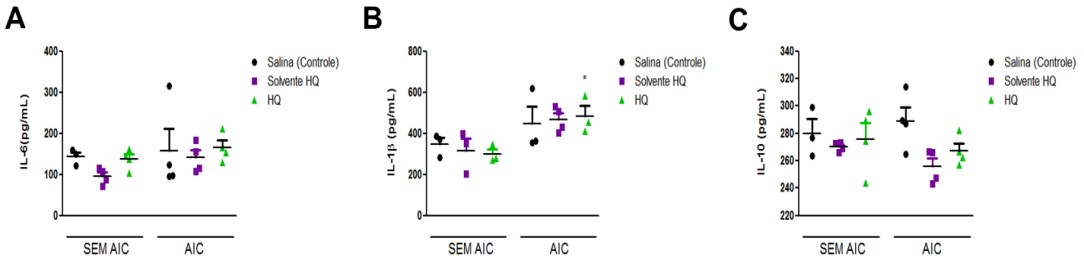

Figura 13: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B) e IL-10 (C) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no soro obtido de 4 animais em cada grupo *P<0,05 vs. respectivo grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro.

Proteínas citrulinadas são produzidas por modificações pós-traducionais que convertem resíduos de arginina em resíduos de citrulina e processos de citrulinação geram novos epítopos, os quais são direcionados especificamente por autoanticorpos e células T. Os autoanticorpos podem ser detectados muito antes dos primeiros sinais de inflamação e a quantificação dos títulos desses autoanticorpos é usado para diagnósticos iniciais da RA (MULLER e RADIC, 2015).

Aqui nós observamos que nos animais sem AIC, a concentração média de anti-CCP nos grupos de animais expostos à solução salina, ou solvente HQ ou HQ foi de 30 IU/mL. Além disso, nos animais sem AIC, a exposição inalatória de HQ não alterou a concentração do anticorpo anti-CCP no soro de animais expostos à salina e ao solvente HQ (Figura 14).

Na presença de AIC, a concentração média de anti-CCP passou para 70 IU/mL e a exposição à HQ aumentou os níveis dessas proteínas no soro dos animais com artrite, quando comparado com o soro dos animais expostos à solução salina e com AIC e em comparação com os animais expostos à HQ e sem AIC (Figura 14).

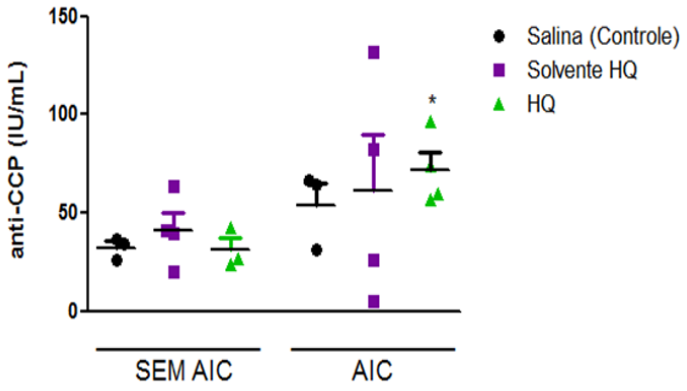

Figura 14: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC. O anticorpo anti-CCP foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração deste anticorpo no soro obtido de 4 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupo controle com AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial

Uma vez que o processo inflamatório observado na artite é caracterizado pela liberação de diversos mediadores inflamatórios no líquido sinovial, tais como citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento (RITCHLIN, 2000), tornou-se interessante quantificar alguns desses mediadores no líquido sinovial após as diferentes exposições inalatórias e após indução de artrite pelo colágeno. Desta forma, no final do período das exposições, os animais foram eutanasiados e os líquidos sinoviais foram coletados.

Inicialmente foi realizada a contagem do número de células presentes no líquido sinovial, e houve aumento no número de células após as 3 exposições inalatórias, em relação aos animais sem AIC. Ainda, após a exposição à HQ houve um aumento estatisticamente significativo no número de células do líquido sinovial nos animais com AIC, em relação às demais exposições (Figura 15). É interessante ressaltar que não foi possível contar células nos fluidos coletados dos ratos expostos ao veículo da HQ e à HQ na ausência de AIC, indicando

que as exposições inalatórias não causaram nenhuma alteração na composição do líquido sinovial destes animais (Figura 15).

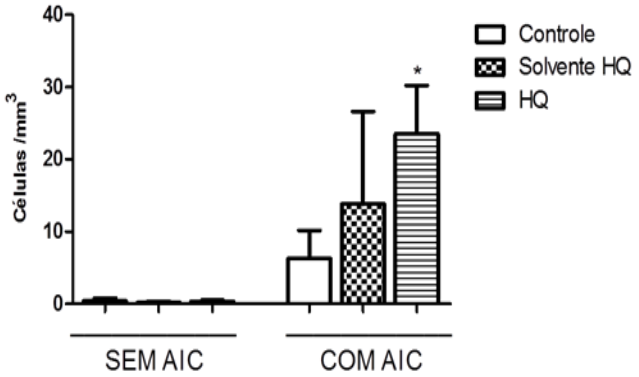

Figura 15: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no líquido sinovial de animais com ou sem AIC. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células totais presentes no líquido sinovial, obtidos de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupo controle com AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Além disso, após a quantificação das citocinas pró-inflamatórias por ELISA, observamos que a exposição à HQ elevou os níveis de algumas dessas citocinas nos fluidos coletados dos animais com AIC em relação aos fluidos coletados dos animais expostos à salina ou ao solvente HQ.

A concentração de IL-6 no líquido sinovial dos animais não foi alterada em animais SEM AIC. Já em animais com AIC houve uma tendência de aumento da concentração desta citocina nos animais expostos ao solvente HQ e expostos à HQ, em relação aos respectivos animais expostos à salina, porém os aumentos observados não foram estatisticamente significativos (Figura 16A).

Os resultados apresentados na Figura 16B mostram que a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-1β no líquido sinovial na ausência de AIC, em comparação aos animais que foram expostos à solução salina e ao solvente HQ, nestas mesmas condições. Por outro lado, na vigência da AIC, houve aumento da concentração de IL-1β no líquido sinovial após exposição à HQ em relação aos animais expostos à salina.

Os resultados apresentados na Figura 16C mostram que tanto em animais sem AIC, bem como em animais com AIC, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no líquido sinovial dos animais.

A produção de NO foi quantificada pelo ensaio de Griess e os resultados mostraram que a exposição à HQ não alterou a concentração do ânion na ausência de artrite. Já na vigência da doença, houve um aumento na concentração de NO, porém não estatisticamente diferente em relação ao observado nos animais expostos à salina e ao veículo da HQ (Figura 16D).

Ainda, não foram detectados níveis da citocina TNF-α no líquido sinovial dos animais de nenhum grupo de exposição inalatória, tanto na ausência como na vigência da AIC.

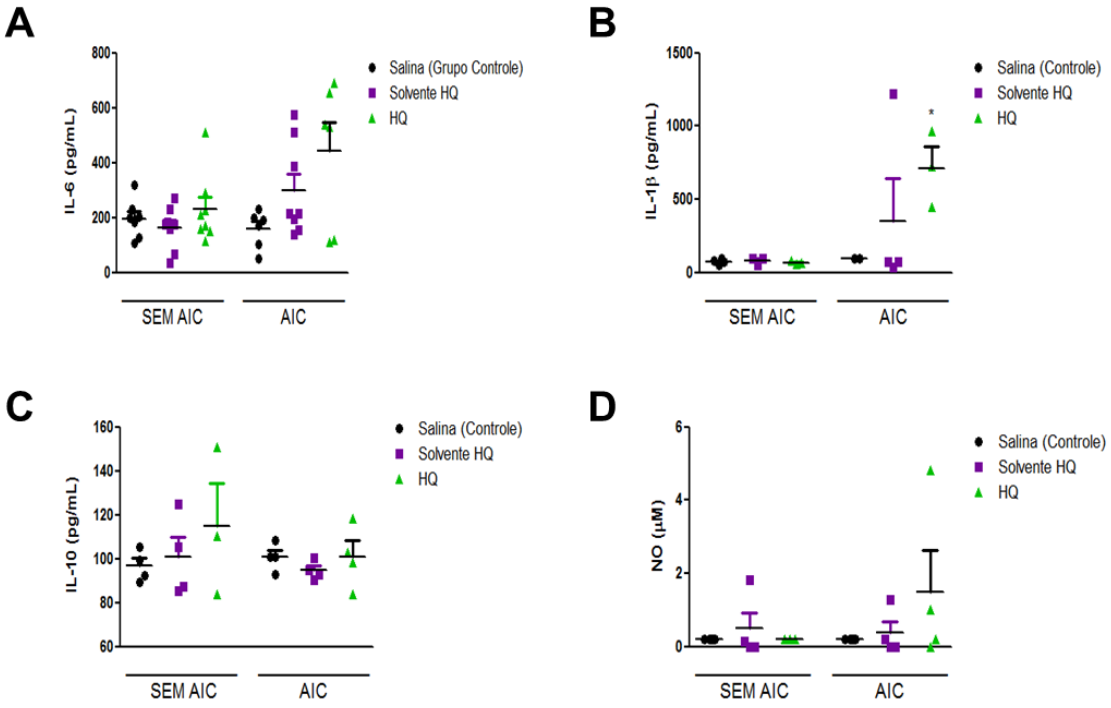

Figura 16: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B) e IL-10 (C) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o NO foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no líquido sinovial obtido de 4-7 animais em cada grupo *P<0,05 vs. grupo salina com AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição das membranas sinoviais

Para comprovar se a indução da AIC foi efetiva e também para avaliar se a HQ estava contribuindo para indução e agravamento da AIC, no 35º dia os animais foram eutanasiados e as

membranas sinoviais das articulações dos joelhos foram coletadas e processadas para análise histológica.

Nos animais SEM AIC, e que foram submetidos à exposição contínua por 35 dias à salina, solvente HQ ou HQ, as membranas sinoviais apresentaram-se íntegras, observando-se finas camadas íntima e sub-íntima e logo após, uma extensa camada de tecido adiposo. Ainda, não foram observadas alterações morfológicas, nem alterações nas membranas sinoviais como migração de células do sistema imune, hiperplasia celular e formação de edema (Figura 17A).

Dentre os animais com AIC, as diferentes exposições inalatórias causaram efeitos distintos. Não foram observadas alterações nas membranas sinoviais dos animais que foram expostos à solução salina, e as membranas sinoviais estavam semelhantes àquelas observadas nos animais sem artrite (Figura 17A,B). Já nos animais com AIC e que foram expostos à solução solvente HQ, pudemos notar influxo de células do sistema imune, hiperplasia celular e formação de pequenos edemas (Figura 17B). Nos animais com AIC que foram expostos à HQ, observou-se um efeito mais exarcebado do processo inflamatório em relação às demais exposições. Nesses animais expostos à HQ, o processo de inflamação estava bem estabelecido, e além do influxo de células do sistema imune para a região avaliada, como neutrófilos, houve formação de *pannus*, além de presença de grandes edemas na região, mostrando, desta forma, que estes animais desenvolveram artrite e que a exposição inalatória à HQ por 35 dias consecutivos aumenta os efeitos decorrentes das injeções de colágeno (Figura 17B).

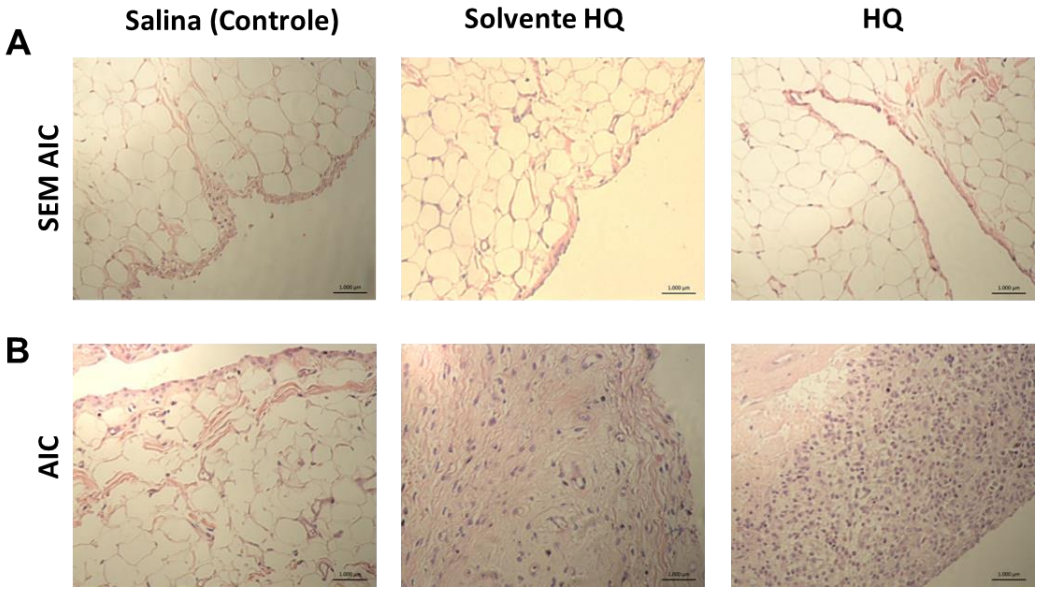

Figura 17: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC. B: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ COM AIC. Imagens obtidas em objetiva de 20X. N= 4 em cada grupo experimental. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, pela análise de Microscopia por Geração de Segundo Harmônico, observamos que a morfologia e o arranjo das fibras de colágeno estavam alteradas nas sinóvias coletadas dos animais com artrite em comparação com as sinóvias coletadas dos animais sem artrite (Figura 18A,B). Além disso, nos animais com AIC, a exposição à HQ levou a uma maior deposição de colágeno nas membranas sinoviais do que as exposições à salina e ao veículo da HQ, o que foi evidenciado por uma maior área ocupada pelo colágeno, maior densidade das fibras de colágeno, representada pela maior área coberta pelo objeto e por um maior perímetro (Figura 18C-E).

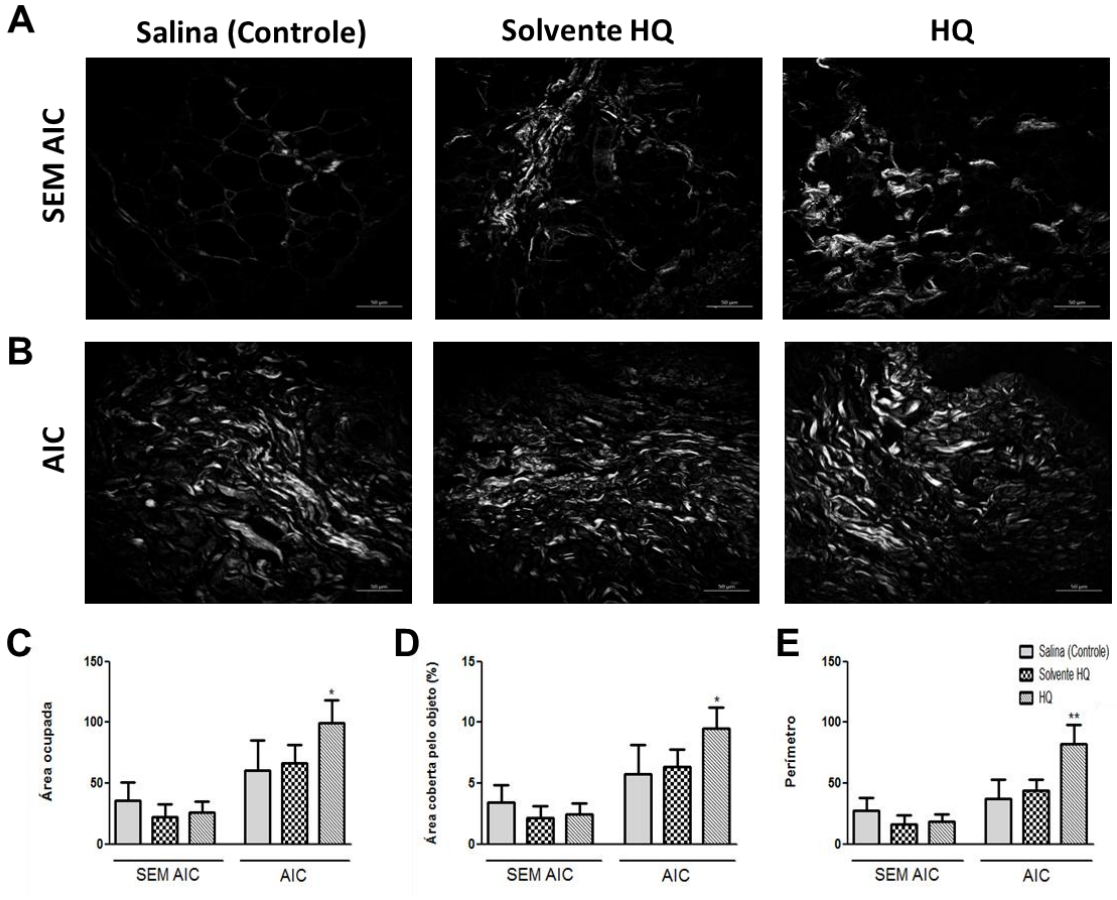

Figura 18: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais. Análise por Geração de Segundo Harmônico sobre a deposição de colágeno nas membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC (A) e COM AIC (B). Imagens obtidas em objetiva de 20X. Área ocupada pelo colágeno (C). Área coberta pelo objeto (D). Perímetro (E). N= 4 em cada grupo experimental. *P<0.05 vs. grupo salina, **P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência

Uma vez que observamos pela análise histológica que a exposição à HQ estava contribuindo para desencadear o processo de inflamação da artrite nas membranas sinoviais, resolvemos confirmar esta hipótese através de análises pela técnica de imunofluorescência, utilizando alguns marcadores específicos. De acordo com os resultados obtidos, observamos que a análise da imunofluorescência confirmou uma maior proliferação de sinoviócitos nas membranas dos animais expostos à HQ e com AIC, o que foi detectado pelo aumento da intensidade da marcação de células positivas para CD90 (Figura 19A,B). A proliferação de

sinoviócitos nos animais expostos à salina ou ao veículo da HQ foram equivalentes e menores do que à observada em animais expostos à HQ (Figura 19A,B). Não foram detectadas diferenças significativas nas imagens obtidas por imunofluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem AIC e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

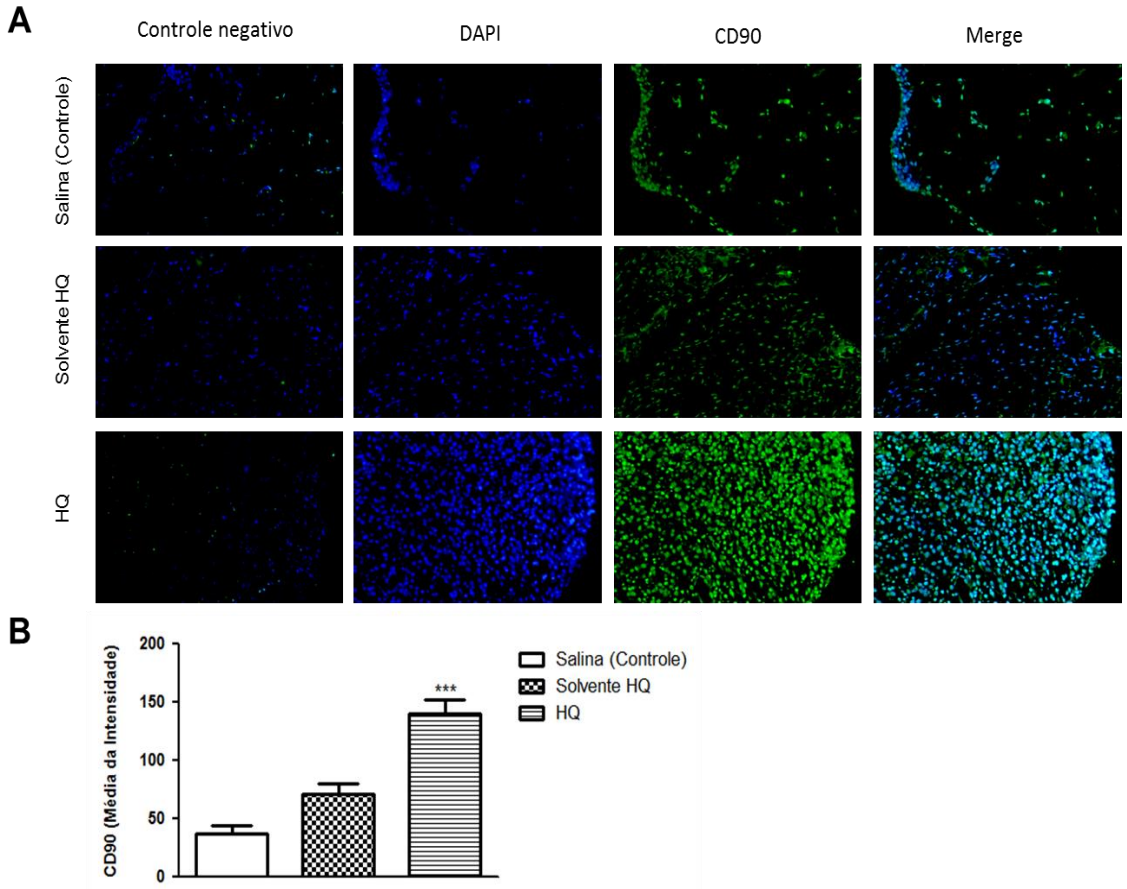

Figura 19: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e composição das membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para CD90. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para CD90. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, a análise por Imunofluorescência confirmou um maior influxo de neutrófilos nas membranas sinoviais de ratos com AIC expostos à HQ, em comparação com as membranas sinoviais coletadas de animais expostos à salina e ao veículo da HQ, uma vez que houve uma maior quantidade de células positivas para Ly6G nas membranas sinoviais após

exposição à HQ (Figura 20A,B). Não foram detectadas diferenças significativas nas imagens obtidas por imunofluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem artrite e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

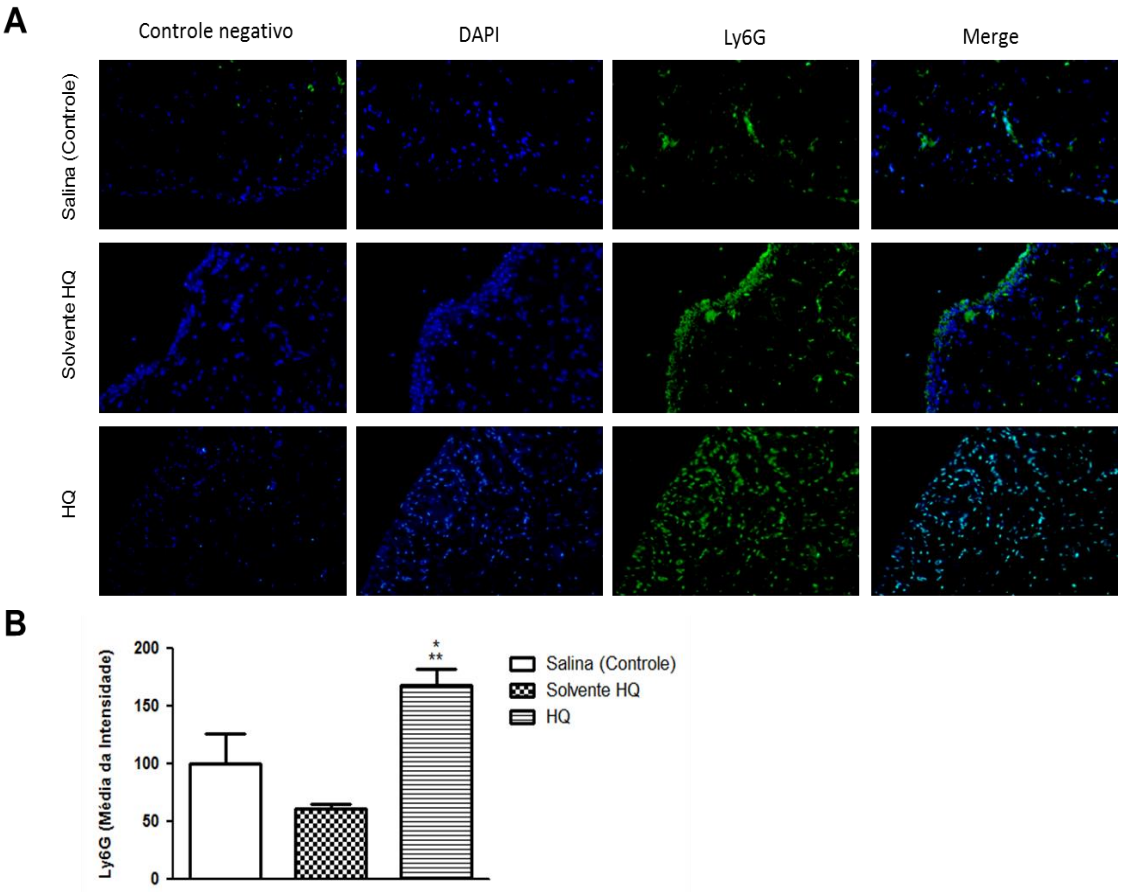

Figura 20: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para Ly6G. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para Ly6G. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. *P<0.05 vs. grupo controle; **P<0.01 vs. grupo solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

A análise da Imunofluorescência também mostrou uma intensa expressão do receptor AhR nas membranas sinoviais dos animais com AIC expostos à HQ, e essa expressão foi muito mais intensa do que foi observado nas amostras provenientes dos animais expostos à salina e ao veículo da HQ com AIC (Figura 21A,B). Ainda, a expressão deste receptor nas membranas

sinoviais de animais expostos à salina ou ao veículo da HQ foram equivalentes e menores do que à observada nos animais expostos à HQ (Figura 21A,B).

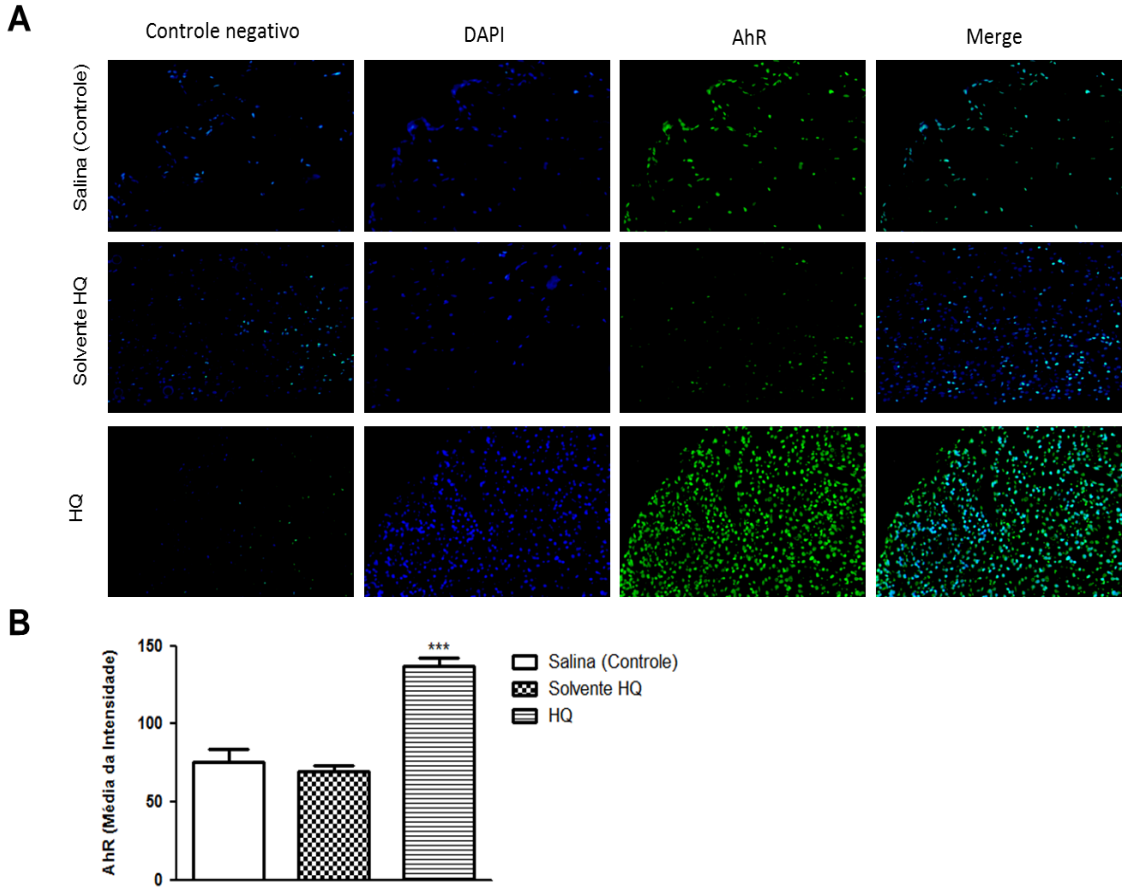

Figura 21: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para AhR. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para AhR. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Além disso, a análise por Imunofluorescência confirmou uma maior expressão do fator de transcrição ROR nas membranas sinoviais dos animais com artrite e expostos à HQ, em comparação com as membranas sinoviais coletadas de animais expostos à salina ou ao veículo da HQ, uma vez que houve uma maior quantidade de células positivas para este marcador nas

membranas sinoviais após exposição à HQ (Figura 22A,B). Este perfil de ação da HQ foi similar ao que foi observado anteriormente para a expressão de AhR.

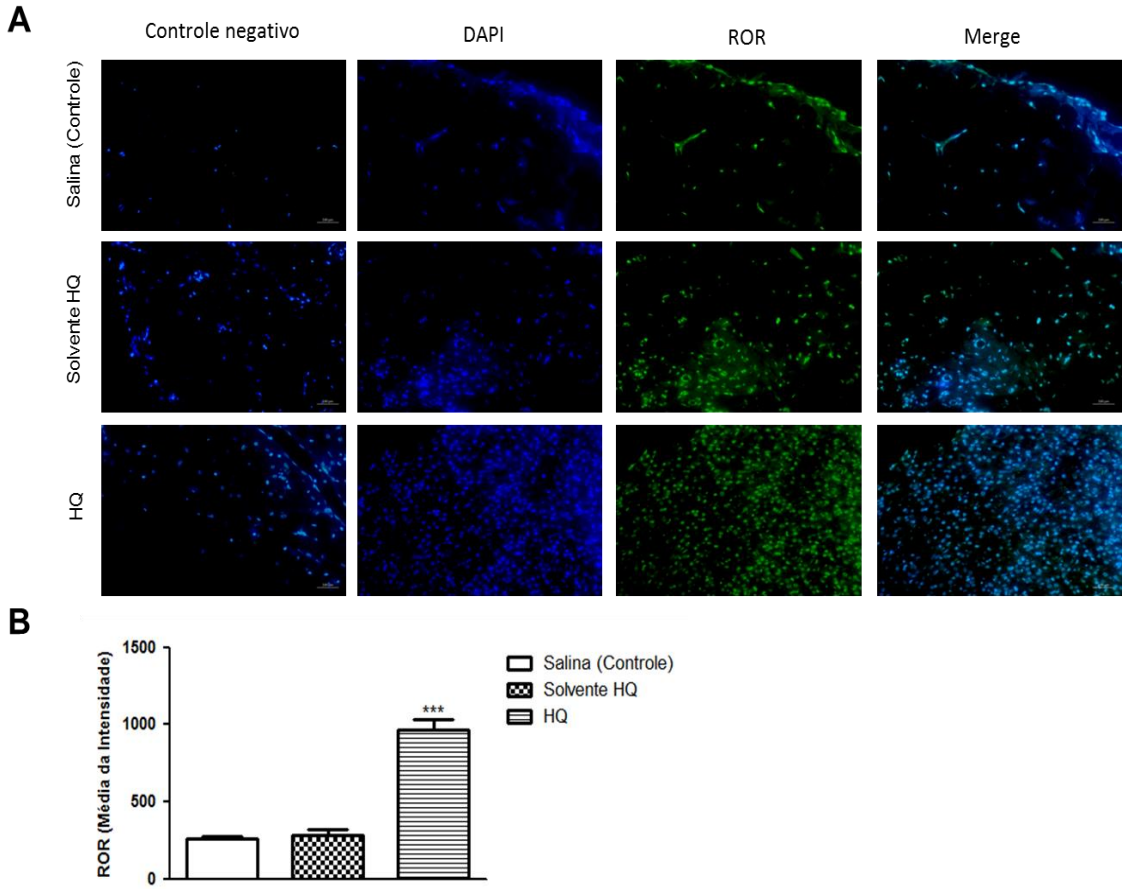

Figura 22: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de ROR nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para ROR. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para ROR. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

E consequentemente às expressões aumentadas de AhR e ROR nas membranas sinoviais, os níveis da citocina IL-17 também estavam elevados na sinóvia dos animais expostos à HQ, quando comparado com os grupos expostos à salina e ao veículo da HQ (Figura 23A,B). A exposição à HQ, salina ou solvente HQ não causou nenhuma alteração na expressão de AhR e ROR e na secreção de IL-17 nas membranas sinoviais de animais sem artrite (dados não mostrados).

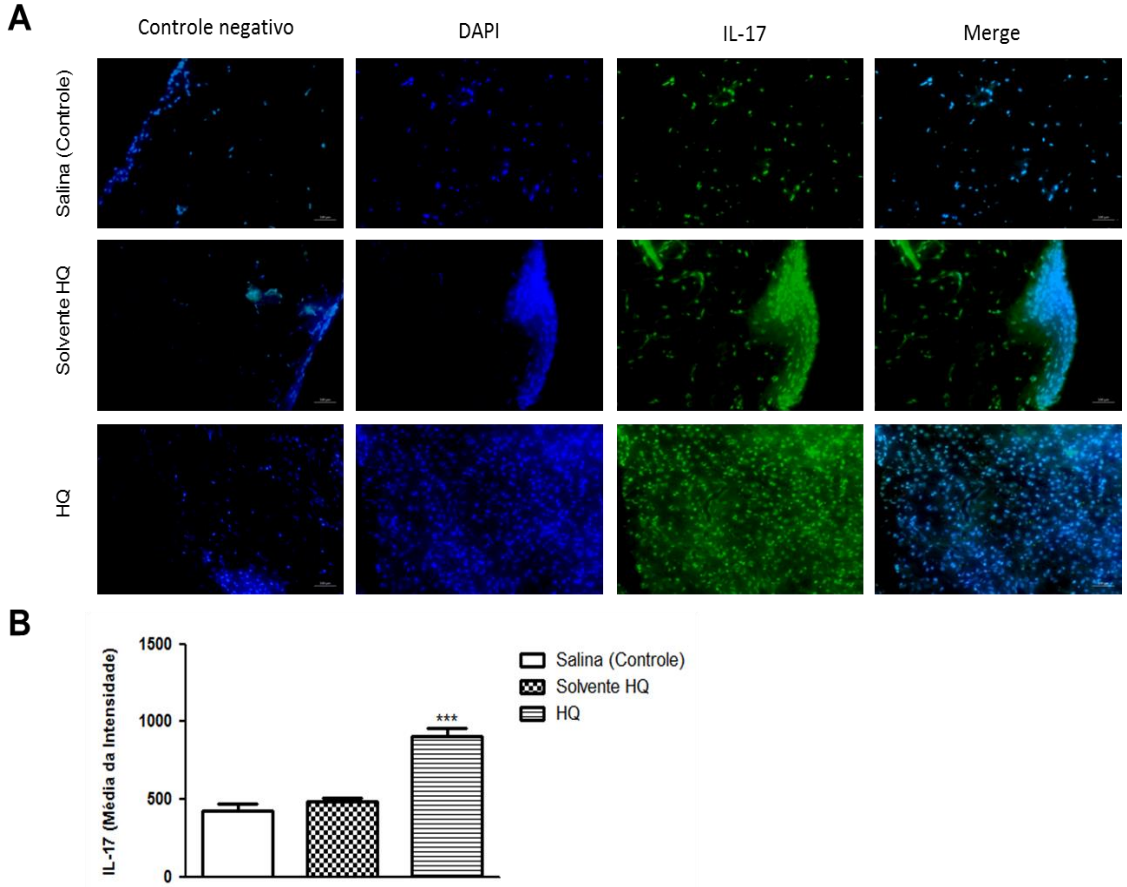

Figura 23: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre os níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para IL-17. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para IL-17. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, tornou-se interessante confirmar se as maiores expressões de AhR e ROR nas sinóvias, decorrentes da exposição à HQ, estavam ocorrendo concomitantemente com os maiores níveis de IL-17. Desta forma, pela análise da co-localização entre ROR e IL-17, notamos maior marcação de células positivas tanto para ROR, bem como para IL-17 nas sinóvias dos ratos expostos à HQ em comparação com as membranas sinoviais dos animais expostos à salina e ao veículo HQ (Figura 24A).

Ainda, uma análise posterior da co-localização para a expressão de AhR e posterior secreção de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC mostrou que esse receptor teve sua expressão aumentada nas células secretoras de IL-17 nas membranas sinoviais dos ratos

expostos à HQ (Figura 24B). Não pudemos fazer uma análise de co-localização entre AhR e ROR, pois ambos anticorpos monoclonais eram isotipos do tipo IgG1, o que impossibilitou a análise simultânea do AhR com o fator de transcrição ROR.

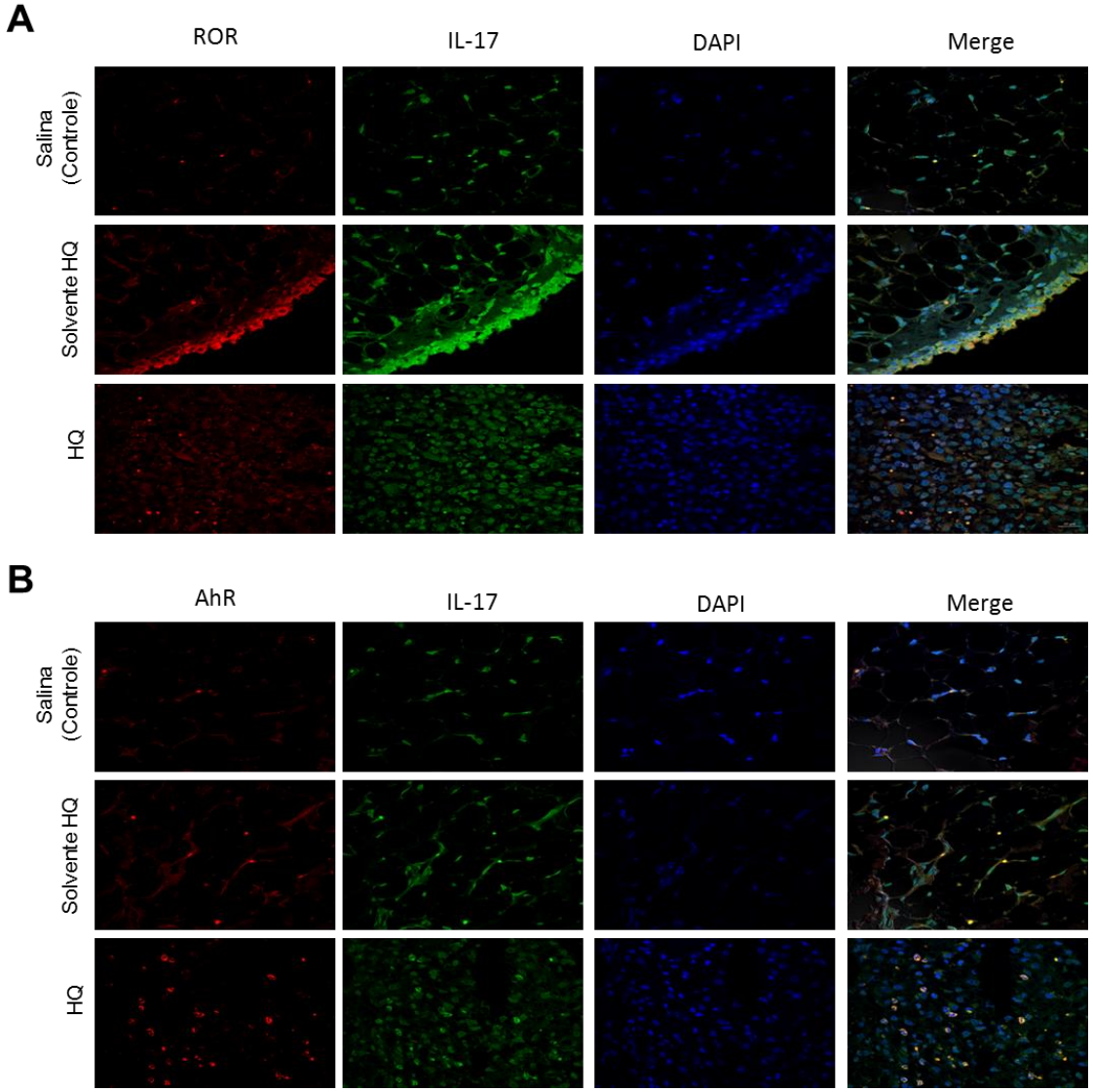

Figura 24: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ na co-localização de ROR/IL-17 e AhR/IL-17 nas células das membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para ROR e IL-17. B: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para AhR e IL-17. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.1.9 Efeitos da exposição *in vitro* à HQ em esplenócitos

Com o objetivo de investigar se a maior co-expressão entre AhR e IL-17 nas células das membranas sinoviais dos animais expostos à HQ poderia refletir uma ação direta da HQ na expressão de AhR e em uma subsequente secreção de IL-17, esplenócitos de ratos *naive* foram isolados e incubados *in vitro* com HQ (10 μM), veículo (5% de etanol) ou meio de cultura (controle). Os dados obtidos mostram que a expressão de AhR foi aumentada quando os esplenócitos foram incubados por 30 minutos com HQ na concentração de 10 μM (Figura 25A,B). O tratamento dos esplenócitos com PCB126, que é uma dioxina co-planar conhecida e ligante de AhR, elevou significativamente a expressão de AhR na concentração de 100 nM (Figura 25A,B). Paralelamente, quando os esplenócitos foram incubados por 30 minutos com um antagonista de AhR (alfa-naftoflavona, concentrações de 10-1000 μM), os efeitos desencadeados pela ação da HQ foram restaurados (Figura A,B). Além disso, a incubação *in vitro* com HQ na concentração de 10 μM por 24 horas induziu diretamente a secreção de IL-17 pelos esplenócitos, em comparação com os esplenócitos incubados somente com meio de cultura ou com veículo da HQ (Figura 25C,D).

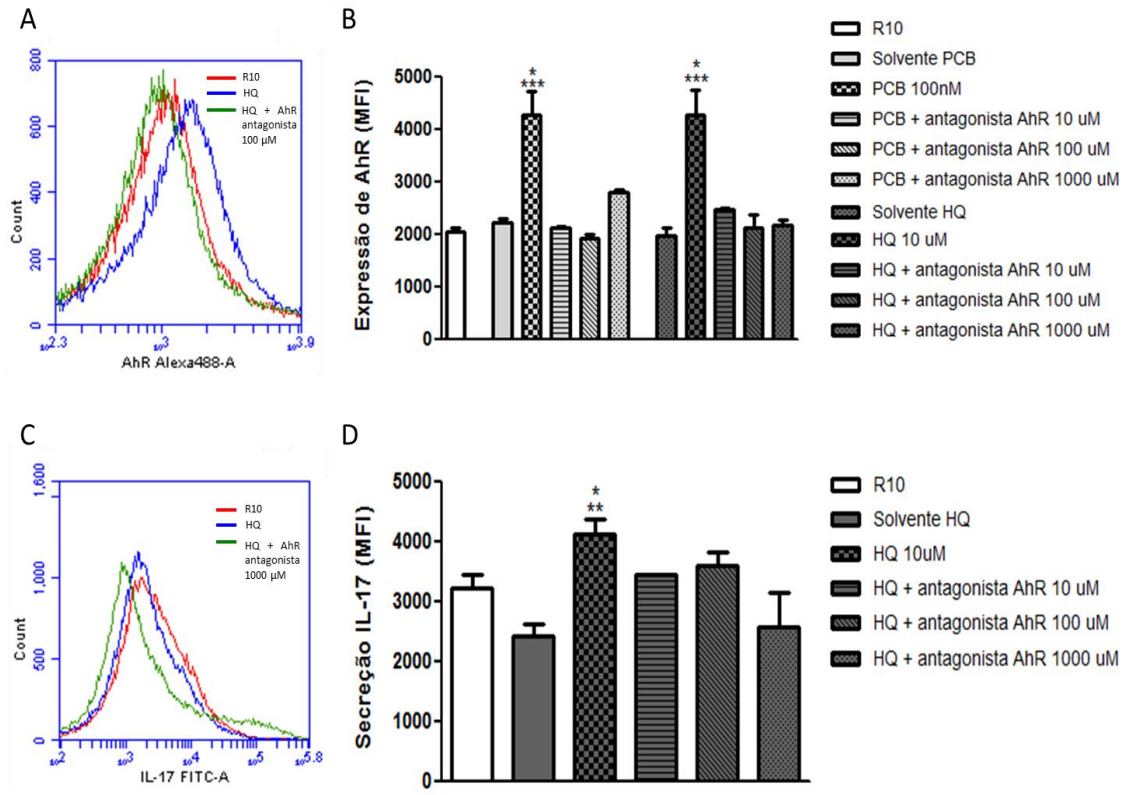

Figura 25: Efeitos da exposição *in vitro* à HQ na expressão de AhR e na secreção de IL-17 em esplenócitos. Esplenócitos foram coletados de animais naive e foram incubados com R10, veículo da HQ (5 % de etanol), HQ (10 µM), veículo do PCB 126 (10 % DMSO), PCB 126 (100 nM), na presença ou ausência de antagonista de AhR (alfa-naftoflavona 10-1000 µM). A expressão de AhR e a secreção de IL-17 foram quantificadas após 30 minutos (A,B) ou 24 horas (C,D) de incubação, respectivamente, por citometria de fluxo. Os resultados expressam a média ± e.p.m. dos dados obtidos de 4 amostras em cada grupo. B = *P<0.05 vs. respectivo grupo de células tratadas com antagonista de AhR; ***P<0.001 vs. respectivos R10 e veículos; D = *P<0.05 vs. Antagonista de AhR 1000 µM; **P<0.01 vs. grupo solvente HQ. HQ = Hidroquinona.

4.2 Efeitos da exposição contínua à HQ durante a fase de sensibilização e indução da AR induzida pelo colágeno.

O objetivo deste protocolo experimental (Grupo experimental **B**) foi o de mimetizarmos os efeitos decorrentes da poluição ambiental e ocupacional e dos efeitos desencadeados pelo tabagismo em um fumante ativo na fase de indução e no início do desenvolvimento do processo inflamatório da AR. Para tanto, neste protocolo experimental, os animais foram submetidos às exposições inalatórias, diariamente, por nebulização, às soluções salina, veículo da HQ ou HQ, durante 1 hora por dia, pelo período de 14 dias consecutivos, até o dia da segunda injeção de colágeno, conforme o esquema de exposição mostrado previamente (Figura 9).

4.2.1 Evolução ponderal

Analisando a variação de massa corpórea no primeiro dia de exposição e no dia da eutanásia dos animais (35º dia), verificamos que nos animais que não receberam imunizações de colágeno (animais sem AIC), a exposição à HQ não causou alteração no ganho de peso corporal nos animais, uma vez que a evolução ponderal foi semelhante à observada nos animais expostos à solução salina e ao veículo HQ (Figura 26A).

Nos animais com AIC, as diferentes exposições também não causaram alterações no ganho de peso corporal dos animais, uma vez que a evolução ponderal foi similar nos animais expostos à HQ em relação aos animais expostos à salina ou ao solvente da HQ (Figura 26B). Houve ganho de peso de 6,23 % no grupo de animais expostos à solução salina, de 16,07 % nos animais expostos à solução solvente HQ e de 33,03 % nos animais expostos à HQ (Figura 26B). Porém, quando comparamos o ganho de peso entre os animais expostos à HQ com ou sem AIC, observamos que houve um ganho de peso menor nos animais expostos à HQ e com AIC (Figura 26A,B).

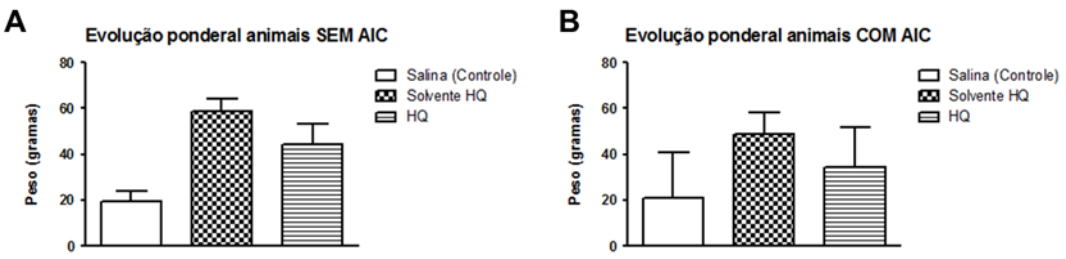

Figura 26: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea. Evolução ponderal foi realizada no 1º e no 35º dia, durante as diferentes exposições inalatórias, , em animais sem AIC (A) ou com AIC (B). Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite

A incidência e a gravidade da artrite foram avaliadas a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (21º dia) até o dia da eutanásia dos animais (35º dia), e a pontuação foi feita de acordo com uma escala de 0 a 4, conforme apresentado previamente na tabela 1.

Assim como já observado no protocolo experimental A, todos os animais que não receberam as imunizações com colágeno (animais sem AIC) tiveram pontuação igual a 0,

indicando que as diferentes exposições não causaram nenhuma alteração clínica e que estes animais não desenvolveram artrite (Figura 27A).

Emtodos os animais que receberam as injeções de colágeno (animais com AIC), observou-se desenvolvimento de artrite,, porém a incidência e gravidade foram diferentes após os 3 tipos de exposição inalatória. Os animais que foram expostos à solução salina obtiveram pontuação entre 1 a 2 (Figura 27B,C), os animais expostos ao veículo da HQ receberam pontuação entre 1 e 2 (Figura 27B,C) e os animais expostos à HQ receberam pontuação entre 2 a 3 (Figura 27B,C).

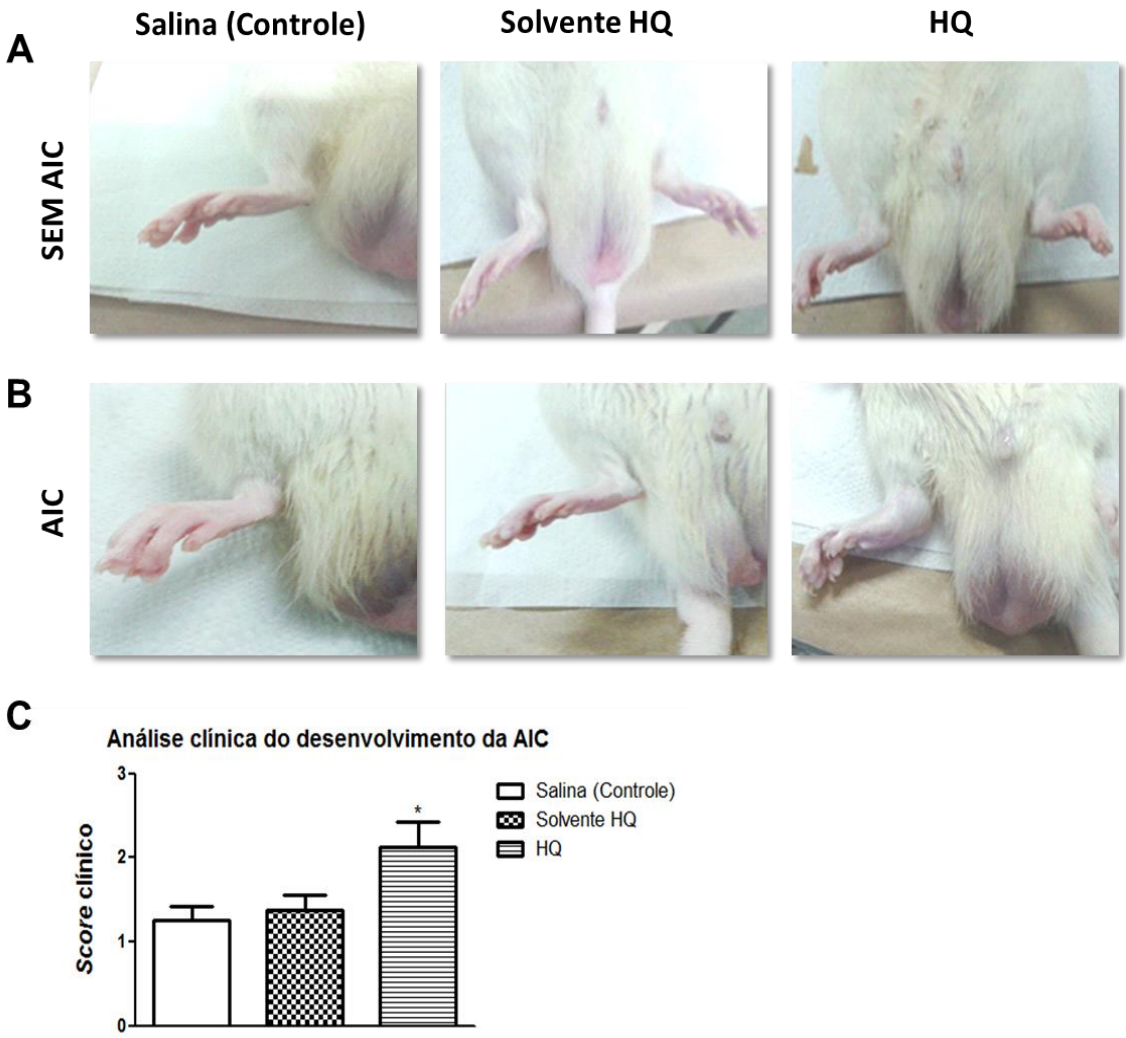

Figura 27: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite. A avaliação clínica foi feita a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (21º dia) até o 35º dia. A: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, SEM AIC. B: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, COM AIC. C: Pontuação clínica do desenvolvimento de artrite após as diferentes exposições inalatórias. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. Grupo Controle. HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.3 Análise do leucograma total e diferencial

A contagem de leucócitos totais do sangue de todos os animais mostrou que não houve diferença estatística significante após as diferentes exposições inalatórias dentre os animais sem AIC (Figura 28A). Porém, houve aumento no número de leucócitos totais após a exposição à

solução salina e pela condição decorrente da inflamação gerada pela indução da artrite pela colágeno (Figura 28A). A exposição à HQ nos animais com AIC não alterou o número de leucócitos totais em comparação com as demais exposições inalatórias (Figura 28A).

A contagem diferencial nos animais expostos à solução salina , solvente HQ e HQ e com AIC, mostrou aumento na porcentagem de neutrófilos circulantes em relação às respectivas exposições nos animais sem AIC (Figura 28B). Porém, nos animais expostos à HQ com AIC, houve redução no número de linfócitos, quando comparado com os animais expostos à solução salina e ao solvente HQ com AIC e em comparação com a respectiva exposição à HQ nos animais sem AIC (Figura 28B).

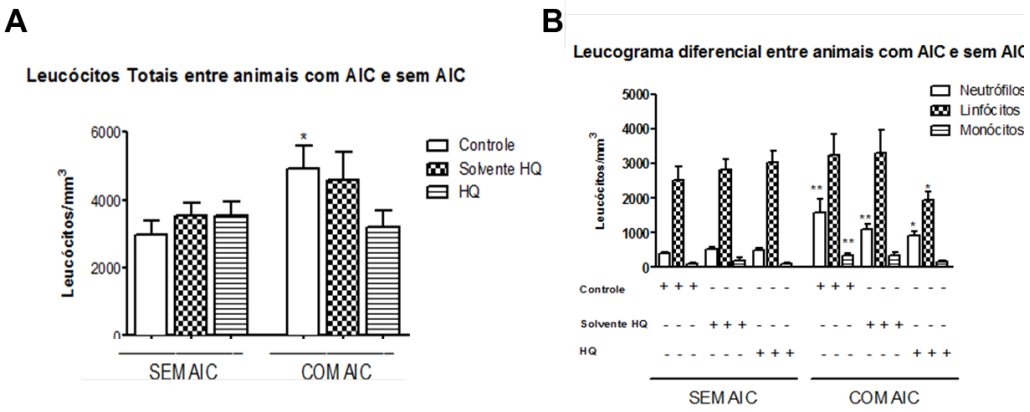

Figura 28: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue. A: Contagem de leucócitos totais do sangue de grupos de animais com ou sem AIC, expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. B: Contagem de leucócitos diferenciais (neutrófilos, linfócitos e monócitos) no sangue de animais com e sem AIC expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células brancas diferenciais presentes no sangue, obtidos de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. respectivos grupos sem AIC; *P<0,01 vs. respectivos grupos sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro.

A concentração de IL-6 no soro dos animais não foi alterada nos animais sem AIC e expostos à salina, ao veículo HQ e à HQ (Figura 29A). Nos animais com artrite não houve aumento da concentração desta citocina no soro dos animais expostos à salina, ao solvente HQ ou à HQ, em relação aos respectivos animais sem AIC, e a exposição à HQ não elevou a

concentração de IL-6 nos animais com AIC em comparação com os animais expostos à salina e ao solvente HQ (Figura 29A).

A concentração de IL-1β no soro, na ausência de AIC, não foi alterada pela exposição à HQ em nenhum dos animais expostos (Figura 29B). Já nos animais com AIC, a exposição à HQ levou a uma tendência de redução desta citocina no soro frente à respectiva exposição inalatória nos animais sem AIC (Figura 29B). Ainda, nos animais com AIC e expostos à solução salina houve uma tendência de aumento na concentração de IL-1β no soro, em comparação com o respectivo grupo de exposição em animais sem AIC (Figura 29B).

Os níveis de TNF-α tiveram alteração após exposição à HQ nos animais sem AIC, quando comparado com os animais expostos às demais soluções, nestas mesmas condições de ausência de artrite (Figura 29C). Nos animais com AIC, a exposição à HQ reduziu a concentração de TNF-α quando comparada com a respectiva exposição inalatória nos animais sem AIC (Figura 29C).

Os resultados apresentados na Figura 29D mostram que em animais sem AIC a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no soro desses animais. Já na vigência da artrite, a exposição à HQ aumentou significativamente a concentração desta citocina, quando comparado com a respectiva exposição em animais sem AIC e em comparação com os animais expostos ao solvente HQ e com AIC (Figura 29D).

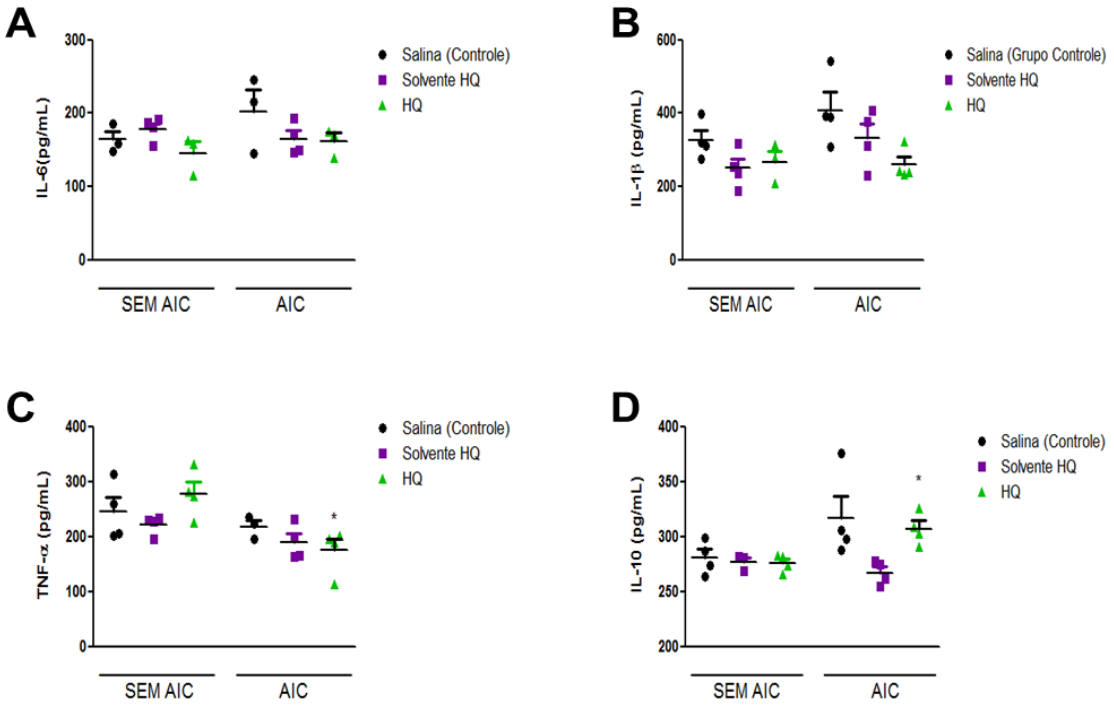

Figura 29: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no soro obtido de 4 animais em cada grupo *P<0,05 vs. respectivo grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro.

Após quantificação do anticorpo anti-peptídeos citrulinados (anti-CCP) no soro, por ELISA, observamos que, nos animais sem AIC a concentração média de anti-CCP nos grupos de animais expostos à solução salina, ou solvente HQ ou HQ foi em torno de 10 IU/mL. Além disso, nos animais sem AIC, a exposição inalatória de HQ não alterou a concentração do anticorpo anti-CCP no soro em comparação com o soro obtido dos animais expostos à salina e ao solvente HQ (Figura 30).

Na presença de AIC, houve um aumento na concentração médida de anti-CCP após as exposições à solução salina e à HQ, e a concentração média de anti-CCP subiu para 20 IU/mL (Figura 30), porém nos animais com AIC, a exposição à HQ não foi capaz de aumentar os níveis das proteínas citrulinadas quando comparado com as exposições à soluna salina e ao solvente HQ na vigência da AIC (Figura 30).

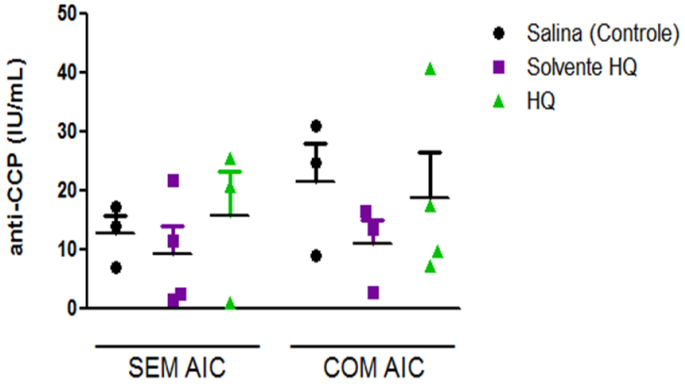

Figura 30: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC. O anticorpo anti-CCP foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração deste anticorpo no soro obtido de 4 animais em cada grupo.HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial

Assim como no protocolo experimental A, no 35º dia os animais foram eutanasiados e foram coletados os líquidos sinoviais de todos os animais para contagem do número total de células e para quantificação de mediadores inflamatórios.

A contagem do número de células presentes no líquido sinovial mostrou que não houve diferença no número de células após a exposição à HQ em comparação com as demais exposições nos animais sem AIC (Figura 31). Entretanto, houve aumento no número de células nos animais com AIC e que foram expostos à solução salina e à HQ, em comparação às respectivas exposições em animais sem AIC (Figura 31).

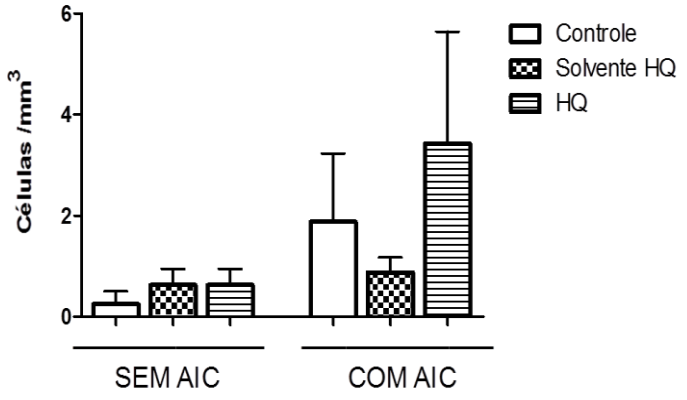

Figura 31: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no exudato (líquido sinovial) de animais com ou sem AIC. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células totais presentes no líquido sinovial, obtidos de 8 animais em cada grupo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Além disso, após a quantificação das citocinas pró-inflamatórias por ELISA, observamos que a exposição à HQ elevou os níveis de algumas dessas citocinas nos exudatos coletados dos animais com AIC em relação aos exudatos coletados dos animais expostos à solução salina ou ao solvente HQ.

A concentração de IL-6 no líquido sinovial dos animais não foi alterada nosanimais sem AIC. Já na vigência da AIC houve um aumento significativo na concentração desta citocina nos animais expostos à HQ, em relação aos respectivos animais com AIC e expostos à solução salina e ao solvente HQ, e em relação aos animais sem AIC e expostos à HQ (Figura 32A).

Os resultados apresentados na Figura 32B mostram que a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-1β no líquido sinovial na ausência de AIC, em comparação aos animais que foram expostos à solução salina e ao solvente HQ, nestas mesmas condições. Por outro lado, na vigência da AIC, houve uma tendência de aumento na concentração deesta citocina no líquido sinovial após exposição à HQ em relação aos animais com AIC e expostos à solução salina e solvente HQ, e em relação aos animais sem AIC e expostos à HQ (Figura 32B).

Os resultados apresentados na Figura 32C mostram que tanto em animais sem AIC, bem como em animais com AIC, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no líquido sinovial dos animais.

Aprodução de NO foi quantificada pelo ensaio de Griess e os resultados mostraram que a exposição à HQ não alterou a concentração desse ânion tanto na ausência, bem como na vigência de artrite (Figura 32D).

Ainda, não foram detectados níveis da citocina TNF-α no líquido sinovial dos animais de nenhum grupo de exposição inalatória, tanto na ausência, bem como na vigência da AIC.

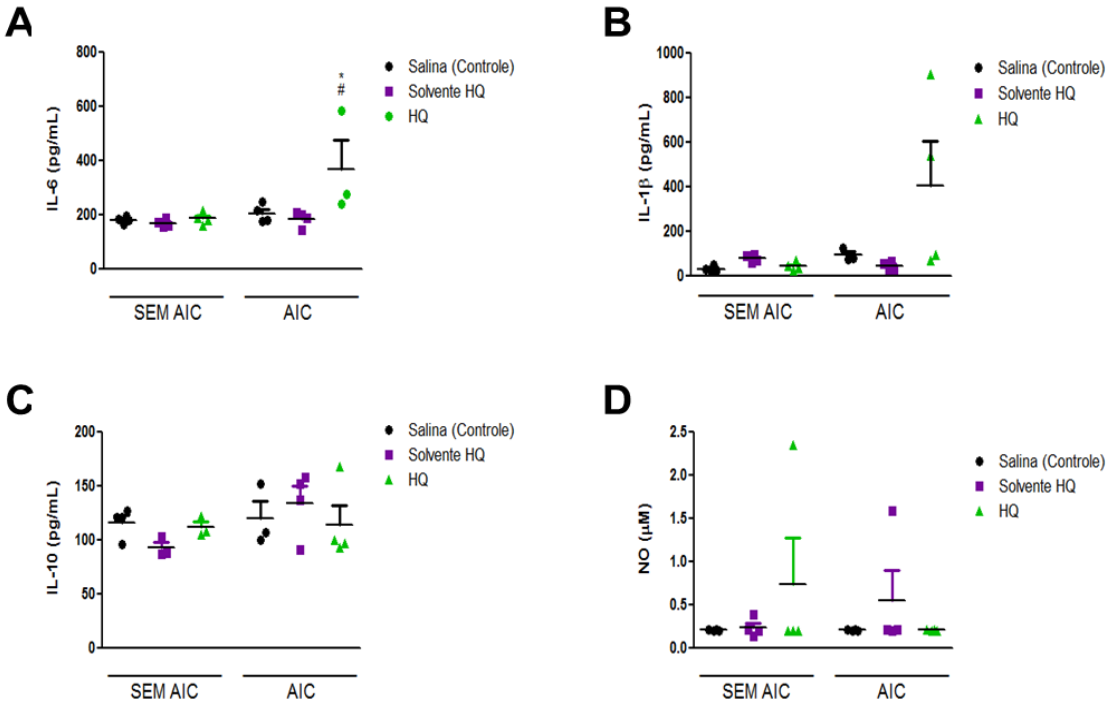

Figura 32: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC. .As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B) e IL-10 (C) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o NO (D) foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no líquido sinovial obtido de 4-7 animais em cada grupo *P<0,05 vs. grupo salina com AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais

Para comprovar se a indução da AIC foi efetiva e também para avaliar se a HQ estava contribuindo para a indução e o desenvolvimento da AIC, no 35º dia os animais foram eutanasiados e as membranas sinoviais das articulações dos joelhos foram coletadas e processadas para análise histológica.

Nos animais sem AIC, e que foram submetidos à exposição contínua por 14 dias (até a 2ª injeção de colágeno) à salina, solvente HQ ou à HQ durante a fase de sensibilização, as membranas sinoviais apresentaram-se íntegras, nas quais pudemos observar camadas íntima e sub-íntima finas e logo após, uma extensa camada de tecido adiposo. Ainda, não foram observadas alterações morfológicas, nem alterações nas membranas sinoviais como migração de células do sistema imune, hiperplasia celular e formação de edema, comprovando que estes animais não desenvolveram artrite (Figura 33A).

Dentre os animais que receberam injeções de colágeno (com AIC), as diferentes exposições inalatórias causaram efeitos distintos. Nos animais expostos à solução salina e ao solvente HQ, foram observados início do processo inflamatório e formação de *pannus* nas membranas sinoviais (Figura 33B), condizente com o *score* clínico observado previamente nas patas. Já nos animais que foram expostos à HQ e com AIC, observou-se um efeito mais exarcebado do processo inflamatório em relação às demais exposições. Nos animais expostos à HQ, o processo inflamatório estava bem estabelecido, e além do influxo de células do sistema imune para a região avaliada, como neutrófilos, houve formação de *pannus*, além de presença de grandes edemas na região, mostrando assim que estes animais desenvolveram artrite e que a exposição inalatória à HQ por 14 dias consecutivos, durante a fase de sensibilização, contribui para o processo de indução e desenvolvimento da artrite, decorrente das injeções de colágeno (Figura 33B).

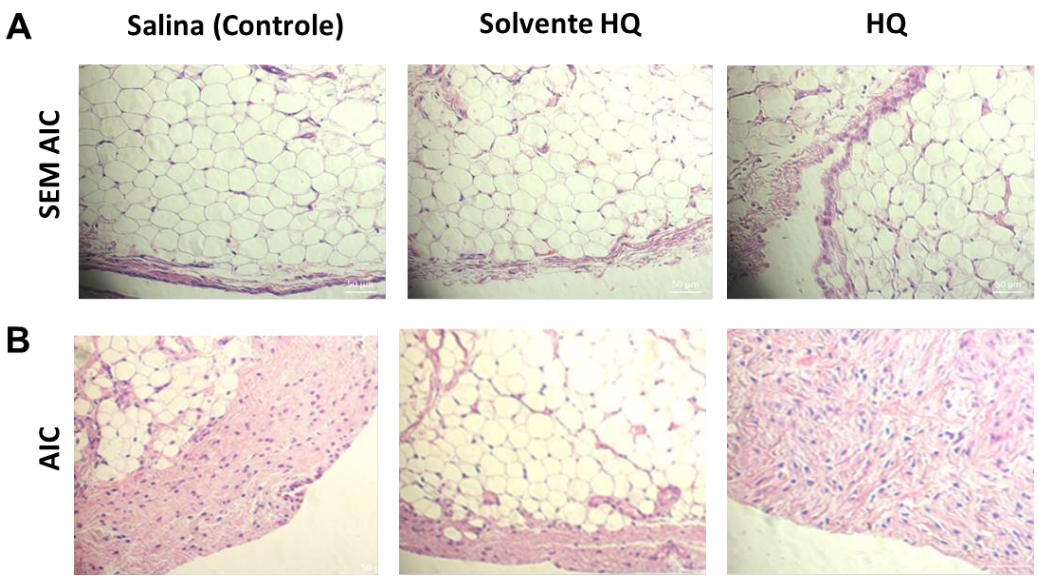

Figura 33: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC. B: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ COM AIC. Imagens obtidas em objetiva de 20X. N= 4 em cada grupo experimental. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, pela análise de Microscopia por Geração de Segundo Harmônico, observamos que a morfologia e o arranjo das fibras de colágenos estavam alteradas nas sinóvias coletadas dos animais com artrite em comparação com as sinóvias coletadas dos animais sem artrite (Figura 34A,B). Além disso, nos animais com AIC, a exposição à HQ levou a uma maior deposição de colágeno nas membranas sinoviais do que as exposições à salina e ao veículo da HQ, o que foi evidenciado por uma maior área ocupada pelo colágeno, uma maior área coberta pelo objeto e por um maior perímetro (Figura 34C-E).

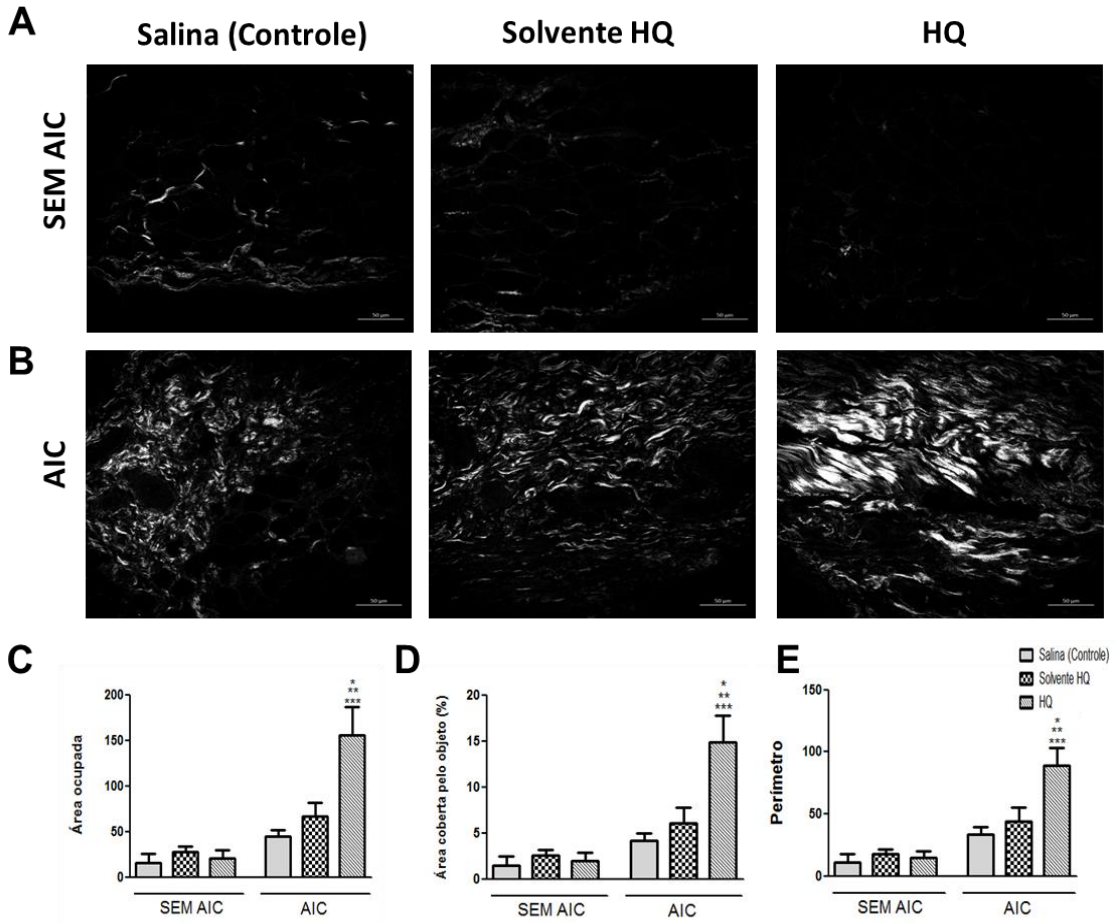

Figura 34: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais. Análise por Geração de Segundo Harmônico sobre a deposição de colágeno nas membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC (A) e COM AIC (B). Imagens obtidas em objetiva de 20X. Área ocupada pelo colágeno (C). Área coberta pelo objeto (D). Perímetro (E). N= 4 em cada grupo experimental. *P<0.05 vs. grupo solvente HQ com AIC; **P<0.01 vs. grupo salina com AIC; ***P<0.001 vs. grupos HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.2.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência

Uma vez que observamos, através da análise histológica das membranas sinoviais, que a exposição à HQ estava contribuindo para desencadear o processo inflamatório da artrite, resolvemos confirmar esta hipótese através da análise pela técnica de imunofluorescência, utilizando alguns marcadores específicos. De acordo com os resultados obtidos, observamos pela análise por imunofluorescência que a exposição à HQ levou a uma maior proliferação de sinoviócitos nas sinóvias dos animais com AIC, quando comparado com as sinóvias coletadas dos animais expostos à solução salina e ao solvente HQ, o que foi detectado pelo aumento da intensidade da marcação de células positivas para CD90 (Figura 35A,B). A proliferação de sinoviócitos nas membranas de animais expostos à salina e ao veículo HQ foi equivalente e menor do que à observada nas sinóvias dos animais expostos à HQ (Figura 35A,B). Não foram detectadas diferenças significativas na intensidade de fluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem AIC e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

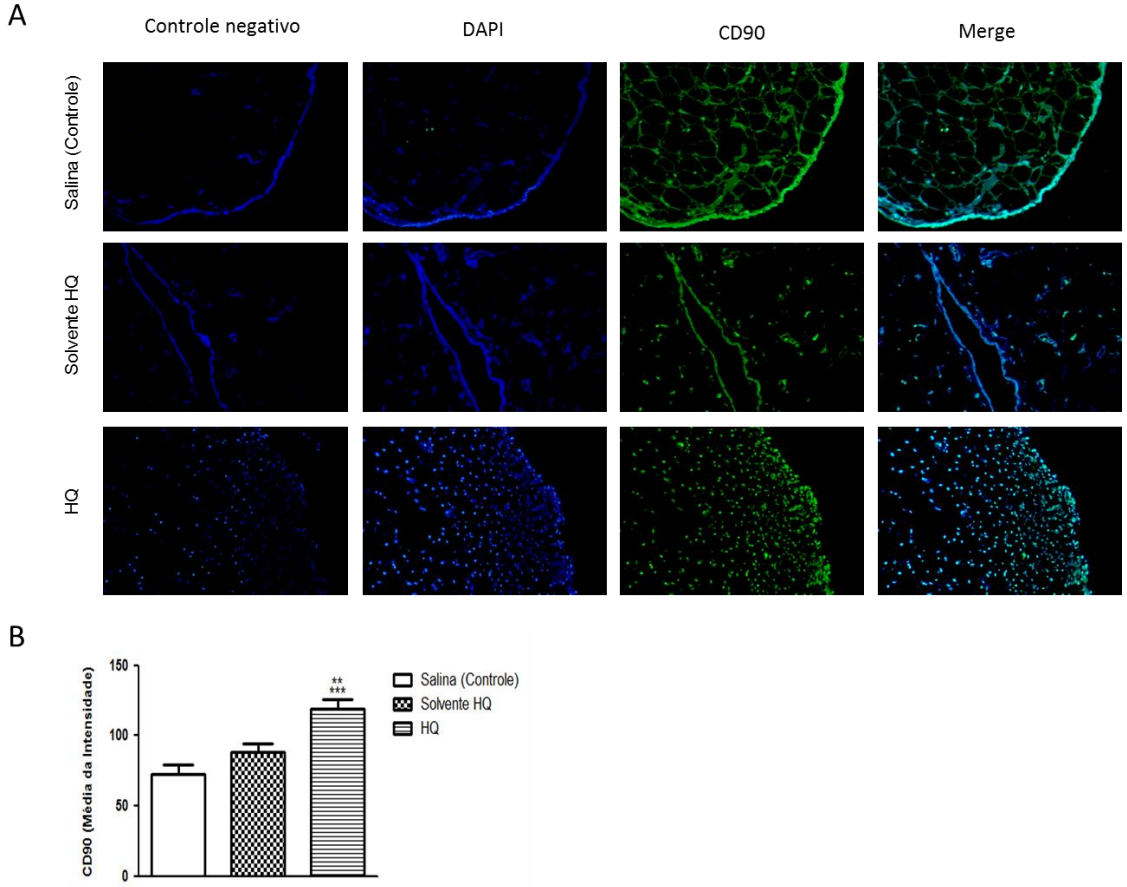

Figura 35: Exposição *in vivo* à HQ altera a morfologia e composição das membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para CD90. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para CD90. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. **P<0.01 vs. grupo Solvente HQ; ***P<0.001 vs. grupo salina. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, a análise por Imunofluorescência confirmou uma maior infiltração de neutrófilos nas membranas sinoviais dos animais com AIC expostos à HQ, em comparação com as membranas sinoviais coletadas de ratos expostos à solução salina e ao veículo HQ, uma vez que houve maior quantidade de células positivas para Ly6G nas membranas sinoviais após exposição à HQ (Figura 36A,B). Além disso, não foram detectadas diferenças significativas na intensidade de fluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem AIC e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

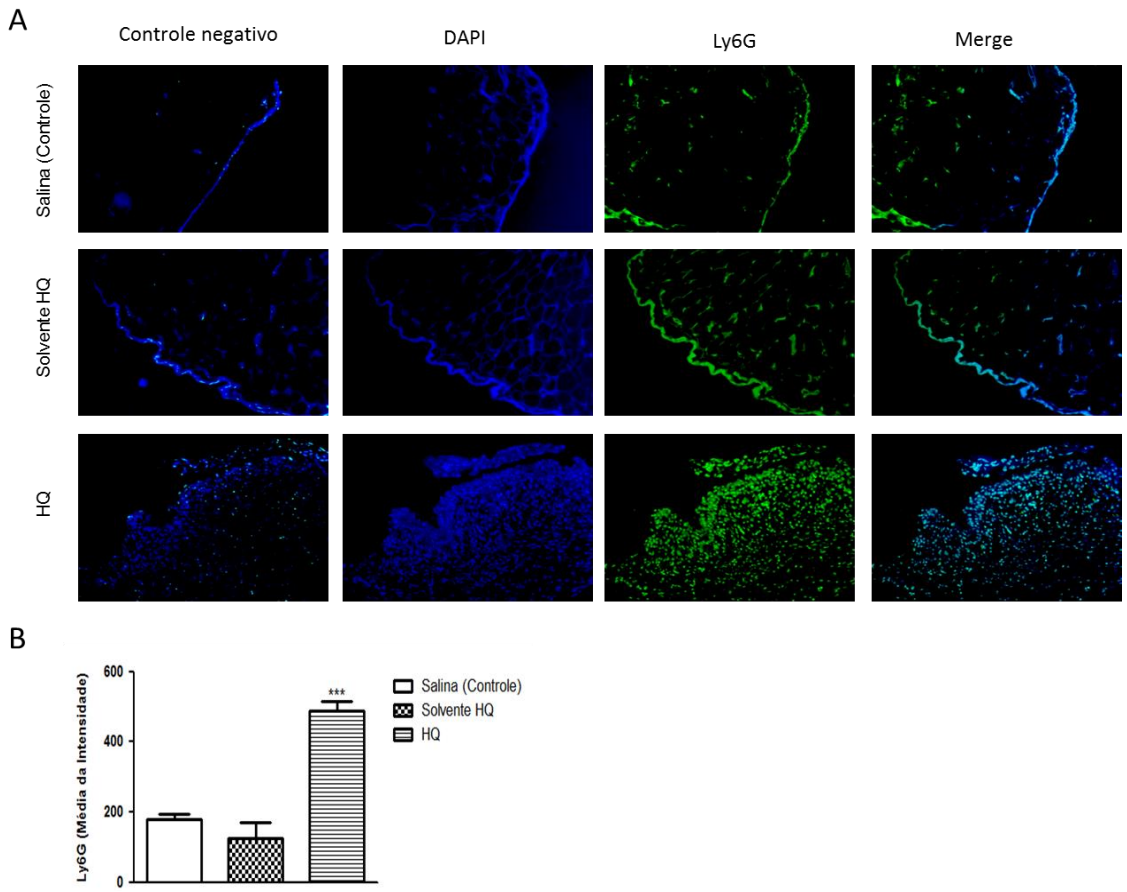

Figura 36: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para Ly6G. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para Ly6G. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.001 vs. grupo salina e grupo solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

A análise da Imunofluorescência também mostrou uma intensa expressão do receptor AhR nas membranas sinoviais dos animais com AIC expostos à HQ, e essa expressão foi muito mais intensa do que a que foi observada nas amostras provenientes dos animais expostos à salina e ao veículo da HQ com AIC (Figura 37A,B). Ainda, a expressão deste receptor nas membranas sinoviais de animais expostos à salina ou ao veículo da HQ foram equivalentes e menores do que à observada nos animais expostos à HQ (Figura 37A,B).

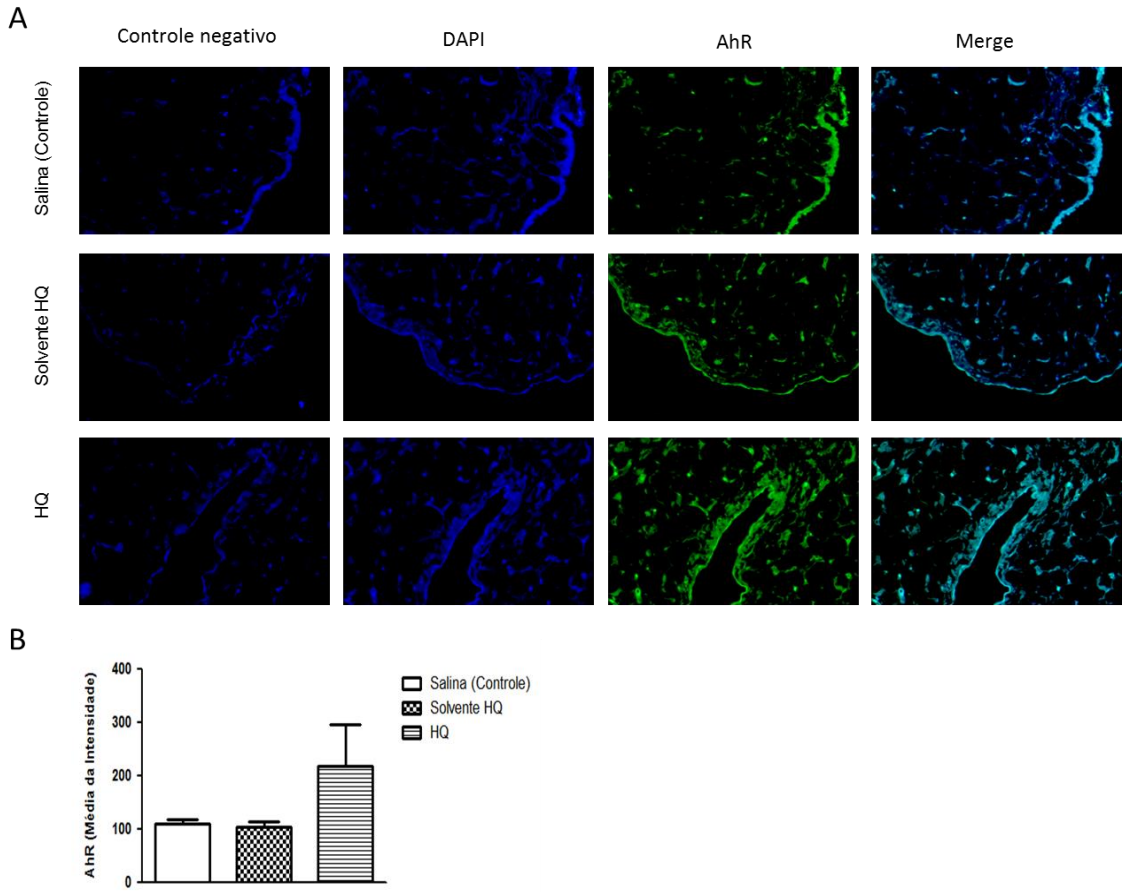

Figura 37: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para AhR. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para AhR. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Paralelamente à expressão aumentada do receptor AhR nas sinóvias dos animais com AIC e expostos à HQ, os níveis de IL-17 também foram maiores nas membranas sinoviais dos animais expostos à HQ, em comparação com o que foi observado nas sinóvias dos animais expostos à solução salina e ao solvente da HQ (Figura 38A,B). Notavelmente, a exposição à HQ, salina ou solvente HQ nos animais sem AIC não causou nenhuma alteração na expressão de AhR e na secreção de IL-17 (dados não mostrados).

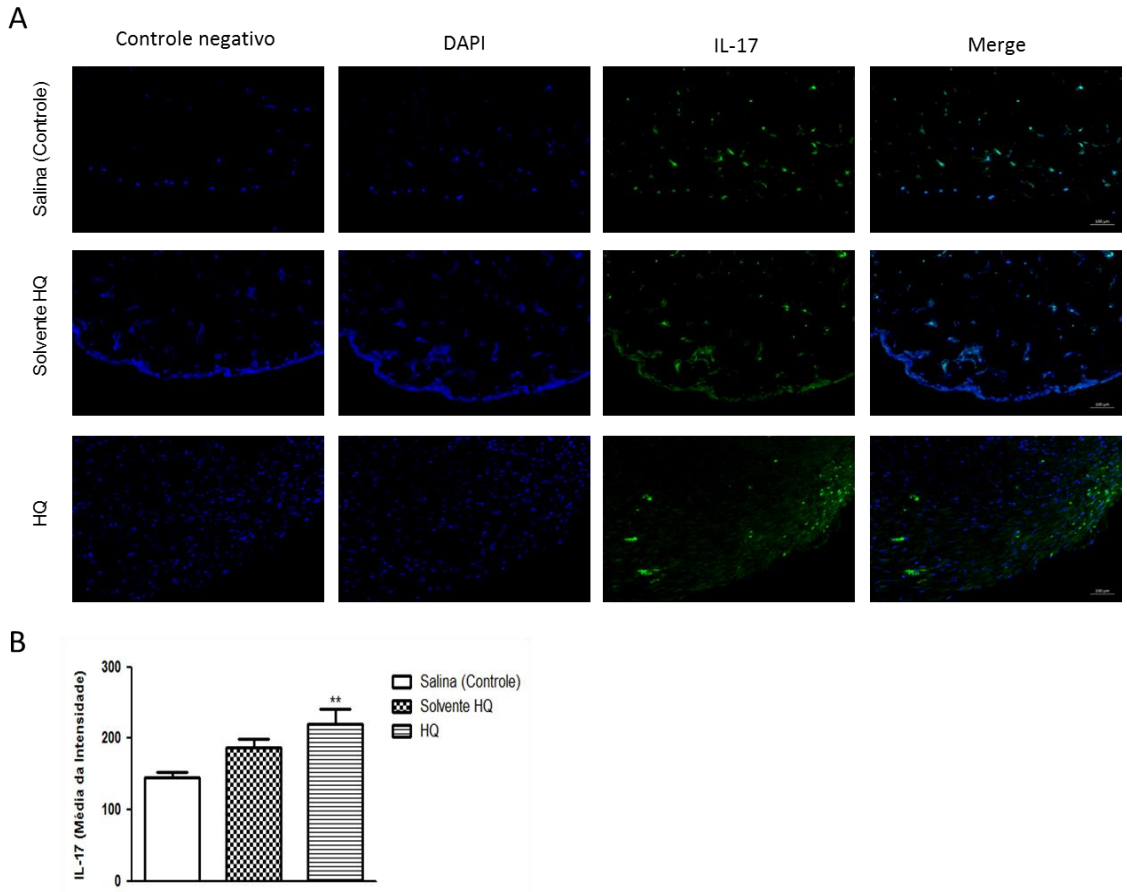

Figura 38: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ nos níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para IL-17. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para IL-17. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. **P<0.01 vs. grupo salina e grupo Solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3 Efeitos da exposição contínua à HQ após o desenvolvimento da AR induzida pelo colágeno.

O objetivo deste protocolo experimental (Grupo experimental **C**) foi avaliar o papel da exposição inalatória à HQ após o período de desenvolvimento da AIC, ou seja, avaliar se a HQ teria um efeito imunosupressor na doença, como é sabido que alguns componentes do cigarro possuem, ou se contribuiria para o agravamento da doença já desenvolvida e estabelecida. Ainda, com este protocolo experimental, poderíamos mimetizar os efeitos desencadeados pelo tabagismo em uma pessoa que começou a fumar depois que já havia desenvolvido artrite. Para tanto, neste protocolo experimental os animais foram submetidos às exposições inalatórias

diariamente, por nebulização, às soluções salina, veículo da HQ ou HQ, durante 1 hora por dia, pelo período de 07 dias consecutivos antes da primeira injeção de colágeno e posteriormente por 07 dias consecutivos (do 29º até o 35º dia), conforme o esquema de exposição mostrado previamente (Figura 9).

4.3.1 Evolução ponderal

Analisando a variação de massa corpórea no primeiro dia de exposição inalatória e no dia da eutanásia dos animais (35º dia), verificamos que as exposições inalatórias à solução salina, ao veículo da HQ e à HQ em animais sem AIC (animais que não receberam imunizações de colágeno) não causou alteração no ganho de peso corporal, uma vez que a evolução ponderal foi semelhante nos animais expostos à solução salina, ao solvente HQ e expostos à HQ (Figura 39A).

Em contrapartida, nos animais com AIC, as diferentes exposições causaram alterações no ganho de peso corporal, ou seja, a evolução ponderal foi diferente após as diferentes exposições inalatórias. Nestes animais com AIC houve ganho de peso de 1,70 % no grupo de animais expostos à solução salina e de 14,09 % nos animais expostos à solução solvente da HQ (Figura 39B). Já nos animais expostos à HQ, houve decréscimo de 2,71% no peso, o que foi estatisticamente significativo quando comparado com a evolução ponderal dos animais expostos à solução salina e ao veículo da HQ e com AIC (Figura 39A,B).

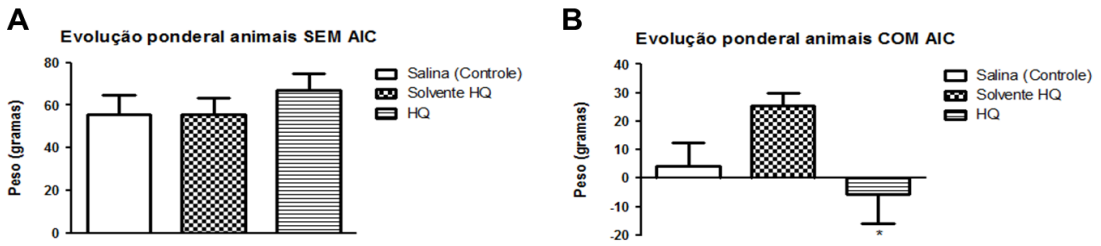

Figura 39: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente HQ ou HQ sobre a variação da massa corpórea. Evolução ponderal foi realizada no 1º e no 35º dia, durante as diferentes exposições inalatórias, em animais sem AIC (A) ou com AIC (B). Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. respectivos grupos com AIC expostos à salina e ao solvente HQ HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.2 Análise clínica do desenvolvimento da artrite

A incidência e a gravidade da artrite foram avaliadas a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (no 21º dia) até o dia da eutanásia dos animais (35º dia), e a pontuação foi feita de acordo com uma escala de 0 a 4, conforme apresentado previamente na tabela 1.

Assim como já observado nos protocolos experimentais A e B, todos os animais que não receberam as imunizações com colágeno (animais sem AIC) tiveram pontuação igual a 0, indicando que as exposições não causaram nenhuma alteração clínica e que estes animais não desenvolveram artrite (Figura 40A).

Em todos os animais com AIC, observou-se desenvolvimento de artrite,, porém a incidência e gravidade variaram após os 3 tipos de exposições inalatórias. Os animais que foram expostos à solução salina (controle) obtiveram pontuação entre 2 a 3 (Figura 40B,C), os animais expostos ao veículo da HQ receberam pontuação entre 1 e 2 (Figura 40B,C) e nos animais expostos à HQ houve uma artrite mais pronunciada, e estes animais receberam pontuação entre 3 a 4 (Figura 40B,C).

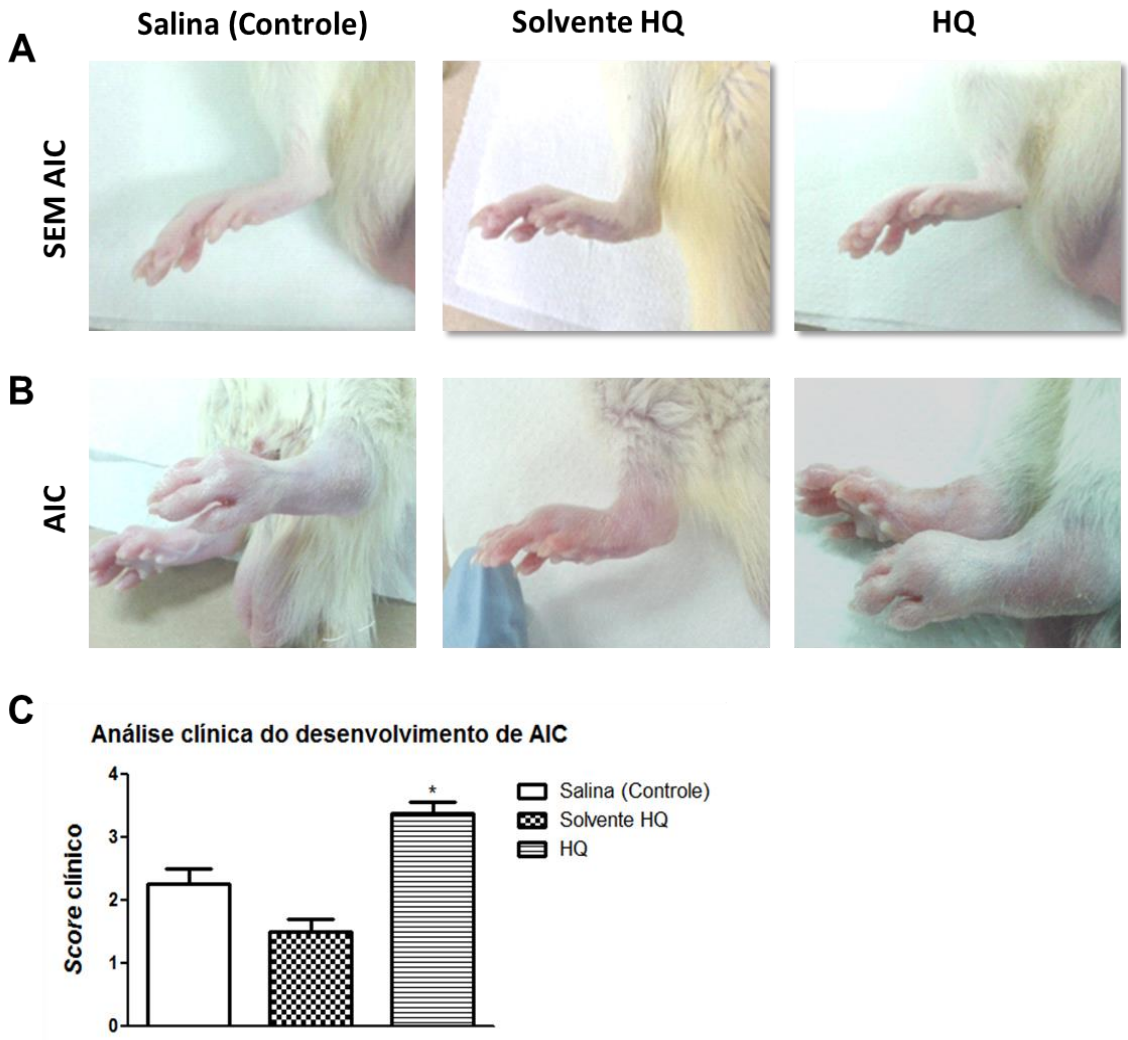

Figura 40: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o desenvolvimento de artrite. A avaliação clínica foi feita a partir de 14 dias após a primeira imunização com colágeno (21º dia) até o 35º dia. A: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, SEM AIC. B: Representação macroscópica das patas de animais, expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, COM AIC. C: Pontuação clínica do desenvolvimento de artrite após as diferentes exposições inalatórias. Os resultados expressam a média ± e.p.m. do peso corporal obtido de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupos com AIC expostos à salina ou ao solvente HQ. HQ = Hidroquinona; AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.3 Análise do leucograma total e diferencial

Acontagem de leucócitos totais do sangue de todos os animais mostrou que não houve diferença estatística significante após as diferentes exposições inalatórias dentre os animais sem AIC (Figura 41A). Porém, houve aumento no número de leucócitos totais após a exposição à solução salina nos animais com AIC, quando comparado com os animais expostos à solução salina e sem AIC (Figura 41A). A exposição à HQ nos animais com AIC também alterou o

número de leucócitos totais em comparação com as amostras provenientes dos animais expostos à HQ e sem AIC (Figura 41A).

A contagem diferencial de leucócitos em animais expostos à solução salina, solvente HQ e HQ com AIC, mostrou aumento na porcentagem de neutrófilos circulantes em relação às respectivas exposições nos animais sem AIC (Figura 41B). Ainda, nos animais expostos à HQ e com AIC, houve aumento no número de linfócitos e de monócitos em comparação com a respectiva exposição nos animais sem AIC (Figura 41B).

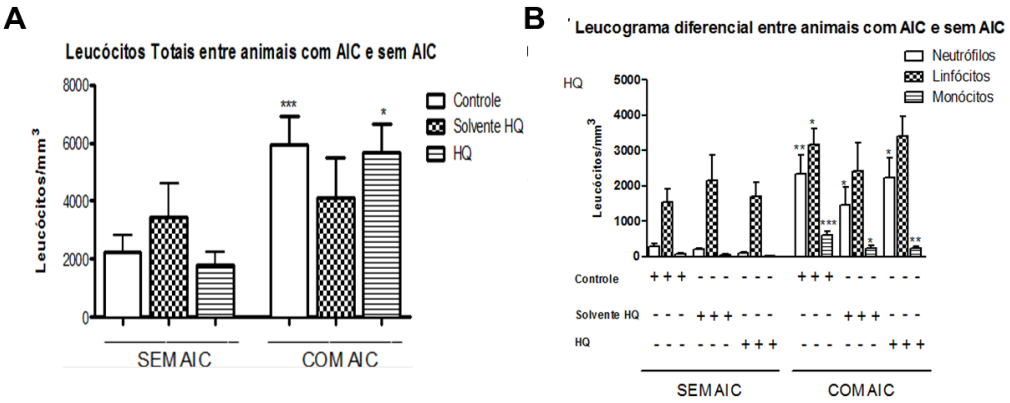

Figura 41: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, solvente da HQ ou HQ sobre o número e perfil de leucócitos no sangue. A: Contagem de leucócitos totais do sangue de grupos de animais com ou sem AIC, expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. B: Contagem de leucócitos diferenciais (neutrófilos, linfócitos e monócitos) no sangue de animais com e sem AIC expostos à solução salina, solvente HQ ou HQ. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células brancas diferenciais presentes no sangue, obtidos de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. respectivos grupos sem AIC; **P<0,01 vs. respectivos grupos sem AIC; ***P<0,001 vs. respectivo grupo sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.4 Efeitos da exposição à HQ sobre a concentração de mediadores inflamatórios no soro.

A concentração de IL-6 no soro dos animais não foi alterada nos animais sem AIC e expostos à salina, ao veículo da HQ ou à HQ. Na vigência de AIC também não houve aumento da concentração desta citocina no soro dos animais expostos à salina, ao solvente HQ ou à HQ, em relação aos respectivos animais sem AIC, conforme apresentado na figura 42A.

A concentração de IL-1β no soro, na ausência de AIC, não foi alterada após nenhuma das exposições inalatórias (Figura 42B). Já nos animais com AIC, a exposição à HQ levou a

uma tendência de aumento desta citocina no soro frente à respectiva exposição inalatória nos animais sem AIC (Figura 42B).

Os níveis de TNF-α não tiveram alteração após nenhuma das diferentes exposições inalatórias, nos animais sem AIC (Figura 42C). Nos animais com AIC, a exposição à HQ aumentou a concentração de TNF-α quando comparada com o soro dos animais com AIC e expostos à solução salina e quando comparada com a respectiva exposição inalatória à HQ nos animais sem AIC (Figura 42C).

Os resultados apresentados na figura 42D mostram que em animais sem AIC a exposição à HQ aumentou a concentração de IL-10 no soro desses animais. Já na vigência da artrite, a exposição à HQ reduziu significativamente a concentração desta citocina, quando comparado com a respectiva exposição em animais sem AIC e em comparação com os animais com AIC e expostos à solução salina (Figura 42D).

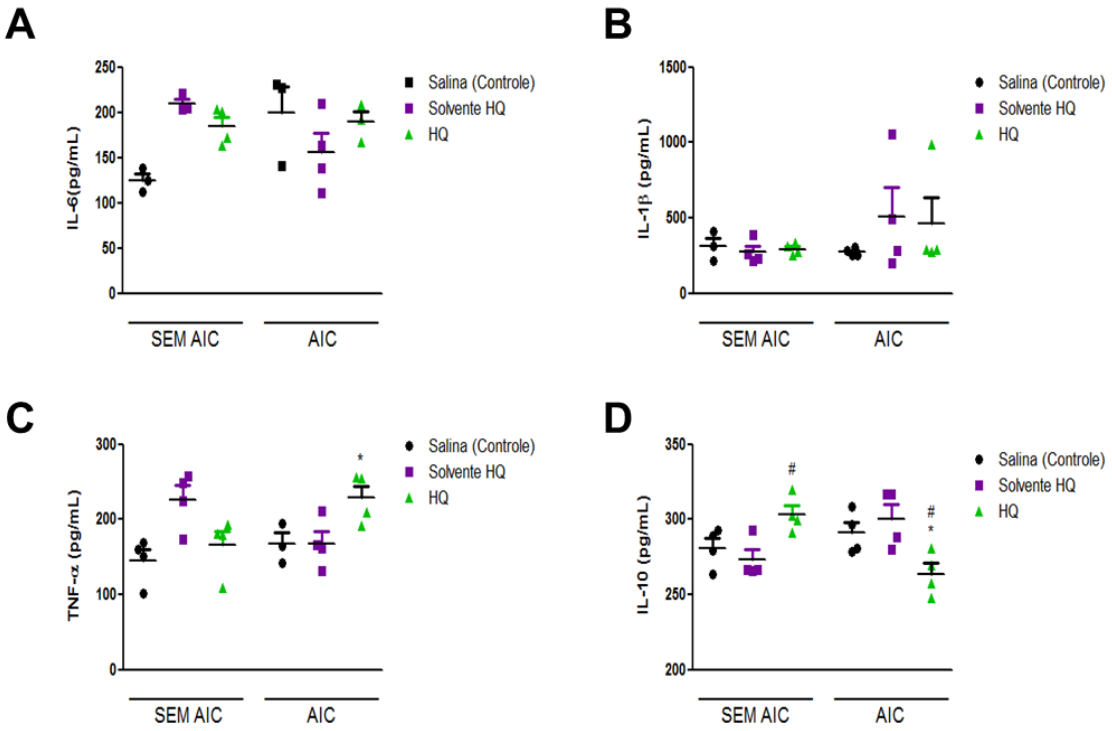

Figura 42: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no soro de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no líquido sinovial obtido de 4 animais em cada grupo $^{\#}P<0,05$ vs. respectivo grupo HQ sem AIC; $^{*}P<0,05$ vs. respectivo grupo exposto à solução salina. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.5 Efeitos da exposição à HQ na expressão de proteínas citrulinadas no soro.

Após quantificação do anticorpo anti-peptídeos citrulinados (anti-CCP) no soro, por ELISA, observamos que nos animais sem AIC a concentração média de anti-CCP nos grupos de animais expostos à solução salina, ou solvente HQ ou HQ foi em torno de 40 IU/mL. Além disso, nos animais sem AIC, a exposição inalatória de HQ não alterou a concentração do anticorpo anti-CCP no soro em comparação com o soro obtido dos animais expostos à salina e ao solvente HQ (Figura 43).

Na presença de AIC, houve aumento na concentração média de anti-CCP após a exposição à HQ, e a concentração média de anti-CCP subiu para 70 IU/mL (Figura 43). Esse aumento nos níveis de proteínas citrulinadas no soro de animais com AIC e expostos à HQ foi estatisticamente significativo quando comparado com os níveis observados nos animais expostos à salina e com AIC e nos amimais expostos à HQ e sem AIC (Figura 43).

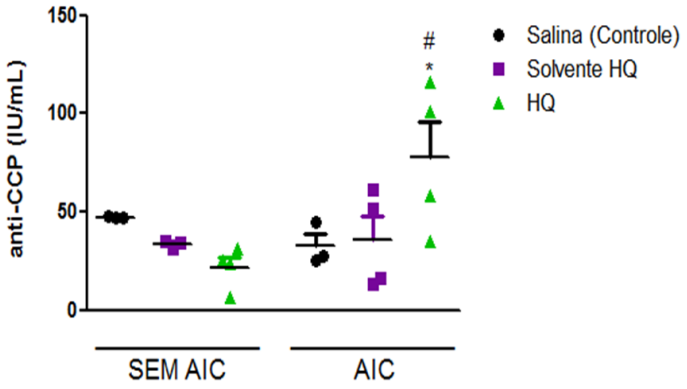

Figura 43: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a concentração de proteínas/peptídeos citrulinados no soro de animais com AIC e sem AIC. O anticorpo anti-CCP foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração deste anticorpo no soro obtido de 4 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupo controle com AIC; #P<0,05 vs. respectivo grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.6 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição do líquido sinovial

Assim como nos protocolos experimentais A e B, no 35º dia os animais foram eutanasiados e foram coletados os líquidos sinoviais de todos os animais para posterior contagem do número total de células e para quantificação de mediadores inflamatórios.

A contagem do número de células presentes no líquido sinovial mostrou que nos animais sem AIC não houve diferença no número de células após a exposição à HQ, em comparação com as demais exposições (Figura 44). Entretanto, houve aumento no número de células nos animais com AIC e que foram expostos à solução salina, ao solvente HQ e à HQ, em comparação às respectivas exposições em animais sem AIC. Além disso, esse aumento foi estatisticamente significativo após as exposições ao solvente HQ e à HQ (Figura 44).

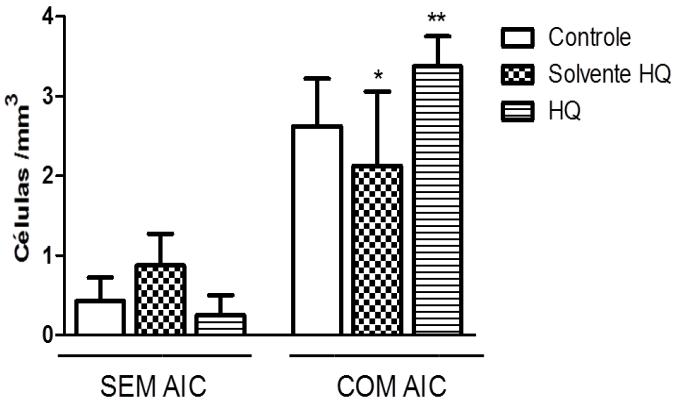

Figura 44: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a contagem de células totais no exudato (líquido sinovial) de animais com ou sem AIC. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da quantidade de células totais presentes no líquido sinovial, obtidos de 8 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupo solvente HQ sem AIC; **P<0,01 vs. grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Além disso, após a quantificação das citocinas pró-inflamatórias por ELISA, pudemos observar que a exposição à HQ elevou os níveis de algumas dessas citocinas nos exudatos coletados dos animais com AIC em relação aos exudatos coletados dos animais expostos à solução salina ou ao solvente HQ.

A concentração de IL-6 no líquido sinovial dos animais não foi alterada em condições basais (animais sem AIC), nem em condições de inflamação, provocada pela injeção de colágeno, sendo que não houve aumento da concentração desta citocina no líquido sinovial dos animais expostos à salina, ao solvente HQ ou à HQ, em relação aos respectivos animais sem AIC (Figura 45A).

Os resultados apresentados na Figura 45B mostram que a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-1β no líquido sinovial na ausência de AIC, em comparação aos animais que

foram expostos à solução salina e ao solvente HQ, nestas mesmas condições. Por outro lado, na vigência da AIC, houve um aumento na concentração desta citocina no líquido sinovial após exposição à solução salina e à HQ em relação às mesmas exposições em animais sem AIC (Figura 45B).

Adicionalmente, os resultados apresentados na figura abaixo mostram que nos animais sem AIC houve uma tendência de aumento na concentração de IL-10 após a exposição à HQ, em comparação com os animais expostos à salina e ao solvente HQ (Figura 45C). Já na vigência da AIC, a exposição à HQ não alterou a concentração de IL-10 no líquido sinovial dos animais quando comparada com as demais exposições (Figura 45C).

Além disso, a produção de NO foi quantificada pelo ensaio de Griess e os resultados mostraram que a exposição à HQ não alterou a concentração desse ânion na ausência de artrite. Já nos animais com AIC houve um aumento na concentração de NO após as 3 exposições inalatórias e este aumento foi estatisticamente significativo após a exposição à HQ, em comparação com a respectiva exposição, em animais sem AIC (Figura 45D).

Ainda, não foram detectados níveis da citocina TNF-α no líquido sinovial dos animais de nenhum grupo de exposição inalatória, tanto na ausência, bem como na vigência da AIC.

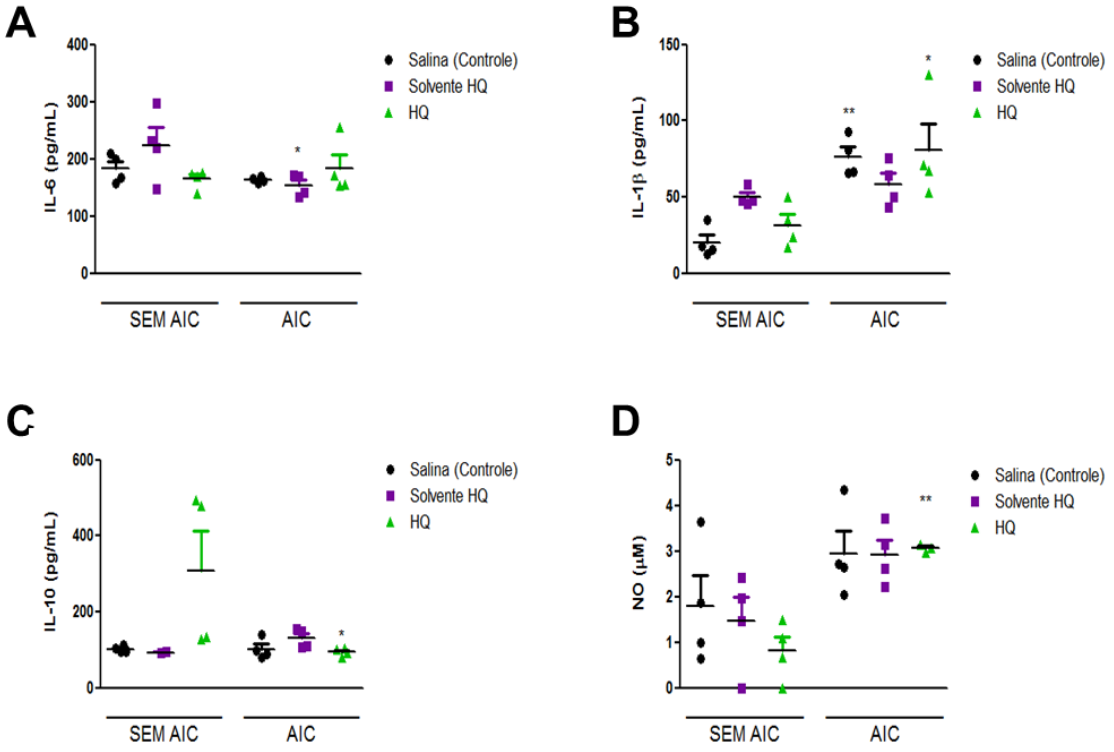

Figura 45 Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes no líquido sinovial de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA) e o NO (D) foi quantificado por Reação de Griess. Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no líquido sinovial obtido de 4-7 animais em cada grupo *P<0,05 vs. grupo salina com AIC e grupo HQ sem AIC; *P<0,01 vs. grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.7 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais

Para comprovar se a indução da AIC foi efetiva e também para avaliar se a HQ estava contribuindo para o agravamento da AIC ou se teria um efeito imunosupressor, no 35º dia os animais foram eutanasiados e as membranas sinoviais das articulações dos joelhos foram coletadas e processadas para análise histológica.

Assim como já visto nos resultados dos protocolos experimentais A e B, nos animais sem AIC, e que foram submetidos à exposição contínua por 07 dias (até a 1ª injeção de colágeno) e posteriormente por 7 dias consecutivos (do 29º dia ao 35º dia) à salina, solvente HQ ou à HQ, as membranas sinoviais apresentaram-se íntegras, nas quais observarmos camadas

íntima e sub-íntima finas e logo após, uma extensa camada de tecido adiposo. Ainda, não foram observadas alterações morfológicas, nem alterações nas membranas sinoviais, como migração de células do sistema imune, hiperplasia celular e formação de edema, comprovando que estes animais não desenvolveram artrite (Figura 46A).

Dentre os animais com AIC, as diferentes exposições inalatórias causaram efeitos distintos. Apesar de os animais expostos à solução salina terem sido pontuados com um *score* clínico entre 2 a 3 na análise clínica das patas, pela análise histológica não foram observadas alterações que indicavam presença de inflamação nas membranas sinoviais destes animais, sendo que as membranas estavam similares àquelas observadas nos animais sem AIC (Figura 46B). Já nos animais que foram expostos ao solvente HQ, observamos um desarranjo das camadas íntima e sub-íntima (camadas onde se concentram os sinoviócitos tipo A e tipo B), porém com uma proliferação de sinoviócitos bem reduzida (Figura 46B). Nos animais que foram expostos à HQ, observou-se um efeito mais exarcebado do processo inflamatório em relação às demais exposições. Nestes animais expostos à HQ, o processo de inflamação estava bem estabelecido, e além do influxo de células do sistema imune para a região avaliada, como neutrófilos, houve formação de *pannus*, além de presença de grandes edemas na região, mostrando assim que a exposição inalatória à HQ aumenta os efeitos decorrentes das injeções de colágeno e contribui para o agravamento da doença já estabelecida (Figura 46B).

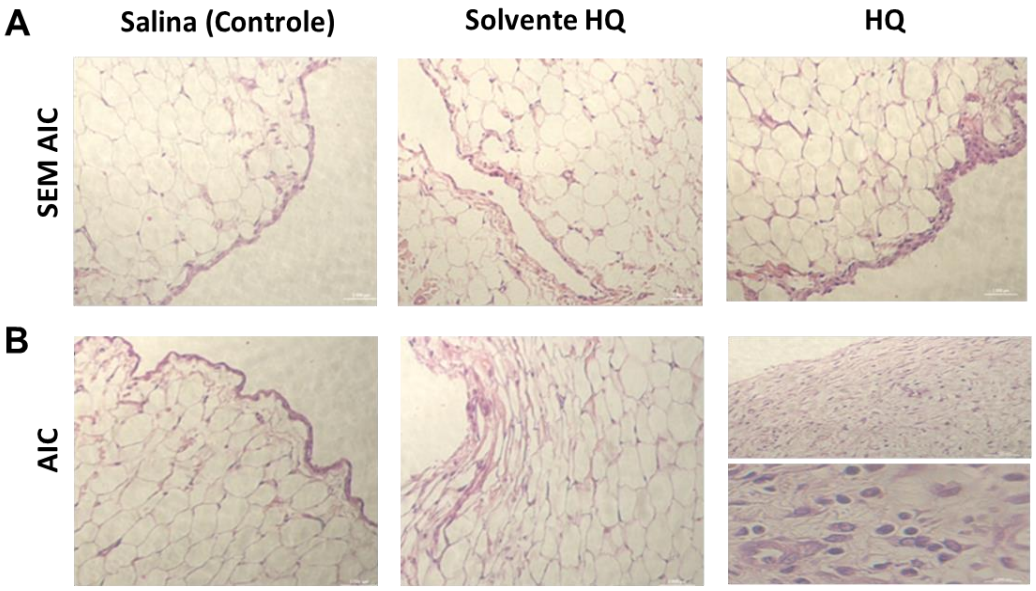

Figura 46: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre as características histológicas das membranas sinoviais coletadas de animais com AIC e sem AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC. B: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ COM AIC. Imagens obtidas em objetiva de 20X. N= 4 em cada grupo experimental. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, pela análise de Microscopia por Geração de Segundo Harmônico, observamos que a morfologia e o arranjo das fibras de colágenos estavam alteradas nas sinóvias coletadas dos animais com artrite em comparação com as sinóvias coletadas dos animais sem artrite (Figura 47A,B). Além disso, nos animais com AIC, a exposição à HQ levou a uma maior deposição de colágeno nas membranas sinoviais do que as exposições à salina e ao veículo da HQ, o que foi evidenciado por uma maior área ocupada pelo colágeno, uma maior área coberta pelo objeto e por um maior perímetro (Figura 47C-E).

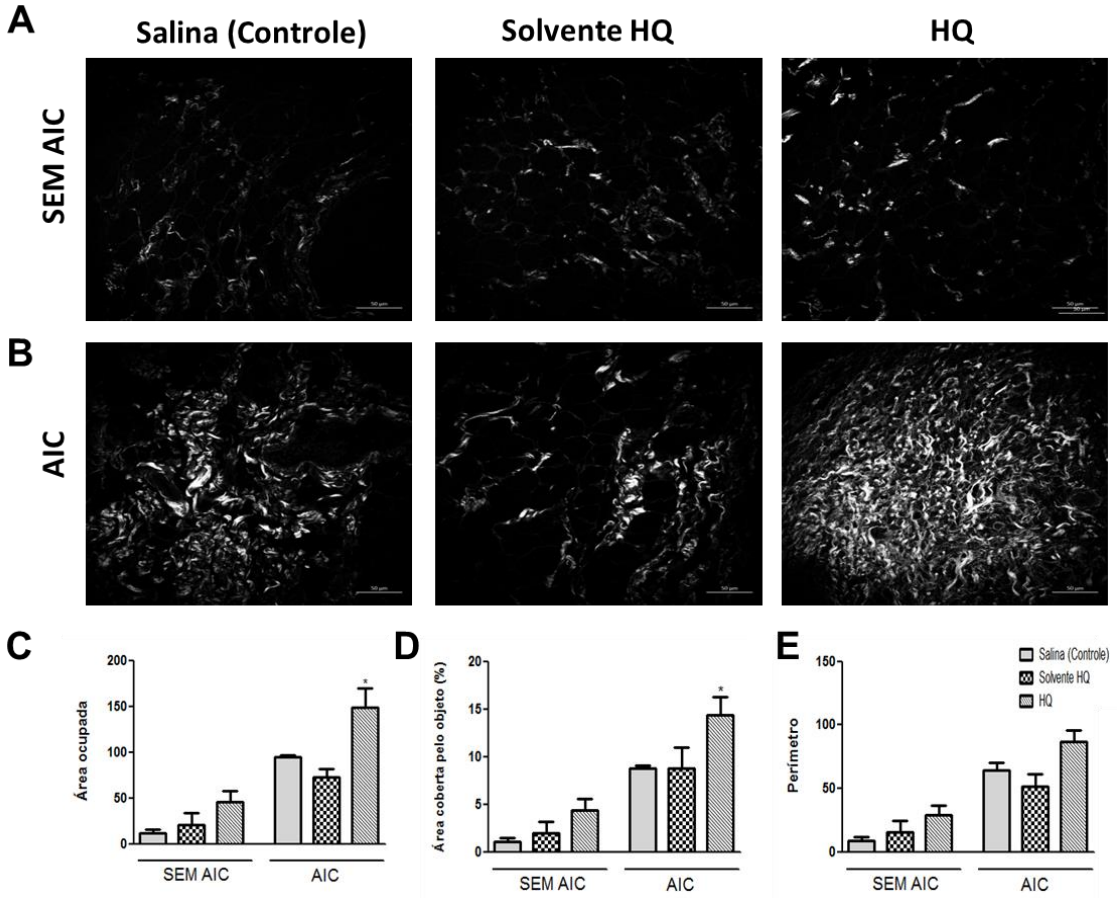

Figura 47: Figura 34: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a morfologia e arranjo do colágeno nas membranas sinoviais. Análise por Geração de Segundo Harmônico sobre a deposição de colágeno nas membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ SEM AIC (A) e COM AIC (B). Imagens obtidas em objetiva de 20X. Área ocupada pelo colágeno (C). Área coberta pelo objeto (D). Perímetro (E).N= 4 em cada grupo experimental.. *P<0.05 vs. grupo salina, **P<0.001 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.8 Efeitos da exposição à HQ sobre a composição celular nas membranas sinoviais: análise por Imunofluorescência

Uma vez que observamos, através da análise histológica das membranas sinoviais, que a exposição à HQ estava contribuindo para o agravamento do processo inflamatório da artrite, resolvemos confirmar esta hipótese pela análise por imunofluorescência, utilizando alguns marcadores específicos. De acordo com os resultados obtidos, observamos que a exposição à HQ levou a uma maior proliferação de sinoviócitos nas membranas sinoviais dos animais com AIC, quando comparado com as sinóvias coletadas dos animais expostos à solução salina e ao

veículo HQ, o que foi detectado por um maior aumento da intensidade de células positivas para CD90 (Figura 48A,B). Não foram detectadas diferenças significativas na fluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem artrite e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

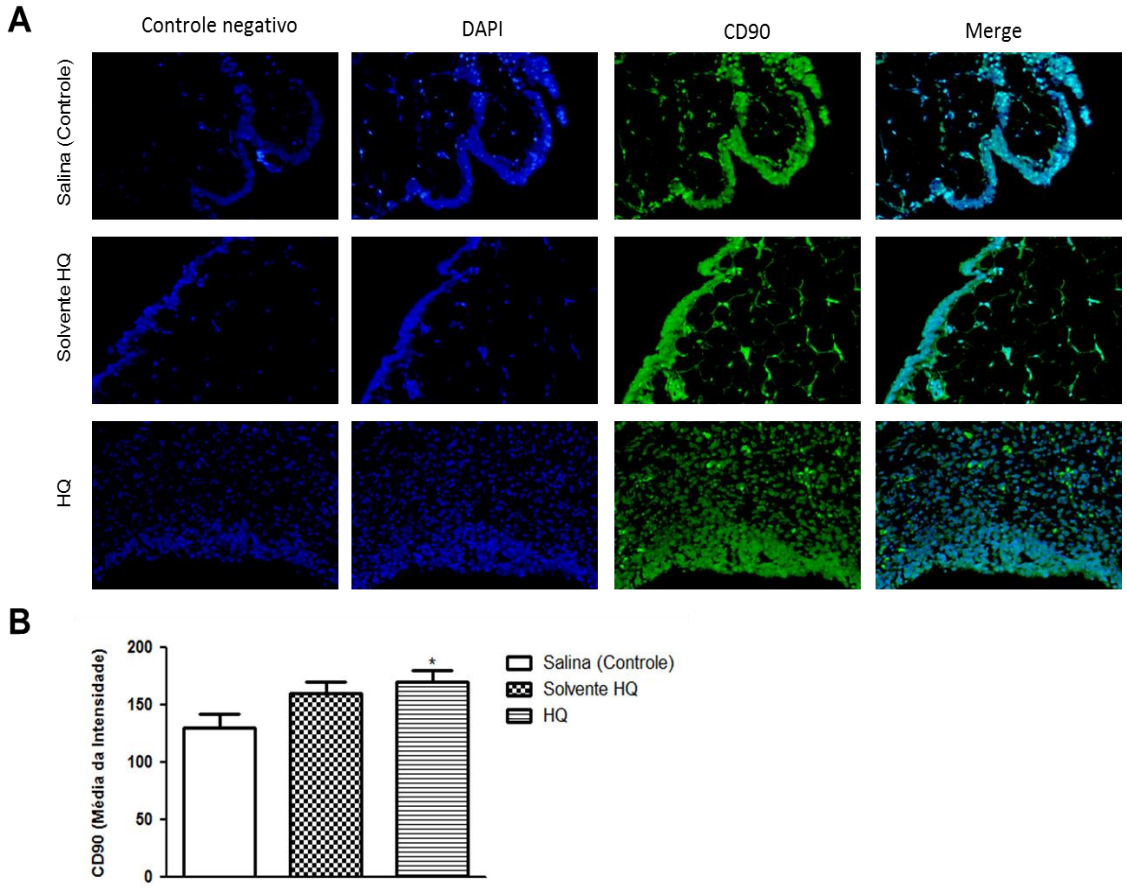

Figura 48: Exposição *in vivo* à HQ aumentou a proliferação e causou hiperplasia celular de sinoviócitos em animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC e expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ, e positivas para CD90. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para CD90. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. **P<0.01 vs. grupo salina. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Adicionalmente, a análise por Imunofluorescência confirmou uma maior infiltração de neutrófilos nas membranas sinoviais de ratos com AIC expostos à HQ, em comparação com as membranas sinoviais coletadas de animais expostos à salina e ao veículo HQ, uma vez que houve uma maior quantidade de células positivas para Ly6G nas membranas sinoviais após exposição à HQ (Figura 49). Não foram detectadas diferenças significativas na fluorescência

para esse marcador na sinóvia dos animais sem artrite e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

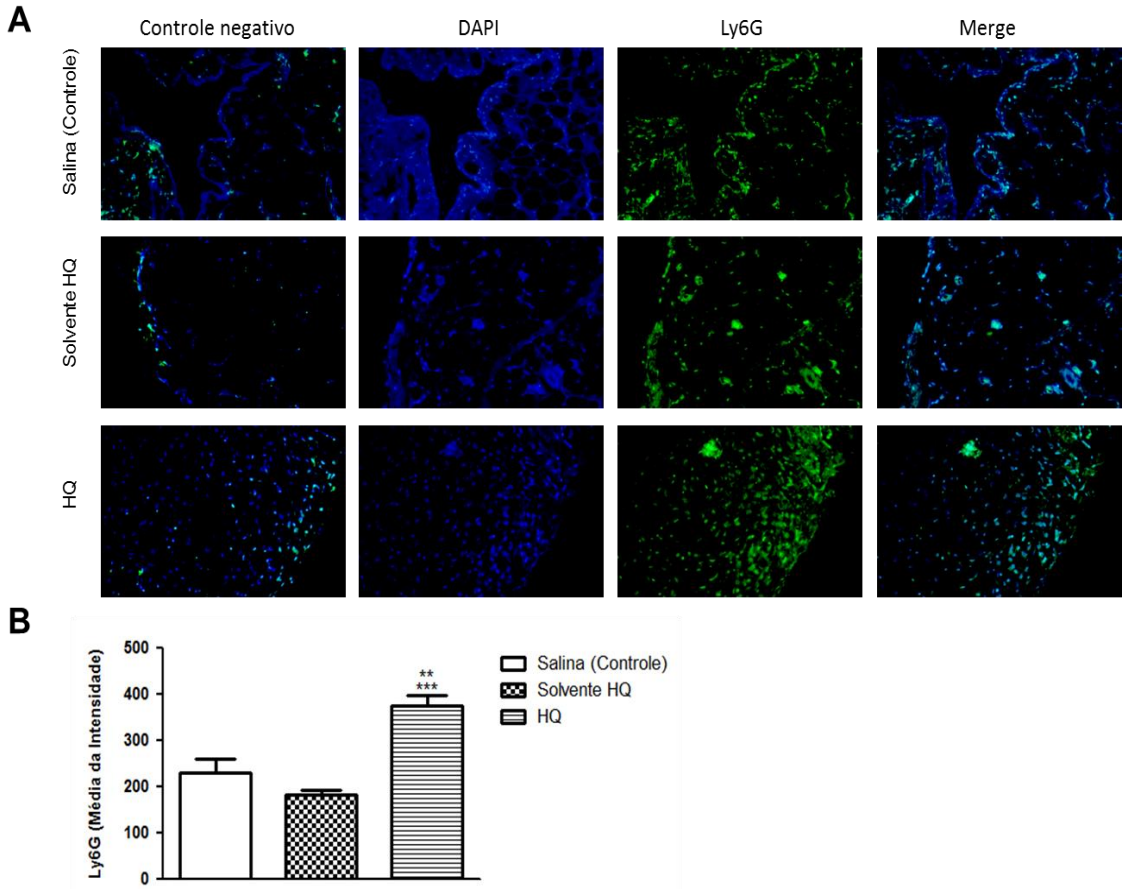

Figura 49: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre o influxo de neutrófilos na cavidade articular em animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para Ly6G. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para Ly6G. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. **P<0.01 vs. grupo salina; ***P<0.01 vs. grupo solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

A análise da Imunofluorescência também mostrou uma intensa expressão do receptor AhR nas membranas dos animais com AIC expostos à HQ, e expressão foi muito maior em comparação com o que foi observado nas amostras provenientes dos animais expostos à salina e

ao solvente HQ (Figura 50). Não foram detectadas diferenças significativas na fluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem artrite e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

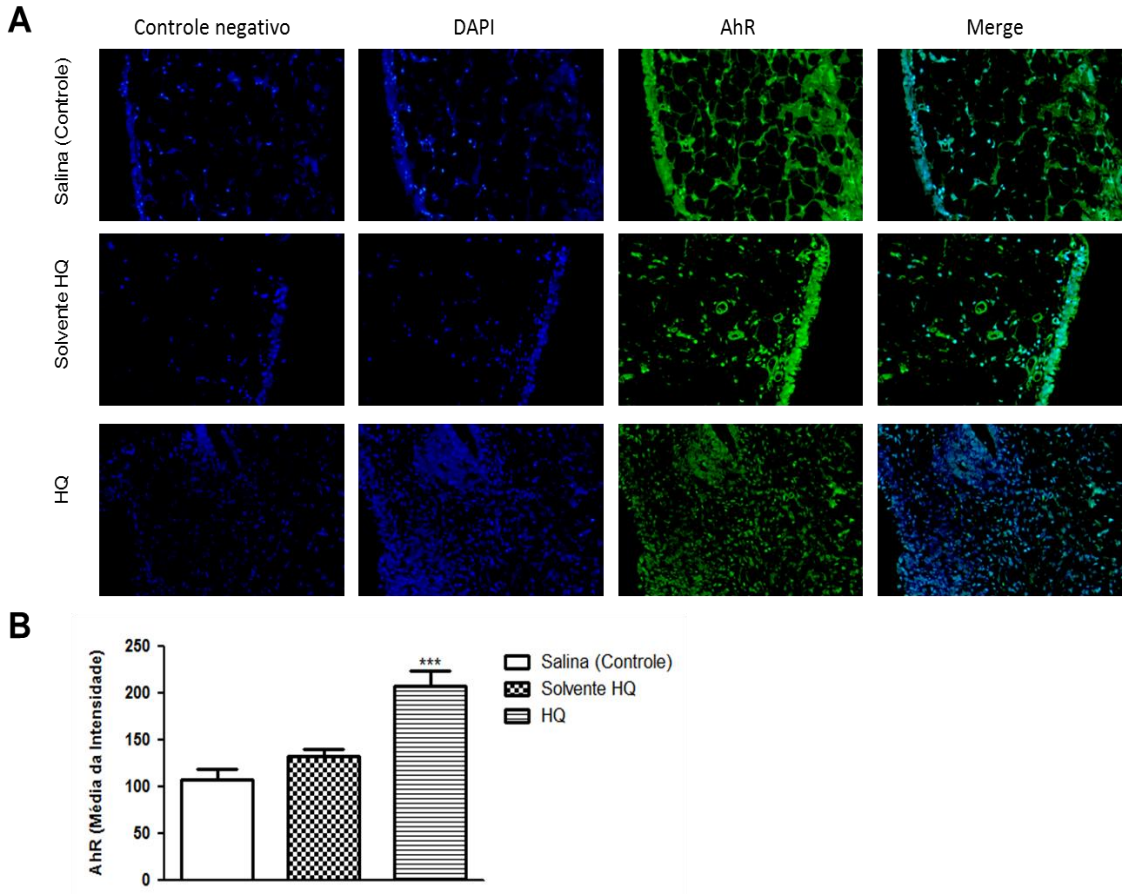

Figura 50: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de AhR nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para AhR. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para AhR. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. ***P<0.01 vs. grupos salina e solvente HQ. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Além disso, a análise por Imunofluorescência confirmou uma maior expressão do fator de transcrição ROR nas membranas sinoviais dos animais com AIC e expostos à HQ, em comparação com as membranas sinoviais coletadas de animais expostos à salina ou ao veículo

da HQ, uma vez que houve uma maior quantidade de células positivas para este marcador nas membranas sinoviais após exposição à HQ (Figura 51A,B). Este perfil de ação da HQ foi similar ao que foi observado anteriormente para a expressão de AhR. Não foram detectadas diferenças significativas na fluorescência para esse marcador na sinóvia dos animais sem artrite e expostos à HQ, salina ou veículo da HQ (dados não mostrados).

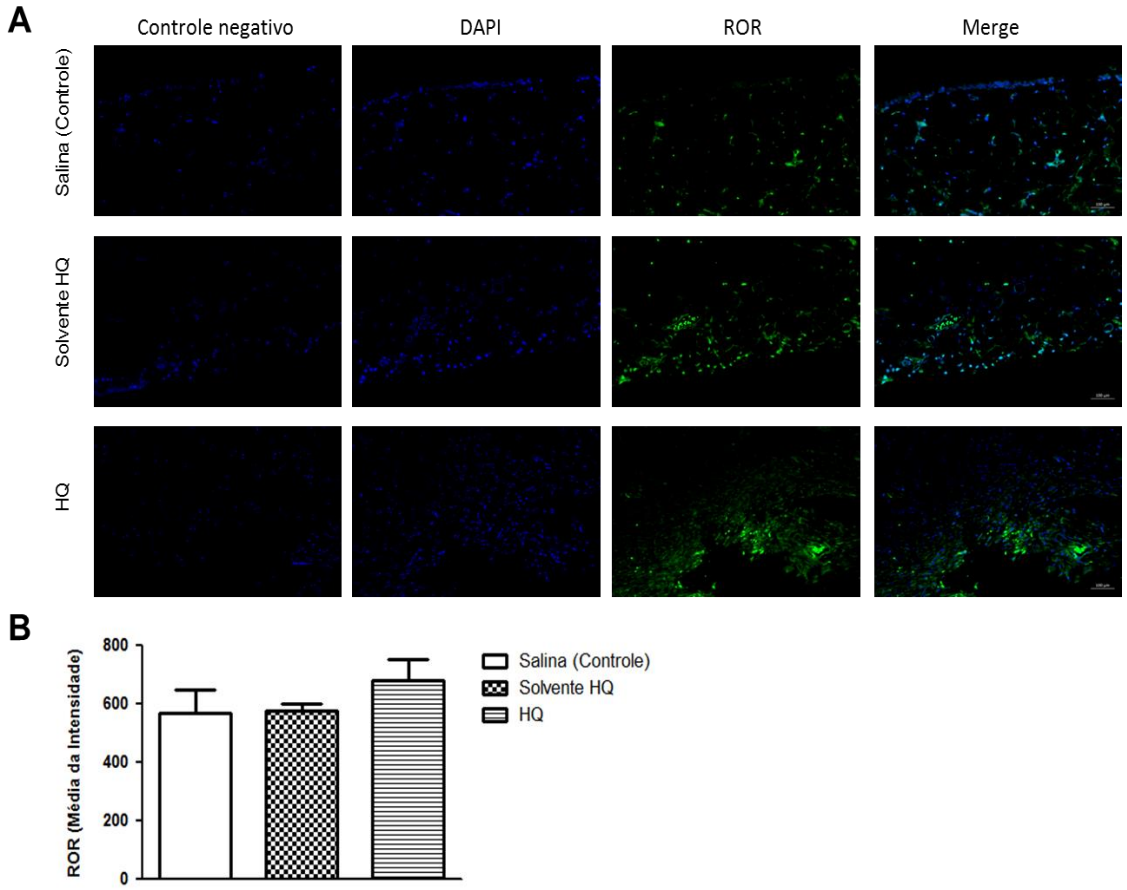

Figura 51: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a expressão de ROR nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais com AIC expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ e positivas para ROR. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para ROR. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

E consequentemente às expressões aumentadas de AhR e ROR nas membranas sinoviais, os níveis de IL-17 também estavam elevados na sinóvia dos animais expostos à HQ, quando comparado com os grupos expostos à salina e ao solvente da HQ (Figura 52). A exposição à HQ, salina ou solvente HQ nos animais sem AIC não causou nenhuma alteração na secreção de IL-17 (dados não mostrados).

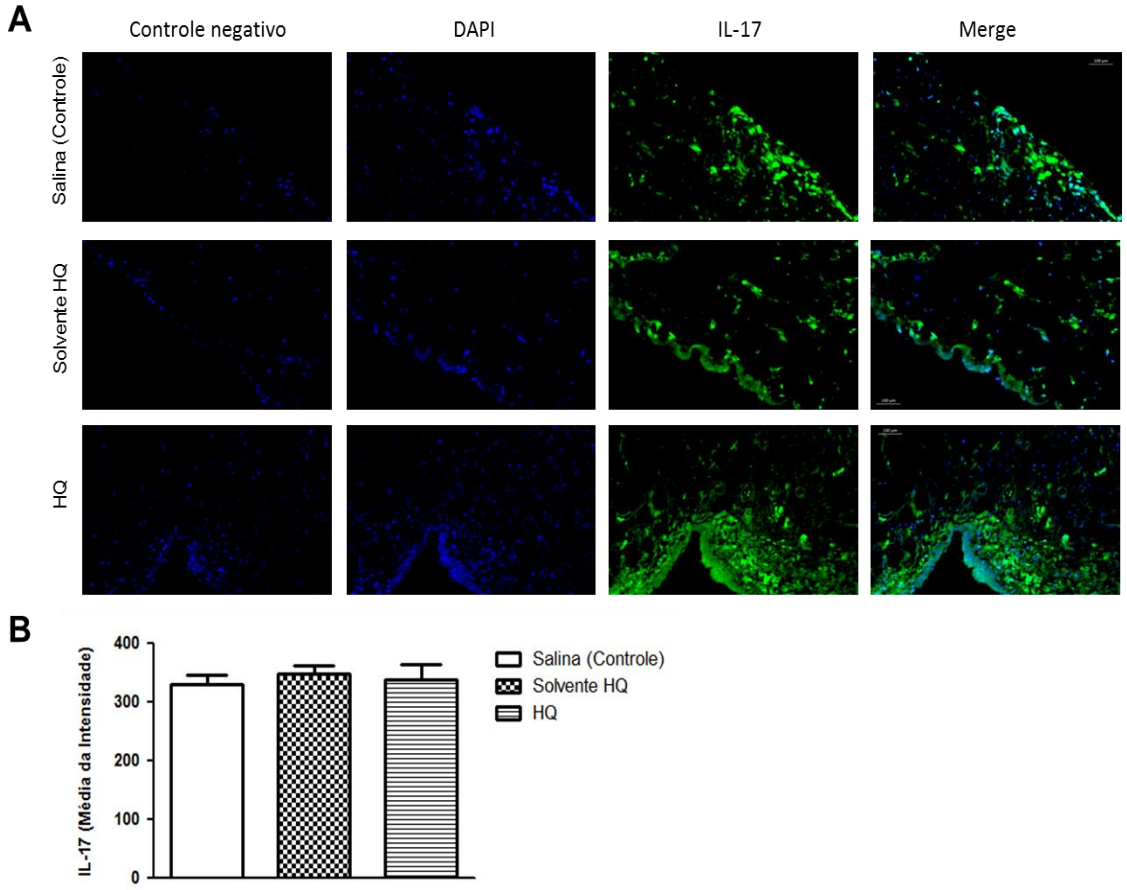

Figura 52: Efeitos da exposição *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ nos níveis de IL-17 nas membranas sinoviais de animais com AIC. A: Representação microscópica das membranas sinoviais coletadas das articulações dos joelhos de animais expostos à solução salina, solvente HQ e à HQ COM AIC e positivas para IL-17. B: Densitometria da média da intensidade de fluorescência para IL-17. Imagens obtidas em objetiva de 20X. DAPI = marcação positiva para núcleo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

4.3.9 Análise dos efeitos da exposição à HQ nos sinoviócitos

Uma vez que no protocolo experimental C, a exposição *in vivo* à HQ desencadeou diversos efeitos que agravaram o quadro inflamatório da artrite, e estes efeitos ocorreram pincipalmente localmente nas membranas sinoviais, resolvemos investigar se esses efeitos iriam se manter ao isolarmos os sinoviócitos tipo B das membranas sinoviais. Desta forma, após a realização do protocolo de exposição do grupo C (mostrado previamente na Figura 9), no 35º dia os animais foram eutanasiados, as membranas sinoviais dar articulações do joelho foram removidas cirurgicamente, e inicou-se o processo de isolamento dos sinoviócitos. Após a digestão enzimática, os sobrenadantes celulares, provenientes das diversas exposições inalatórias, foram coletados nos tempos de 4 horas, 24 horas e após as passagens 1, 2 e 3. Posteriormente foi feita a quantificação dos mediadores inflamatórios TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-10.

De acordo com os resultados obtidos, observamos que após o período de 4 horas de digestão enzimática com colagenase das membranas sinoviais, a exposição à HQ não desencadeou nenhum efeito sobre a secreção e liberação das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 nos sobrenadantes avaliados, em comparação com as amostras obtidas dos animais expostos à salina ou ao solvente HQ, tanto na ausência bem como na vigência da AIC (Figura 53A-C). Neste período de tempo avaliado, a exposição à HQ elevou somente os níveis de IL-10, em comparação com as amostras provenientes de animais com AIC e expostos à solução salina e em comparação com animais expostos à HQ e sem AIC (Figura 53D).

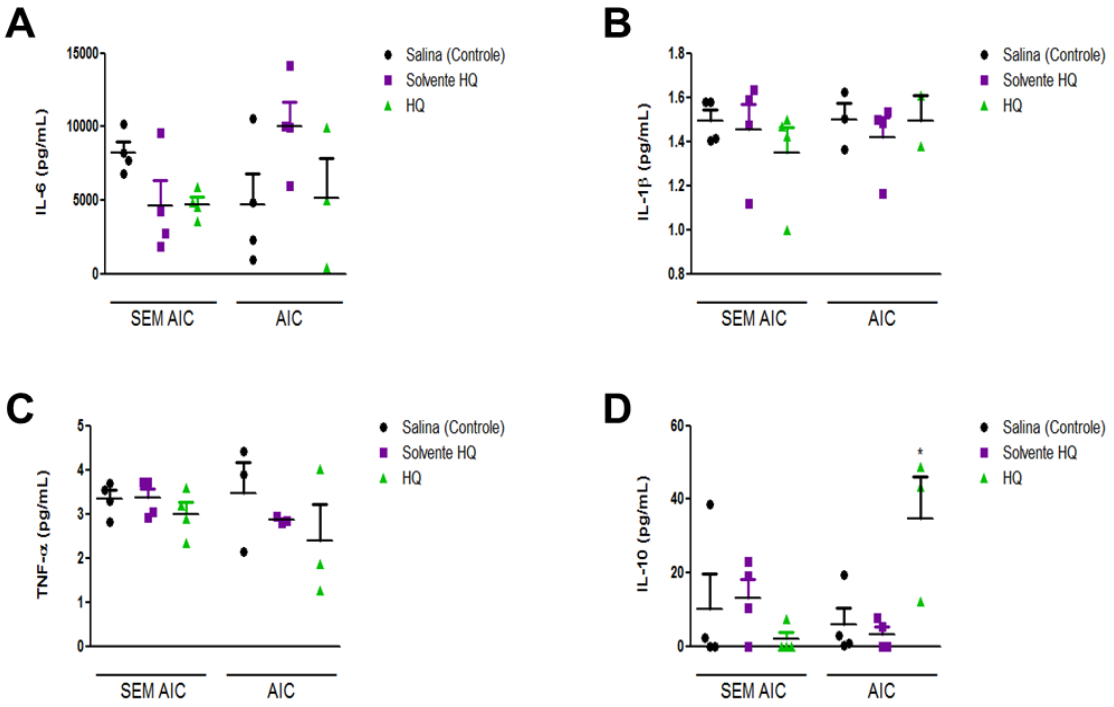

Figura 53: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no sobrenadante coletado das células sinoviais obtido de 4 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupos salina e solvente HQ com AIC e vs. grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

No tempo de 24 horas foi possível observar que a exposiçâo à HQ não alterou os níveis de IL-6, em comparação com as demais exposições, tanto em animais sem AIC, bem como em animais com AIC (Figura 54A).

Entretanto, no mesmo período avaliado, a exposição à HQ foi responsável por elevar significativamente os níveis de secreção de TNF-α e de IL-1β nas amostras provenientes de ratos com AIC, quando comparado com animais com AIC expostos à salina e ao veículo da HQ e em comparação com animais expostos à HQ e sem AIC (Figura 54B,C).

Ainda, neste mesmo período avaliado, não houve alteração nos níveis de IL-10 nas amostras coletadas dos animais expostos à HQ e com AIC, em relação às demais exposições inalatórias, tanto na ausência como na presença de artrite (Figura 54D).

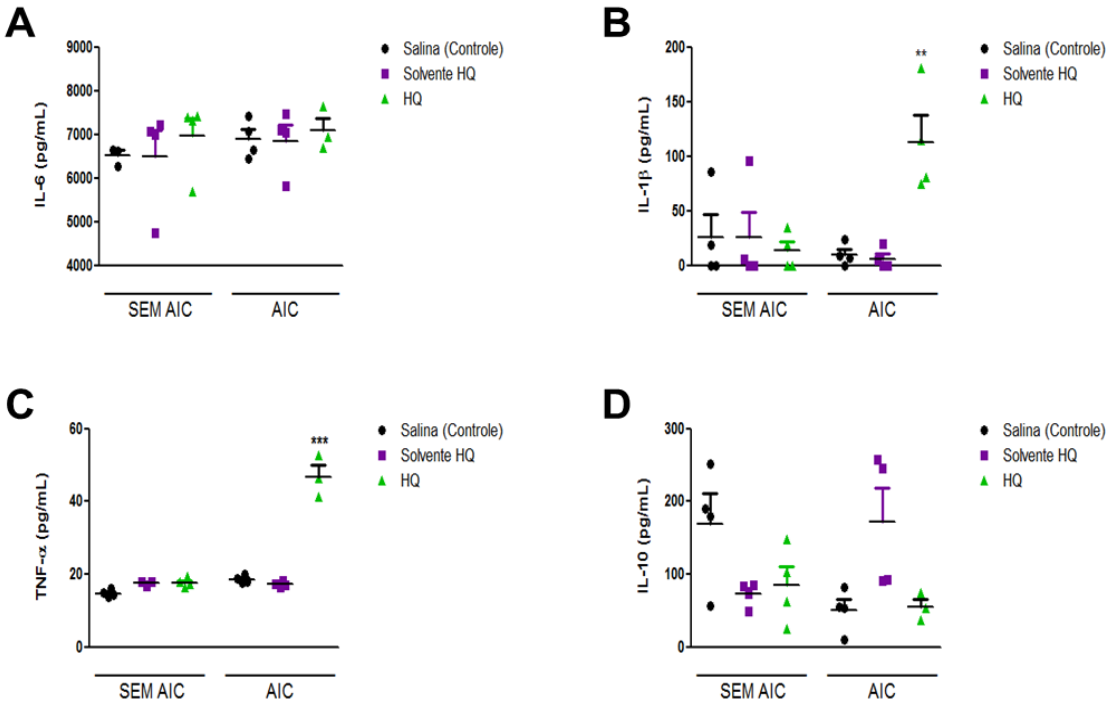

Figura 54: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no sobrenadante coletado das células sinoviais obtido de 4 animais em cada grupo. *P<0,05 vs. grupos salina e solvente HQ com AIC, e vs. grupo HQ sem AIC; ** P<0,01 vs. grupos salina e solvente HQ com AIC e vs. Grupo HQ sem AIC; *** P<0,001 vs. grupos salina e solvente HQ com AIC e vs. grupo HQ sem AIC. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Posteriormente, avaliamos também os sobrenadantes coletados na primeira passagem e neste período avaliado, a HQ não alterou os níveis de nenhuma citocina quantificada em relação às demais exposições inalatórias, tanto de animais sem AIC, como de animais com AIC (dados não mostrados).

Em continuidade, avaliamos o perfil de secreção das mesmas citocinas nos sobrenadantes coletados na segunda passagem de células. De acordo com os resultados obtidos, observamos que a exposição à HQ desencadeou uma tendência de aumento nos níveis das citocinas de IL-6 e de IL-10 em relação às amostras obtidas dos animais com AIC expostos à salina e ao veículo da HQ, e em relação às amostras obtidas de animais expostos à HQ e sem AIC (Figura 55A,D). Porém, a mesma tendência de aumento desencadeada pela exposição à HQ

não foi observada nos níveis de TNF- α e de IL-1β, uma vez que o perfil de secreção dessas citocinas foi semelhante após as diferentes exposições inalatórias (Figura 55B,C).

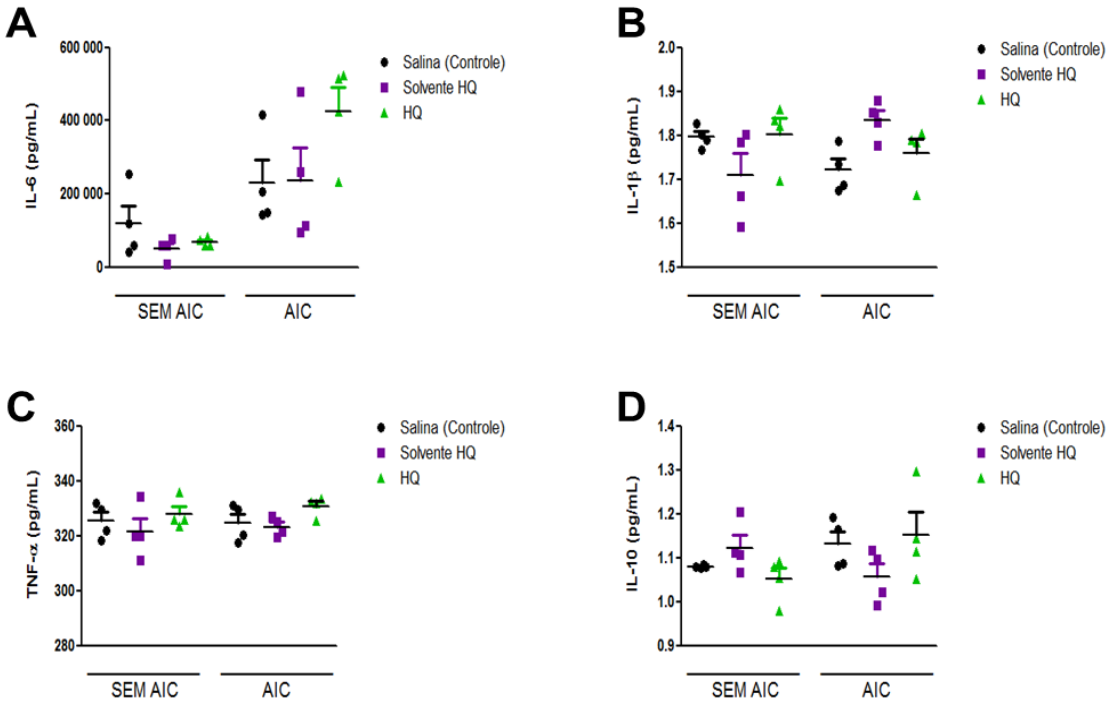

Figura 55: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios presentes nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no sobrenadante coletado das células sinoviais obtido de 4 animais em cada grupo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

Por fim, analisamos ainda as amostras coletadas na terceira passagem do cultivo de células sinoviais. E de acordo com os dados obtidos, os efeitos desencadeados pela exposição à HQ não foram mantidos ao longo das passagens. Neste caso, a exposição à HQ não alterou os níveis de nenhuma das citocinas avaliadas anteriormente quando comparado com as exposições à solução salina e ao veículo da HQ, na vigência e ausência da artrite (Figura 56A-D).

Além disso, as células foram cultivadas e mantidas até a quinta passagem, e os efeitos desencadeados pela exposição à HQ nesta passagem foram similares aos obtidos na terceira passagem (dados não mostrados). Vale ressaltar que houve perda da viabilidade celular

significativa a partir desta passagem. Desta forma não foi possível continuar o protocolo de isolamento de sinoviócitos tipo B.

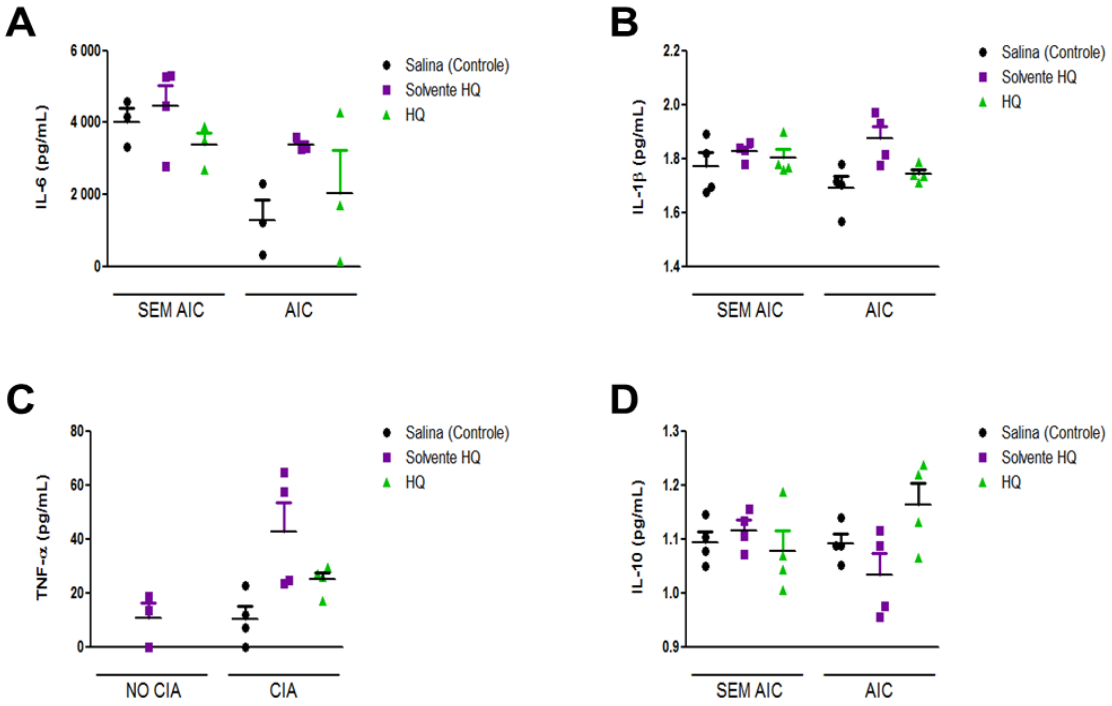

Figura 55: Efeitos das exposições *in vivo* à solução salina, veículo da HQ ou HQ sobre a quantificação de mediadores inflamatórios nos sobrenadantes das células sinoviais de animais com AIC e sem AIC. As citocinas IL-6 (A), IL-1β (B), TNF-α (C) e IL-10 (D) foram quantificadas por ensaio imunoenzimático (ELISA). Os resultados expressam a média ± e.p.m. da concentração destes mediadores no sobrenadante coletado das células sinoviais obtido de 4 animais em cada grupo. HQ = Hidroquinona. AIC = artrite induzida pelo colágeno.

5 DISCUSSÃO

Evidências clínicas mostram que a fumaça do cigarro leva à indução e ao agravamento da AR, e diversos estudos experimentais apontam para os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), metais e nicotina presentes na fumaça do cigarro como responsáveis por esses efeitos nocivos (YU *et al.*, 2011; AFRIDI *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2017; MCHUGH, 2017). Neste estudo, os resultados obtidos mostram, pela primeira vez, o papel facilitador da exposição *in vivo* à HQ sobre o desenvolvimento e agravamento da AR e, desta forma, sugerem o papel da HQ, que é o composto com maior atividade pró-oxidativa presente na fumaça do cigarro, como um possível agente responsável pela indução e para o agravamento da AR observada em humanos. Os resultados foram obtidos pela exposição sistêmica à HQ em nebulização, em um protocolo de exposição inalatória baseado em estudos prévios do nosso grupo, que utilizaram concentrações menores que as preconizadas para exposição humana pelas agências regulamentadoras (RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a,b). Desta forma, acreditamos que os resultados obtidos aqui sejam relevantes para a toxicologia ambiental e ocupacional, para compreensão dos mecanismos tóxicos da ação da HQ e para a elucidação de como o tabaco contribui para a etiopatogenia da AR.

Já se sabe que exposições diárias, à HQ em nebulização, na concentração de 25 ppm, não alteram o hemograma e o mielograma de camundongos (MACEDO et al., 2006, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a,b). No entanto, a toxicidade da HQ foi evidenciada durante ensaios de desafios imunológicos, uma vez que os animais expostos à HQ apresentraram resposta prejudicada a células Th2 e reação inata ao receptor *Toll-like* 4 (MACEDO *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011; SHIMADA *et al.*, 2012a,b). Além disso, nestes estudos realizados anteriormente em nosso laboratório, e também no estudo realizado nesta tese de doutorado, a concentração de HQ no ar durante as exposições foi de 0,20 mg/m^3, equivalente a 0,04 ppm, o que é 10 vezes menor do que a concentração máxima permitida para a exposição humana durante um período de 8 horas/dia (TLV-TWA – *time weighted average*) (NIOSH, 1994). Embora não seja possível fazer uma extrapolação direta entre a exposição em animais de experimentação e a exposição humana, acredita-se que os animais foram submetidos a níveis baixos de exposição à HQ, durante o desenvolvimento da AIC.

O modelo experimental para indução de AR é longo, e o modelo de AIC aqui preconizado é um dos que melhores modelos para se estudar AR, pois este modelo mimetiza os mecanismos da gênese e sintomatologia da AR humana (DURIE, FAVA e NOELLE, 1994; BRAND *et al.*, 1996; LUBBERTS e VAN DEN BERG, 2003; AYA *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2011; OKAMOTO *et al.*, 2011; YUE *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013), e aqui optamos por avaliar a sintomalogia e os efeitos das exposições após 28 dias de indução da AIC, baseado em

trabalhos da literatura (BRAND, LATHAM e ROSLONIEC, 2007; BACKSTROM e DAHLGREN; 2008; YUE *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2015).

Os protocolos experimentais foram delineados com três perguntas principais, as quais foram respondidas pelos períodos de exposição à HQ, a saber: se a HQ poderia ser um agente que participa do desenvolvimento e agravamento da AR, assim animais foram expostos à HQ durante todo o período experimental, descrito previamente no protocolo experimental **A**; se a HQ facilitaria os eventos iniciais de indução da AR, envolvidos nos eventos de sensibilização e se esta exposição traria alguma consequência ao final da AIC, e para responder essa pergunta, os animais foram expostos à HQ por 14 dias consecutivos, do 1º até o 14° dia, encerrando as exposições no dia da injeção reforço de colágeno, como já descrito no protocolo experimental **B**; e no terceiro protocolo experimental investigamos se a exposição à HQ poderia alterar a doença já iniciada e estabelecida e, para tanto, os animais foram expostos à HQ na fase final da doença, ou seja por 7 dias consecutivos, do 29º ao 35º dia, de acordo com o que foi descrito no protocolo experimental **C**. Parâmetros clínicos, histológicos e hematológicos e indicadores de inflamação local e sistêmica foram avaliados em todos os protocolos experimentais, de acordo com a literatura que avaliaram estes parâmetros como marcadores da AR (STOLT *et al.*, 2003; WITTE *et al.*, 2005; BACKSTROM e DAHGREN, 2008; KOBAYASHI *et al.*, 2008; MOREIRA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2014) e, na maioria destes parâmetros aqui analisados, os resultados mostraram o papel facilitador da HQ no desenvolvimento e no agravamento da AIC, como discutiremos a seguir.

A evolução ponderal dos animais, ao longo do desenvolvimento da artrite, foi um parâmetro clínico importante em nossas investigações, uma vez que relatos da literatura mostram que a perda de peso é uma das manifestações extra-articulares e sistêmicas na AR (SAAG *et al.*, 1997; PAPADOULOS *et al.*, 2005) e, ainda que, o hábito de fumar contribui para gerar baixos índices de massa corporal em modelos de animais com AIC (MOREIRA *et al.*, 2011). Além disso, AR induzida por adjuvantes e por colágeno, em modelos experimentais, leva à perda de tecido adiposo, associada à inflamação crônica da doença (STOLT *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2008; GOMEZ-SANMIGUEL *et al.*, 2016). Verificamos, neste trabalho, que a exposição ao solvente da HQ e à HQ não alteraram a evolução ponderal na ausência de artrite, e, diferentemente do que foi relatado na literatura, a indução da AIC não alterou o ganho de peso, uma vez que animais expostos à solução salina e com AIC tiveram ganho de peso normal. No entanto, na vigência de artrite, a exposição à HQ durante todo o período de indução e desenvolvimento da doença, bem como quando realizada na fase final da mesma, levou a uma redução no peso dos animais, o que não foi observado nos animais expostos à HQ somente na fase de sensibilização da doença. A perda de peso observada nos animais expostos à HQ nos

protocolos experimentais **A** e **C** foi coincidente com maior pontuação clínica da doença em ambos os casos. Estes resultados enfatizam o efeito prejudicial da associação entre o tabagismo e a AR, como também já foi visto em estudos envolvendo fumantes adultos (CHATKIN *et al.*, 2007). Por outro lado, interessantemente, os animais expostos à HQ somente na fase de sensibilização da doença (grupo experimental **B**) tiveram ganho de peso similar ao observado nos animais expostos à salina ou ao veículo da HQ, e estes mesmos animais receberam pontuação clínica menor do que os animais expostos à HQ dos grupos A e C. Não temos explicação para tal fato, mas é possível que a exposição à HQ cause redução na massa corpórea, ao agravar o processo inflamatório, ou por causar maior dificuldade de locomoção.

Uma vez que AR é caracterizada pela poliartrite periférica, simétrica e a progressão do quadro está associada ao surgimento de deformidades e alterações nas articulações (LIPSKI, 1998; MCINNES e SCHETT, 2011), a análise clínica dos animais foi um parâmetro investigado, seguindo a classificação de pontuação baseada no trabalho de Backstrom e Dahgren (2008), como descrito na metodologia deste trabalho. Vale ressaltar que, o desenvolvimento da AIC é considerado clinicamente significante quando podemos observar aparecimento de edemas em pelo menos um dígito ou pata (HOLMDAHL *et al.*, 1992; BACKSTROM e DAHGREN, 2008). Com base neste parâmetro, concluímos que a exposição à salina, ao veículo da HQ ou à HQ não foram capazes de causar nenhuma alteração clínica nos animais que não foram imunizados com colágeno; que as imunizações com colágeno foram eficazes, sendo que a exposição à HQ, agravou o inchaço e edemas das patas nos 3 grupos experimentais, sendo que as exposições à HQ ao longo de todo o processo da gênese da doença, ou na etapa final da mesma, leva a piora do quadro. Uma vez que aumento dos volumes das articulações dos joelhos, das patas e dos tornozelos são indicativos da inflamação da AR e são frequentemente usados para medir a atividade da doença (NIELSEN *et al.*, 2008), os aspectos de inchaço das patas observados nos resultados deste trabalho são inquestionáveis para mostrar que a exposição à HQ agrava o desenvolvimento da AR provocada pela injeção de colágeno. De acordo com estes resultados, é possível sugerir que a exposição à HQ seja mais relevante para o desenvolvimento e agravamento da AR, do que para os fenômenos envolvidos com a etapa inicial de sensibilização e desafio com o antígeno.

Como já foi bem descrito na Introdução, em doenças autoimunes, como a AR, a autotolerância pode ser quebrada por meio de modificações pós-traducionais, como o processo de citrulinação, no qual ocorre mudança conformacional do aminoácido arginina em citrulina, pela ação da enzima PAD, gerando novas proteínas, como as proteínas/peptídeos cíclicos. Essas

modificações nas proteínas podem gerar novos epítopos levando à formação de novos auto-antígenos, diferentes daqueles quais o organismo tinha aprendido a ser tolerante e a quantificação das proteínas/peptídeos citrulinados cíclicos gerados após citrulinação, mostraram valores preditivos e prognósticos em pacientes em AR (ZHAO, 2008; GYORGI *et al.,* 2011; VALESINI *et al.,* 2015). Assim, neste trabalho consideramos relevante quantificar o anticorpo anti-CCP, como um indicador de diagnóstico da AIC e, de fato, os níveis destes anticorpos estavam aumentados em todos os grupos de animais com AIC, em comparação com os animais sem AIC.

Vale ressaltar que trabalhos da literatura mostraram que a citrulinação pode ser desencadeada pelo cigarro ou por infecções (KLARESCOG *et al.,* 2013). Além disso, foi obervada uma correlação positiva entre o tabagismo e AR soro positiva para ACPAs (KLARESKOG *et al.,* 2006; OLIVER e SILMAN, 2006; MAKRYGIANNAKIS *et al.,* 2008). Outros trabalhos mostraram que, na ausência de AR, o cigarro gerou aumento na expressão da enzima PAD e citrulinação de células do lavado broncoalveolar de fumantes em comparação com não fumantes (MAKRYGIANNAKIS *et al.,* 2008). Adicionalmente, condições de inflamação crônica nos pulmões podem predispor indivíduos susceptíveis a desenvolverem autoanticorpos e posteriormente AR (VALESINI *et al.,* 2015). Soma a estes, o fato de que dentre os mais de 8.000 componentes do cigarro, já sabe-se que a produção de ACPAs ocorre independentemente da ação da nicotina (JIANG *et al.,* 2014). Aqui, observamos que a exposição à HQ durante todo período de indução e desenvolvimento ou na fase final da artrite, elevou os títulos de ACPAs no soro, o que não foi observado nos animais expostos à HQ somente na fase de sensibilização da artrite. Esses resultados corroboram os efeitos de piora dos sintomas clínicos da AIC desencadeados pela exposição à HQ, uma vez que títulos elevados de ACPAs também estão associados com a gravidade da doença e com a posterior destruição articular (CONIGLIARO *et al.,* 2016; NGUYEN e JAMES, 2016). Também é possível sugerir que a exposição à HQ não induz a produção de ACPAs na fase inicial do desenvolvimento e de sensibilização, sugerindo fortemente que a HQ atue em processos pós sensibilização, quer seja como um agente local na AR ou na ativação de células da circulação. Dados não apresentados, mas obtidos durante a realização deste trabalho, mostram que a exposição à HQ não alterou a proliferação de linfócitos do baço, o que corrobora a possível ausência de efeito da HQ na fase de sensibilização ao antígeno.

A literatura mostra leucocitose na fase de agudização da AR (COSTA *et al.,* 1989; MCCUTCHAN e FISHER, 1990; DINARELLO, 2005; BEZERRA *et al.,* 2007; ZHOU *et al.,* 2015), no entanto o efeito não é tão evidente durante a cronificação do processo, como

observamos pelos nossos resultados. Ademais, a exposição à HQ leva a efeitos tóxicos na medula óssea e, consequentemente, redução na mobilização de leucócitos para a circulação. Desta forma, o leucograma é empregado como um dos efeitos biológicos de toxicidade do BZ e da HQ (KETTLE e WINTERBOURN, 1992; MEDINSKY, KENYON and SCHLOSSER, 1995; SNYDER 2002; 2004; PENG *et al.,* 2012). No entanto, é importante ressaltar que este efeito é dependente da dose, do tempo e frequência de exposição (ROSS *et al.,* 1996; ZHAO *et al.,* 2008; KIM *et al.,* 2009; RIBEIRO *et al.,* 2011). Nossos dados anteriores resultantes da exposição à HQ, na mesma dose e o mesmo tempo diário de exposição que os empregados no presente estudo, mas em períodos mais curtos de exposição, não afetaram o leucograma dos animais (MACEDO *et al.,* 2006; 2007; FERREIRA *et al.,* 2007; RIBEIRO *et al.,* 2011; HEBEDA *et al.,* 2012; SHIMADA *et al.,* 2012a,b). Aqui, nossos dados confirmam que embora a exposição à HQ tenha ocorrido por períodos superiores aos realizados nos trabalhos acima citados, não observou-se também alterações de leucograma na ausência da AIC, confirmando, que a dose empregada para exposição à HQ pode ser considerada baixa. A análise do número de leucócitos revelou que a AIC induziu aumento de neutrófilos na circulação em todos os grupos de animais analisados nos diferentes delineamentos de exposição à solução salina, mostrando que a neutrofilia está presente em estágios avançados da doença, e que as exposições não modificaram este perfil de mobilização neutrofílica para circulação. Linfocitose somente foi observada em animais expostos à HQ durante a fase de sensibilização e desafio ao colágeno. Acreditamos que esta redução não reflita prejuízos da mobilização destas células da medula óssea para a circulação, mas sim a distribuição alterada dos linfócitos no organismo, e sua maior localização em tecidos linfóides primários e secundários. No entanto, esta hipótese precisa ser confirmada.

O líquido sinovial atua como protetor e agente lubrificador das articulações, e na ausência de AR, ou seja, em articulações normais, é composto por um a pequeno número de linfócitos, e apenas poucos neutrófilos, monócitos e macrófagos. Durante a AR, há aumento no número de leucócitos no líquido sinovial, sendo que os linfócitos são encontrados principalmente nos estágios iniciais da doença (TRAMPUZ *et al.,* 2004). Nossos resultados mostraram, de fato, que a AIC foi caracterizada pela alteração do perfil de células no líquido sinovial em comparação com os animais sem AIC, e que a exposição à HQ, em todos os protocolos experimentais realizados, aumentou o influxo de células nos líquidos sinoviais, uma vez que em todos os grupos de animais sem AIC, o número de células no líquido sinovial era baixo ou nulo. No entanto, a resposta foi menos acentuada, a exemplo do que foi descrito para a pontuação clínica obtida pela avaliação clínica, quando os animais foram expostos à HQ somente na fase de sensibilização e indução da artrite (no grupo experimental **B**). Nos

protocolos experimenais realizados por toda fase de desenvolvimento e agravamento da doença, os níveis de células no líquido sinovial aumentaram consideravelmente após as exposições à HQ. Desta forma, a análise deste parâmetro corroborou a importância da ação da HQ para o processo de desenvolvimento e agravamento da AR no modelo de AIC em ratos *Wistar*.

Sabidamente, o influxo leucocitário nas cavidades sinoviais, vem como a ativação de células residentes, desencadeia a secreção de substâncias químicas inflamatórias que irão mediar a resposta da AR, e o aumento da concentração destes mediadores está correlacionado diretamente com a gravidade da doença. Dentre estes mediadores, podemos citar diversas citocinas que possuem papéis centrais na patogênese da AR, tais como TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-17, entre outras (OSPELT, 2004; FIRESTEIN, 2004; 2005; RENGEL, OSPELT e GAY, 2007; ZHANG *et al.*, 2011; DA ROCHA *et al.*, 2012; PINTO *et* al., 2015; NOAK e MIOSSEC, 2017). Apesar disso, não foi observado aumento nos níveis dessas citocinas somente pela indução da AIC, exemplificada pela exposição à salina. Diferentemente, observamos um perfil de secreção das citocinas IL-6 e IL-1β após a exposição à HQ, nos 3 protocolos experimentais, o que condiz com a maior atividade da doença. Apesar de se saber que o TNF- α é uma citocina chave envolvida na patogênese da AR (NOAK e MIOSSEC, 2017), é importante salientar que o TNF-α não foi detectado em nenhuma amostra de líquido sinovial dos grupos estudados, e uma possível explicação para tal fato pode ser que, como visto por Tak e Bresnihan (2000), o TNF-α está presente principalmente nas fases iniciais da AR e com o avanço da doença sua concentração local na AR diminui.

A literatura também mostra uma correlação entre a secreção de citocinas no local da inflamação e via sistêmica (NAKAHAMA *et al.*, 2011) e aqui nós vimos que apenas a exposição à HQ gerou uma tendência de aumento na concentração de IL-1β e de TNF-α no soro de animais com AIC.

Sabe-se também que além da ação de células do sistema imune que migram para o sítio da inflamação, a produção de mediadores inflamatórios também ocorre em células residentes da cavidade articular, como os sinoviócitos do tipo B (FIRESTEIN, 1996; KOJIMA et al., 2002; MIRANDA-CARÚS, et al., 2004). Desta forma, resolvemos investigar o papel da exposição à HQ sobre a capacidade de secreção de sinoviócitos isolados da sinóvia. E de acordo com os resultados obtidos, observamos que a HQ também desempenhou uma ação direta sobre essas células, uma vez que houve aumento nos níveis de TNF-α e IL-1β em sinoviócitos isolados das sinóvias de animais com AIC e expostos à HQ.

Como já foi salientado na Introdução, muitas das lesões que caracterizam a AR afetam as membranas sinoviais, sendo que durante o quadro de AR, as membranas sinoviais passam

por alterações morfológicas e funcionais importantes, ocorrendo principalmente infiltração de células do sistema imune inato e adaptativo ao espaço articular, proliferação e hiperplasia dos sinoviócitos tipo B, além de alterações vasculares, como neovascularizações, aumento da vascularidade e degradação da matriz (FIRESTEIN, 1996; BURMESTER *et al.*, 1997; FOX, 1997; OSPELT, 2004; FIRESTEIN, 2009; PAP e GAP, 2009; BARTOK e FIRESTEIN, 2010; YANG e KARIN, 2014; REIS *et al.*, 2015; CHIMENTI *et al.*, 2015). Frente a estas informações e após as análises histológicas das membranas sinoviais, os nossos resultados mostraram que somente na vigência da AIC ocorreram alterações na estrutura e na composição das membranas sinoviais, e estas alterações foram muito mais evidentes e exacerbadas somente após a exposição à HQ, o que é mais uma evidência da toxicidade da HQ no modelo de AIC. Uma possível hipótese é que a HQ, por ser um componenente do cigarro com grande atividade pró-oxidativa, gere estresse oxidativo localmente na sinóvia, e assim contribua para o agravamento da doença. Mas são necessários estudos mais aprofundados para confirmar essa suposição.

Em doenças crônicas, nas quais as lesões teciduais são persistentes, como a AR, há deposição excessiva de colágeno nas articulações, resultante da ação simultânea de sinoviócitos, macrófagos e fibroblastos, que produzem fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que estimulam a síntese de colágeno e em estágios mais avançados da doença, sendo que essa deposição leva destruição cartilaginosa e óssea (ROBBINS; COTRAN, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho vão ao encontro com essas informações, uma vez que a exposição à HQ levou a maior deposição das fibras de colágeno e a um rearranjo dessas fibras nas sinóvias dos animais com AIC do que as demais exposições. Do exposto, podemos supor uma ação direta da HQ sobre os sinoviócitos e também sobre a secreção e liberação de mediadores inflmatórios liberados no processo inflamatório da AR. Estudos estão sendo realizados no laboratório para avaliar esta hipótese.

Uma grande quantidade de leucócitos foi detectada na membrana e no líquido sinovial de animais expostos à HQ, representado principalmente por neutrófilos. Neutrófilos são células de vida-curta no sangue, as quais são as primeiras células a migrarem para os sítios locais de inflamação, para fagocitar e eliminar os agentes nocivos. Contudo, o influxo exacerbado e contínuo de neutrófilos no tecido inflamado danifica o tecido, através de ações de enzimas proteolíticas liberadas de grânulos intracelulares, por mecanismos de estresse oxidativo, causados por espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) e pela ação de NETs (EDWARDS e HALLETT, 1997; CASCÃO *et al.*, 2010). Os neutrófilos tornam-se ativados no líquido sinovial, sofrem desgranulação e e liberam ROS, RNS, citocinas e eicosanóides no líquido sinovial ou diretamente na superfície articular. A ativação de neutrófilos também

contribuiu para a proliferação e invasão dos sinoviócitos (EDWARDS e HALLETT, 1997; CROSS *et al.,* 2005; CASCÃO *et al.,* 2010). Aqui, observamos nos três protocolos experimentais avaliados, que a exposição à HQ aumentou a proliferação de sinoviócitos, detectada por uma maior expressão de CD90 (Thy-1), uma glicoproteína de superfície celular ancorada por glicosilfosfatidilinositol (GPI), que é altamente expressa na sinóvia de pacientes com AR (FUELDNER *et al.,* 2012; BRADLEY *et al.,* 2013).

O papel da HQ e de seus metabólitos na ativação de neutrófilos ainda precisa ser melhor elucidado. Contudo, dados anteriores do nosso grupo mostraram que a exposição *in vivo* à HQ aumentou a expressão de integrinas β2 e β3 e de PECAM-1 em neutrófilos circulantes de ratos, mostrando que a exposição à HQ ativa neutrófilos circulantes no sangue (RIBEIRO *et al.,* 2011). Consequentemente, nós mostramos que a exposição à HQ leva a uma maior infiltração de neutrófilos na cavidade articular, e assim, que neutrófilos são alvo da exposição *in vivo* à HQ, o que nos leva a supor que que a exposição à HQ pode exacerbar o *priming* de neutrófilos circulantes, detectados no sangue de pacientes com AR (WRIGHT *et al.,* 2014).

Recentemente, estudos têm apontado para o papel da expressão do receptor AhR em células Th17 em modelos de AIC. Animais $AhR^{-/-}$ são resistentes à AIC e a deficiência de AhR, especialmente em células T leva à supressão do desenvolvimento de AIC (NAKAHAMA *et al.,* 2011). Além disso, AhR induz a diferenciação de Th17, por inibir negativamente alguns reguladores da diferenciação de células Th17, tais como STAT1 e STAT5, e/ou por se ligar ao promotor de IL-17 (KIMURA *et al.,* 2008). Como já salientado na Introdução, a IL-17 é uma citocina pró-inflamatória envolvida em doenças autoimunes, secretada principalmente por células Th17, mastócitos e células mielóides (GAFFEN, 2008; HUEBER *et al.,* 2010; HUIZINGA *et al.,* 2010). A IL-17 é encontrada na sinóvia e induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias por condrócitos e fibroblastos sinoviais, além de ter importante papel na osteoclastogênese e na destruição articular (SATO *et al.,* 2006; VAN DEN BERG and MIOSSEC, 2007; BENEDETTI e MIOSSEC, 2014; FISCHER *et al.,* 2015). Nossos dados mostram que a expressão de AhR e a secreção de IL-17 nas membranas sinoviais dos animais com AIC estavam aumentas nos 3 protocolos experimentais aqui realizados. Então, estes dados sugerem maior ativação de células secretoras de IL-17 após exposição à HQ. Além disso, esses resultados corroboraram com a maior expressão de ROR nas sinóvias de animais expostos à HQ, um fator de transcrição conhecido por ativar a diferenciação de células Th17 e a posterior secreção de IL-17 (YANG *et al.,* 2008).

Por tanto, com base nestes resultados, nós hipotetizamos que a exposição *in vivo* à HQ também pode contribuir para a ativação de células Th17 via AhR. Mas ainda não existem dados na literatura descrevendo as ações da HQ sobre a polarização de células Th17 para dar suporte

para nossos resultados. Além disso, o papel da HQ e de metabólitos do benzeno como possíveis ligantes para induzir a expressão de AhR ainda não estão elucidados (YOON *et al.*, 2002; ABIKO *et al.*, 2016). Pela primeira vez, nós mostramos os efeitos diretos da HQ na expressão de AhR e na secreção de IL-17, tanto após exposição *in vivo*, como após exposição *ex vivo*. A expressão de AhR em esplenócitos induzida pela exposição *in vitro* à HQ foi similar à expressão promovida pelo PCB 126 (*dioxin-like 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl*), que é um ligante clássico de AhR, e em ambos os casos, a expressão de AhR foi inibida pelo tratamento dos esplenócitos com um antagonista de AhR. Assim, nossos dados mostram claramente a ação direta da HQ na expressão de AhR e esses efeitos também são estendidos à secreção de IL-17 por células do sistema imune. Por isso, supomos que a via AhR/IL-17 ativada pela exposição à HQ pode estar relacionada com o desenvolvimento e o agravamento da AIC em ratos.

Sabe-se que a HQ quando é adminstrada *in vivo*, após ser metabolizada, é transportada para medula óssea, onde pode ser oxidada em quinonas altamente tóxicas por processo de auto-oxidação ou pela ação da enzima MPO (SMITH, 1996; GASKELL, MCLUCKIE e FARMER, 2005; SCHNATTER *et al.*, 2012), e por tal motivo ainda não é possível distinguir seus efeitos de toxicidade e de seus metabólitos e com base nos presentes resultados obtidos neste trabalho, é de fundamental importância compreender e elucidar os efeitos decorrentes da HQ e de seus metabólitos sobre as respostas imunes celulares e humorais que ocorrem durante a AR. Do exposto, podemos afirmar que a exposição à HQ, agrava a AIC, sendo que os efeitos foram menos acentuados na exposição durante a fase de sensiblização. Em contrapartida, a exposição na última semana de desenvolvimento da AIC, levou a uma sintomatologia mais pronunciada, mostrando que a HQ age principalmente após o início do desenvolvimento da doença.

Dessa forma, como já foi mostrado previamente em nosso grupo que a exposição *in vivo* à HQ ativa neutrófilos circulantes, mesmo na ausência de qualquer estímulo inflamatório (RIBEIRO *et al.*, 2011), nós acreditamos que a HQ contribui para o desenvolvimento e agravamento da AR ao ativar resposta imune pela indução do influxo de neutrófilos na cavidade articular e pela posterior ativação de AhR e ativação de células secretoras de IL-17.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho mostram que:

- a exposição à HQ a ratos *Wistar* machos (25ppm, 1h/dia) agravou o desenvolvimento da CIA, sendo que as exposições durante todo o curso da doença ou na fase final da mesma levou a sintomas mais graves;

- o agravamento da CIA causada pela exposição à HQ foi visualizada pelo inchado e edemas das patas, perda de peso, aumento de proteínas citrulinadas no soro e citocinas inflamatórias no líquido sinovial, nas exposições contínua e na última etapa da doença;

- a fisiopatologia das articulações foi caracterizada pelo aumento de citocinas inflamatórias, sendo que a exposição à HQ induziu aumento, em especial, de IL-6, aumento na deposição de colágeno, aumento na proliferação de sinoviócitos e no influxo de células inflamatórias;

- a exposição à HQ levou à maior infiltração, na articulação, de células AhR+, ROR+ e IL-17+, sugerindo que a exacerbação desta via seja um mecanismo importante na ação da HQ;

- o tratamento *in vitro* com HQ induziu a expressão de AhR e IL-17 em esplenócitos, que foi revertida pelo antagonista de AhR, confirmando a possível participação desta via na ação da HQ.

Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho nos permitem concluir:

- que, a HQ como um importante componente do cigarro, exerce um papel como facilitador do desenvolvimento e agravamento da AR, pelo modelo de AIC em ratos *Wistar*.

- uma ação prejudicial da HQ e um mecanismo de toxicidade inéditos.

Assim, esses resultados contribuem para a melhor compreensão do papel de poluentes ambientais, como o cigarro, na etiopatogenia da AR e trazem novas evidências sobre os mecanismos de ação de fatores ambientais pró-oxidativos em doenças relacionadas com o sistema imune.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIKO, Y. et al. Quinone-mediated induction of cytochrome P450 1A1 in HepG2 cells through increased interaction of aryl hydrocarbon receptor with aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. **J. Toxicol. Sci.,** v. 41, p. 775–781,2016.

ADACHI, M. et al. Cigarette smoke condensate extracts induce IL-1-beta production from rheumatoid arthritis patient-derived synoviocytes, but not osteoarthritis patient-derived synoviocytes, through aryl hydrocarbon receptor-dependent NF-kappa-B activation and novel NF-kap. **J. Interferon Cytokine Res.,** v. 33, p. 297–307, 2013.

AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS. Encontro vai debater saúde dos trabalhadores em postos de gasolina. Curitiba, Paraná, 06 de dezembro de 2005.
Disponível em <http://www.aen.pr.gov.br/modules/noticias/article.php?storyid=16903&tit=Encontro-vai-debater-saude-dos-trabalhadores-em-postos-de-gasolina>

AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO E GÁS NATURAL. Portaria nº 309/2001. Regulamento Técnico ANP nº 05/2001.

AFRIDI, H. I.; FARAH, N. T.; KAZI, T., G.; BRABAZON, D.; Estimation of toxic elements in the samples of different cigarettes and their effect on the essential elemental status in the biological samples of Irish smoker rheumatoid arthritis consumers. **Environ. Monit. Assess.,** v. 187, p. 157, 2015.

AHO, K.; HELIOVAARA, M.; KNEKT, P.; et al. Serum immunoglobulins and the risk of rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.,** v.56, p. 351-356, 1997.

AKDIS, M. et al. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor beta, and TNF-alpha: Receptors, functions, and roles in diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.,** v. 138, p. 984–1010, 2016.

ALETAHA D. et al. Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Againist Rheumatism collaborative initiative. **Arthritis Rheum.,** v. 62, p. 2569–2581, 2010.

ALONZI, T.; FATTORI, E.; LAZZARO, D.; COSTA, P.; PROBERT, L.; KOLLIAS, G.; DE BENEDETTI, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. **J. Exp. Med.,** v. 187, p. 461-468, 1998.

American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines: Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. **Arthitis Rheum.,** v. 46, p. 328-46, 2002.

ARBUCKLE, M. R. et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. **N. Engl. J. Med.,** v.349, p. 1526-1533, 2003.

ARNETT, F. C. et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.,** v.31, p. 315-324, 1988.

ARNOLD, S. M.; ANGERER, J.; BOOGAARD, P. J.; et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. **Crit. Rev. Toxicol.,** v. 43, p. 119-153, 2013.

AYA, K. et al. NF-(kappa)B-inducing kinase controls lymphocyteand osteoclast activities in inflammatory arthritis. **J. Clin. Invest.,** v. 115, p. 1848-1854, 2005.

BAAN, R.; GROSSE, Y.; STRAIF, K.; et al. Special report: policy a review of human carcinogens-part f: chemical agents and related occupations. **Lancet Oncol.,** v. 10, p. 1143-1144, 2009.

BACKSTROM, N. F.; DAHLGREN, U. I. H. Induction of experimental arthritis in Balb⁄C miceby inclusion of a foreign protein in the collagen inoculum. **Scand. J. Immunol.,** v. 67, p. 322–328, 2008.

BAHADAR, H.; MAGBOOL, F.; MOSTAFALOU, S.; BAEERI, M.; GHOLAMI, M.; GHAFOUR-BOROUJERDI, E.; ABDOLLAHII, 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.,** p. 1-9; 2015.

BANSBACK, N.; MARRA, C. A.; FINCKH, A.; ANIS, A. The economics of treatment in early rheumatoid arthritis. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.,** v. 23, p. 83-92, 2009.

BARTOK, B.; FIRESTEIN, G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. **Immunol. Rev.,** v. 233, n.1, p. 233-255, 2010.

BATSALOVA, T et al. Comparative analysis of collagen type II-specificimmune responses during development ofcollagen-induced arthritis in two B10 mouse strains. **Arthritis Res. Ther.,** v.14, p. 1-13, 2012.

BENNIKE, T.; AYTURK, U.; HASLAUER, C. M.; FROEHLICH, J. W.; PROFFEN, J. W.; BARNABY, O.; BIRKELUND, S.; MURRAY, M. M.; WARMAN, M. L.; STENSBALLE, A.; STEEN, H. A Normative Study of the Synovial Fluid Proteome from Healthy Porcine Knee Joints. **J. Proteome Res.,** v. 13, p. 4377-4387, 2014.

BÉLISLE, J.; ZIGRAS, T.; COSTANTINO, S.; CARTIER, R.; BUTANY, J.; WISEMAN, P. W.; LEASK, R. L. Second harmonic generation microscopy to investigate collagen configuration: a pericarditis case study. **Cardiovasc. Pathol.,** v. 19, n. 4, p. 125-128, 2010.

BELLUCI, E.; TERENZI, R.; LA PAGLIA, G. M. C.; GENTILSECHI, S.; TRIPOLI, A.; TANI, C.; ALUNNO, A. One year in review 2016: pathogenesis of rheumatoid arthritis.**Clin. Exp. Rheumatol**., v. 34, p. 793-801, 2016.

BESSIS, N.; DECKER, P.; ASSIER, E.; SEMERANO, L.; BOISSIER, M. C. Arthritis models: usefulness and interpretation. **Semin. Immunopathol.,** v. 39, p. 469-86, 2017.

BEVAART, L.; VERVOORDELDONK, M J.; TAK, P. P. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: how does it relate to rheumatoid arthritis? **Arthritis Rheum.,** v. 62, n. 8, p. 2192-22-5, 2010.

BEZERRA, M. M.; BRAIN, S. D.; GIRÃO, V. C.; GREENACRE, S.; KEEBLE, J.; ROCHA, F. A. Neutrophils-derived peroxynitrite contributes to acute hyperalgesia and cell influx in zymosan arthritis. **N. Schmi. Arch. Pharmacol.,** v. 374, n. 4, p. 265-273, 2007.

BOMBARA, M. P.; WEBB, D. L.; CONRAD, P.; MARLOR, C. W.; SARR, T.; RANGES G. E.; AUNE, T. M.; GREVE, J. M.; BLUE, M. L. Cell contact between T cells and synovial fibroblasts causes induction of adhesion molecules and cytokines. **J. Leukoc. Biol**., v. 54, n. 5, p. 399-406, 1993.

BONNESEN, C.; EGGLESTON, I. M.; HAYES, J. D. Dietary indoles and isothiocyanates tha are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. **Cancer Res.,** v. 61, p. 6120-6130, 2001.

BRADLEY, J. E. et al. Effect of the GPI anchor of human Thy-1 on antibody recognition and function. **Lab. Invest.,** v., 93, p. 365–374, 2013.

BRAND, D. D.; MARION, T. N.; MYERS, L. K.; et al. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen induced arthritis: a comparison of susceptible and non susceptible strains. **J. Immunol.,** v. 157, p. 5178, 1996.

BRAND, D.A.; LATHAM, K. A.; ROSLONIEC, E. F. Collagen-induced arthritis. **Nature Protocols**, v.2, n.5, p.1269-1275, 2007.

BREBAN, M. A. et al. Influence of the bacterial flora on collagen-induced arthritis in susceptible and resistant strains of rats. **Clin .Exp. Rheumatol.,** v. 11, p. 61-64, 1993.

BRENNAN, F. M.; MCINNES, I. B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.,** v. 118, n. 11, p. 3537–45, 2008.

BUGATTI, S. et al. B cells in rheumatoid arthritis. **Autoimmun. Rev.,** v. 7, n. 2, p. 137–142, 2007.

BURMESTER, G.R.; STUHLMULLER, B.; KEYSZER, G.; KINNE, R. W. Mononuclear phagocytes and rheumatoid synovitis. Mastermind or workhorse in arthritis? **Arthritis Rheum.,** v. 40, p. 5–18, 1997.

BURMESTER, G.R.; FEIST,, E.; DORNER, T. Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v. 10, p. 77-88, 2014.

BURBACH, K. M.; POLAND, A.; BRADFIELD, C. A. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 89, p. 1992.

BYSTROM, J.; CLANCHY, F. I.; TAHER, T. E.; MANGAT, P.; JAWAD A. S.; WILLIAMS, R. O.; MAGEED, R. A. TNFalpha in the regulation of Treg and Th17 cells in rheumatoid arthritis and other autoimmune inflammatory diseases. **Cytokine,** 2016.

CAO, S. et al. Altered cytokine profiles of human retinal pigment epithelium: oxidant injury and replicative senescence. **Mol. Vis.,** v.19, p. 718-728, 2013.

CARBONELL, J.; COBO, T.; BALSA, A.; DESCALZO, M. A.; CARMONA, L.; SERAP Study Group. The incidence of rheumatoid arthritis in Spain: results from a nationwide primary care registry. **Rheumatology (Oxford),** v. 47, p. 1088–1092, 2008.

CASCÃO, R. et al. Neutrophils in rheumatoid arthritis: More than simple final effectors. **Autoimmun. Rev.,** v. 9, p. 531–535, 2010.

CASSIM, B.; MODY, G.; BHOOLA, K. D. Kallikrein cascade and cytokines in inflamed joints. **Pharmacol. Ther.,** v. 94, n.1-2, p. 1-34, 2002.

CETESB. Ficha de Informação de Produto Químico: Hidroquinona. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=HIDROQUINONA&cod=2662>.

CHANDRASEKHAR, S.; HARVEY, A. K.; HRUBEY, P. S.; BENDELE, A. M. Arthritis induced by interleukin-1 is dependent on the site and frequency of intraarticular injection. **Clin. Immunol. Immunopathol.,** v. 55, p. 382–400, 1990.

CHATKIN, R.; CHATKIN, J. M. Tabagismo e variação ponderal: a fisiopatologia e a genética podem explicar esta associação. **J. Bras. Pneumol.,** v. 33, p. 712-119, 2007.
CHEN, C.; CANO, M.; WANG, J. J.; LI, J.; HUANG, C.; YU, Q.; HERBERT, T. P.; HANDA, J. T.; ZHANG, S. X. Role of unfolded protein response dysregulation in oxidative injury of retinal pigment epithelial cells. **Antioxid. Redox Signal.,** v. 20, n. 14, p. 2091-2106, 2014.

CHENG, L.; QIAN, L.; TAN, Y.; WANG, G-S.; LI, X-M.; LI, X-P.; LUO, C-Y. Unbalanced expression of aryl hydrocarbon receptor in peripheral blood CCR6+CD4+ and CD4+CD25+T cells of rheumatoid arthritis. **Rev. Bras. Reumatol**., v. 5, n. 3, p. 190-196, 2017.

CHIB, M.; MASIRONI, R. Toxic and trace-elements in tobacco and tobacco-smoke.**Bull WHO**, v. 70, p. 269–275, 1992.

CHIMENTI, M. S.; TRIGGIANESE, P.; CONIGLIARO, P.; CANDI, E.; MELINO, G.; PERRICON, R. The interplay between inflammation and metabolism in rheumatoid arthritis. **Cell Death and Disease,** v.6, p.e1887, 2015.

CHO, M. L.; CHO, C. S.; MIN, S. Y.; KIM, S. H.; LEE, S. S.; KIM, W. U.; MIN, D. J.; MIN, J. K.; YOUN, J.; HWANG, S. Y.; PARK, S. H.; KIM, H. Y. Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.,** v. 46, n. 5, p. 1202-1209, 2002.

CHO, J. Y. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. **Med. Inflamm.,** p.1-11, 2008.

CHOI, J. M.; et al. Hydroquinone, a major component in cigarette smoke, reduces ifn-γ production in antigen-primed lymphocytes. **Arch. Pharmac. Res.,** v.31, n.3, p.337-341, 2008.

CHOY, E. H.; PANAYI, G. S. Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.,** v. 344, p. 907-916, 2001.

CHUNG, C. B.; BOUCHER, R.; RESNICK, D. MR imaging of synovial disorders of the knee. **Semin. Musculos. Radiol.,** v. 13, n. 4, p. 303-325, 2009.

CHUNG, S. J.; KWON, Y. J.; PARK, M. C.; PARK, Y. B.; LEE, S. K. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. **Yonsei Med. J.,** v. 52, n. 1, p. 113-120, 2011.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatol.,** v. 51, p. 3-11, 2012.

COHEN, S.; HURD, E.; CUSH, J.; SCHIFF, M.; WEINBLATT, M. E.; MORELAND, L. W.; KREMER, J.; BEAR, M. B.; RICH, W. J.; McCABE, D. Treatment of rheumatoid arthritis with anakinra, a recombinant human interleukin-1 receptor antagonist, in combination with methotrexate: results of a twenty-four-week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis Rheum.,** v. 46, p. 614–624, 2002.

CONIGLIARO, P. et al. Autoantibodies in inflammatory arthritis. **Autoimmun. Rev.,** v. 15, p. 673-683, 2016.

COSTA, G.; ALLEN, J. B;, WAHL, S. M. Bacterial cell wall induced chronic inflammation is associated with increased CSF production and leukocytosis. **Cytokine,** v. 1., p. 126–131, 1989.

COSTENBADER, K. H. et al. Smoking intensity, duration, and cessation, and the risk of rheumatoid arthritis in women. **Am. J. Med.,** v. 119, p. 503-511, 2006.

CRISWELL, L.A., et al. Smoking interacts with genetic risk factors in the development of rheumatoid arthritis among older caucasian women. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 65, p. 1163-1167, 2006.

CROFFORD, L. J.; WILDER, R. L.; RISTIMAKI, A. P. Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. **J. Clin. Invest.,** v. 93, n. 3, p. 1095-1101, 1994.

CROSS, M., SMITH, E., HOY, D., et al.. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. **Ann Rheum Dis.,** v. 73, n. 7, p. 1316-1322, 2014.

CSALARI, J.; SZANTAI, K. Transfer rate of cadmium, lead, zinc and iron from the tobacco-cut of the most popular Hungarian cigarette brands to the combustion products. **Acta. Aliment.,** v. 31, p. 279–288, 2002.

Da ROCHA, L. F.; DUARTEN, A.; DANTAS, A. T.; MARIZ, H. A.; PITTA IDA, R.; GALDINO, S. L., et al. Increased serum interleukin 22 in patients with Rheumatoid arthritis and correlation with disease activity. **J. Rheumatol.,** v. 39, p. 1320-1325, 2012.

DAYER, J. M.; BRESNIHAN, B. Targeting interleukin-1 in the treatment of rheumatoid arthritis. Arthrittis Rheum., v. 46, p. 574-578.

DEANE, K. D.; NORRIS, J. M.; HOLERS, V. M. Preclinical rheumatoid arthritis: identification, evaluation, and future directions for investigation. **Rheum. Dis. Clin. North. Am.,** v. 36, p. 213-241, 2010.

DECAPRIO, A. P. The toxicology of hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure.**Crit. Rev. Toxicol.,** v. 29, n. 3, p. 283–330, 1999.

DEISINGER, P. J.; HILL, T. S.; ENGLISH, J. C.. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. **J. Toxicol Environm. Health,** v. 47, n. 1, p. 31-46, 1996.

DELRIO, A. N.; FADDA, M. Ultrastructural characteristics of the human synoviocytes. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.,** v. 66, n. 3, p. 209-214, 1990.

DEMORUELLE, M. K.; PARISH, M. C.; DERBER, I. A.; KOFENBACH, J. R.; HUGHES-AUSTIN, J. M.; WEISMAN, M. H.; et al. Performance of anti-cyclic citrullinated peptide assays differs in subjects at increased risk of rheumatoid arthritis and subjects with established disease. **Arthritis Rheum.,** v. 65, p. 2243-2253, 2013.

De RYCKE, L.; NICHOLAS, A. P.; CANTAERT, T.; KRUITHOF, E.; ECHOLS, J. D.; VANDEKERCKHOVE, B.; et al. Synovial intracellular citrullinated proteins colocalizing with peptidyl arginine deiminase as pathophysiologically relevant antigenic determinants of rheumatoid arthritis-specific humoral autoimmunity. **Arthritis Rheum.,** v. 52, p. 2323–2330, 2005.

De ROOY, D. P.; van NIES, J. A.; KAPETANOVIC, M. C.; KRISTJANSDOTTIR, H.; ANDERSSON, M. L., et al. Smoking as a risk factor for the radiological severity of rheumatoid arthritis: a study on six cohorts. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 73, p. 1384–1387, 2014.

De VRIES, R. Genetics of rheumatoid arthritis: time for a change! **Curr. Opin. Rheumatol.,** v. 23, n. 3, p. 227–232, 2011.

DIMITROVA, N. D.; KOSTADINOVA, R. Y.; MARINOVA, S. N.; POPOV, T. A.; PANEV, T. I. Specific immune responses in workers exposed to benzene. **Inter. Immunopharmacol.;** v. 5, n. 10, p. 1554-1559, 2005.

DINARELLO, C. A. Blocking IL-1 in systemic inflammation. **J. Exp. Med.,** v. 201, n. 9, p. 1355-1359, 2005.

DOMAGALA-KULAWIK, J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. **J. Physiol. Pharmacol.,**. v. 6, p. 19-34, 2008.

DRAGAN, Y. P.; SCHRENK, D. Animal studies addressing the carcinogenicity of TCDD (or related compounds) with an emphasis on tumour promotion. **Food Addit. Contam.,** v. 17, p. 289-302.

DREIER, R..; WALLACE, S.; FUCHS, S.; BRUCKNER, P.; GRÄSSEL, S. Paracrine interactions of chondrocytes and macrophages in cartilage degradation: articular chondrocytes provide factors that activate macrophage-derived pro-gelatinase B (pro-MMP-9). **J. Cell Sci.,** v. 114, p. 3813-3822, 2001.

EASTMOND, D. A.; SCHULER, M.; FRANTZ, C.; CHEN, H.; PARKS, R.; WANG, L.; HASEGAWA, L. Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans. **Res. Rep. Health Eff. Inst.,** v. 103, p. 1-68, 2001.

DURIE, F. H.; FAVA, R. A.; NOELLE, R. J. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. **Clin. Immunol. Immunopathol.,** v.73, n. 1, p. 11-18, 1994.

EC, REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30 November 2009 on cosmetic products, 2009.

EDWARDS, S. W.; HALLETT, M. B. Seeing the wood for the trees: the forgotten role of neutrophils in rheumatoid arthritis. **Immunol. Today,** v. 18, p. 320-324, 1997.

EMA, M.; SOGAWA, K.; WATANABE, N., et al. cDNA cloning and structure of mouse putative Ah receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 184, p. 246-253, 1992.

ESPINOSA-HEIDMANN, D. G. et al. Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.,** v. 47, n. 2, p. 729-737, 2006.

FAN, Z.; YANG, H.; BAU, B.; SODER, S.; AIGNER, T. Role of mitogen-activated protein kinases and NFkappaB on IL-1beta-induced effects on collagentype II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human chondrocytes. **Rheumatol. Int.,** v. 26, n. 10, p. 900-903, 2006.

FEARON, U.; CANAVAN, M.; BINIECKA, M.; VEALE. Hypoxia, mitochondrial dysfunction and synovial invasiveness in rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v. 12, p. 385-397, 2016.

FELDMAN, M.; BRENNA, F. M.; MAINI, R. N. Rheumatoid arthritis. **Cell,** v. 85, n.3, p. 307-310, 1996a.

FELDMAN, M.; BRENNA, F. M.; MAINI, R. N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 14, p. 397-440, 1996b.

FERREIRA, A. et al. Exposição a hidroquinona e ao fenol sobre a resposta inflamatória pulmonar induzida por bactéria. **Braz. J. Pharmacol. Sci.,** v.43, n.3, p.455-464, 2007.

FIOCCO, U. et al. Co-stimulatory modulation in rheumatoid arthritis: the role of (CTLA4-lg) abatacept. **Autoimmun. Rev.,** v. 8, p. 76, 82, 2008.

FISCHER, J. A. A.; AXEL, J.; HUEBER, S. W.; GALM, M.; BAUM, W.; KITSON, C.; AUER, J.; LORENZ, S. H.; MOELLEKEN, J.; BADER, M.; TISSOT, A. C.; TAN, S.; SEEBER, S.; SCHETT, G. Combined Inhibition of Tumor Necrosis Factor and Interleukin-17 as a Therapeutic opportunity in Rheumatoid Arthritis development and characterization of a novel bispecific antibody. **Arthritis and Rheumatol**., v. 67, n. 1, p. 51-62, 2015.

FIRESTEIN, G. S. INVASIVE FIBROBLAST-LIKE SYNOVIOCYTES IN RHEUMATOID ARTHRITIS. **Arthritis Rheum.,**, v. 39, n. 11, p. 1781-1790, 1996.

FIRESTEIN, G. S. Rheumatoid synovitis and pannus, in: J.H. Klippel, P.A. Dieppe (Eds.), **Rheumatology**, Mosby, London, p. 5/ 13.1– 5/13.5, 1997.

FIRESTEIN, G. S. 2004. The T cell cometh: interplay between adaptive immunity and cytokine networks in rheumatoid arthritis. **J. Clin. Invest.,** v. 114, p. 471-474, 2004.

FIRESTEIN, G. S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **J. Clin. Rheumatol.,** v. 11, p. 39-44, 2005.

FIRESTEIN, G. S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein, GS.; Budd, RC.; Harris, T.; McInnes, IB.; Ruddy, S.; Sergent, JS., editors. **Kelly's Textbook of Rheumatology**. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; p. 1035-1086, 2009.

FOULQUIER, C., et al. Peptidyl arginine deiminase type 2 (PAD-2) and PAD-4 but not PAD-1, PAD-3, and PAD-6 are expressed in rheumatoid arthritis synovium in close association with tissue inflammation. **Arthritis Rheum.,** v. 56, p. 3541-3553, 2007.

FOX, D. A. The role of T cells in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis: new perspectives. **Arthritis Rheum.,** v. 40, p. 598–609, 1997.

FUELDNER, C. et al. Identification and evaluation of novel synovial tissue biomarkers in rheumatoid arthritis by laser scanning cytometry. **Arthritis Res. Ther.,** v. 14, p. 8, 2012.

FUJI-KURIYAMA, Y.; EMA, M.; MIURA, J.; SOGAWA, K. Ah receptor: a novel ligand-activated transcription factor. **Exp. Clin. Immunogenet.,** v. 1, p. 65-74, 1994.

FUNATAKE, C. J.; MARSALL, N. B.; STEPPAN, L. B., et al. Cutting edge: activation of the aryl hydrocarbon receptor by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin generates a population of CD4+ CD25+ cells with characteristics of regulatory T cells. **J. Immunol.,** v. 175, p. 4184-4188, 2005.

GABAY, C.; MARINOVA-MUTAFCHIEVA, L.; WILLIAMS, R. O.; GIGLEY, J. P.; BUTLER, D. M.; FELDMANN, M.; AREND, W. P. Increased production of intracellular

interleukin-1 receptor antagonist type I in the synovium of mice with collagen-induced arthritis: a possible role in the resolution of arthritis. **Arthritis Rheum.,** v. 44, p. 451–462, 2001.

GAFFEN, S. L. An overview of IL-17 function and signaling. **Cytokine**, v. 43, p. 402-407, 2008.

GANOUSIS, L. G. et al. Cell-specific metabolism in mouse bone marrow stroma: studies of activation and detoxification of benzene metabolites. **Mol. Pharmacol.,** v. 42, n. 6, p. 1118-1125, 1992.

GASKELL, M.; MCLUCKIE, K. I.; FARMER, P. B. Genotoxicity of the benzene metabolites para-benzoquinone and hydroquinone. **Chem**. **Biol. Interact**. v. 153, p. 267-270, 2005.

GOMEZ-SANMIGUEL, A. B. et al. Formoterol decreases muscle wasting as well as inflammation in rat model of rheumatoid arthritis. **Am. J. Physiol. Endocrionl. Metab.,** v. 310, p. 925-937, 2016.

GYORGI, B.; TOTH, E.; TARCSA, E.; FALUS, A.; BUZAS, E. I. Citrullination: a posttranslational modificiation in health and disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.,** v. 38, p. 1662-1677, 2011.

GÜC, M. O.; ILHAN, M.; KAYAALP, S. O. The rat anococcygeus muscle is a convenient bioassay organ for the airway epithelium-derived relaxant factor. **Eur. J. Pharmacol.,** v. 148, n. 3, p. 405-409, 1988.

HAAG, S.; SCHNEIDER, N.; MASON, D. E.; TUNCEL, J.; ANDERSON, I. E.; PETERS, E. C.; BURKHARDT, H.; HOLMDAH, R. Identification of New Citrulline-Specific Autoantibodies, Which Bind to Human Arthritic Cartilage, by Mass Spectrometric Analysis of Citrullinated Type II Collagen. **Ahrtritis Rheum.,** v. 66, n. 40, p. 1440-1449, 2014.

HARRE, U; GEORGESS, D.; BANG, H.; BOZEC, A.; AXMANN, R.; OSSIPOVA, E.;, et al. Induction of osteoclastogenesis and bone loss by human autoantibodies against citrullinated vimentin. **J. Clin. Invest.,** v.122, p. 1791–1802, 2012.

HARTWIG, A. The role of DNA repair in benzene-induced carcinogenesis. **Chem. Biol. Interac.,** v. 184, n. 1-2, p. 269-272, 2010.

HASHIZUME, M.; MIHARA, M. The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis,** v. 7, 2011.

HEBEDA, C. B.; PINEDO, F. J.; BOLONHEIS, S. M.; FERREIRA, Z. F.; MUSCARÁ, M. N.; TEIXEIRA, S. A.; FARSKY, S. H. Intracellular mechanisms of hydroquinone toxicity on endotoxin-activated neutrophils. **Arch. Toxicol.,** v. 86, n. 11, p. 1773-1781, 2012.

HECHT, S. S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. **Nat. Rev. Cancer,** v. 3, p. 733–744, 2003.

HERRON, G. S.; BANDA, M. J.; CLARK, E. J.; GAVRILOVIC, J.; WERB, Z. Secretion of metalloproteinases by stimulated capillary endothelial cells. II. Expression of collagenase and stromelysin activities is regulated by endogenous inhibitors. **J. Biol. Chem.,** v. 261, n. 16, p. 2814-2818, 1986.

HOBBS, A. J.; TUCKER, J. F.; GIBSON, A. Differentiation by hydroquinone of relaxations induced by exogenous and endogenous nitrates in non-vascular smooth muscle: role of superoxide anions. **Brit. J. Pharmacol.,** v. 104, n. 3, p. 645-50, 1991.

HOLMDAHL, R.; GOLDSCHMIDT, T. J.; KLEINAU, S.; KVICK, C.; JONSSON, R. Arthritis induced in rats with adjuvant oil is a genetically restricted, α–β T-cell dependent autoimmune disease. **Immunology,** v. 76, p. 197-202, 1992.

HSU, C. C.; LIEN, J. C.; CHANG, C. W.; CHANG, C. H.; KUO, S. C.; HUANG, T. F. Yuwen02f1 suppresses LPS-induced endotoxemia and adjuvant-induced arthritis primarily through blockade of ROS formation, NFkB and MAPK activation. **Biochem. Pharmacol.,** v. 1, n. 85, p. 385-395, 2013.

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-x03BA;B Signaling Pathway. **Cell Physiol. Biochem.** v.37, n. 2, p. 592-602, 2015.

HUEBER, A. J.; ASQUITH, D. L.; MILLER, A. M.; REILLY, J.; KERR, S.; LEIPE, J.; et al. Mast cells express IL-17A in rheumatoid arthritis synovium. **J. Immunol.,** v. 184, p. 3336–3340, 2010.

HUI, A. Y.; MCCARTY, W. J.; MASUDA, K.; FIRESTEIN, G. S.; SAH, R. L. A systems biology approach to synovial joint lubrication in health, injury, and disease. **Wiley Interdiscip Rev. Syst. Biol. Med.,** v. 4, n. 1, p. 15-37, 2012.

HUNTER, C. A.; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat. Immunol.,** v. 16, p. 448-457.

HUSGAVFEL-PURSIAINEN, K. Genotoxicity of environmental tobacco smoke: a review. **Mutation Research,** v. 567, p. 427–445, 2004.

IARC. **Hydroquinone.** Monographs.Supplement 7, p. 691-719, 1987.

IWANAGA, T.; SHIKICHI, M.; KITAMURA, H.; YANASE, H.; NOZAWA-INOUE, K. Morphology and functional roles of synoviocites in the joint. **Arch. Histol. Cytol.,** v. 63, n. 1, p. 17-31, 2000.

JACQUES, C.; GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; GABAY, C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. **Vitam. Horm.,** v. 74, p. 371-403, 2006.

JIANG, X.; ALFRESSON, L.; KLARESKOG, L.; BENGTSSON, C. Smokeless tobacco (moist snuff) use and the risk of developing rheumatoid arthritis: results from a case-control study. **Arthritis Care Res.,** v. 66, n. 10, p. 1582-1586, 2014.

JIN, S.; SATO, N. Benzoquinone, the substance essential for antibacterial activity in aqueous extracts from succulent young shoots of the pear Pyrus spp. **Phytochemistry,** v. 62, p. 101–107, 2003.

JOHNSON, E. S.; LANGÅRD, S.; LIN, Y. S.A critique of benzene exposure in the general population.**Sci. Total Environm.,** v. 374, p. 183–198, 2007.

JONES, J. E.; CAUSEY, C. P.; KNUCKLEY, B.; SLACK-NOYES, J. L.; THOMPSON, P. R. Protein arginine deiminase 4 (PAD4): current understanding and future therapeutic potential. **Curr. Opin. Drug Discov. Devel.,** v. 12, p. 616–627, 2009.

JONGBLOED, S. L.; LEBRE, M. C.; FRASER, A. R.; GRACIE, J. A.; STURROCK, R. D.; TAK, P. P., et al. Enumeration and phenotypical analysis of distinct dendritic cell subsets in psoriatic arthritis and rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. Ther.,** v.8, 2006.

JUNQUEIRA, CARNEIRO. Histologia Básica, Texto e Atlas. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KALLIOLIAS, G. D.; IVASHKIV, L. B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v. 12, p. 49-62, 2016.

KARLSON, E. W. et al. A retrospective cohort study of cigare
tte smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. **Arthritis Rheum.,** v. 42, p. 910-917, 1999.

KARLSON, E. W.; DEANE, K. Environmental and gene-environment interactions and risk of rheumatoid arthritis. **Rheum. Dis. Clin. N. Am.,** v. 38, p. 405–426, 2012.

KASANTSEVA, M. G.; HIGHTON, J.; STAMP, L. K.; HESSIAN, P. A. Dendritic cells provide a potential link between smoking and inflammation in rheumatoid arthritis. **Arthritis Res. & Therapy**, v. 14, p. 1-11, 2012.

KAZI, T. G. et al. Toxic metals distribution in different components of Pakistani and imported cigarettes by electrothermal atomic absorption spectrometer. **J. Hazard Mater.,** v. 163, p. 202-207, 2009.

KEENAN, J. J.; GAFFNEY, S. H.; GALBRAITH, D. A.; BEATTY, P.; PAUSTENBACH, D. J. Gasoline: A complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure? **Chem. Biol. Interac.,** v. 184, p. 293–295, 2010.

KENNEDY, A. et al. Angiogenesis and blood vessel stability in inflammatory arthritis. **Arthritis Rheum.,** v. 62, p. 711-721, 2010.

KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Oxidation of hydroquinone by myeloperoxidase. Mechanism of stimulation by benzoquinone. **J. Biol. Chemistry,** v. 267, n. 12, p. 8319-8324, 1992.

KIDD, B., et al. Epitope spreading to citrullinated antigens in mouse models of autoimmune arthritis and demyelination. **Arthritis Res. Ther.,** v. 10, p. R119, 2008.

KIM, E.; KANG, B.Y.; KIM, T.S. Inhibition of interleukin-12 production in mouse macrophages by hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, via suppression of nuclear factor-κB binding activity. **Immunol. Letters**, v.99, p.24–29, 2005.

KIM, M.; BAE, M.; NA, H.; YANG, M. Environmental toxicants—induced epigenetic alterations and their reversers. **J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.** v.31, n.3, p.285, 2013.

KIM, Y. J. et al. Risk Assessment of Hydroquinone: Differential Responses of Cell Growth and Lethality Correlated to Hydroquinone Concentration. **J. Toxicol. Environm.** Health, Part A, v.72, p.1272–1278, 2009.

KIMURA, A., NAKA, T., NOHARA, K., FUJII-KURIYAMA, Y. AND KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** 2008.

KIMURA, A.; NAKA, T.; NAKAHAMA, T.; CHINEN, I.; MASUDA, K.; NOHARA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y.; KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor in combination with Stat1 regulates LPS-induced inflammatory responses. **J. Exp. Med.,** v. 206, p. 2027–2035,2009.

KLARESKOG, L.; STOLT, P.; LUNDBERG, K.; KALLBERG, H.; BENGTSSON, C.; et al. A new model for an etiology of rheumatoid arthritis: smoking may trigger HLA-DR (shared epitope)-restricted immune reactions to autoantigens modified by citrullination. **Arthritis Rheum.,** v. 54, p. 38-46, 2006.

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.

KLARESKOG, L.; WIDHE, M.; HERMANSSON, M.; RONNELID, J. Antibodies to citrullinated proteins in arthritis: pathology and promise. **Curr. Opin. Rheumatol.,** v. 20, p. 300–305, 2008.

KLARESKOG, L.; GREGERSEN, P. K.; HUIZINGA, T. W. Prevention of autoimmune rheumatic disease: state of the art and future perspectives. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 69, p. 2062-2066, 2010.

KLARESKOG, L.; MALMSTROM, V; LUNDGERG, K.; PADYUKOV I.; ALFREDSSON, I. Smoking citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Semin. Immunol.,** v. 23, p. 92-98, 2011.

KOBAYASHI, S. et al.A role for the aryl hydrocarbon receptor and the dioxin TCDD in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford),** v. 47, p. 1317–1322, 2008.

KOCH, A. E. Chemokines and their receptors in rheumatoid arthritis: future targets? **Arthritis Rheum.,** v. 52, p. 710-721, 2005.

KOEHLER, M. J.; KÖNIG, K.; ELSNER, P.; BÜCKLE, R.; KAATZ, M. In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. **Opt Lett.,** v. 31, p. 2879-2881, 2006.

KOJIMA, F.; NARABA, H.; SASAKI, Y.; OKAMOTO, R.; KOSHINO, T.; KAWAI, S. Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. **J. Rheumatol.,** v. 29, n. 9, p. 1836-42, 2002.

KOKKONEN, H.; SODERSTROM, I.; ROCKLOV, J.; HALLMANS, G.; LEJON, K.; RANTAPAA, S. Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of RA. **Arthritis Rheum.,** v. 62, n. 2, p. 383-391, 2010.

KUHN, K. A.; KULIK, L.; TOMOOKA, B.; BRASCHLER, K. J.; AREND, W.; P.; ROBINSON, W. H.; et al. Antibodies against citrullinated proteins enhance tissue injury in experimental autoimmune arthritis. **J. Clin. Invest.,** v. 116, p. 961–973, 2006.

KURKÓ, L. et al. Genetics of rheumatoid arthritis — a comprehensive review. **Clinic. Rev. Allerg. Immunol.,** p. 1-10, 2013.

LAHOTI, T. S.; HUGHES, J. M.; KUSNADI, A.; JOHN, K.; ZHU, B.; MURRAY, I. A.; GOWDA, K.; PETERS, J. M.; AMIN, S. G.; PERDEW, G. H. Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonism Attenuates Growth Factor Expression, Proliferation, and Migration in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Rheumatoid Arthritis**. J. Pharmacol. Exp. Ther.,** v. 348, p. 236–245, 2014.

LAM, J.; TAKESHITA, S.; BARKER, J. E.; KANAGWA, O.; ROSS, F. P.; TEITELBAUM, S. L. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. **J. Clin. Invest,** v. 106, p. 1481-1488.

LEE, J. Y. et al. Hydroquinone, a Reactive Metabolite of Benzene, Reduces Macrophage-mediated Immune Responses. **Molecules and Cells**, v.23, n.2, p.198-206, 2007.

LEE, J.S.; YANG, E.J.; KIM, I.S. Hydroquinone-induced apoptosis of human lymphocytes through caspase 9/3 pathway. **Mol. Biol. Rep.,** v.39, n.6, p. 6737-6743, 2012.

LEE, A.; QIAO, Y.; GRIGORIEV, G.; CHEN, J.; PARK-MIN, K. H.; PARK, S. H.; IVASHKIV, L. B.; KALLIOLIAS, G. D. Tumor necrosis factor alpha induces sustained signaling and a prolonged and unremitting inflammatory response in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. **Arthritis Rheum.,** v. 65, p. 928-938, 2013.

LEE, J.; LURIA, A.; RHODES, C.; RAGHU, H.; LINGAMPALLI, N.; SHARPE, O; RADA, B.; SOHN, D. H.; ROBINSON, W. H.; SOKOLOVE, J. Nicotine drives neutrophil extracellular traps formation and accelerates collagen-induced arthritis. **Rheumatology,** v. 56, p. 644-653, 2017.

LESLIE, D.; LIPSKY, P.; NOTKINS, A. L. Autoantibodies as predictors of disease. **J. Clin. Invest.,** v. 108, p. 1417–1422, 2001.

LETTIERI, B. D.; AQUILANO, K.; BALDELLI, S.; ROTILIO, G. Proline oxidase-adipose triglyceride lipase pathway restrains adipose cell death and tissue inflammation. **Cell Death Differ.,** v. 21, p. 113-123, 2014.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 2, p. 725–734, 2002.

LI, Z.; WANG, C.; ZHU, J.; BAI, Y.; WANG, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, S.; LIU, X.; ZHOU, S.; HUANG, W.; BI, Y.; WANG, H. The possible role of liver kinase B1 in hydroquinone-induced toxicity of murine fetal liver and bone marrow hematopoietic stem cells. **Environ. Toxicol.,** p. 1-12, 2014.

LINDBLAD, S. S. et al. Smoking and nicotine exposure delay development of collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis Res. Ther.,** v. 11, p. R88, 2009.

LIPSKI, P. E. Rheumatoid arthritis. In: KASPER D. L. et al. **Harrison´s Principles of Internal Medicine.** International edition, 14th ed., New York: McGraw Hill, 1998.

LÓPEZ-LONGO, F. J.; SÁNCHEZ-RAMÓN, S.; CARREÑO, I. The value of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid arthritis: do they imply new risk factors? **Drug News Perspect.,** v. 22, p. 543-8, 2009.

LUBBERTS, E.; VAN DEN BERG, W. B. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and collagen-induced arthritis. **Adv. Exp. Med. Biol.,** v. 520, p. 194–202. 2003.

MACEDO, S. M.; et al. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. **Toxicology**, v. 220, n. 2-3, p. 126-35, 2006.

MACEDO, S. M.; VAZ, S. C.; LOURENÇO, E. L.; DE SOUSA, M. da G.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FERREIRA, J. M. Jr.; ALMEIDA, S. R.; DE LIMA, W. T.; FARSKY, S. H.

In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. **Toxicology**, v. 241, n. 1-2, p. 47-57, 2007.

MATEOS, J.; LOURIDO, L.; FERNÁNDEZ-PUENTE, P.; CALAMIA, V.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, C.; OREIRO, N.; RUIZ-ROMERO, C.; BLANCO, F. J. Differential protein profiling of synovial fluid from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients using LC−MALDI TOF/TOF. **J. Proteomics,** v. 75, p. 2869−2878, 2012.

MARTEL-PELLETIER, J.; WELSCH, D. J.; PELLETIER, J. P. Metalloproteases and inhibitors in arthritic diseases. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.,** v. 15, n. 5, p. 805-829, 2001.

MARTEL-PELLETIER, J.; PELLETIER, J. P.; FAHMI, H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. **Semin. Arthritis Rheum.,** v. 33, n. 3, p. 155–167, 2003.

MACEDO, S. M. et al. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. **Toxicology,** v. 241, n. 1-2, p. 47-57, 2007.

MAJKA, D. S. et al. Duration of preclinical rheumatoid arthritis-related autoantibody positivity increases in subjects with older age at time of disease diagnosis. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 67, p. 801-807, 2008.

MANNERS, P. J.; BOWER, P. J. Worldwide prevalence of juvenile arthritis why does it vary so much? **J. Rheumatol.,** v. 29, p. 1520–1530, 2002.

MANFREDSDOTTIR, V. F. et al. The effects of tobacco smoking and rheumatoid factor seropositivity on disease activityand joint damage in early rheumatoid arthritis. **Rheumatol.,** v. 45, p. 734-740, 2006.

MAKRYGIANNAKIS, D.; HERMANSSON, M.; ULFGREN, A. K.; NICHOLAS, A. P.; ZENDMAN, A. J.; et al. Smoking increases peptidylarginine deiminase 2 enzyme expression in human lungs and increases citrullination in BAL cells. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 67, p. 1488-1492, 2008.

MALMSTROM, V.; CATRINA, A. I.; KLARESKOG, L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. **Nat. Rev. Immunol.,** p. 1-16, 2016.

MARTINEZ-GAMBOA, L.; BREZINCHEK, H. P.; BURMESTER, G. R.; DORNER, T. Immunopathologic role of B lymphocytes in rheumatoid arthritis: rationale of B cell-directed therapy. **Autoimmun. Rev.,** v. 5, p. 437-442, 2006.

MASDOTTIR, B. et al. Smoking, rheumatoid factor isotypes and severity of rheumatoid arthritis. **Rheumatology,** v. 39, p. 1202-1205, 2000.

MCDONALD, T. A.; HOLLAND, N. T.; SKIBOLA, C.; DURAMAD, P.; SMITH, M. T. Hypothesis: phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. **Leukemia,** v. 15, n. 1, p. 10-20, 2001.

MCGREGOR, D. Hydroquinone: an evaluation of the human risks from its carcinogenic and mutagenic properties. **Critic. Rev. Toxicol.,** v. 37, p. 887–914, 2007.

MCINNES I. B.; SCHETT, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Immunol.,** v. 7, p. 429-442, 2007.

MCINNES I. B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **N. Engl. J. Med.,** v.365, p. 2205-2219, 2011.

McHALE, C. M.; ZHANG, L. P.; SMITH, M. T. Current understanding of the mechanism of benzene-induced leukemia in humans: implications for risk assessment. **Carcinogesis**, v. 33, p. 240-252, 2009.

MCCUTCHAN, H. J.; FISHER, R. C. Synovial leukocytosis in infectious arthritis. **Clin. Orthop. Relat. Res.,** v. 257, p. 226-230, 1990.

MEDINSKY, M. A.; KENYON, E. M.; SCHLOSSER, P. M. Benzene: a case study in parent chemical and metabolite interactions. **Toxicology**, v. 105, n. 2-3, p. 225-33, 1995.

MELADO, M.; MARTÍNEZ-MUÑOZ, L.; CASCIO, G.; LUCAS, P.; PABLOS, J. L.; RODRÍGUEZ-FRADE, J. M. T cell migration in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Immunol.,** 2015.

MERTENS, M.; SINGH, J. A. Anakinra for rheumatoid arthritis: a systematic review. **J. Rheumatol.,** v. 36, p. 1118-1125, 2009.

MEYER, O.; LABARRE, C.; DOUGADOS, M.; GOUPILLE, P.; CANTAGREL, A.; DUBOIS, A.; et al. Anticitrullinated protein/peptide antibody assays in early rheumatoid arthritis for predicting five year radiographic damage. **Ann. Rheum. Dis.;** v. 62, p. 120-126, 2010.

MIHALY, S. R.; NINOMIYA-TSUJI, J.; MORIOKA, S. TAK 1 control of cell death. **Cell Death Differ.,** v. 21, p. 1667–1676, 2014.

MILLER, A. C.; SCHATTENBERG, D. G.; MALKINSON, A. M.; ROSS D. Decreased content of the IL1 alpha processing enzyme calpain in murine bone marrow-derived macrophages after treatment with the benzene metabolite hydroquinone. **Toxicology Letters,** v. 74, n. 2, p. 177-184, 1994.

MINCIULLO, P. L.; NAVARRA, M.; CALAPAI, G.; GANGEMI, S. Cytokine network involvement in subjects exposed to benzene. **J. Immunol. Res.,** 2014.

MIRANDA-CARÚS, M. E.; BALSA, A.; BENITO-MIGUEL, M.; PÉREZ DE AYALA, C.; MARTÍN-MOLA, E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. **J. Immunol.,** v. 173, n. 2, p. 1463-76, 2004.

MONTESANO, R.; VASSALI, J. D.; BAIRD, A.; GUILLEMIN, R.; ORCI, L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 83, n. 19, p. 7297-7301, 1986.

MOREIRA, T. L.; GOMES, A. R. S.; DRESCH, T. R.; SILVA, S. M.; VALDERRAMAS, S. Effects of inhaled cigarette smoke on the myoarticular system of female rats with collagen-induced arthritis.**Clinics,** v. 66, n. 5, p. 915-917, 2011.

MORO, A. M.; CHARÃO, M. F.; BRUCKER, N., et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. **Mutat. Res.,** v. 754, p. 63-70, 2013.

MOUDGIL, K. D. et al. Environmental modulation of autoimmune arthritis involves the spontaneous microbial induction of T cell responses to regulatory determinants within heat shock protein 65. **J. Immunol.,** v. 166, p. 4237–4243, 2001.

MULLER, S.; RADIC, M. Citrullinated autoantigens: from diagnostic markers to pathogenetic mechanisms. **Clinic. Rev. Allerg. Immunol.,** p. 1-8, 2014.

MULLER-LADNER, U.; PAP, T.; GAY, R. E.; NEIDHART, M.; GAY, S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. **Nat. Clin. Pract. Rheum.,** v. 1, n. 2., p. 102-110, 2005.

MULLER-LADNER, U.; OSPELT, C.; GAY, S.; DISTLER, O.; PAP, T. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Synovial fibroblasts. **Arthritis Res. & Ther.,** v. 9, n. 6, p. 1-10, 2007.

NAGASE, H.; KASHIWAGI, M. Aggrecanases and cartilage matrix degradation. **Arthritis Res. Ther.,** v. 5, n. 2, p. 94-103, 2003.

NAKAHAMA, T.; KIMURA, A.; NGUYEN, N.T.; CHINEN, I.; HANIEH, H.; NOHARA, K.; FUJI-KURIAMA, Y.; KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor deficiency in T cells suppresses the development of collagen-induced arthritis. **PNAS**, v. 108, n. 34, p. 14222-14227, 2011.

NEGISHI, T.; KATO, Y.; OONEDA, O. Effects of aryl hydrocarbon receptor signaling on the modulation of TH1/TH2 balance. **J. Immunol.,** v. 175, p. 7348–56, 2005.

NETEA, M. G.; SIMON, A.; van de VEERDONK, F.; KULLBERG, B. J.; VAN DER MEER, J. W.; JOOSTEN, L. A. IL-1beta processing in host defense: beyond the inflammasomes. **PLoS Pathog.,** v. 6, 2010.

NG, C. T. et al. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 69, p. 1389-1395, 2010.

NGUYEN, T. N.; NAKAHA, T.; KISHIMOTO, T. Aryl hydrocarbon receptor and experimental autoimmune arthritis. **Semin. Immunopathol.,** v. 35, p. 637-644, 2013.

NGUYEN, N. T. et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonism and its role in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Pharmacol.,** v. 7, p. 29-35, 2015.

NIELEN, M. M; van der HORST, A. R.; van SCHAARDENBURG, D.; van der HORST-BRUINSMA, I. E.; van de STADT, R. J.; AARDEN, L.; et al. Specific antibodies precede the symptoms of rheumatoid artritis: a study of serial measurements in blood donors. **Arthritis Rheum.** v. 50, p. 380-386, 2004.

NIELEN, M. M.; van SCHAARDENBURG, D.; REESINK, H. W.; TWISK, J. K.; van de STADT, R. J.; van der HORST-BRUINSMA, I. E.; et al. Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.,** v. 65, p. 535-537, 2006.

NIELSEN, R. H.; CHRISTIANSEN, C.; STOLINA, M., KARSDAL, M. A. Oestrogen exhibits type II collagen protective effects and attenuates collagen-induced arthritis in rats. **Clin. Exp. Immunol.,** v. 152, p. 21-28; 2008.

NIOSH. **Hydroquinone.** Manual of analytical methods (NMAM), Method 5004, Issue 2.4thedition, 1994.

NISHIMURA, K.; SUGIYAMA, D.; KOGATA.; Y, TSUJI, G.; NAKAZAWA, T.; KAWANO, S.; et al. Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. **Ann. Intern. Med.,** v. 146, p. 797–808, 2007.

NOACK, M.; MIOSSEC, P. Selected cytokine pathways in rheumatoid arthritis. **Semin. Immunopathol.,** v. 39, p. 365–383, 2017.

NORTH, M.; TANDON, V. J.; THOMAS, R.; et al. Genome-wide functional profiling reveals genes required for tolerance to benzene metabolites in yeast. **PLoS one,** 2011.

OHSHIMA, S.; SAEKI, Y.; MIMA, T.; SASAI, M.; NISHIOKA, K.; NOMURA, S.; KOPF, M.; KATADA, Y.; TANAKA, T.; SUEMURA, M.; KISHIMOTO, T. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen induced arthritis. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v.95, p. 8222**–** 8226, 1998.

OHTAKE, F.; BABA, A.; TAKADA, I., et al. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. **Nature**, v. 446, p. 562-566.

OKAMOTO, S. et al. Etiological role of cigarette smoking in rheumatoid arthritis: nasal exposure to cigarette smoke condensate extracts augments the development of collagen-induced arthritis in mice. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 404, p. 1088–92, 2011.

OLIVER, J. E.; SILMAN, A. J. Risck factors for the development of rheumatoid arthritis. **Scand. J. Rheumatol.,** v. 35, p. 169-74, 2006.

OLIVERI, I.; PALAZZI, C.; PERUZ, G.; PADULA, A. Management issue with elderly onset rheumatoid arthritis: an uptodate. **Drugs Aging,** v. 22, p. 809-822, 2005.

OSPELT, C.; NEIDHART, M.; GAY, R. E.; GAY, S. Synovial activation in rheumatoid arthritis. **Frontiers in Biosc.,** v. 9, p. 2323-2335, 2004.

OSTA, B.; BENEDETTI, G.; MIOSSEC, P. Classical and paradoxial effects of TNF-alpha on bone homeostasis. Front. Immunol., v. 45, p. 48, 2014.

PAP, T.; GAY, S. Fibroblasts and fibroblast-like synoviocytes. In: Firestein, GS.; Budd, RC.; Harris,T.; McInnes, IB.; Ruddy, S.; Sergent, JS., editors. **Kelly's Textbook of Rheumatology**. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, p. 201-214, 2009.

PAPADOULOS, N. G.; ALAMANOSI, Y.; VOUGARI, P. V.; EPAGELIS, E. K.; TSIFETAKI, N.; DROSOS, A. A. Does cigarette smoking influence disease expression, activity and severity in early rheumatoid arthritis patients? **Clin. Exp. Rheumatol.,** v. 23, p. 861-866, 2005.

PATEL, R. R.; RYU, J. H.; VASSALLO,, R. Cigarette Smoking and Diffuse Lung Disease. **Drugs**, v. 68, n. 11, p. 1511-1527, 2008.

PAYET, J. GOULVESTRE, C.; BIALÉ, I.; AVOUAC, J.; WIPFF, J.; JOB-DESLANDRE, C.; et al. Anticyclic citrullinated peptide antibodies in rheumatoid and nonrheumatoid rheumatic disorders: experience with 1162 patients. **J. Rheumatol.,** v. 41, p. 2395-2402, 2014.

PEDERSEN J.K.; KJAER, N. K.; SVENDSEN, A.J; HØRSLEV-PETERSEN, K. Incidence of rheumatoid arthritis from 1995 to 2001: impact of ascertainment from multiple sources. **Rheumatol Int**., v. 29, p. 411-415, 2009.

PETTY, R. E.; SOUTHWOOD, T. R.; MANNERS, P.; BAUM, J.; GLASS, D. N.; GOLDENBERG, J.; et al. International League of Associations for Rheumatology classification of juvenile idiopathic arthritis: second revision, Edmonton, 2001. **J. Rheumatol.,** v. 31, p. 390-392, 2004.

PENG, D.; JIAXING, 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.

PIFER, J. W. et al. Mortality study of employees engaged in the manufacture and use of hydroquinone. Internat.**Arch. Occcupat. Environm. Health**, v. 67, n. 4, p. 267-280, 1995.

PINTO, L. G.; TALBOT, J.; PERES, R. S.; FRANCA, R. F.; FERREIRA, S. H.; RYFFEL, B.; AVES-FILHO, J. C.; FIGUEIREDO, F.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1beta production. **Arthritis Res. Ther.,** v. 2, 2015.

PONS, M.; MARIN-CASTAÑO, M. E. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment in vitro and in vivo. **Plos One,** v. 6, n.2, e16722, 2011.

PRATESI, F.; PETIT-TEIXEIRA, P.; SIDNEY, J.; MICHOU, I.; PUXXEDU, I.; SETTE, A.; et al. HLA shared epitope and ACPA: just a marker or an active player? **Autoimmun. Rev.,** v. 12, p. 1182-1187, 2013.

PRYOR, W.A.; STONE, K.; ZANG, L.Y.; BERMÚDEZ, E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. **Chem. Res. Toxicol.,** v. 11, n. 5, p. 441-448, 1998.

PUGA, A.; BARNES, S. J.; DALTON, T. P., et al. Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest. **J. Biol. Chem.,** v. 275, p. 2943-2950, 2000.

PUGA, A.; TOMLINSON, C. R.; XIA, Y. Ah receptor signals cross-talk with multiple developmental pathways. **Biochem. Pharmacol.,** v. 69, p. 199-207, 2005.

QUINTANA, F. J., BASSO, A. S., IGLESIAS, A. H.; et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, 2008.

REIS, A. C.; ALESSANDRI, A. L.; ATHAYDE, R. M.; PEREZ, D. A.; VAGO, J. P.; AVILA, T. V. Induction of eosinophil apoptosis by hydrogen peroxide promotes the resolution of allergic inflammation. **Cell Death Dis.,** v.6, p. e1632, 2015.

RENGEL, I.; OSPETL, C.; GAY, S. Proteinases in the joint: clinical relevance of proteinases in joint destruction. **Arthritis Res. & Ther.,** v. 9, n. 5, p. 221-231, 2007.

REYNISDOTTIR, G.; KARIMI, R.; JOSHUA, V.; OLSEN, H.; HENSVOLD, A. H.; HARJU, A.; et al. Structural changes and antibody enrichment in the lungs are early features of anticitrullinated protein antibody-positive rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol.,** v. 66, p. 31-39, 2014.

RIBEIRO, A. L.; SHIMADA, A. L.; HEBEDA, C. B.; DE OLIVEIRA, T. F.; DE MELO LOUREIRO, A. P.; SANTOS, A. M.; DE LIMA W. T.; FARSKY, S. H. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. **Toxicology**, v. 288, p. 1–7, 2011.

RIM, T. H.; CHENG, C. Y.; KIM, D. W.; KIM, S. S.; WONG, T. Y. A nationwide cohort study of cigarette smoking and risk of neovascular age-related macular degeneration in East Asian men. **Br. J. Ophthalmol.,** 2017.

RITCHLIN, C. Fibroblast biology. Effector signals released by the synovial fibroblast in arthritis. **Arthritis Res.,** v. 2, p. 356-360, 2000.

ROBBINS; COTRAN. Patologia – Bases Patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RODGMAN, A.; PERFETTI, T. A. The chemical components of tobacco and tobacco smoke. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Taton, London, New York, v. 2., 2013.

ROHRBACH, A. S.; SLADE, D. J.; THOMPSON, P. R.; MOWEN, K. A. Activation of PAD4 in net formation. **Front. Immunol.,** v. 29, 2012.

ROCHA, J. C. F.; PEIXOTO, M. E. B.; JANCAR, S; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A.; ROCHA, F. A. C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.,** v. 136, n. 4, p. 588-596, 2002.

ROSS, D.; SIEGEL, D.; SCHATTENBERG, D. G.; SUN, X. M.; MORAN, J. L. Cell-specific Activation and Detoxification of Benzene Metabolites in Mouse and Human Bone Marrow: Identification of Target Cells and a Potential Role for Modulation of Apoptosis in Benzene Toxicity. **Environ. Health Perspectives**, v. 104, n. 6, p. 1177-1182, 1996.

RUIZ-ESQUIDE, V. et al. Effects of smoking on disease activity and radiographic progression in early rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.,** v. 38, p. 2536-2539, 2011.

SAAG, K. G.; CERTHAN, J. R.; KOLLURI, S.; OHASHI, K.; HUNNINGHAKE, G. W.; SCHAWARTZ, D. A. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. **Ann Rheum. Dis.,** v. 56, p. 463-469, 1997.

SACK, U.; KINNE, R. W.; MARX, T.; HEPPT, P.; BENDER, S.; EMMRICH, F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Int.,** v. 13, p. 45–51, 1993.

SAKKAS, L. I.; BOGDANOS, D. P.; KATSIARI, C.; PLATSOUCAS, C. D. Anti-citrullinated peptides as autoantigens in rheumatoid arthritis-relevance to treatment. **Autoimmun. Rev.,** v. 13, p. 1114-20, 2014.

SATO, K.; SUEMATSU, A.; OKAMOTO, K.; YAMAGUCHI, A.; MORISHITA, Y.; KADONO, Y.; et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. **J. Exp. Med.,** v. 203, 2673–2682, 2006.

SCHNATTER, A. R.; GLASS, D. C.; TANG, G.; IRONS, R. D.; RUSHTON, L. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 104, p. 1724-1737, 2012.

SCOTT, D. L.; WOLFE, F.; HUIZINGA, T. W. Rheumatoid arthritis. **Lancet.,** v. 376, p. 1094-1108, 2010.

SHIMADA, A. L. B., et al. In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. **Toxicology,** v. 296, p. 20-26, 2012a.

SHIMADA, A. L. B., et al. In vivo hydroquinone exposure causes tracheal hyperresponsiveness due to TNF secretion by epithelial cells. **Toxicology Letters,** v. 211, p. 10-17, 2012b.

SHIMIZU, Y. Y.; NAKATSURU, M.; ICHINOSE, Y., et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 97, p. 779-782, 2000.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; KOELLER, M.; WEISMAN, M. H.; EMERY, P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet,** v. 370, p. 1861-1874, 2007.

SMITH, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environm. Health Perspect.,** v. 104, p. 1219-1225, 1996.

SMITH, C. A.; TOUPIN-APRIL, K.; JUTAI, J. W.; DUFFY, C. M.; RAHMAN, P.; CAVALLO, S; BROSSEAU, L. A Systematic Critical Appraisal of Clinical Practice Guidelines in Juvenile Idiopathic Arthritis Using the Appraisal of Guidelines for Research and Evaluation II (AGREE II) Instrument. **PLoS One.,** v. 10, n. 9, 2015.

SNIR, O.; WIDHE, M.; HERMANSSON, M.; von SPEE, C.; LINDBERG, J.; HENSEN, S.; et al. Antibodies to several citrullinated antigens are enriched in the joints of rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Rheum.,** v. 62, p. 44-52, 2010.

SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Metabol. Rev.,** v. 36, n. 3-4, p. 531-547, 2004.

SONG, H-P.; LI, X.; YU, R.; ZENG, G.; YUAN, Z. Y.; WANG, W. E. I. Phenotypic characterization of type II collagen-induced arthritis in Wistar rats. **Exp. Ther. Med.,** v. 10, n. 4, p. 1483-1488, 2015.

SOUBIER, M.; MATHIEU, S.; PAYET, S.; DUBOST, I. I.; RISTORI, J. M. Elderly-onset rheumatoid arthritis. **Joint Bone Spine.,** v. 77, p. 290-296, 2010.

SPENGLER, J. et al. Release of active peptidyl arginine deiminases by neutrophils can explain production of extracellular citrullinated autoantigens in rheumatoid arthritis synovial fluid. **Arthritis Rheumatol.**, v. 67, p. 3135–3145, 2015.

STABBERT, R.; DEMPSEY, R.; DIEKMANN, J.; EUCHENHOFER, C.; HAGEMEISTER, T.; HAUSSMANN, H. J. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of *in vitro* bioactivity assays. **Toxicol Vitr.,** v. 47, p. 222-246, 2017.

STANLEY, D. Prevalence and aetiology of symptomatic elbow osteoarthritis. **J. Should Elbow Surg.,** v.3, p. 386-9, 1994.

STANLEY, L. C.; WARD-SMITH, P. The diagnosis and management of juvenile idiopathic arthritis. **J. Pediatr. Health Care,** v. 25, p. 191–194, 2011.

STOLT, P.; et al. Quantification of the influence of cigarette smoking on rheumatoidarthritis: results from a population based case-control study, usingincident cases. **Ann. Rheum. Dis.,** v.62, p. 835-841, 2003.

STOCKINGER, B.; DI MEGLIO, P.; GIALITAKIS, M.; DUARTE, J. H. The Ary Hydrocarbon Receptor: multitasking in the Imune System. **Annu. Rev. Immunol.,** v. 32, p. 403-432, 2014.

SWANN, D. A.; HENDREN, R. B.; RADIN, E. L.; SOTMAN, S. L.; DUDA, E. A. The lubricating activity of synovial fluid glycoproteins. **Arthritis Rheum.,** v. 24, p. 22−30, 1981.

SYMMONS, D.; TURNER, G.; WEBB, R.; et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in the United Kingdom: new estimates for a new century. **Rheumatology,** v. 41, p. 793-800, 2002.

SZEKANECZ, Z.; KOCH, A. E. Chemokines and angiogenesis. **Curr. Opin. Rheumatol**., v. 13, p. 202-208, 2001.

SZODORAY, P. et al. Anti-citrullinated protein/peptide autoantibodies in association with genetic and environmental factors as indicators of disease outcome in rheumatoid arthritis. **Autoimmun. Rev.,** v. 9, n. 3, p. 140–143, 2010.

TAK, P. P.; BRESNIHAN, B. The pathogenesis and prevention of joint damage in rheumatoid arthritis - Advances from Synovial Biopsy and Tissue Analysis. **Arthritis & Rheumat.,** v. 43, n. 12, p. 2619-2633, 2000.

TAKEMURA, S. et al. T cell activation in rheumatoid synovium is B cell dependent. **J. Immunol.,** v. 167, n. 8, p. 4710–4718, 2001.

TAMAKI, A.; HIDETOSHI, H.; NAKAJIMA, H.; TAKII, T.; KATAGIRI, D.; MIYAZAWA, K.; HIROSE, K.; ONOZAKI, K. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Increases mRNA Level for Interleukin 1 Beta in Human Fibroblast-Like Synoviocyte Line via Aryl Hydrocarbon Receptor. **Biol. Pharm. Bull.,** v. 27, n. 3, p. 407-410, 2004.

TANAKA, R.; FUKUSHIMA, S. I.; SASAKI, K.; TANAKA, Y.; MUROTA, H.; MATSUMOTO, T.; ARAKI, T.; YASUI, T. *In vivo* visualization of dermal collagen fiber in skin burn by collagen-sensitive second-harmonic-generation microscopy. **J. Biomed. Opt.,** v. 18, n. 6, 2013.

TARNER, I. H.; HARLE, P.; MULLER-LADNER, U.; GAY, R. E.; GAY, S. The different stages of synovitis: acute vs chronic, early vs late and non-erosivevs erosive. **Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.,** v. 19, p. 19-35, 2005.

TAYLOR, P. C.; PETERS, A. M.; PALEOLOG, E.; CHAMPAN, P. T.; ELLIOTT, M. J.; MCCLOSKEY, R.; FELDMAN, M.; MAINI, R. N. Reduction of chemokine levels and leukocyte traffic to joints by tumor necrosis factor alpha blockade in patientis with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum.,** v. 43, p. 38-47, 2000.

TAYSSE, L.; TROUTAUD, D.; KHAN, N. A.; DESCHAUX, P. Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (Cyprinuscarpio). **Toxicology,** v. 98, n. 1-3, p. 207-14, 1995.

THAVARAJAH, P.; LOW, N. H. Adulteration of Apple with Pear Juice: Emphasis on Major Carbohydrates, Proline, and Arbutin. **J. Agricultural Food Chem.,** v. 54, p. 4861-4867, 2006.

THOMAS, D. J.; SADLER, A; SUBRAHMANYAM, V. V.; SIEGEL, D.; REASOR, M. J.; WIERDA, D.; ROSS, D. Bone marrow stromal cell bioactivation and detoxification of the benzene metabolite hydroquinone: comparison of macrophages and fibroblastoid cells. **Mol. Pharmacol.,** v. 37, n. 2, p. 255-62, 2001.

TIEMESSEN, M. M.; et al. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.,** v. 104, p. 19446–19451, 2007.

TONG, Y.; NIU, M.; DU, Y.; MEI, W.; CAO, W.; DOU, Y.; YU, H.; DU, X.; YUAN, H.; ZHAO, W. Aryl hydrocarbon receptor suppresses the osteogenesis of mesenchymal stem cells

in collagen-induced arthritic mice through the inhibition of β-catenin. **Exp, Cell Res.,** v. 350, p. 349–357, 2017.

TRAMPUZ, A.; HANSSEN, A. D.; OSMON, D. R., et al. Synovial fluid leukocyte count and differential for the diagnosis of prosthetic knee infection. **Am. J. Med.,** v. 117, p. 556-562, 2004.

VALESINI, G.; GERARDI, M. C.; IANNUCELLI, C; PACUCCI, V. A.; PENDOLINO, M.; SHOENFELD, Y. Citrullination and autoimmunity. **Autoimmun. Rev.,** 2015.

VAN DEN BERG W, B.; MIOSSEC, P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v. 5, p. 549-553, 2009.

VAN DE LOO, F. A.; JOOSTEN, L. A.; VAN LENT, P. L.; ARNTZ, O. J.; VAN DEN BERG, W. B. Role of interleukin-1,tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in cartilage proteoglycan metabolism and destruction. Effect of in situ blocking in murine antigen- and zymosaninduced arthritis. **Arthritis Rheum.,** v. 38, p. 164–172, 1995.

VAN MAANEN, M. A. et al. Stimulation of nicotinic acetylcholine receptors attenuates collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheum.,** v. 60, p. 114–122, 2009.

VAN BEERS, J. J., et al. The rheumatoid arthritis synovial fluid citrullinome reveals novel citrullinated epitopes in apolipoprotein E, myeloid nuclear differentiation antigen, and β-actin. **Arthritis Rheum.,** v. 65, p. 69–80, 2013

VESSEY, M. P.; VILLARD-MACKINTOSH, L.; YEATES, D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis.**Contraception,** v. 35, p. 457–464, 1987.

VIATTE, S.; PLANT, D.; RAYCHAUDHURI, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v. 9, p. 141-153, 2013.

VINCENTI, M. P.; COON, C. I.; BRINCKERHOFF, C. E. Nuclear factor κB/p50 activates an element in the distal matrix metalloproteinase 1 promoter in interleukin-1β-stimulated synovialfibroblasts. **Arthritis Rheum.,** v. 41, p. 1987-1994, 1998.

VINEIS, P., et al. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. **J. Natl. Cancer Inst.,** v. 2, p. 99-106, 2004.

WANG, B.; CHEN, M. Z.; XU, S. Y. Effect of total glucosides of paeony on synoviocyte function and splenocyte proliferation in adjuvant arthritis rats. **Chin. J. Pharmacol.Toxicol.,** v. 8, p. 128-132, 1994.

WANG, H., et al.Nicotinic acetylcholine receptor .7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature,** v. 421, p. 384–388, 2003.

WEHRENS, E. J.; PRAKKEN, B. J.; van WIJK, F. T cells out of control–impaired immune regulation in the inflamed joint. **Nat. Rev. Rheumatol.,** v.9, p. 34-42, 2013.

WESTER, R. C.; MAIBACH, H. I. Percutaneous absorption: Short-term exposure, lag time, multiple exposures, model variations, and absorption from clothing. In **Dermatotoxicology**, 5th ed., eds. F. Marzulli and H. Maibach, p. 35–48. Washington, DC: Taylor and Francis, 1996.

WESTERHOF, W.; KOOYERS, T. J. Hydroquinone and its analogues in dermatology - a potential health risk. **J. Cosmetic Dermatol.,** v .4, n. 2, p. 55-59, 2005.

WESTMAN, M.; ENGSTROM, M.; CATRINA, A. I.; LAMPA, J. Cell specific synovial expression of nicotinic _7 acetylcholine receptor in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. **Scand. J. Immunol.**, v. 70, p. 136–40, 2009.

WILBUR, S.; WOHLERS, D; PAIKOFF, S.; KEITH, L. S.; FAROON, O. Atsdr evaluation of potential for human exposure to benzene. **Toxicol Ind. Health,** v. 24, p. 399-442, 2008.

WILLIS, V. C.; GIZINSKI, A. M.; BANDA, N. K.; CAUSEY, C. P.; KNUCKLEY, B.; CORDOVA K, N.; et al. N-alpha-benzoyl-N5-(2-chloro-1-iminoethyl)-L-ornithine amide, a protein arginine deiminase inhibitor, reduces the severity of murine collagen-induced arthritis. **J. Immunol.,** v. 186, p. 4396–4404, 2011.

WITTE, K. K. A. et al. The effect of micronutrient supplementation on quality-of-life and left ventricular function inelderly patients with chronic heart failure. **Eur. Heart J.,** v. 26, p. 2238–2244, 2005.

YANG, L.; KARIN, M. Roles of tumor suppressors in regulating tumor-associated inflammation. **Cell Death Differ.,** v. 21, p. 1677–1686, 2014.

YOON, B.; HIRABAYASHI, Y.; KAWASAKI, Y.; KODAMA, Y.; KANEKO, T.; KANNO, J.; KIM, D., et al. Aryl Hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity. **Toxicol. Sciences,** v. 70, p. 150-156, 2002.

YU, H.; YANG, Y. H.; RAJAIAH, R.; MOUDGIL, K. D. Nicotine-Induced Differential Modulation of Autoimmune Arthritis in the Lewis Rat Involves Changes in Interleukin-17 and Anti–Cyclic Citrullinated Peptide Antibodies. **Arthrits Rheum.,** v. 63, n. 4, p. 981-991, 2011.

YUE, R.; ZHAO, L.; HU, Y.; JIANG, P.; WANG, S.; XIANG, L.; LIU, X.; SHAN, L.; ZHANG, W.; LIU, R. Metabolomic Study of Collagen-Induced Arthritis in Rats and the Interventional Effects of Huang-Lian-Jie-Du-Tang, a Traditional Chinese Medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Med.,** v. 13, p. 1-12, 2013.

YUSOF, M. Y.; EMERY, P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. **Drugs,** v. 73, p. 341–356, 2013

ZHAO, J.; ZHAO, Y.; HE, J.; JIA, R.; LI, Z. Prevalence and significance of anti-peptidyl arginene deiminase 4 antibodies in rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol.,** v. 35, n. 6, p. 969-974, 2008.

ZHANG, L.; LI, J. M.; LIU, X. G.; MA, D. X.; HU, N. W.; LI, Y. G., et al. Elevated Th22 cells correlated with Th17 cells in patients with Rheumatoid arthritis. **J. Clin. Immunol.,** v. 31, p. 606-614, 2011.

ZHANG, Y. et al. Synergistic effects of interleukin-1β and interleukin-17A antibodies on collagen-induced arthritis mouse model. **Internat. Immunopharmacol.,** v. 15, p. 199–205, 2013.

ZHOU, Y.; ZUO, X.; LI, Y.; WANG, Y.; ZHAO, H.; XIAO, X. Nicotine inhibits tumor necrosis factor- induced IL-6 and IL-8 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. **Rheumatol. Int.,** v. 32, p. 97–104, 2012.

ZHOU, Y.; DI PUCCHIO, T.; SIMS, G. P.; MITTEREDER, N.; MUSTELIN, T. Characterization of the hyercitrullination reaction in human neutrophils and other leukocytes. **Mediators Inflamm.,** 2015.

ANEXOS

Anexo I: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF **123.2013-P435**

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Papel da exposição à hidroquinona na artrite reumatóide experimental induzida pelo colágeno**" (Protocolo CEUA/FCF/435), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Cintia Scucuglia Heluany**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 14 de outubro de 2013.

São Paulo, 11 de dezembro de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador 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

Anexo II: Ficha do Aluno – Sistema Janus

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 7531350/1 - Cíntia Scucuglia Heluany

Email:	cintiaheluany@usp.br
Data de Nascimento:	17/09/1985
Cédula de Identidade:	RG - MG-13 . 639 . 449 - MG
Local de Nascimento:	Estado de Minas Gerais
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais - Brasil - 2009
Mestrado:	Mestra em Ciências - Área: Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Fisiopatologia
Data de Matrícula:	31/07/2013
Início da Contagem de Prazo:	31/07/2013
Data Limite para o Depósito:	28/11/2017
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Sandra Helena Poliselli Farsky - 28/07/2017 até o presente. Email: sfarsky@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 31/07/2013
Prorrogação(ões):	120 dias Período de 31/07/2017 até 28/11/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 21/10/2015

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 31/07/2013 Prorrogação em 28/07/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
Última ocorrência: Prorrogação em 28/07/2017
Impresso em: 22/10/2017 12:20:42

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 7531350/1 - Cíntia Scucuglia Heluany

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5746-3/1	Comprometimento do Sistema Imunológico nas Intoxicações	05/08/2013	15/09/2013	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/2	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	88	B	N	Concluída
EDM5791-6/1	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	03/06/2014	120	8	83	A	N	Concluída
FBC5793-12/1	Tópicos em Análises Clínicas I	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	24
Estágios:			
Total:	0	20	24

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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: Prorrogação em 28/07/2017
Impresso em: 22/10/2017 12:20:42

Anexo III: Comprovante de submissão do artigo, referente a uma parte dos resultados obtidos durante o doutorado

Toxicological Sciences

OXFORD UNIVERSITY PRESS | Toxicological Sciences

Hydroquinone is a potential component of cigarette smoking on development of rheumatoid arthritis

Journal:	*Toxicological Sciences*
Manuscript ID	TOXSCI-17-0555
Manuscript Type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	12-Oct-2017
Complete List of Authors:	Heluany, Cintia Scucuglia; University of Sao Paulo, Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences Kupa, Leonard de Vinci Kanda; University of Sao Paulo, Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences Fernandes, Cristina Maria ; Butantan Institute, Pharmacology Division; Butantan Institute, Pharmacology Division Viana, Mariana Nascimento; Butantan Institute, Pharmacology Division Barbosa, Christiano Marcello Vaz; University of São Paulo, Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences Silveira, Eduardo; University of São Paulo, Clinical and Toxicological Analyses Farsky, Sandra; University of Sao Paulo, Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences
Key Words:	environmental pollution, cigarette smoke, benzene metabolite, synovial membrane, AhR

SCHOLARONE™
Manuscripts