UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)

Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue).

ANDRÉ VINICIUS NUNES

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Eduardo L. V. Silveira
Co-orientador(a): Dra. Viviane Schuch

São Paulo
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)

Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue).

ANDRÉ VINICIUS NUNES

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de MESTRE
Orientador: Prof. Dr. Eduardo L. V. Silveira
Co-orientador(a): Dra. Viviane Schuch

São Paulo
2019

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

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

N972i

Nunes, André Vinicius
Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue) / André Vinicius Nunes. - São Paulo, 2019.
186 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Silveira, Eduardo Lani Volpe da
Coorientador: Schuch, Viviane

1. Hidroquinona. 2. Resposta Imune. 3. Vacinas. 4. Transcriptoma. I. T. II. Silveira, Eduardo Lani Volpe da , orientador. III. Schuch, Viviane , coorientador.

André Vinicius Nunes

Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue).

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do Título de MESTRE

Prof. Dr. Orientador/Presidente

Prof. Dr. Eduardo Lani Volpe da Silveira

Dra. Co-orientadora

Dra. Viviane Schuch

1º. Examinador(a)

2º. Examinador(a)

3º. Examinador(a)

São Paulo, 2019.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) .

A Deus e toda minha família pelo apoio e amor dedicado.

A minha mãe/avó Maria de Lourdes e Maríbia por serem toda a minha força.

Aos meus irmãos Rodrigo, Manuela e Fernanda.

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

LOUIS PASTEUR

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha grande força em todos os momentos que passei durante o meu mestrado.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Silveira e minha co-orientadora Dra. Viviane Schuch pela dedicação e paciência.

Agradeço aos professores colaboradores deste projeto, Profª. Dra. Sandra Farsky, Profª. Dra. Irene Soares, Prof. Dr. Luís Carlos Ferreira e Profª. Dra. Tânia Marcourakis.

Agradeço ao pessoal do laboratório de toxicologia da FCF, Profª. Dra. Tânia Marcourakis, Ana Carolina, Stephanny e tantos outros.

Agradeço ao pessoal do laboratório de toxicologia e farmacologia da FCF, da Profª. Dra. Sandra Farsky em especial Cíntia Heluany por me ajudar em muitos momentos.

Agradeço a Profª. Dra. Ana Paula de Melo Loureiro por me deixar utilizar o laboratório durante o período de exposição dos animais, e por me ouvir em relação a outros planos para o projeto.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, do Prof. Dr. Luís Carlos Ferreira, em especial ao Lennon, Maria Fernanda e a Deni, por toda ajuda durante execução desta pesquisa.

Agradeço ao pessoal do laboratório da Profª. Dra. Irene Soares, em especial a técnica Kátia Sanches por me ajudar nos protocolos iniciais.

Agradeço a Fabiana (Faby) técnica do laboratório por me ajudar em muitos momentos.

Agradeço aos meus amigos, David Soares, Érika, Nágela Fernanda e Ticiana por estarem junto comigo esses anos todos.

Agradeço a Mestre Tathyane Quirino por estar comigo durante os dois anos do mestrado.

Agradeço as alunas de Iniciação científica do laboratório de Imunologia Aplicada, Isabela Salles, Andreia, Tiffany e Nayara.

Agradeço a Doutoranda Vivian Bonezi e a Pós-doc. Mariana Ribeiro por fazerem parte da minha história e por terem paciência em me escutar durante esses anos do mestrado, além de toda ajuda na realização dos experimentos e claro da amizade que vou levar por toda vida.

Agradeço a Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo brilhante trabalho em manter a qualidade do seu ensino e pesquisa.

Agradeço ao pessoal da Associação dos Pós-graduandos Helenira Preta Resende da Universidade de São Paulo por todo carinho nestes anos de luta por uma pós graduação que respeite o papel dos alunos, além do seu histórico de lutas e permanência de suas atividades, em especial quero citar a presidenta da Associação Nacional de Pós-graduandos (ANPG), a doutoranda Flávia Calé que me inspira a não desistir de lutar por um país melhor onde a educação e saúde sejam prioridades.

Agradeço aos grandes amigos que fiz durante o mestrado e que vou levar para vida, a todo povo negro que luta a cada dia para existir e permanecer dentro de uma Universidade, todos vocês foram essenciais para eu continuar de pé e de cabeça erguida.

Não menos importante, agradeço a todas as pessoas que não citei o nome aqui, pois são muitas, que contribuíram direta e indiretamente com o sucesso desta pesquisa, meu muito obrigado a todos vocês.

RESUMO

NUNES, A. V. Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue). 186 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019.

A fumaça do cigarro apresenta mais de 8700 substâncias identificadas, as quais já foram relacionadas com o desenvolvimento das mais variadas doenças. Dentre elas, uma substância relevante neste contexto de toxicidade do cigarro é a hidroquinona (HQ), gerada após a biotransformação do benzeno inalado. A HQ apresenta atividades relacionadas com a imunossupressão das respostas imune inata e adaptativa, observados mais no contexto *in vitro* e parcamente no *in vivo*; contudo, nenhum estudo ainda trouxe a abordagem do efeito da exposição à HQ sobre a resposta induzida por vacinação. Sendo assim, será que a exposição à fumaça do cigarro ou à HQ influenciaria na resposta de células B e geração de anticorpos induzidas por imunizações com vacinas anti-virais? Observamos que, após a exposição diária com 2500 ppm de HQ (equivalente a um maço de cigarro fumado / dia) por 8 semanas e vacinação com proteína recombinante codificadora do domínio III do Envelope do vírus da Dengue sorotipo 2 (EDIII) mais o adjuvante Alum, houve uma “tendência” para menores títulos de IgG total e IgG1 específicos à EDIII em camundongos *C57BL/6*. Análises histológicas revelaram um menor número de folículos e redução significativa de suas áreas no baço do grupo HQ em comparação com os não expostos. Para entendermos o efeito da HQ sobre a resposta humoral, realizamos uma análise de dados públicos de transcriptoma obtidas de amostras de sangue de humanos. Curiosamente, observamos que a HQ regula positivamente genes relacionados com a ativação de células B, assim como a migração e quimiotaxia de neutrófilos e outros leucócitos. Como é sabido que existe uma população de neutrófilos (N2) com a capacidade de auxiliar as respostas de células B, hipotetizamos que essas células poderiam disparar um mecanismo imunocompensatório que aumenta os títulos de anticorpos no grupo HQ.

Palavras chave: Hidroquinona, Resposta Imune, Vacinas, Transcriptoma.

ABSTRACT

NUNES, A.V. The Influence of Hydroquinone in the humoral and cellular immune responses elicited by vaccination with Dengue envelope recombinant Protein; Dissertation (Master of Science). 186 p. School of Pharmaceutical Sciences of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil, 2019.

The cigarette smoke has more than 8700 harmful substances related to the occurrence of the most varied diseases. Among them, a relevant substance is the hydroquinone (HQ), generated upon the biotransformation of inhaled benzene. In vitro and in vivo analyses have demonstrated that HQ can suppress both innate and adaptive immune responses. However, no study has approached the effect of the HQ exposure on the vaccination-induced response. Thus, would the exposure to the cigarette smoke or HQ influence the B-cell and antibody responses elicited by immunizations with antiviral vaccines? We observed a "tendency" to lower titers of IgG total and IgG1 anti-EDIII in mice daily exposed to 2,500 ppm of HQ for 8 weeks and vaccinated. Histological analyses revealed a smaller number of follicles and a significant reduction in their area in the HQ group in comparison to their counterparts. In order to understand the effect of the HQ on the humoral response, we performed an analysis of public transcriptome data derived from human blood samples. We observed that the HQ up-regulates the expression of genes related to B cell activation as well as the migration and chemotaxis of neutrophils and other leukocytes. Considering that N2 neutrophils have the ability to help the B cell response, we have hypothesized that the HQ exposure may trigger an immunocompensatory effect, increasing the humoral response.

Key Words: Hydroquinone, Immune Response, Vaccines, Transcriptome.

LISTA DE ABREVIATURAS

AEC	Substrato 3-amino 9-etilcarbazol
ASC	Célula secretora de anticorpos, do inglês - *antibody-secreting cell*
ATP	Adenosina Trifosfato, do inglês - *Adenosine triphosphate*
BZ	Benzeno
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CO_2	Dióxido de Oxigênio
CG	Centro Germinativo
cDNA	DNA Complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês - *Deoxyribonucleic acid*
DENV1	Sorotipo 1 do Vírus da Dengue
DENV2	Sorotipo 2 do Vírus da Dengue
DENV3	Sorotipo 3 do Vírus da Dengue
DENV4	Sorotipo 4 do Vírus da Dengue
EDI	Domínio I da proteína do Envelope (E) do Vírus da Dengue
EDII	Domínio II da proteína do Envelope (E) do Vírus da Dengue
EDIII	Domínio III da proteína do Envelope (E) do Vírus da Dengue
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática, do inglês - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
ELISPOT	Ensaio para quantificação do número de células secretoras de anticorpos, do inglês - *Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FBS	Soro Bovino Fetal, do inglês - *Fetal Bovine Serum*
HQ	Hidroquinona
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgA	Imunoglobulina A
IgG1	Subclasse tipo 1 de imunoglobulina G
IgG2	Subclasse tipo 2 de imunoglobulina G
IgG2a	Subclasse tipo 2a de imunoglobulina G

IgG2b	Subclasse tipo 2b de imunoglobulina G
IgG3	Subclasse tipo 3 de imunoglobulina G
IgG4	Subclasse tipo 4 de imunoglobulina G
i.m	via intramuscular
i.p	via intraperitoneal
IQ	Instituto de Química
IL	Interleucina
INFγ	Interferon gamma
M	Proteína estrutural da membrana do DENV
mRNA	RNA mensageiro, do inglês - *Messenger RNA*
nAbs	Anticorpos neutralizantes, do inglês - *neutralizing antibodies*
NF-κB	Fator nuclear Kappa B, do ingles - *Nuclear Factor kappa B*
NK	Células natural Killer
nm	Nanômetro
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2a	Proteína não estrutural 2a
NS2b	Proteína não estrutural 2b
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4a	Proteína não estrutural 4a
NS4b	Proteína não estrutural 4b
NS5	Proteína não estrutural 5
OPD	Substrato O-fenilenodiamina, do inglês - *O-phenylenediamine*
ORF	Fase de Leitura Aberta, do inglês - *open reading frame*
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês - *Phosphate Buffered Saline*
q.s.p	Quantidade suficiente para
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo *Roswell Park Memorial Institute*.
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês - *Ribonucleic acid*
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês, *Real Time PCR*
s.c	via subcutânea
Tb-HQ	Terci-Butil hidroquinona
Th1	Cells T auxiliadoras (padrão de resposta Th1)
Th2	Cells T auxiliadoras (padrão de resposta Th2)
Th17	Cells T auxiliadoras (padrão de resposta Th17)

TLR4	Receptor do tipo Toll 4, do inglês - *Toll-like receptor 4*
TLR5	Receptor do tipo Toll 5, do inglês - *Toll-like receptor* 5
TLR7	Receptor do tipo Toll 7, do inglês - *Toll-like receptor* 7

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1 – Principais fontes de exposição à Hidroquinona. 7

Tabela 2 – Resultados do estudo com o BZ obtido da plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO – NCBI).....46

Tabela 3 – Resultados do estudo com a HQ obtido da plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO – NCBI).....46

Tabela 4 – Resultados do estudo com cigarro obtido da plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO – NCBI).....47

Tabela 5 - Dados gerados através da plataforma GEO2R do NCBI-GEO, através do estudo GEO Ref: GSE21862.; FC: *Fold change*.....53

Tabela 6 - Genes com sobreposição entre o estudo do benzeno, cigarro e hidroquinona com suas funções.....66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Principais problemas relacionados ao Tabagismo..... 2
Figura 2 - Metabolização do Benzeno e geração de Hidroquinona (HQ)..... 3
Figura 3 - Oxidação da Hidroquinona e geração de produtos na médula óssea..... 6
Figura 4 - Modelo estrutural dos Anticorpos..... 10
Figura 5 - Distribuição global da infecção pelo vírus da Dengue em 2016.....16
Figura 6 - Série histórica da incidência de casos de Dengue no Brasil de 1990 à 2016... 17
Figura 7 - Ciclo do vírus da Dengue em humanos e nos mosquitos 18
Figura 8 - Desenho experimental da exposição com a HQ e imunização com a EDIII do DENV 27
Figura 9 - A exposição à HQ por curto período antes (5 dias) ou durante (15 dias) e após (13 dias) a vacinação não foi suficiente para provocar uma imunossupressão nos animais..... 35
Figura 10 - A exposição com maiores doses de HQ tem o potencial de reduzir os títulos de anticorpos induzidos por vacinação com EDIII..... 37
Figura 11 - Imunização de proteína recombinante combinada com Alum induz maiores títulos de IgG-específicos via intramuscular, que pela via subcutânea..... 39
Figura 12 - A exposição por 8 semanas com 2500 ppm de HQ apresentou uma redução não significativa na capacidade de resposta humoral indizida por vacinação para IgG1..... 40
Figura 13 - A exposição com a HQ reduz não significativamente a frequência de células secretoras de anticorpos do baço mas não na medula óssea e timo..... 41
Figura 14 - A exposição com 2500 ppm de HQ diminui a área folicular no baço de camundongos vacinados com a EDIII..... 43
Figura 15 - A exposição com 2500 ppm de HQ diminui a área medular no timo de camundongos vacinados com a EDIII..... 44
Figura 16 - Desenho experimental da análise transcriptômica..... 45
Figura 17 - Lista de genes regulados negativamente pelo BZ que não possui relação com a resposta imune humoral..... 48
Figura 18 - Network dos 6 genes down-regulated pelo BZ interligados apresentando algum tipo de relação com a resposta imune..... 49

Figura 19 - Genes Up-regulated pelo BZ relacionados com a resposta imune e suas redes em porcentagem..... 50
Figura 20 - Network dos 9 genes Up-regulated pelo BZ interligados com a resposta imune..... 52
Figura 21 - Genes *Down-regulated* pelo cigarro associados com ativação de células T..... 55
Figura 22 - *Network* dos 12 genes *down-regulated* pelo cigarro associados com a resposta imune..... 57
Figura 23 - Genes *up-regulated* pelo cigarro associados com resposta viral..... 58
Figura 24 - Network dos 14 genes *Up-regulated* pelo cigarro associados com a defesa viral..... 60
Figura 25 - Genes *down-regulated* pela tB-HQ estão envolvidos em processos com células T e receptor Fc..... 62
Figura 26 - Network dos 8 genes *Down-regulated* pela HQ (tB-HQ) associados com processos de células T..... 63
Figura 27 - Genes *Up-regulated* pela HQ (tB-HQ) possuem relação direta com à resposta imune humoral bem como migração e quimiotaxia de neutrófilos..... 65
Figura 28 - Network dos 8 genes *Up-regulated* pela HQ (tB-HQ) apresentando uma relação com a resposta humoral além da migração e quimiotaxia de neutrófilos..... 67
Figura 29 - Contagem de genes regulados negativamente e positivamente de transcriptoma analisados entre todos os estudos..... 69
Figura 30 - Tipos de interações entre os principais genes de células secretoras de anticorpos (ASC) e os genes *up-* e *down-regulated* sobrepostos entre os estudos com o cigarro, BZ e HQ..... 72
Figura 31 - Genes regulados positivamente pela HQ exibem mais de 60% de co-expressão com os genes de ASCs..... 74
Figura 32 - A exposição com a HQ diminuiu, mas não significativamente, a capacidade de neutralização viral em ensaio de PRNT..... 75

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 1

1.1 Poluentes e seus efeitos tóxicos 1

1.2 Hidroquinona 4

1.3 Sistema imune e sua relação com à Hidroquinona 7

1.4 Dengue.....15

1.5 Resposta imune ao Dengue.....20

2.0 OBJETIVOS.....26

2.1 Objetivo geral..... 26

2.2 Objetivos específicos 26

3.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....27

4.0 MÉTODOS.....28

4.1 Animais e amostras analisadas 28

4.2 Imunizações..... 28

4.3 ELISA..... 29

4.4 ELISPOT..... 30

4.5 Análise Histológica 30

4.6 Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida 31

4.7 Seleção e análise de dados de transcriptoma (Biologia de Sistemas) 33

4.8 Análise de dados transcriptômicos ……32

4.9 Análise de Enriquecimento do conjunto de genes……..……32

5.0 Construção da rede gênica……....……33

5.1 Ensaio de Neutralização (PRNT)……33

5.2 Análise estatística……..……34

6.0 RESULTADOS.....34

7.0 DISCUSSÃO 76

8.0 CONCLUSÕES 88

9.0. ASPECTOS ÉTICOS.....89

10.0 DISSEMINAÇÃO E AVALIAÇÃO.....89

11.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....90

12.0 ANEXOS.....112

1. INTRODUÇÃO

1.1 Poluentes e seus efeitos tóxicos

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição do ar é designada como a contaminação do ambiente interno ou externo por qualquer agente que possa modificar as características naturais da atmosfera. Esses agentes podem ser de natureza química, física ou biológica, podendo destacar-se substâncias como: o monóxido de carbono, ozônio, dióxido de enxofre e o dióxido de nitrogênio (Sircar, K. et al. 2015.; EPA, 2017; REVIHAAP. 2017). Tais componentes estão presentes geralmente na poluição doméstica, em veículos automotores, na queima de combustível por indústrias químicas, siderúrgicas e também incêndios (Alexis, N. P et al., 2004; Jarrett, M., 2009).

Outros compostos tóxicos derivados dessas mesmas fontes, que também podem oferecer um grande risco para saúde humana e ambiental, são o cigarro e os seus componentes tóxicos. A exposição a esses agentes está associada com maiores chances de desenvolvimento e progressão de doenças graves que consequentemente podem levar o indivíduo ao óbito (WHO, 2017). Ainda em relação ao cigarro, é inquestionável o impacto de sua toxicidade para a saúde pública mundial. Esse possui mais de 8700 substâncias identificadas (Stabbert et al., 2017), dentre as quais estão descritos metais, gases tóxicos e substâncias cancerígenas. Não obstante, os mecanismos propostos de como a ação da fumaça do cigarro afeta o início ou o desenvolvimento de certas doenças, ainda não são bem explanados. O efeito dos seus constituintes individuais, como a HQ, ainda é contraditório e pouco compreendido nestes modelos biológicos (Hecht & Szabo, 2014.; INCA, 2017).

A exposição às substâncias presentes na fumaça do cigarro propicia o desenvolvimento de graves doenças como alterações na pele, infertilidade, problemas respiratórios, cardiovasculares, diabetes e câncer, assim como o enfraquecimento do sistema imunológico (revisado por Stämpfli & Anderson, 2009), (Figura 1). Estima-se que existam aproximadamente 1,1 bilhão de fumantes no mundo, sendo somente no Brasil mais de 200 mil óbitos a cada ano pertinentes ao tabagismo, onde mais de 1,5% são de fumantes passivos (Jarrett et al., 2009; BRASIL, 2014).

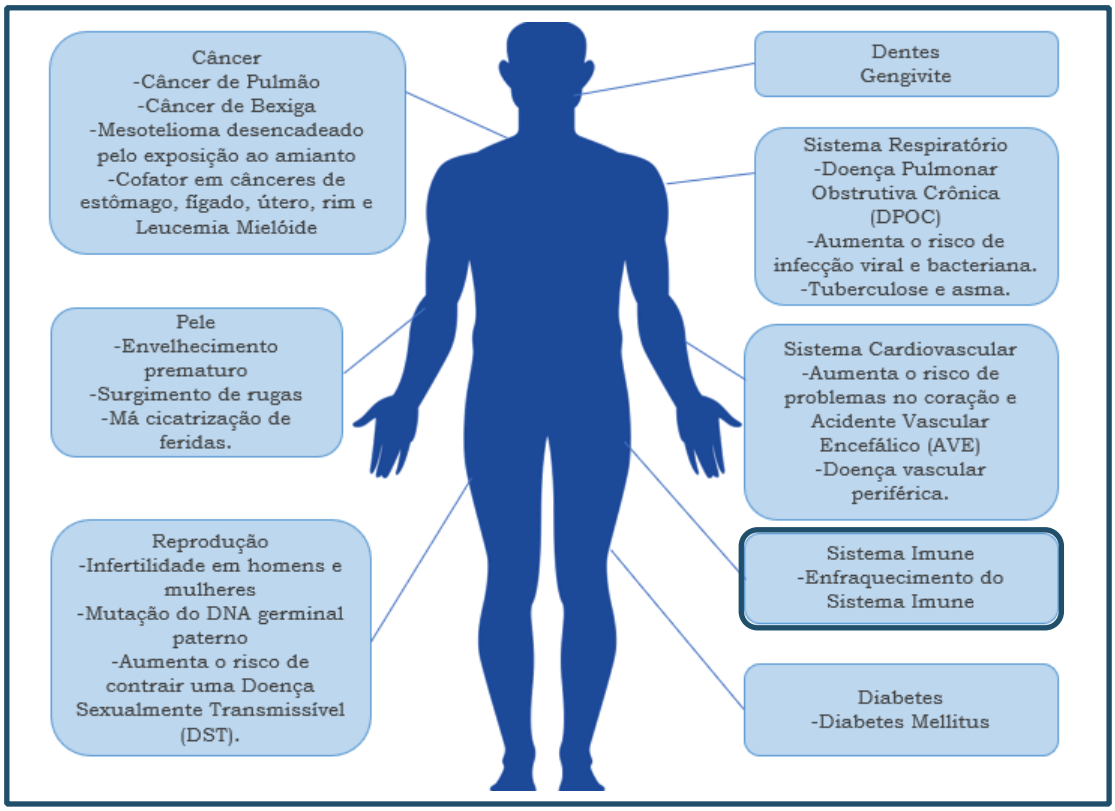


Figura 1 - Principais problemas relacionados ao tabagismo. Fonte: Figura modificada de: *adverse effects of cigarette smoke, From How cigarette smoke skews immune responses to promote infection, lung disease and cancer. Martin R. Stämpfli & Gary P. Anderson, Nature Reviews Immunology 9, 377-384 (2009).*

Durante a queima do cigarro ocorre a metabolização de várias substâncias químicas, dentre elas o BZ (Figura 2). Esse é um composto aromático (hidrocarboneto) empregado em vários processos químicos e siderúrgicos, sendo utilizado na fabricação de plásticos, corantes e resinas. Muitos são os meios de contato com o BZ, sendo bem comum a exposição ocupacional e sua liberação por veículos (Wilber, 2008). Dentre seus vários efeitos tóxicos para o organismo, são descritos a hematoxicidade, neoplasias e efeitos imunossupressores (Li et al., 2014). Alguns estudos que mostraram o perfil de expressão gênica regulados pelo BZ e seus metabólitos apontam alvos críticos da hematopoese sendo alterados após a alta exposição com essa substância (Li et al., 2014).

É crucial abordar também os vários estudos em humanos relacionados à exposição ao BZ, onde o prejuízo para a função imunológica possui um grande destaque. As exposições com essa substância, mesmo em baixas concentrações, mostraram alterar as proporções das células imunes (Lan et al., 2004), além do forte efeito sobre as vias de sinalização envolvidas na resposta imunológica (McHale et al., 2010).

Esse processo inicia-se com a absorção do BZ pelas vias dérmicas, respiratória, oral ou intestinal. Em seguida, ele é metabolizado pelas enzimas do citocromo P-450 presentes no fígado e no pulmão (Schlosser et al., 1989; Snyder, 2004). Com isso, é gerado o óxido de benzeno que é amplamente metabolizado ou sofre rearranjo espontâneo, produzindo o fenol. Este último é convertido pelas enzimas do citocromo P-450, principalmente a CYP2E1, em HQ no fígado (Hedli, 1996; Inchem, 2017). Depois de absorvida, a HQ é rapidamente distribuída pela corrente sanguínea aos tecidos (Pinedo, 2009; CEFARMA, 2017; Santos et al., 2017).

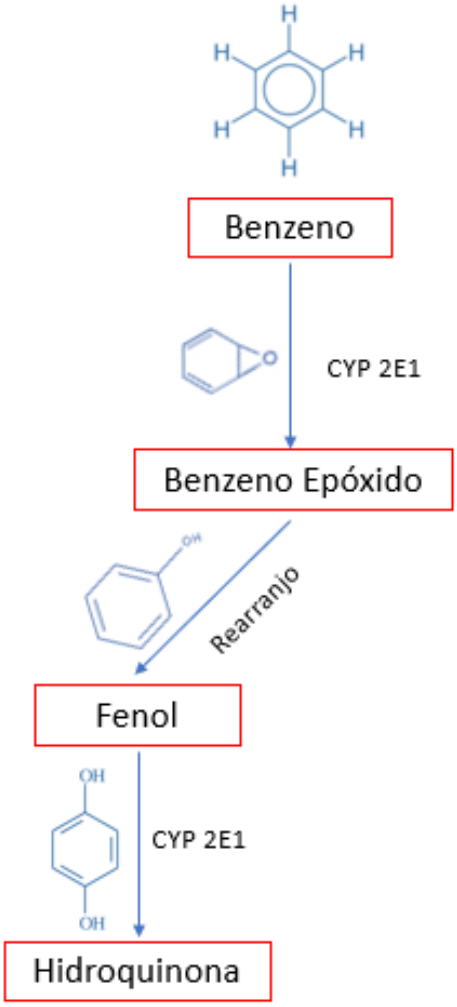


Figura 2 - Metabolização do Benzeno e geração de Hidroquinona (HQ). A metabolização do benzeno é realizada pelas enzimas do citocromo P450 no pulmão e no fígado, principalmente pela CYP 2E1, gerando a hidroquinona e o fenol que são seus principais metabólitos. Figura modificada de: Santos., et al. Aspectos Toxicológicos do Benzeno, Biomarcadores de Exposição e Conflitos de Interesses. Rev. Bra. De Saúde Ocupacional. 2017.

1.2 Hidroquinona

Além do cigarro, a HQ também pode ser encontrada a partir da atividade nas indústrias químicas e petrolíferas, em medicamentos dermatológicos, solventes usados em reveladores fotográficos e em fontes alimentícias, como o café, vegetais, frutas, chá e vinho. Consequentemente, essa dualidade em meios de exposição, trazem maiores dificuldades no processo de compreensão da absorção da HQ no organismo humano com relação as diferentes fontes de exposição (DeCaprio, 1999; Lee et al., 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais fontes de exposição à Hidroquinona.

Fontes de exposição à Hidroquinona	
Produtos domissanitários	Desinfetantes, naftalenos, lustra-móveis, ceras para chão.
Produtos alimentícios	Café, frutas, verduras, chá, pão, vinho, algumas plantas medicinais.
Medicamentos	Cremes dermatológicos.
Solventes	Alguns óleos brutos (ex. *óleo Bunker*)
Industria siderúrgica	Componente usado nos processos siderúrgicos.
Industria Química	Gás de coqueira (BTX) Benzeno, Tolueno e Xileno.
Industria Petrolífera	Gasolina automotiva.

A HQ, quando aquecida, atua como combustível. É um produto redutor que é oxidado para semiquinona e quinona de forma reversível (Enguita e Leitão., 2013; INCHEM., 2017). Também esta disponível na natureza na forma de arbutina, sendo convertida no organismo em HQ (Inoue et al., 2013).

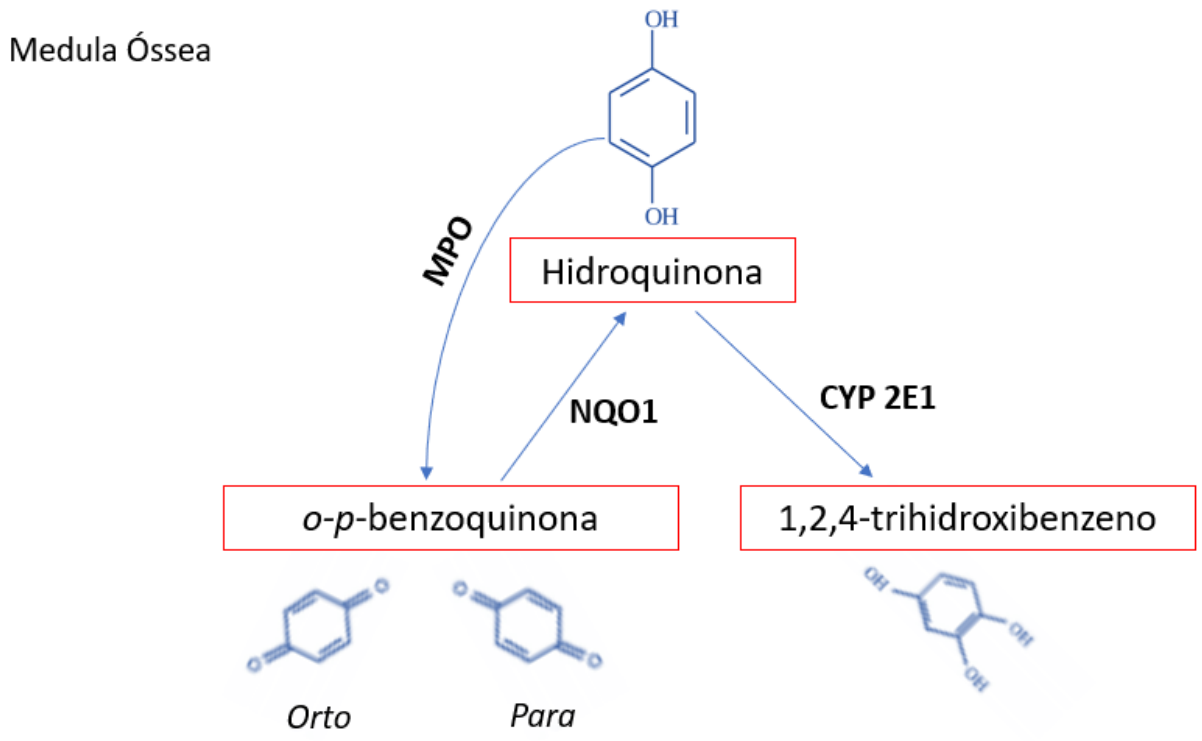
Apesar das poucas fontes citadas, o seu veiculo maior de exposição conhecida, é o cigarro. Considerando que sua fumaça pode ser dividida em fase de vapor e fase

particulada, a HQ pode representar cerca de 10% da fase particulada (Stabbert et al., 2017). Ademais, suas concentrações podem variar de 100 a 300 microgramas por cigarro, tendo um papel de depósito de cerca de 100 microgramas por cigarro de HQ nos pulmões, podendo ser então distribuída para outros orgãos e tecidos (IARC, 1987).

Ainda é indispensável citar a fonte de exposição ocupacional envolvendo a HQ. Em diferentes países, essa exposição pode variar de 0,5 a 2 mg/m^3. Um terço dos mais de 30 milhões de produtos produzidos à base de HQ no mundo são vendidos nos EUA (Tse., 2010; Enguita e Leitão., 2013; Onlinelibrary, 2017). A Organização do Trabalho dos Estados Unidos determina que o limite de exposição à HQ seja de 2 mg/m^3. Mesmo assim, desde o ano 2000 os países da União Europeia proibiram a venda de produtos cosméticos à base de HQ que exceda o valor de 1% em suas formulações, justificado pelos impactos relatados, pouco elucidados e controversos sobre essa substância (Tse, 2010; OSHA, 2018).

Apesar da HQ poder ser dosada no sangue e na urina das pessoas, são escassos os resultados concretos da sua concentração no ar, água ou solo. Sua concentração em alguns produtos pode muitas vezes variar de 1 - 2% dependendo da formulação, o que é permitido em alguns países como os EUA. Entretanto, alguns produtos de limpeza de pele podem atingir concentrações ainda maiores, o que é motivo de alta preocupação para as órgãos fiscalizadores responsáveis (INCHEM, 2017.; Onlinelibrary, 2017).

Já em relação aos seus efeitos no organismo, a HQ reage com componentes diversos do sistema biológico, podendo exercer diretamente um efeito sobre o metabolismo das células. A HQ ainda pode sofrer metabolização pelas mesmas enzimas do CYP-450 e oxidação na medula óssea pela ação da enzima mieloperoxidase, formando os metabólitos reativos *o*- e *p*-benzoquinona (Santos et al., 2017). A sua excreção juntamente com seus metabolitos é rápida, ocorrendo principalmente pela urina (Hedli., 1996.; DeCaprio., 1999; Inchem, 2017). (Figura 3).



MPO= Mieloperoxidase; NQO1= NAD(P)H quinona oxidorredutase-1

m

Figura 3 - Oxidação da Hidroquinona e geração de produtos na médula óssea. A hidroquinona é oxidada na medula óssea via ação da enzima mieloperoxidase (MPO), gerando os metabólitos reativos *orto*- ou *para*-benzoquinona. Ocorre também a reação inversa, na qual estes metabólitos são reduzidos em HQ via catálise pela enzima NAD(P)H quinona oxidorredutase-1 (NQO1). A HQ ainda pode ser convertida para o metabólito 1,2,4-trihidroxibenzeno pela ação catalítica da enzima CYP2E1. Figura modificada de: Santos., et al. Aspectos Toxicológicos do Benzeno, Biomarcadores de Exposição e Conflitos de Interesses. Rev. Bra. De Saúde Ocupacional. 2017.

Poucos estudos trazem abordagens para se obter resultados concretos da biodisponibilidade da HQ no organismo. A maioria deles apontam resultados no contexto dermatológico, o que dificulta saber realmente o grau de toxicidade geral para o organismo humano (Monteiro et al., 2013).

1.3 Sistema Imune e sua relação com a Hidroquinona

O sistema imune compreende uma rede complexa de células, tecidos e órgãos que, juntos, medeiam ações para proteger o organismo contra o estabelecimento de infecções ou qualquer agente que traga prejuízos ao seu funcionamento (https://www.nature.com/subjects/immune-system). O sistema imune pode ser dividido em imunidade inata e adaptativa, os quais, possuem respostas distintas.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos, sendo mediada por fagócitos, como os macrófagos e células dendríticas (DCs), assim como por células NK (Medzhitov, 2013). Dentre os seus mecanismos de ativação, existem os receptores de reconhecimento de padrões moleculares (do inglês, *Pattern Recognition Receptors* - PRRs) de microrganismos ou associados a perigos de tecidos inflamados que reconhecem PAMPs (do inglês, *pathogen-associated Molecular Patterns*) ou DAMPs (do inglês, *Damage-associated Molecular Patterns*), respectivamente (Akira et al., 2006; Akira, 2013; O´Neill et al., 2013).

Dentre os protótipos dos PRRs, podemos destacar os receptores do tipo Toll (do inglês, *Toll Like Receptor* - TLR) que reconhecem um conjunto distinto de PAMPs. Disparam, então, uma sinalização intracelular que culmina no recrutamento de moléculas adaptadoras específicas. Consequentemente, sua ativação leva à translocação dos fatores de transcrição NF-κB e do regulador de Interferon IRF para o núcleo celular, resultando na resposta imune inata (Kawasaki & Kawai, 2014). Essa família dos TLRs dispõe de 10 membros (TLR1 – TLR10) em humanos e 12 nos camundongos (TLR1 – TLR9, TLR11 – TLR12) (Mancuso et al., 2009; Guiducci et al., 2013; Zakeri & Russo, 2018).

Sabe-se que alguns receptores associados à resposta imune inata, como TLR7 e TLR5, influenciam diretamente a geração da resposta imune humoral. Foi observado que camundongos deficientes de TLR7 apresentaram menores números de folículos, frequências de células B e T foliculares, e secretoras de anticorpos no baço, culminando em menores títulos de anticorpos (Soni et al., 2014). Em um contexto de infecção com o vírus da coriomeningite linfocítica, estes mesmos camundongos deficientes de TLR7 mostraram menor proliferação de células B foliculares e redução de células secretoras de anticorpos (Clingan & Matloubian, 2013). Quanto ao papel de TLR5 nesta resposta, menores títulos de IgG total e subclasses específicas no soro

foram observados em camundongos deficientes de TLR5 após imunização com vacina contra gripe. Neste caso, a relação do TLR5 na imunidade à vacina da gripe estaria associada com a microbiota dos animais, já que o ligante deste receptor é a flagelina (proteína bacteriana). Após tratamento com antibióticos em camundongos selvagens, diminuiu-se as quantidades de bactérias nas fezes, e foi observada uma menor resposta humoral após imunização com vacina da gripe nos camundongos deficientes para TLR5 (Oh et al., 2014).

E qual a relação destes receptores com o cigarro ou HQ? Estudos *in vitro* apontam que culturas de células dendríticas infectadas com vírus sincicial respiratório (RSV) ou de células epiteliais pulmonares com um extrato feito de cigarro têm as expressões de TLR7 e de TLR5 reduzidas respectivamente (Castro et al., 2011; Wang et al., 2012). Indivíduos fumantes saudáveis ou fumantes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) também apresentam uma menor expressão de TLR5 (Wang et al., 2012). Além disso, sabe-se que a microbiota bacteriana intestinal de fumantes é alterada em relação a indivíduos normais (Biedermann et al., 2013).

Além disso, já foi observado que macrófagos alveolares oriundos de fumantes ativos secretam níveis significativamente mais baixos de citocinas pró-inflamatórias que as mesmas células de indivíduos saudáveis (Holt & Keast, 1977; McCrea et al., 1994). Ainda, a atividade funcional de células NK, provenientes também de fumantes, foi reduzida significativamente quando cultivada juntamente com melanomas e outras células cancerosas em relação às mesmas células de indivíduos saudáveis (Ferson et al., 1979; Sopori, 2002).

A HQ induz uma imunossupressão, promovendo o crescimento de células tumorais, o qual está diretamente associado com a supressão e modulação da resposta imune (Snyder, 2002; Snyder, 2004). Neste caso, a HQ inibiu a proliferação de linfócitos através da supressão da síntese de DNA, e exerceu um efeito citotóxico em eosinófilos, neutrófilos e até mesmo em linfócitos através da via caspase 9/3, observados em estudos *in vitro* (Lee, 2012; Li, 1996; Yang, 2011).

Em relação à imunidade adaptativa, essa compreende o processo de eliminação tardia dos patógenos, que apesar das mais variadas características, possui um importante fator que é a especificidade e memória imunológica (Akira et al., 2006). Ela se desenvolve por seleção clonal de linfócitos T e B, a partir de um processo conhecido como rearranjo gênico das seqüências VDJ de seus respectivos receptores de antígenos durante os estágios iniciais do desenvolvimento. Isso gera múltiplas

combinações que aumentam o espectro de atuação destas células (Akira et al., 2006; Cooper & Alder, 2006; Munoz et al., 2007). Ainda em relação à resposta adaptativa, essa pode ser dividida em imunidade humoral e celular (https://www.nature.com/subjects/immune-system).

Alguns estudos têm explanado que a HQ compromete a função de células do sistema imune inato e adquirido, apreciados no contexto *in vitro*, sugerindo que a exposição à HQ pode afetar a resposta imune humoral (Taysse et al., 1995; Kim et al., 2005; Lee et al., 2007; Choi et al., 2008). A imunidade humoral tem como base a resposta mediada por anticorpos que também são conhecidos como imunoglobulinas. Essas moléculas de proteínas glicosiladas presentes na superfície de células B (imunoglobulinas de superfície) atuam como receptores de antígenos (BCR), ou são secretadas no espaço extracelular exercendo funções como a neutralização (Figura 4 (Murphy, 2012)).

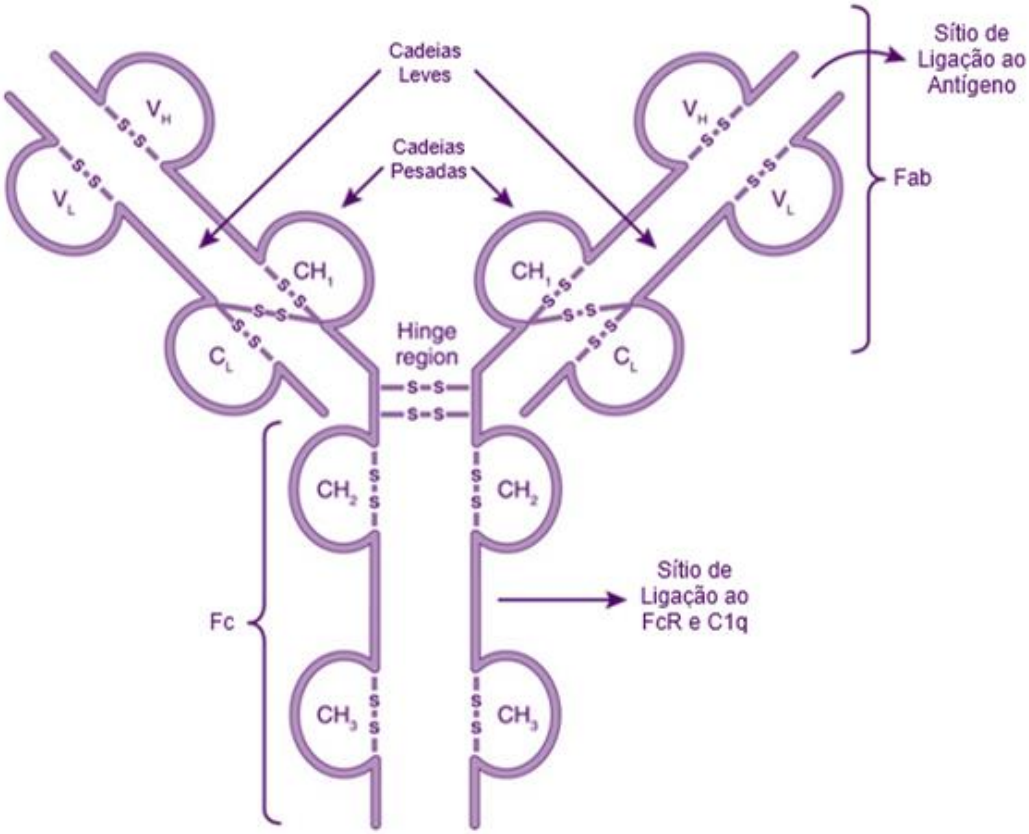


Figura 4 - Modelo estrutural dos Anticorpos – As imunoglobulinas ou anticorpos são compostos por duas cadeias leves (VL e CL) e duas cadeias pesadas (VH e CH). A região Fab (região de ligação ao antígeno – é composta por um domínio de cada cadeia (VH e VL)). As regiões determinantes de complementariedade (CDRs) estão presentes nos domínios variáveis e determinam os pontos de contato do anticorpo em relação ao antígeno. Os domínios CH2 e CH3 da cadeia pesada constituem o fragmento Fc, que são importantes para as funções efetoras dos anticorpos. Figura adaptada de Hoffman et al., 2015.

Existem ainda quatro subclasses ou isotipos de anticorpos IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) com funções efetoras importantes, como: neutralização, com a ligação ao patógeno inibindo seu efeito tóxico promovendo a infectividade, ativando macrófagos e outras células imunes que se ligam aos receptores Fc (FcRs) que reconhecem as regiões constantes de classes específicas das imunoglobulinas, ou consequentemente ativam a via clássica do sistema complemento através da ligação a C1q; opsonização, que se trata do revestimento do patógeno facilitando a sua captação pelos fagócitos e a ativação do sistema complemento (Hoffman et al., 2015; Nature, 2016). Li e colaboradores apontaram que fumantes crônicos apresentam

níveis séricos de IgG significativamente reduzida em relação aos indivíduos saudáveis (Li et al., 1996).

É de sumo destaque salientar a importância das células B no processo de resposta humoral. Existem duas classes principais de linfócitos B tanto em camundongos quanto em humanos, que se classificam de acordo com a sua ontogenia e também a sua localização anatômica, esses são os linfócitos B1 e B2. Os linfócitos B2 ainda se dividem em células B da Zona Marginal (MZ) e células B Foliculares (FO) que vão originar células B de memória ou células B secretoras de anticorpos (Cerutti et al., 2013; Hoffman et al., 2015).

Os Linfócitos B1 exibem peculiaridades fenotípicas, ontogênicas e funcionais próprias que divergem de outros tipos celulares, como as células B2 convencionais. Esses secretam anticorpos naturais poli-reativos que agem na linha de frente na defesa com sua função neutralizante. Outras moléculas atuam também nesse processo de imunomodulação, tal como interleucina 10 (IL-10), fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), adenosina, IL-3 e IL-35 que também são produzidas por células B1 com ou sem estímulos, que regulam doenças inflamatórias agudas e crônicas. Quanto aos linfócitos B2, eles se desenvolvem a partir de células B transicionais 2 (T2) originárias de precursores na medula óssea com liberação ao longo da vida (Cerutti et al., 2013; Hoffman et al., 2015).

As células B da (MZ) expressam BCRs poli-reativos que se ligam a uma gama de PAMPs e também receptores do complemento (CD21 e CD35). Produzem anticorpos IgM poli-reativos que facilitam a eliminação de microrganismos transmitidos pelo sangue e células apoptóticas, diferente das células B (FO) que expressam BCRs mono-reativos (Martin & Kearney, 2002). Um fator importante é que as células B (MZ) participam principalmente de processos de respostas a antígenos independentes de linfócitos T, dispondo de anticorpos de alta afinidade e transportando opsoninas ligadas ao complemento para células dendríticas em folículos linfóides do baço (Colino et al., 2002).

Em relação as células B (FO), essas são residentes no baço e nódulos linfáticos e as mais abundantes de todas as linhagens de células B,. São elas as principais responsáveis pela geração de anticorpos IgG com alta afinidade via ajuda de células T, processo primordial para a proteção mediada por imunidade humoral clássica após infecção ou vacinação (Cerutti et al., 2013).

Ainda em relação à resposta imune humoral, é essencial falar da reação do GC, pois a resposta humoral depende dessa reação para que as células B secretoras de anticorpos e células B de memória produzam imunoglobulinas de alta afinidade ao antígeno (Nilushi & Ulfklein, 2015). As reações dos GCs são transitórias e parte de um complexo sistema dentro dos órgãos linfóides secundários em resposta ao antígeno que envolve uma colaboração única entre proliferação de células B específicas ao antígeno, células T e DC foliculares (Gatto & Brink, 2010; Nilushi & Ulfklein, 2015). Os anticorpos de alta afinidade gerados aqui ampliam a proteção imunológica e, assim como aceleram as respostas de memória contra antígenos específicos. Para isso, é preciso que ocorra o processo de hipermutação somática nos genes V(D)J da região variável da imunoglobulina (Ig) nas células B ativadas, com o intento de diversificar o repertório de anticorpos de alta afinidade (Gatto & Brink, 2010; Nilushi & Ulfklein, 2015). Essa ativação celular leva as células B a proliferarem e diferenciarem-se em células secretoras de anticorpos e células B de memória dentro dos GCs (Nilushi & Ulfklein, 2015).

Os folículos linfóides, em sua grande maioria, são constituídos por células B IgM+ e IgD+ *naive* que ocupam uma região interfolicular delimitadas por áreas com um vasto número de células T (zonas de células T). A formação dos GCs ocorre no centro dos folículos, onde estão presentes as células dendríticas foliculares (FDCs) que originalmente apresentam gênese e fenótipo diferentes das DCs convencionais (Nilushi & Ulfklein, 2015).

Esse processo inicia-se pela ativação das células B *naive* por antígenos exteriores ao folículo linfoide (Batista & Harwood, 2009). Com isso, ocorre a migração das células B para as zonas de células T ou B e até para a região interfolicular. Lá, elas proliferam e interagem por longos períodos com células T específicas para os antígenos, completando o processo de ativação das células B (Okada et al., 2005; Qi et al., 2008; Nilushi & Ulfklein, 2015).

Durante estas reações dos GCs, diversos genes têm sua expressão alterada. Por exemplo, a expressão do gene BCL-6, que controla o programa de transcrição que facilita a migração dessas células B para os GCs (Basso & Dalla-Favera, 2010; Nilushi & Ulfklein, 2015). Outro importante gene expresso pelas células B do GC que contribui diretamente na regulação da expressão de BCL-6 é o IRF8 (Lee et al. 2006). Esse gene exerce suas influências na reação do GC no processo de recombinação somática por troca de classe e desenvolvimento de células secretoras de anticorpos

através da união com PU.1 (PU.1 é um fator de transcrição familiar específico da transformação E26 que é necessário para o desenvolvimento do sistema imune) e IRF4 para promover a ativação de *Aicda* e BCL-6, genes centrais para a manutenção do programa de células B, enquanto reprimem genes como *Prdm1* que promovem a diferenciação terminal (Turkistany & DeKoter, 2011; Shukla & Lu, 2014; Nilushi & Ulfklein, 2015). Outros genes também participam deste processo, como o MEF2B e o MEF2C. Enquanto o MEF2B sabidamente é altamente expresso pelas células B do GC e atua na ativação da transcrição de BCL-6, MEF2C parece ser necessário para formação do CG exercendo um papel importante na proliferação de células B após estímulo antigênico (Wilker et al., 2008; Yin gel al., 2013). Outro fator crucial é o IRF4 (Fator Regulador de Interferon 4), também referido como sendo importante para formação do GC, tanto em benefício da diferenciação das células B quanto das células T. Sem a expressão de IRF4, não há formação dos GCs após a imunização e muito menos a diferenciação das células B em secretoras de anticorpos (Willis et al., 2014) e de células T foliculares *Helper* (Nilushi & Ulfklein, 2015). Já o gene MYC codifica uma fosfoproteína nuclear com papel crucial na regulação da proliferação, diferenciação e morte celular. Camundongos knock-out para a expressão de MYC imunizados não formam os GCs (Calado et al., 2011; Nilushi & Ulfklein, 2015).

Além disso, fatores de transcrição também estão envolvidos nesse processo, como o Fator Nuclear KB (NF-kB). Ele exerce um papel primordial na ativação das células B, sendo que o prejuízo a esse fator traz impasses na formação do GC. O POU2AF1 e o OBF1 também são relevantes nesse processo (Nilushi & Ulfklein, 2015).

Retomando o tópico principal que é a HQ e sua relação com o sistema imune, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Sandra Farsky (Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP)), colaboradora deste projeto, tem demonstrado que animais expostos à HQ, por aerossol, apresentam uma menor resposta inflamatória de origem alérgica (Macedo et al., 2006; Macedo et al., 2007) e inata (Ribeiro et al., 2011; Shimada et al., 2012a; Shimada et al., 2012b), além do agravamento da artrite reumatóide induzida por colágeno em ratos (Heulany et al., comunicação pessoal). Mais especificamente, a HQ inibe a secreção de TNF-a induzida pelo fator de transcrição NF-KB, resultando em uma diminuição da produção de IL-2 (David et al., 1998). Além do NF-KB, a HQ reduz também a atividade do fator de transcrição AP-1 (Choi et al., 2008) e a secreção de citocinas, como IFNg e IL-12, *in vitro* e *in vivo* (Choi et al., 2008; Kim et al., 2005). Este mesmo fator de transcrição desempenha um papel

crítico e importante no desenvolvimento e ativação de células B, como já mencionado (Pyatt et al., 1998). Quanto aos linfócitos B, a HQ foi capaz de impedir a maturação de seus precursores, as células pré-B, também observados no contexto *in vitro* (King et al., 1987; King et al., 1989).

Fazendo novamente um paralelo à presença da HQ no cigarro, já foi relatado que a exposição crônica à fumaça do cigarro culmina na redução da capacidade funcional do sistema imunológico (revisado por Stampfly & Anderson, 2009). Corroborando com este fato, recentemente foi descrito que indivíduos fumantes e infectados com HIV possuem maior carga viral que os não fumantes (Ande et al., 2015). Ainda, dados sobre a imunização contra pneumococcus em pessoas sob tratamento para artrite reumatóide mostraram um menor número de indivíduos respondedores à vacina quando estes são fumantes crônicos. Reduzidas respostas humoral e celular foram detectadas nestes mesmos indivíduos (Roseman et al., 2012). Camundongos expostos à fumaça do cigarro por 4 semanas e vacinados com proteína recombinante de P6 (antígeno bacteriano) apresentaram menores títulos de anticorpos e eliminação do patógeno em relação aos camundongos vacinados não expostos (Lugade et al., 2014). Um cenário similar foi observado em camundongos expostos à fumaça do cigarro de 8-16 semanas, mas imunizados com adenovírus. Eles tiveram menores títulos de IgG e capacidade de neutralização viral em amostras de soro que os animais não expostos (Robbins et al., 2004).

Considerando a direta associação entre a inalação crônica da fumaça do cigarro e as consequências patofisiológicas observadas, independentemente de ser fumante ativo ou passivo, é plausível acreditar que ocorra uma redução das funções inata e adaptativa do sistema imune, assim como a participação da HQ neste processo. Mesmo com um número significativo de estudos com o cigarro indicando um envolvimento direto prejudicial ao sistema imune e alguns poucos estudos relatando os efeitos da HQ, ainda não se sabe o real efeito da HQ sobre a resposta humoral no contexto *in vivo*. Sendo assim, a pergunta principal do nosso trabalho é: “será que camundongos C57BL/6, expostos à HQ, apresentam alterações nas respostas imune humoral e celular induzidas por vacinas?” Para tentar responder à essa pergunta, utilizamos uma vacina baseada em uma proteína recombinante que codifica o domínio III do Envelope do vírus da Dengue (sorotipo 2).

1.4 Dengue

A Dengue é uma doença induzida por infecção viral e transmitida pelos mosquitos do gênero *Aedes* das espécies *Aedes aegypti e Aedes albopictus*. São descritos 4 sorotipos de vírus causador da Dengue (DENV1 à DENV4), antigênicamente diferentes uns dos outros, de forma que a exposição a um sorotipo não necessariamente protege o indivíduo contra uma infecção secundária com um sorotipo heterólogo (Modis et al.,2004; Lee et al., 2015).

A incidência do número de casos de Dengue cresceu drasticamente no mundo todo nos últimos anos. No entanto, o número real de casos é dubitável pois muitos deles foram classificados erroneamente (WHO, 2019). Uma estimativa mais atual indica que possa ocorrer mais de 390 milhões de infecções por Dengue por ano, das quais 96 milhões induzem manifestações clínicas da doença. Outro dado, fundamentado na prevalência de casos da doença, estimou que 3,9 bilhões de pessoas estão em risco de infecção pelo vírus da Dengue em mais de 127 países (Bhatt et al., 2013; OMS, 2019)

A maior prevalência de Dengue ocorre principalmente nas faixas tropicais e subtropicais do globo. Sendo considerada de grande endemia em muitos países, além do continente Asiático, América latina, Pacífico e África (Figura 5; *(Mat*his, 2014; Teets et al., 2014; WHO, 2019), esta doença traz um profundo impacto para a saúde pública e grande reflexo direto no eixo social e econômico (Guzman; Harris, 2015). É pertinente destacar que o número de casos comunicados à OMS aumentou de 2,2 milhões em 2010 para 3,2 milhões em 2015 (WHO, 2019).

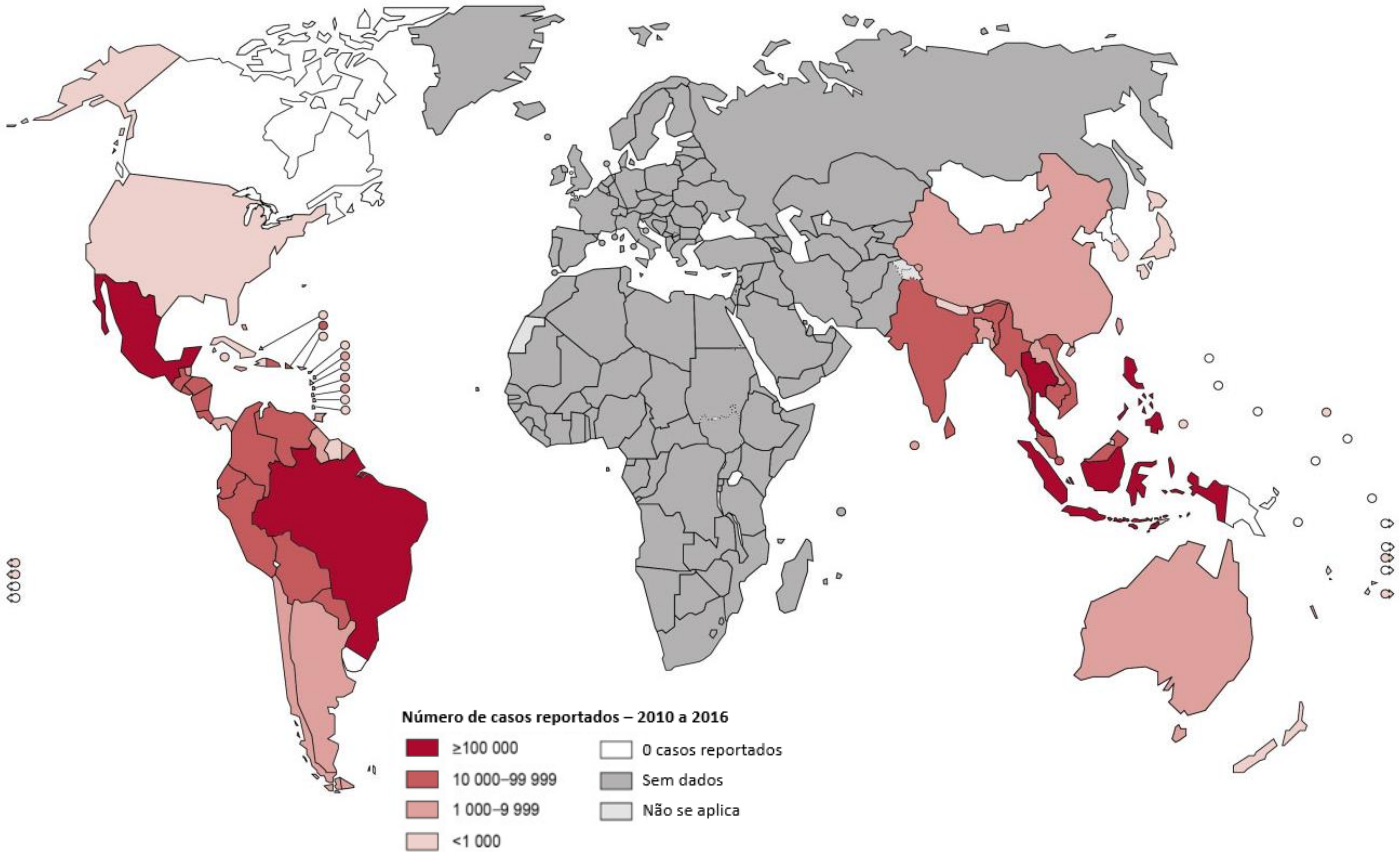


Figura 5 - Distribuição global da infecção pelo vírus da Dengue em 2016. As áreas de risco estão representadas pela escala de cor que vai de cinza (ausência de dados até aquele momento) à vermelho (presente), sendo que, quando maior a tonalidade do vermelho, maior o número de casos (WHO, 2019 < https://www.who.int/Denguecontrol/epidemiology/en/>).

Inelutavelmente, as Américas tiveram um papel relevante no numero de casos da infecção pelo vírus da Dengue, contribuindo com 14% das infecções ocorridas no mundo, onde mais da metade ocorreram no Brasil e no México (Bhatt et al., 2013). No ano de 2012, uma investigação realizada pela OMS apontou o Brasil como sendo o país líder em número de casos de infecção pelo vírus da Dengue no período entre 2004 e 2010 (WHO, 2012). Em 2016, foram relatados nacionalmente um total de 1.496.282 casos. Em 2017, ouve uma queda em relação aos anos anteriores, foram confirmados 237 casos de Dengue grave e 2.389 casos de Dengue com sinais de alarme, dos quais 144 foram a óbito. Já em 2018, até (28/07/2018), foram confirmados 191 casos de Dengue grave e 2.098 casos de Dengue com sinais de alarme (risco de agravamento da doença). Ademais, constatou-se que a região Centro-Oeste obteve o maior número de casos atestados de Dengue grave e Dengue com sinais de alarme, havendo 81 e 1.260 casos, respectivamente apontados (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE,

2018). Estes números representaram 38% menos casos que em relação ao ano anterior, indicando assim uma redução no número de mortes e infecção por Dengue. Mesmo assim, é primordial destacar que o Brasil corre um risco exorbitante de apresentar uma nova epidemia dessa infecção a cada ano, segundo os dados mais nupérrimos vistos pela caracterização do percurso da incidência de novos casos (Figura 6; (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2016).

De acordo com os dados deste ano (2019) do Ministério da Saúde, houve um aumento considerável no número de casos de Dengue no Estado de São Paulo, onde, até o dia 16 de março desse mesmo ano, teve um crescimento de 2.124% em relação ao mesmo período do ano passado, no qual, o Estado notificou 83.045 casos da doença. Ainda assim, no mesmo período de 2018, foram comunicados 3.734 casos. No geral a incidência no Estado é de 182,4 casos/100 mil habitantes, entretanto, São Paulo registrou neste ano 31 óbitos em virtude da doença, no mesmo período (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2019 - http://portalms.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45314-cresce-em-264-o-numero-de-casos-de-Dengue-no-pais).

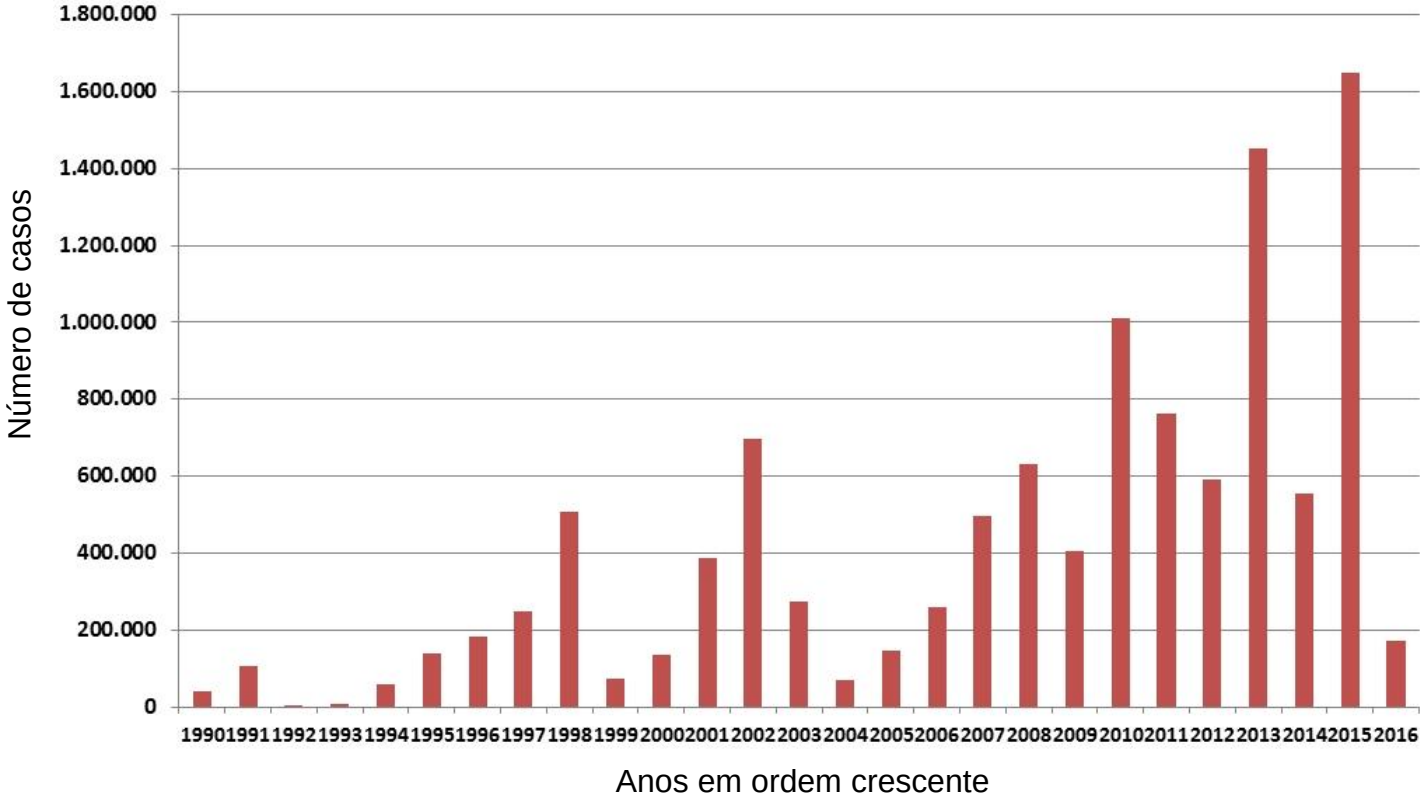


Figura 6 - Série histórica da incidência de casos de Dengue no Brasil de 1990 à 2016. Fonte: http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos.

A transmissão do vírus da Dengue ocorre através do ciclo de transmissão humano-mosquito-humano. Em torno de quatro dias após a picada do mosquito *Aedes,* a pessoa apresenta alta viremia no sangue e sintomas. Enquanto a viremia pode durar aproximadamente cerca de cinco dias podendo chegar até doze, os sintomas podem durar aproximadamente 1 semana (Guzman et al., 2016) (Figura 7). No entanto, a maioria dos casos se caracteriza por ser assintomático ou subclínico (total ausência de sintomas e titulação positiva para IgM ou IgG específicos para proteínas do vírus) (revisado por (Khanna, 2016)). Mesmo sendo assintomáticos, estes indivíduos ainda podem ser transmissores.

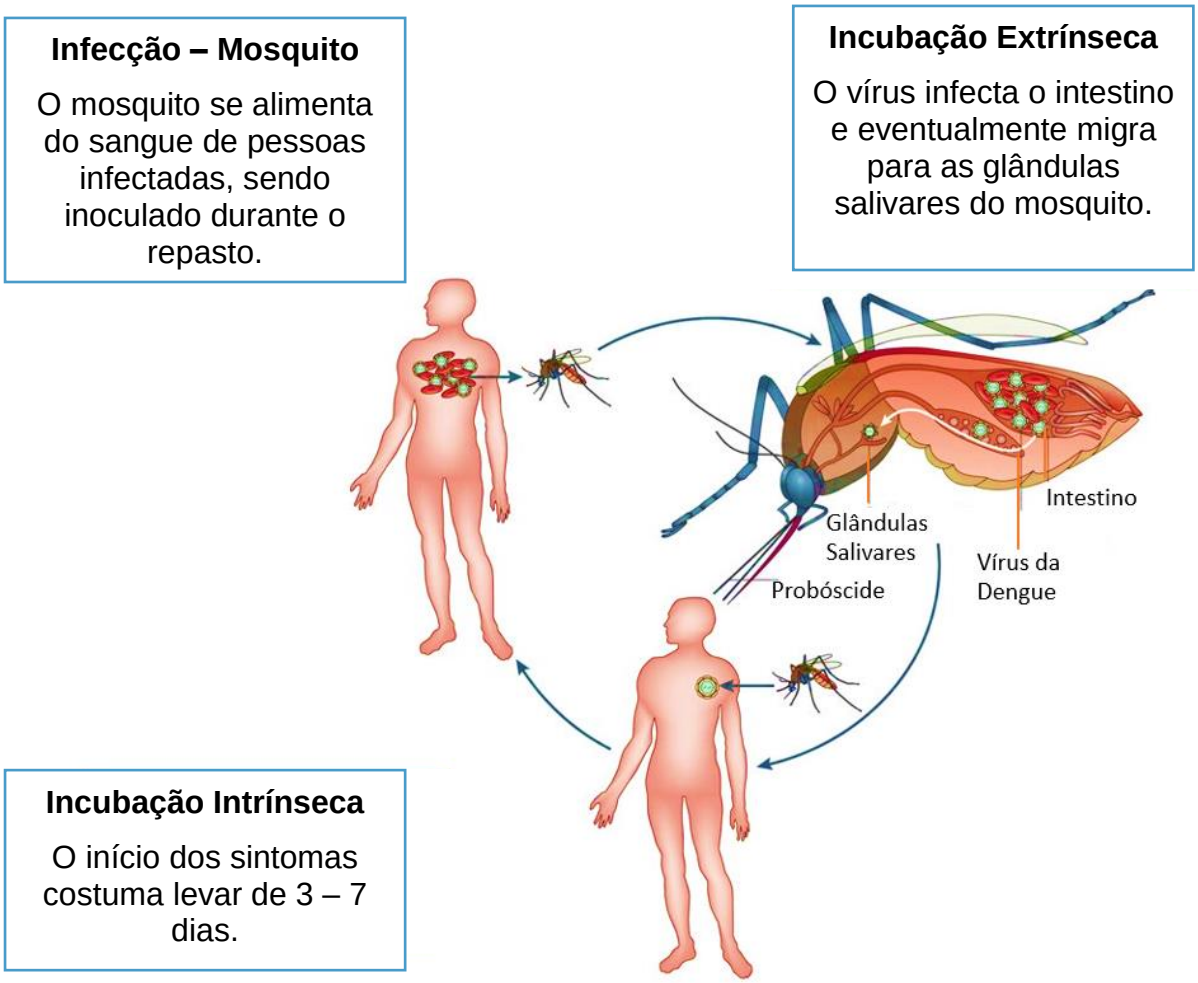


Figura 7 – Ciclo do vírus da Dengue em humanos e nos mosquitos. O mosquito *Aedes* pode se infectar durante o repasto sanguíneo de pessoas contaminadas com o vírus da Dengue na fase virêmica da infecção. Nos mosquitos, as células do intestino médio são as primeiras a serem infectadas. Posteriormente, as partículas virais disseminam-se para outros tecidos e para a glândula salivar, onde um único mosquito pode infectar e transmitir o vírus da Dengue para várias pessoas no processo de alimentação. Figura adaptada de: Guzman et al., 2016.

Ainda em relação ao vírus da Dengue, seu genoma é composto de RNA de fita simples de cadeia positiva, codificante de 10 genes cujas sequências de nucleotídeos divergem em cerca de 30% em relação aos outros sorotipos. Possui aproximadamente 11 Kb de comprimento e uma única fase de leitura aberta (ORF) que expressa uma poliproteína de aproximadamente 370 kDa (Malavige et al., 2004).

Inicialmente, este vírus infecta as células fagocíticas mononucleares, tais como os como macrófagos, *monócitos* e DCs. Contudo, ele também pode infectar outras células como leucócitos no sangue periférico e células endoteliais *em órgãos linfóides como o baço, nódulos linfáticos,* medula óssea, *timo*, rins, coração, pulmões, estômago. É bem provável que no cérebro também, pois muitas complicações neurológicas provocados pela infecção por Dengue, são cada vez mais relatadas em humanos (Li et al., 2017). Corroborando com este fato, a presença do vírus da Dengue foi observada no sistema nervoso central (SNC), por meio da detecção de proteínas virais, ácido ribonucléico (RNA) e imunoglobulinas (Miagostovich et al., 1997a e 1997b; Araújo et al., 2011; Lima et al., 2011). No ano de 2017, Salazar et al., descobriram que o vírus da Dengue era altamente neurotrópico nas espécies de *Aedes aegypti*. Além disso, os sorotipos DENV-2 e DENV-3 possuem uma maior relação com as principais complicações neurológicas (Lum et al., 1996; Thisyakorn et al., 1999; Miagostovich et al., 2006; Soares et al., 2010). Esses dados reforçam a hipótese da capacidade do vírus em poder atravessar a *barreira hematoencefálica* (Sunit Singhi, 2007; Santos et al., 2016). Além disso, já foi relatado que o vírus infecta as células B e T em menor quantidade comparadas com as outras células (Silveira et al., 2018).

No processo de infecção pelo vírus da Dengue, tais fenômenos moleculares têm início com a ligação do vírus à célula alvo, através da interação entre as proteínas de superfície viral e as moléculas receptoras presentes na superfície celular. O vírus se liga ao sulfato de heparano (polissacarídeo) glicosaminoglicano, que é expresso em muitos tipos de células (Miagostovich et al., 1997). Adicionalmente, uma lectina do tipo C específica de manose (CLEC), foi identificada como um receptor do vírus da Dengue em células dendríticas imaturas, contribuindo também com esse processo, além da $\alpha_v\beta_3$ integrina e receptores fosfatidilserina TIM (célula T / imunoglobulina transmembrana e domínio mucina) além de TYRO3, AXL e MER (que formam o complexo TAM), (Laureti et al., 2018; Van Der Schaar et al., 2007; Kanai et al., 2006). Essa interação permite a internalização da partícula viral, que geralmente envolve a

endocitose mediada por receptores (Salazar et al., 2007). O meio ácido do endossomo é essencial para promoção da fusão da membrana viral com a membrana endossômica. Após a internalização do vírus, a entrada do genoma viral ao ambiente citoplasmático é mediada pela fusão entre o envelope viral e a membrana endossômica (Van Der Schaar et al., 2007). Por exposição dos vírus ao pH ácido, os homodímeros do Envelope dissociam-se e o peptídeo de fusão dos monómeros da proteína E insere-se na membrana endossomal, o que resulta na formação de trímeros (Melo, 2009; Van Der Schaar et al., 2007). Então, o domínio III da proteína E trimérica se dobra de volta para o peptídeo de fusão, e a energia liberada por essa mudança conformacional leva a formação de um intermediário de hemifusão. Subsequentemente, forma-se um poro de fusão e o nucleocapsídeo é distribuído no citoplasma da célula (Lindenbach, D., e C. M. Rice, 2001). A replicação viral é iniciada logo após a remoção do revestimento do nucleocapsídeo no citoplasma da célula, sendo posteriormente traduzido pela maquinaria celular, gerando assim as proteínas virais (Melo, 2009; Van Der Schaar et al., 2007; Lindenbach, D., e C. M. Rice, 2001). Esse processo detalhado se dá por meio da replicação do RNA e tradução das proteínas estruturais virais. Os vírus imaturos são reunidos por brotamento de nucleocapsídeos recém-formados no lúmen do retículo endoplasmático. Durante este processo, as partículas virais obtêm o seu envelope de bicamada lipídica, no qual o complexo heterodimérico prM-E é inserido. Subsequentemente, as partículas amadurecem passando através da rede de Golgi e trans-Golgi (TGN). No TGN ou outro compartimento pós-TGN, a prM é clivada pela furina, resultando na formação de partículas maduras contendo as proteínas M e E. Finalmente, as partículas do vírus da progênie são liberadas da célula por exocitose Depois, o genoma é replicado e novas cópias de RNA são incorporadas nas partículas (Van Der Schaar et al., 2007; Lindenbach, D., e C. M. Rice, 2001).

O material genético de RNA liberado codifica um precursor de poliproteína com cerca de 3400 aminoácidos. Este polipeptídio é então processado na fase pós-tradução por sinalases de células hospedeiras e pela protease codificada pelo vírus NS2B / NS3 para sintetizar três proteínas estruturais e sete não estruturais (Figueiredo, 1999a, 1999b). As proteínas estruturais - Capsídeo, pré-membrana e envelope – fazem parte da construção da partícula viral enquanto as proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) estão envolvidas na

replicação do material genético viral, na montagem e estruturação do vírus e na modulação da respostas da célula hospedeira (Bressanelli et al., 2004; Martina et al., 2009).

O RNA presente no interior do vírus é complexado com as proteínas do capsídeo e esse é circundado por uma bicamada lipídica que contém as proteínas de membrana na parte externa e também a proteína do envelope, que unidos instrumentam as interações do vírus com o hospedeiro durante a sua entrada (Zhang et al., 2004). A proteína do envelope é disposta na superfície do vírus sendo a proteína externa que possui 90 monômeros fortemente compactados contra a membrana. Por sua vez, ela facilita a entrada viral nas células hospedeiras por ligação a receptores celulares com a mediação da fusão de membranas virais e celulares (Zhang et al., 2004; Kanai et al., 2006). Contudo, já foi observado que a proteína E contém epítopos de neutralização específicos ao sorótipo e possui uma conformação específica, induzindo altos títulos de anticorpos neutralizantes (Crill., 2001; Sukupolvi-Petty et al., 2007; Gromowski, 2008; Coconi-Linares et al., 2013). Além de tudo, a proteína do envelope representa um dos antígenos mais utilizados nas formulações vacinais contra o vírus da Dengue. Essa proteína glicosilada é também o principal determinante na montagem do vírus icosaédrico e o catalisador da fusão para unir membranas celulares virais e o seu alvo (Klein et al., 2013). Com dobramento em três domínios, a proteína E possui uma porção proximal à membrana e uma âncora transmembrana. Os arranjos dos três domínios dobrados em uma conformação de pre-fusão dimérica e um trímero de pós-fusão induzido por pH baixo agrupam-se em uma larga superfície hidrofóbica em uma extremidade do trímero pós-fusão (Rey et al., 1995; Modis et al., 2003; Modis et al., 2004; Bressanelli et al., 2004). Enquanto o domínio I é o N-terminal central, o domínio II faz parte da homodimerização responsável pela fusão da membrana endossômica e o domínio III, semelhante a imunoglobulina, é responsável pela ligação de células alvo e entrada viral (Jitoboan et al., 2016).

1.5 Resposta Imune ao Dengue

Após a infecção pelo vírus da Dengue, ocorre uma série de eventos imunológicos, culminando com a geração de anticorpos específicos aos epítopos presentes no envelope do vírus, onde ocorre neutralização das regiões dos domínios

I e II (responsáveis pela formação do dímero), impedindo essa formação. Além do bloqueio da ligação do vírus com a membrana celular (Figueiredo, 1999a), esses domínios são considerados fatores antigênicos primordiais do vírus (Campos et al., 2017).

Quanto à conformação estrutural, o domínio I possui uma estrutura *β* (Beta) localizada no centro do monômero da proteína do envelope e o domínio II, uma estrutura mais alongada (Modis & Clements, 2003; Oliphant et al., 2006). Apesar de todos os domínios serem alvos de anticorpos neutralizantes, até hoje o domínio III é o que mais possui epítopos descritos (Lee et al., 2015; Campos et al, 2017). Esses domínios também possuem uma alta reatividade cruzada com outros flavivírus, como o Zika vírus (Lee et al., 2015; Campos et al, 2017).

Simultaneamente aos processos citados acima, iniciam-se os processos de defesa do hospedeiro com os respectivos mecanismos da imunidade inata e adaptativa. O indivíduo infectado começa a ter níveis consideráveis de viremia poucos dias após. Por outro lado, esta carga viral pode ser controlada pelo hospedeiro devido aos mecanismos da resposta imune inata, quando os primeiros sinais de inflamação sistêmica ainda são observados. O processo de ativação dessa resposta é decorrente da produção de interferons (IFNs) tipo I, alfa e beta, pelas células infectadas (Guzman & Kouri, 2002; Ho et al., 2005; Gomes et al., 2010). Pacientes com Dengue severa apresentam uma "tempestade de citocinas", com níveis de citocinas pró-inflamatórias elevadas, podendo acarretar na ativação endotelial e favorecendo o extravazamento vascular com hemorragia e choque (Guzman & Kouri, 2002). As seguintes citocinas como interferon-α (IFN-α), IFN-γ, fator de necrose tumoral-α (TNF-α), interleucina-1β (IL -1β), IL-2, IL-6, IL-8 e IL-10 no plasma caracterizam esta resposta tanto em pacientes com Dengue clássica - DF, como com as formas graves da doença, como por exemplo a febre hemorrágica da Dengue - FHD (Green & Rothman, 2006; Halstead et al., 2007; Costa et al., 2013).

Esse processo ocorre devido aos primeiros ciclos de replicação viral, pois o RNA do vírus aumenta sua concentração e são reconhecidos por sensores específicos do hospedeiro denominados PPRs. Por conseguinte, as citocinas que são produzidas se deve ao fato do reconhecimento dos PAMPs que provocam o aumento de suas concentrações (Kumar.; Kawai.; Akira, 2011). Dentre os vários PRRs que estão envolvidos na detecção do vírus da Dengue, estudos têm demonstrado o papel da RNA helicase I coordenada pelo ácido retinóico (RIG-I) e fator 5 de diferenciação

do mieloma (MDA5; (Nasirudeen et al., 2011; Ng; Kato; Fujita, 2012). Mais especificamente, TLR3 detecta o RNA de fita dupla (dsRNA), ao mesmo tempo que TLR7 reconhece RNA de fita simples (ssRNA). Já RIG-I e MDA5 foram identificados como receptores intracelulares (citoplasma) de dsRNA (Kelsall et al., 2002; Urcuqui-Inchima et al., 2017). Os receptores do tipo *Toll* intracelulares, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 (Nishiya et a., 2005) estão implicados no reconhecimento de ácidos nucléicos virais.

Após a interação destes receptores com seus ligastes virais, vias intracelulares são ativadas, conduzindo à produção de efetores antivirais, incluindo interferon e citocinas pró-inflamatórias (Urcuqui-Inchima et al., 2017; Tsai et al., 2009; ; Liang et al., 2011; Urcuqui-Inchima et al., 2017). Ainda em relação aos processos citados acima, ocorre também a translocação nuclear de outros fatores de transcrição, como NFκ-B e IRF3 e 7. Múltiplas vias de sinalização são ativadas, seguidas pela secreção de IFN-I (Dejnirattisai et al., 2008). Esse processo é primordial, pois estimula a transcrição de múltiplos genes que conectam as respostas imune inata e adaptativa (Kutubuddin et al., 1991).

Com relação à resposta adaptativa, logo após a infecção pelo vírus da Dengue, as células mais eficientes na apresentação dos antígenos, as DCs, detectam os PAMPs, realizam a endocitose e também sua função mais conhecida que é o processamento antigênico para uma ativação eficiente das células T (Souza et al., 2016), para posteriormente migrar para órgãos linfóides, como os linfonodos, para assim, completarem a apresentação dos antígenos (Kelsall et al., 2002). Diferente das células T, a ativação de células B *naive* não necessitam do processamento do antígeno.

Os antígenos apresentados via moléculas de HLA classe I e II são exibidos respectivamente aos linfócitos TCD8+ e TCD4+ nessa devida ordem (Dejinirattisai el., 2008). Células T específicas já foram descritas como tendo um papel crucial na proteção contra a Dengue (Weiskopf et al., 2013). Linfócitos T também são capazes de produzir quantidades elevadas de citocinas pró-inflamatórias, com um substancial efeito sobre o endotélio vascular, podendo causar efeitos patológicos (Stephenson, 2005). Em relação as células TCD8+ ativadas, elas produzem IFN-gama e TNF-alfa, entre outros. Além disso, essas células lisam células infectadas via degranulação de granzimas e perforinas (potentes toxinas que participam do processo de morte celular) (Dejinirattisai el., 2008; Voskoboinik et al., 2015). Já as células TCD4+ produzem

citocinas pró-inflamatórias como INF-gama, IL-2, IL-4, IL-6 e IL-21 e citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e a IL-13, além de auxiliar na ativação das células TCD8+ (Simmons et al., 2005; Apanna et al., 2007) e células B CD19+ (Ho et al., 2001).

No que diz respeito às células B, essas produzem anticorpos que podem controlar a infecção viral secundária via mecanismos de bloqueio da interação vírus com a célula do hospedeiro (Wahala; Silva, 2011). Entretanto, em relação à infecção pelo vírus da Dengue, a proteção contra um sorotipo específico, não necessariamente conferirá proteção contra um sorotipo diferente (Crill et al, 2009).

Salientando ainda a relevância do papel da resposta imune, não podemos deixar de explicitar os fortes avanços na procura pelo desenvolvimento de formulações vacinais eficazes, mesmo se tratando da complexidade dessa infecção. O ideal é que a formulação vacinal seja tetravalente (proteção contra os 4 sorotipos do vírus da Dengue) e que forneça proteção a longo prazo contra os sorotipos do vírus. Segundo a OMS, um dos grandes desafios a se colocar em pauta é a falta de um modelo animal adequado e a medida da relação do quanto uma vacina será protetora à longo prazo. A busca por uma vacina adequada contra a Dengue já têm mais de seis décadas. Apesar desses desafios e buscas incessantes, no ano de 2015, foi registrada no México a primeira vacina comercial da Dengue, chamada de *Dengvaxia* (CYD-TDV). Ela é uma vacina quimérica tetravalente, criada pela *Sanofi Pasteur* (WHO, 2017; Fatima e Syed, 2018). Trata-se de uma composição atenuada do vírus, composta por quimeras do vírus da febre amarela 17D e os genes estruturais para as proteínas da pré-membrana e do envelope de cada um dos quatro sorotipos do vírus da Dengue no capsídeo (Halstead, 2018). A *Dengvaxia* já foi aprovada em 19 países e foi muito usada em campanhas de vacinação nas Filipinas, com o envolvimento de mais de 800.000 crianças em idade escolar (Fatima & Syed, 2018). Não obstante, de acordo com diversas análises realizadas logo após o seu licenciamento, houve fortes indicios de que essa vacina poderia colocar em risco algumas pessoas levando ao quadro das formas mais graves da infecção. Isso causou muito medo nas pessoas, pois essa vacina protege cerca de somente 35% para DENV2, além do fenômeno de ADE. Além disso, houve fortes indagações críticas da comunidade científica (Nytimes, 2019), pois a proposta era que a *Dengvaxia* promissoramente reduziria o risco mundial de infecções pelo vírus da Dengue, suas formas mais grave e redução das hospitalizações relacionados a essa doença (Fatima e Syed, 2018).

Um fato inusitado muito pleiteado é que a proteção gerada por essa vacina era aparentemente mais eficaz nas pessoas que nunca tiveram histórico de infecção precedente por Dengue. Dessa forma, a Sanofi revelou há pouco tempo atrás que os indivíduos que nunca tiveram histórico de infecção por Dengue apresentam um risco consideravelmente elevado de desenvolver as formas mais grave da doença e maiores chances de hospitalizações por conta da imunização com a *Dengvaxia* em relação as pessoas que não foram vacinadas (Halstead, 2018; Fatima e Syed, 2018). Por conta dessas grandes controvérsias e medo da população, a venda e a distribuição dessa vacina foi suspensa nas Filipinas, levando a debates no mundo inteiro sobre a segurança e eficácia das formulações vacinais e os grandes impactos negativos provados por resultados de ensaios clínicos ligados por autópsias de mortes relacionadas a *Dengvaxia* (Fatima e Syed, 2018; Telegraph, 2019).

Todavia, qual seria a possível explicação para as questões que envolveram a a antecipação, identificação e o licenciamento dessa vacina? De acordo com alguns relatos da própria fabricante e de agências internacionais envolvidas na pesquisa direta com a *Dengvaxia*, esse pode ser um fato explicado pelo ceticismo (Halstead, 2018). O ceticismo está mais relacionado com o aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE, do inglês – *Antibody Dependent Enhancement*) que ocorre quando anticorpos pré-existentes gerados após uma infecção primária por um sorotipo se ligam a uma partícula infectante do vírus durante uma infecção subsequente com outro sorotipo diferente do primeiro, sem conseguir neutralizar o vírus. Ou seja, o complexo anticorpo – vírus se liga a receptores Fc (FcyR) em monócitos circulantes e os anticorpos “ajudam” o vírus a infectar os monócitos de forma mais eficaz. Como resultado desse processo, sucede-se o aumento da replicação viral e maiores chances de desenvolvimento das formas mais graves da doença (Whitehead et al., 2007). É importante evidenciar que essa é uma hipótese que provavelmente possa acontecer com o vírus da Dengue em humanos, mesmo tendo sido demonstrado que o aumento dos níveis de anticorpos anti-DENV preexistentes estão diretamente associados à gravidade da Dengue secundária em humanos (Halstead, 2018; Katzelnick et al., 2017).

Na cenário atual, é notável explanar que o número de trabalhos publicados sobre a influência de compostos tóxicos, como a HQ, na resposta imune seja irrisório. Considerando a importância da HQ como um dos principais metabólitos do benzeno, componentes da fumaça do cigarro e sua interação com a resposta imune, é

fundamental investigar como ela influenciaria a resposta imune humoral induzida por uma formulação vacinal.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar se camundongos C57BL/6 expostos à HQ, por aerossol, apresentam alterações na resposta imune humoral e celular induzida por vacina viral com Proteína recombinante EDIII derivada do vírus da Dengue.

2.2 Objetivos específicos

- Vacinação dos animais com uma proteína recombinante do Domínio III do envelope do vírus da Dengue (EDIII) em combinação com o adjuvante Alum;
- Quantificar a resposta humoral por análise dos títulos de IgG e suas subclasses específicas (IgG1 e IgG2b) ao antígeno em questão no soro por ELISA;
- Quantificar a frequência de células secretoras de IgG específicas aos antígenos vacinais no baço e medula óssea por ELISPOT;
- Quantificação de centros germinativos no baço e zona medular no timo por histologia;
- Correlacionar dados públicos de expressão gênica de estudos com benzeno, hidroquinona e cigarro usando a biologia de sistemas com os resultados encontrados no nosso estudo (Ver Figura 8 – Delineamento Experimental).

3.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

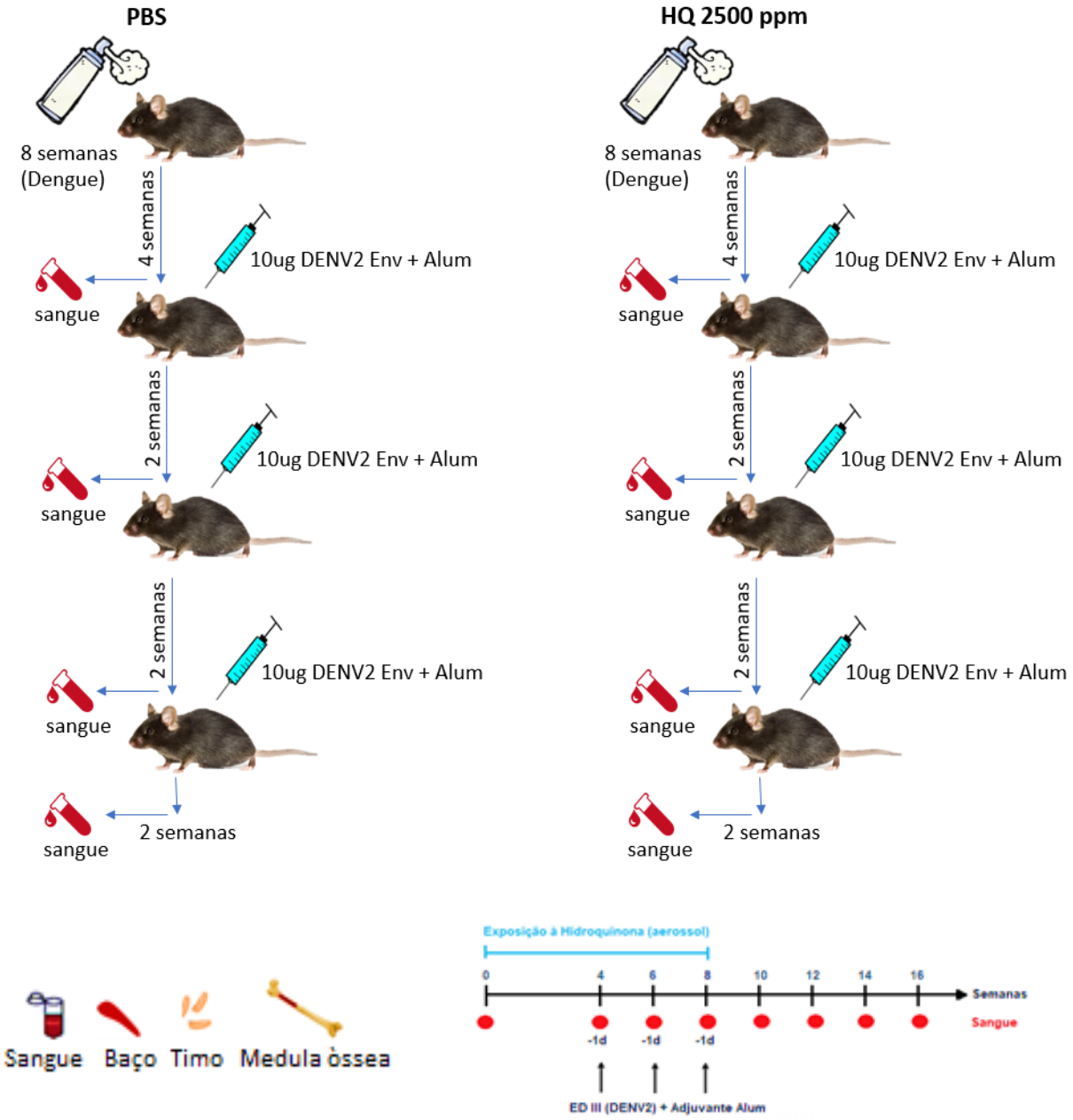


Figura 8 - Desenho experimental da exposição com a HQ e Imunização com a EDIII do DENV. Camundongos C57BL/6 foram expostos com 2500 ppm de HQ ou PBS, por aerossol, durante 8 semanas. Após 4 semanas de exposição com a HQ, os animais foram vacinados com três doses, intervaladas a cada duas semanas, com 10 ug da proteína recombinante do Dengue (EDIII) via i.m. Duas semanas após cada dose, os animais tiveram amostras de sangue e orgãos coletados para análises de ELISA, ELISPOT e histologia. Ver sessão “3 – Métodos”.

4. MÉTODOS

4.1 Animais e amostras analisadas

Camundongos C57BL/6, machos, com peso entre 20-25g, provenientes do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP) / Instituto de Química (IQ-USP) da Universidade de São Paulo, foram mantidos em ciclo de 12 horas claro / escuro, com água e comida à vontade, e expostos, por meio de nebulização, por 8 semanas consecutivas à 2500 ppm de HQ (99%, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO), na frequência de +/- 1mL/minuto e 1 hora/dia. Os animais do grupo controle receberam volumes equivalentes do veículo (solução salina PBS 1x) pela mesma via. Para tanto, os animais de cada grupo foram acondicionados separadamente em uma câmara de polipropileno (650x445x245mm) contendo 3 orifícios, um deles em um dos lados da caixa e dois na extremidade oposta. Pelo primeiro orifício, as soluções de HQ ou PBS foram nebulizadas utilizando um inalador ultrassônico (NS®, São Paulo, BR) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 e 10,0 μm^3. Os outros dois orifícios permitiram a saída de gases da caixa de acondicionamento. Todo o procedimento foi realizado em capela de exaustão e de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CEUA FCF-USP nº 506 e 561). Antes da obtenção de quaisquer amostras de soro ou células, os animais foram nestesiados pela injeção de Ketamina (80mg/kg; Syntec®, Hortolândia, SP) associada à Xilazina (8mg/kg, i.p.; Syntec®, Hortolândia, SP). Amostras de sangue periférico foram obtidas do plexo orbital ocular, enquanto células de outros tecidos ou órgãos foram coletadas somente após a eutanásia dos animais através de exposição a CO_2 em câmara específica. Vale salientar que os animais não sofrem durante este procedimento, o qual já foi realizado diversas vezes no laboratório da Profa. Dra. Sandra Farsky (Macedo et al., 2006; Macedo et al., 2007; Ribeiro et al., 2011; Shimada et al., 2012a; Shimada et al., 2012b).

4.2 Imunizações

Cada animal foi imunizado um total de 3 vezes, cujas doses consistiam de um total de 100 uL, contendo PBS 1x, 10ug de proteína recombinante (EDIII), cedida pelo Prof. Dr. Luis Carlos Souza Ferreira (laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP) e o adjuvante Alum (Thermo Fisher) na

proporção 1:1 (antígeno + PBS e adjuvante – de acordo com o fabricante e experimentos prévios no nosso laboratório). Nos principais resultados apresentados, as três imunizações com a proteína recombinante da Dengue foram realizadas nas semanas 4, 6 e 8 da exposição com a HQ, tendo um intervalo de 2 semanas entre as doses cada uma, pela via intramuscular (i.m) em ambos os lados da região do músculo da coxa dos animais. Em relação a imunização com a proteína recombinante MSP-1 de *P. vivax* (PvMSP1-19), os animais foram imunizados 3 vezes, com um total de 100uL contendo 10ug do antígeno pelas vias subcutânea ou intramuscular. Essa proteína foi cedida pela professora Dra. Irene Soares da FCF-USP (Laboratório de Parasitologia Aplicado à vacinas).

4.3 ELISA

O ensaio de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para detecção de anticorpos IgG anti-EDIII do vírus da Dengue no soro de camundongos expostos à HQ ou PBS e imunizados foi realizado conforme desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Silveira da FCF-USP, com modificações. Primeiramente, 1,0 ug/mL da mesma proteína recombinante usada nas imunizações para Dengue foi adicionada à cada poço da placa de ELISA (*Costar high-binding*) para o *coating*. Após incubação por período *overnight* a 4ºC, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS contendo 0.5% de *Tween* 20 (PBS-T20 0.5%) e bloqueadas por 2 horas a 37ºC com solução de PBS contendo 10% de FBS (Solução bloqueio). Em seguida, diluições séricas de amostras de soro, isoladas de sangue periférico 13 dias após cada vacinação (*priming* ou *boost*) de camundongos expostos à HQ, foram realizadas a partir de 1:50 em solução bloqueio e adicionadas às placas. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-T20 0.5% e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado à peroxidase diluído 1:3000 em solução bloqueio. Após 90 minutos de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 3 vezes com solução PBS-T20 0.5% e reveladas com solução contendo o substrato O-fenilenodiamina (OPD - 1 mg/ml) diluído em tampão fosfato-citrato (pH 5.0) contendo 0.03% de peróxido de hidrogênio. Para finalizar a revelação do ensaio, foi adicionado 4N de ácido sulfúrico às placas de ELISA. Em seguida, as placas foram lidas em um leitor de ELISA (*Awareness Technology, model Stat Fax 3200, EUA*) sob densidade ótica de 492 nm.

4.4 ELISPOT

O ensaio de ELISPOT para enumeração de células secretoras de IgG, totais e específicas à EDIII foi realizado conforme desenvolvido no laboratório do Prof. Dr. Eduardo Silveira da FCF-USP, com modificações. 5ug/mL da mesma proteína recombinante usada nas vacinações para Dengue e 10ug/mL do anticorpo anti-IgG (H + L) murino (Rockland), ambos diluídos em PBS, foram adicionados individualmente às placas de ELISPOT (Millipore MSHAN4B50) para o *coating*. Após incubação por período *overnight* a 4ºC, as placas foram lavadas 4 vezes com solução de PBS contendo 0.05% de Tween 20 (PBS-T20 0.05%) e 4 vezes com PBS. Em seguida, elas foram bloqueadas por 2 horas com meio de cultura RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (RPMI-FBS). Este meio de cultura foi removido das placas e cerca de 1 x 10^6 células do baço, medula óssea ou timo, diluídas em RPMI-FBS, foram adicionadas nos primeiros poços da placa. Diluições séricas de 3 vezes foram realizadas para estas células, as quais foram incubadas por período overnight a 37ºC em estufa de 5% de CO_2. Depois, as células foram removidas e as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T20 0.05%. Em seguida, uma solução de anticorpo secundário biotinilado individual específico para IgG, diluído 1:1000 em solução de (PBS-T20 0.05%-FBS 2%), foi incubada por 90 minutos à temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente por 4 vezes com solução PBS-T20 0.05% e receberam solução de Avidin D - HRP (Vector labs), diluída 1:1000 em PBST20 0.05%-FBS 2%. A incubação foi realizada por 3 horas à temperatura ambiente e na ausência de luz. Por fim, o ensaio foi revelado a partir da adição do substrato filtrado 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) às placas. O AEC (BD 551015) foi diluído a partir de 1 gota do cromógeno para cada 1mL da solução tampão e 100uL foi acrescentado a cada pocinho da placa. Após revelação, todos os poços foram lavados com água corrente e as placas, secas e mantidas no escuro até obtenção das imagens de cada poço.

4.5 Análises Histológicas

Os orgãos foram coletados e fixados em paraformoldeído 4% e incubados durante 24 horas, após esse período foram transferidas para o álcool 70%. As amostras foram colocadas em parafina para cortes histológicos transversais de 3 mm. Foi removida a parafina e coradas com hematoxilina-eosina para posterior análise. Foram analisadas 4 cortes em cada lâmina de dois animais por grupo. Sendo que

para análise estatística, consideramos 10 campos de cada corte (40 campos por grupo/orgão).

4.6 Eletroforese de Proteína em Gel de Poliacrilamida

A integridade da proteína EDIII foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970) com modificações. Para isso, 5ug da proteína foram diluídas em tampão de amostra (Tris-HCl 1M pH 6,8, contendo SDS 4%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,03% e H_2O q.s.p) e desnaturadas após incubação por banho-maria (97°C por 5 minutos). A eletroforese foi feita em gel com concentração de 15% para o *Stacking* gel (Acrilamida 30% (0,67mL); SDS 20% (40uL); Tris 0,5M pH 6.8 (1mL); água destilada (1,9 ml); APS (ammonium persulfate) 10% (30uL) e Temed (3 uL). O *Running* gel foi composto de Acrilamida 30% (5mL); SDS 20% (100uL); Tris 1.5M pH 8.8 (2,5mL); água destilada (2,4mL) APS (ammonium persulfate) 10% (50 uL) e Temed (5 uL). A eletroforese foi conduzida por 70 minutos a 140V em aparelho MiniPROTEAN Bio-rad. O gel foi fixado em mistura contendo metanol, água, ácido acético (2,5% / 5% / 0,5%) e corado com solução Ponceau (0,625g/100 mL de água) por 20 minutos. Depois, ele foi descorado com solução de água destilada contendo 2% de ácido acético por 2 vezes durante 15 minutos para cada incubação. Por fim, o gel foi escaneado para obtenção de sua imagem através do *software* da Labscan.

4.7 Seleção e análise de dados de transcriptroma (Biologia de Sistemas)

Foi realizada uma busca sistemática por meio do banco de dados do NCBI Gene Expression Omnibus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) a fim de selecionarmos séries de dados de expressão gênica em indivíduos expostos ao benzeno, hidroquinona e cigarro (casos) e não expostos ou não fumantes (controles). Para ser incluídos neste projeto, os estudos deveriam obedecer aos seguintes critérios selecionados: (1) Dados obtidos com o perfil de expressão por array; (2) Amostras de tecidos imunológicos e sangue periférico de *Homo sapiens* e estudos realizados em *Mus musculus*; (3) desenho do estudo caso-controle (quais critérios usaríamos para definir os DEGs de cada estudo – mais detelhes no tópico 4.8 - Análise de dados transcriptômicos); (4) mínimo de 4 amostras por série de dados. Com o intuito de se complementarem, os dados sobre a exposição com esses agentes (principalmente a HQ, foco do nosso modelo experimental *in vivo*), foram considerados os genes

diferencialmente expressos (DEGs) com uma meta-análise (técnica *estatística* especialmente desenvolvida para integrar os resultados de dois ou mais estudos independentes, sobre uma mesma questão de pesquisa, combinando, em uma medida, os resultados de ambos estudos) separando apenas genes, cujas expressões que realmente foram significativas nos dados de exposição ao benzeno, hidroquinona e cigarro disponíveis, para dar uma maior consolidação no perfil de assinaturas gênicas destas condições.

4.8 Análise de dados transcriptômicos

Uma forma de encontrar assinaturas de expressão gênica é definir os DEGs de uma determinada condição. Com base nisso, a primeira parte da análise dos dados foi comparar casos e controles para cada substância, com o propósito de verificar as alterações nos padrões de expressão gênica para cada uma delas. Para cada conjunto de dados selecionados, essa análise foi realizada com o GEO2R, uma ferramenta on-line que realiza uma análise de expressão diferencial separando cada grupo (casos e controles). A saída GEO2R (ou *output* – saída de dados de um sistema informático) é uma lista de todos os genes no conjunto de dados e seu correspondente valor-p ajustado, valor-p bruto e log-fold change (logFC). Logo após, fizemos a identificação dos DEGs envolvidos em cada organismo exposto com as diferentes substâncias. Em seguida, os DEGs mais consistentes foram definidos para cada estudo. Isso foi feito considerando o valor de *p* obtidos através da ferramenta *R studio* (computação estatística). Consideramos como DEGs os genes perturbados positivamente ou negativamente, e aqueles considerados consistentes para cada condição, foram classificados em *up-regulated* (regulados positivamente) e *down-regulated* (regulados negativamente), de acordo com seu perfil de expressão.

4.9 Análise de Enriquecimento do conjunto de gene

Para comparar os efeitos da exposição com as substâncias propostas sobre a atividade de expressão gênica, realizamos uma Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA), a qual estima o nível de expressão de um conjunto de genes baseado em uma classificação de expressão gênica. Assinaturas identificadas foram usadas como conjuntos de genes e o log2 da mudança de vezes foi usado como critério de classificação.

5.0 Construção da rede gênica

Os subconjuntos de DEGs *up-regulated* e *down-regulated* definido nos estudos com o benzeno, hidroquinona e cigarro foram usados como base para construir uma rede de interação gênica no *GENEmania Cytoscape app* (Montojo et al., 2012), com as devidas funções que cada um se relaciona. A rede foi visualizada e editada no Paint 3D (PCWorld, 2018).

5.1 Ensaio de neutralização (PRNT)

Para a realização do PRNT, a cepa DENV2 NGC foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira (Instituto de Ciências Biomédicas - ICB, São Paulo, Brasil). Resumidamente, a cepa NGC foi propagada na linha celular C6/36 de *Aedes albopictus,* cultivada em meio Leibovitz contendo 5% de FBS incubados à 28 °C durante 7 dias. O sobrenadante de C6/36 infectado com a cepa NGC foi coletado e titulado para a determinação de UFP/ml (Unidade Formadora de Placa / ml). Para o teste de neutralização (PRNT), as células *Vero* foram mantidas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e semeadas em placas de 24 poços (1×10^5 células / poço) 24h antes da infecção (Poggianella et al., 2015). As amostras de soro dos camundongos (*pools*) dos animais imunizados, expostos ou não com à HQ, foram inativadas quanto às proteínas do complemento durante 30 min a 56 °C e duplamente diluídas (duplicatas). As IgG específicas de EDIII purificadas foram testadas em diferentes concentrações. Os sobrenadantes de células C6/36 contendo 200 UFP de DENV/ml foram incubados com cada diluição do soros anti-EDIII ou anticorpos IgG purificados durante 1h a 37 °C. As células Vero foram lavadas com DMEM isento de soro e infectadas em duplicatas com 200 uL da mistura de neutralização durante 1h a 37 °C. A suspensão viral foi removida e as células foram cobertas com 1 ml de DMEM completo [2,5% FBS e 1% carboximetilcelulose (Synth, São Paulo, Brasil)]. Após incubação das placas a 37 °C durante 7 dias, as células foram fixadas durante 15 min com paraformaldeído a 4% e coradas com cristal violeta durante 10 min. A porcentagem de redução de placa comparado ao controle positivo (DENV não exposto a anticorpos) foi calculada. Os títulos de anticorpos neutralizantes foram expressos como a diluição do soro, produzindo redução de 50% no número de placas ($PRNT_{50}$) ou PRNT total (porcentagem direta de redução).

5.2 Análise Estatística

As análises estatísticas aplicadas aos resultados foram ultilizadas no software Prism 5 (GraphPad Software Inc.), pelo teste *T student*. Diferenças significativas foram consideradas a partir do valor $p \leq 0.05$.

6.0 RESULTADOS

Antes de realizarmos as imunizações ou utilizarmos a EDIII nos ensaios de ELISA e ELISPOT, foi inspecionada a integridade da proteína por eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 9A). Considerando que sua construção geraria uma proteína com peso de 10 kDa (conforme descrição prévia (Maeda et al., 2017)), concluímos que a EDIII possuia integridade ideal para ser usada posteriormente nos ensaios e nas imunizações como o antígeno vacinal. Ainda, de acordo com Maeda et al., 2017, a proteína EDIII apresentou quantidades baixas de LPS, < 0,02 EU/g, abaixo do valor permitido para uso de proteína recombinante para formulações vacinais que é < 3.6 EU/100 ul (Padma e Singh, 2008). Utilizamos adjuvante na formulação, pois, o uso de uma proteína recombinante sozinha poderia induzir tolerância.

Como não tinhamos conhecimento do quanto à HQ poderia ser imunossupressora no contexto de vacinação com uma proteína recombinante, nosso primeiro protocolo de exposição com essa substância foi fundamentado em dados do laboratório da Profa. Dra. Sandra Farsky (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP). Sendo assim, usamos 25 ppm de HQ (n=6 /grupo) por um total de 33 dias (período curto de exposição), sendo que, nos dias 5 e 20, os animais foram imunizados com 10ug de EDIII combinadas com o adjuvante Montanide ISA 720 (Seppic) (Figura 9B). No entanto, 5% de etanol foi adicionado à HQ para dissolvê-la, conforme desenvolvido no laboratório da Profa. Dra. Sandra Farsky. Durante todo este período, não houve alterações significativas no peso dos animais (Figura 9C), e nem nos títulos de anticorpos anti-EDIII gerados pelo grupo vacinado e exposto à HQ em comparação com os somentes vacinados (Figura 9D).

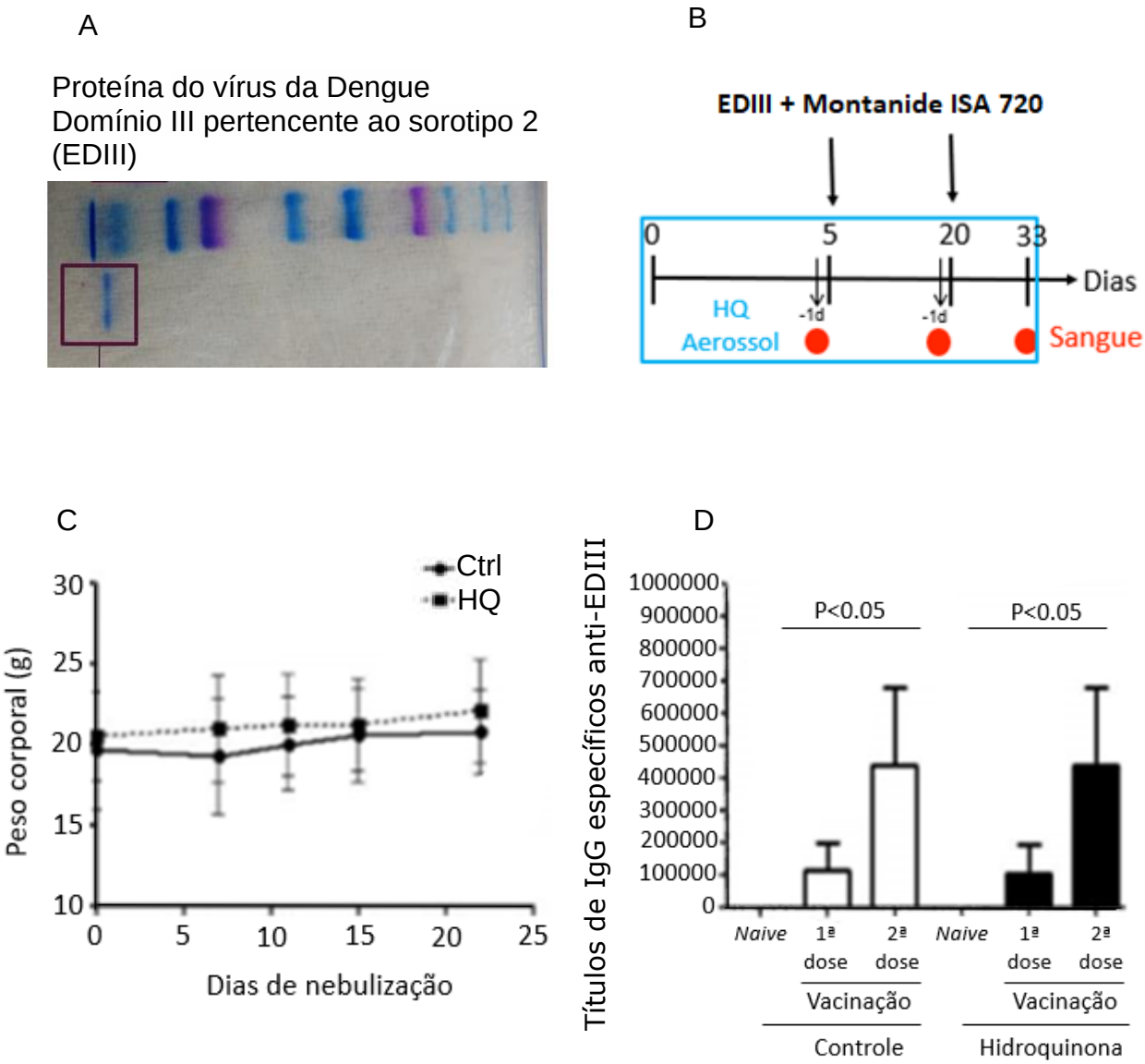


Figura 9 - A exposição à HQ por curto período antes (5 dias) ou durante (15 dias) e após (13 dias) a vacinação não foi suficiente para provocar uma imunossupressão nos animais. A) Padrão eletroforético da EDIII (peso de 10 kDa) em gel de Poliacrilamida para verificação da sua integridade. B) Esquema de vacinação e exposição à HQ. Animais foram expostos durante 33 dias à HQ; Cinco e vinte dias depois eles foram vacinados com à EDIII. C) O peso corporal dos animais foi medido em diferentes tempos durante e após a nebulização com a HQ, não tendo diferenças entre os grupos. D) Os títulos de IgG anti-EDIII específicos foram avaliados por ELISA, antes da vacinação e após cada dose da vacinação para ambos os grupos. Os valores representam a média +/- desvio padrão das diluições do soro mais baixas que apresentaram densidade óptica (OD) lidas maiores do que 3 vezes a OD para a amostra de controle negativo (sem soro). P>0,05.

A não observação de diferenças significativas nesse protocolo pode ser devido ao curto período de tempo de exposição à HQ, ou seja, só expusemos 5 dias antes da primeira dose. Outro fato, é a concentração baixa da HQ que é 25 ppm, ou seja, o

equivalente a aproximadamente 0,2 cigarros com um padrão de 20 cigarros por caixa (IARC, 1987).

Considerando que experimentos similares, mas a partir da exposição com fumaça do cigarro em camundongos apresentaram queda da resposta humoral e menor capacidade de eliminação bacteriana por meio de períodos mais longos de exposição (4 semanas ou mais) (Lugade et al., 2014), resolvemos mudar assim o nosso protocolo. Fizemos algumas modificações no preparo da solução de HQ (que é solúvel em água), assim como no adjuvante da vacina. A troca do preparo da solução de HQ foi baseada em 2 pontos: 1) tanto a HQ quanto o etanol, usado no 1o experimento, são potenciais imunossupresores (Tisman e Herbert., 1973; Snyder, 2002; Snyder, 2004); 2) a HQ é solúvel em água: (https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/h9003?lang=pt&region=BR). Sendo assim, passamos a empregar o PBS como veiculo, pois a mistura da HQ com o etanol poderia pontecializar os efeitos imunossupressores da HQ. No caso do adjuvante, o Montanide ISA720 foi substituído pelo hidróxido de alumínio (*Alum*), pois tem sido demonstrado que o Montanide, em combinação com antígenos proteícos, gera uma resposta bem mais imunogênica e duradoura que o *Alum* (Tobias, et al., 2017). Desse modo, poderia ser possível que os altos títulos de anticorpos gerados após a vacinação com a EDIII e o Montanide pudessem mascarar a imunossupressão gerada pela HQ. Por conseguinte, além de menos imunogênico, outra razão pela escolha do *Alum* é em virtude desse ser um dos poucos licenciados para uso em humanos.

Mediante a tais mudanças no protocolo de exposição e imunização, com o intuito de encontrar qual concentração de HQ alteraria a resposta imune humoral contra a EDIII, expusemos os animais com à HQ, por um total de 8 semanas, com diferentes concentrações (25 ppm, 250 ppm e 2500 ppm - n=4/grupo. Figura 10A e 10B). Após 4 semanas de exposição à HQ, os animais foram, então, imunizados com 3 doses da proteína EDIII via s.c (Figura 10A). Observamos que os animais vacinados e expostos ao PBS ou 25 ppm de HQ apresentaram similares títulos de IgG anti-EDIII, com média em torno de 15000 e desvio padrão de 25000, descartando assim a possibilidade do uso dessa concentração. Por outro lado, camundongos vacinados e expostos à 250 ppm ou 2500 ppm de HQ tiveram uma “tendência” não significativa para menores títulos de IgG anti-EDIII com média em torno de 5000 +/- Desvio padrão de 10000. Entretanto ainda sim, não tiveram diferenças significativas entre os grupos.

Figura 10B).

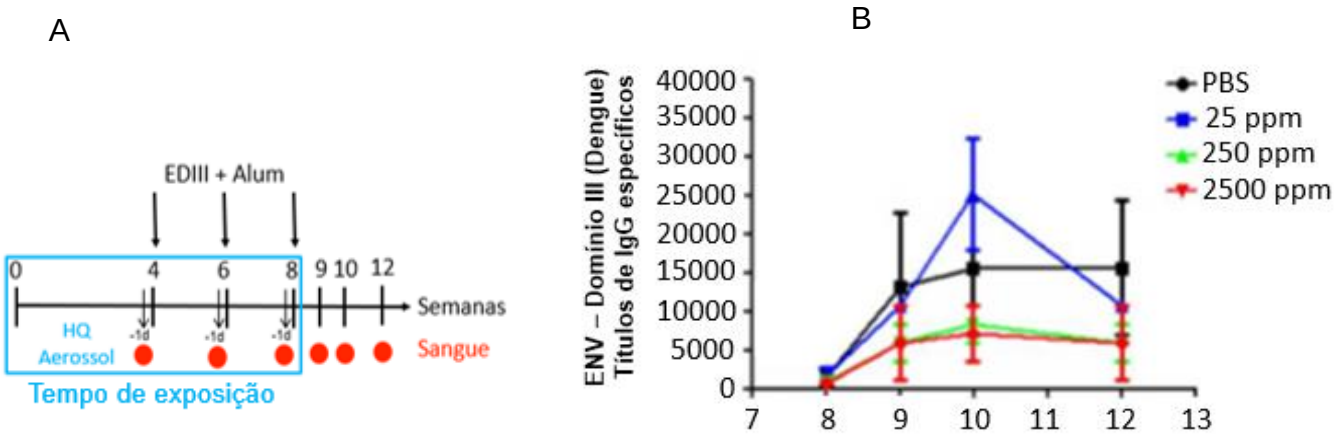


Figura 10 – A exposição com maiores doses de HQ tem o potencial de reduzir os títulos de anticorpos induzidos por vacinação com EDIII. A) Escala de tempo especificando o período de exposição à HQ, imunizações e coletas de sangue. B) A exposição a longo prazo, visivelmente, reduziu a resposta humoral do grupo exposto a 250 ppm e 2500 ppm de HQ no soro de camundongos C57BL/6 vacinados com a proteína EDIII (n=4/grupo), em relação aqueles que receberam 25ppm de HQ. Os valores representam a média e desvio padrão das diluições de soro mais baixas que apresentaram densidade óptica (OD) lidas maiores do que 3 vezes a OD para a amostra de controle negativo (sem soro). P>0,05.

Algo inusitado nos despertou a atenção nesse resultado, pois “aparentemente” ocorreu uma redução nos títulos de IgG específicos nas concentrações de 250 e 2500ppm de HQ em comparação a concetração de 25ppm ou o grupo controle (PBS), mesmo enfatizando bem a não diferença significativa. Sendo assim, quais fatores poderiam levar a esse resultado? Será que esses títulos menores se devem a baixa imunogenicidade da vacina? E o que poderíamos fazer para aumentar essa propriedade sem mascarar a possível imunossupressão provocada pela HQ?

Após o nosso primeiro resultado da imunização com Alum, notamos títulos de anticorpos menores do que os previstos. Por isso, realizamos um novo experimento com o objetivo de aumentar a imunogenicidade da vacina, tendo visto que já havia sido descrito que a imunização com ovalbumina combinada com *Alum*, pela via i.m, gerou títulos maiores em comparação com outras vias (Shakya & Gili, 2015). Deste modo, realizamos um experimento piloto paralelo aos nossos experimentos de exposição com a HQ, para padronizarmos a via de administração de uma proteína recombinante, como a EDIII junto com o adjuvante *Alum* e verifircarmos se notaríamos diferenças nos títulos de IgG-específicos utilizando o nosso adjuvante. Como

tínhamos pouca quantidade de EDIII disponível no momento, decidimos fazer este experimento com uma outra proteína recombinante, a PvMSP1-19 (proteína de superfície do merozoíta-1 (MSP-1) de *Plasmodium vivax*), cedida pela Profa. Dra. Irene Soares (Laboratório de Parasitologia Clínica – FCF/USP).

Dentre os poucos adjuvantes licenciados para uso em humano, destaca-se o *Alum* (hidróxido de alumínio). Os adjuvantes de alumínio formam depósitos nos tecidos, danificando as células e provocando a liberação de ácido úrico, ATP e DNA ocasionando uma maior resposta inflamatória e consequente ativação das células dendríticas, por mecanismos diretos e indiretos (Lindblad, 2004; Lindblad, 2010). Além disso, ativam o sistema complemento e induz retenção da atividade migratória dos macrófagos e ativação dos linfócitos (Harm HogenEsch, 2012). Sabe-se que o Alum estimula seletivamente uma maior resposta de Th2 em camundongos e uma resposta mista nos seres humanos (Harm HogenEsch, 2012).

Neste caso, fizemos 3 imunizações com a proteína PvMSP1-19 combinada com *Alum*, intervaladas por 2 semanas entre cada dose, pelas vias i.m. ou s.c (Figura 11A). Analisamos os títulos de IgG anti-PvMSP1-19 por ELISA, e constatamos que o grupo vacinado pela via i.m exibiu maiores títulos, com mediana em torno de 7000 para segunda dose, e 11000 para terceira dose. Em comparação ao grupo vacinado via s.c com mediana de 12 e 2000 para segunda e terceira doses, respectivamente. Para ambas segundas e terceiras doses, houve uma diferença significativa nos títulos de anticorpos IgG específicos a MSP1-19 entre os grupos i.m e s.c. P (<0,05). (Figura 11B). Desta forma, inferimos que após a 2ª dose, via i.m, os títulos de IgG anti-PvMSP1-19 foram altos, apresentando similar magnitude aos títulos da imunização obtidos após a 3ª dose da vacinação pela mesma via.

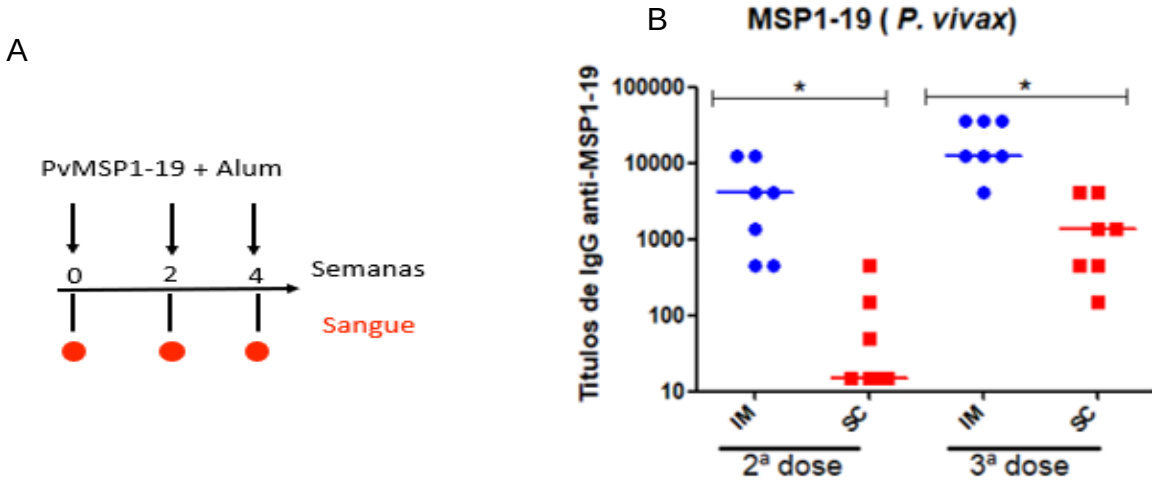


Figura 11 - Imunização de proteína recombinante combinada com Alum induz maiores títulos de IgG-específicos via intramuscular, que pela via subcutânea. A) Escala de tempo especificando o período de imunizações e coletas de sangue. B) Os resultados apontam que a imunização com PvMSP1-19 tanto para segunda dose quanto a terceira via i.m., tiveram títulos de IgG anti-PvMSP1-19 maiores que os animais que foram vacinados via s.c. (n=7/grupo). Os dados representam valores individuais e a mediana de cada grupo. *P* (<0,05).

Dados os resultados preliminares (Ver figura 10 e 11), decidimos fazer a exposição com a maior concentração de HQ (2500 ppm), que é o equivalente a aproximadamente um maço de cigarro fumado por dia, lavando em consideração as proporções de HQ presente em casa cigarro (IARC, 1987). Por um total de 8 semanas consecutivas de exposição, utilizando a via i.m para a imunização com 3 doses de EDIII combinada com *Alum* (Figura 12A). Após a terceira dose da vacina, dosamos os títulos de IgG especificos à EDIII semanalmente por até 10 semanas. Observamos que logo na segunda semana após a última dose, existe um pico dos títulos de IgG específicos. Da 4ª até a 8ª semana, os títulos destes anticorpos se mantiveram em níveis similares. Na 10ª semana, observamos uma leve diminuição nesse parâmetro, mas não significativa no grupo HQ (Figura 12B). Esse mesmo tipo de análise foi realizada para IgG1 e IgG2b anti-EDIII nesses animas. Foi visível a redução nos títulos de IgG1 no grupo exposto à HQ em relação ao grupo controle. Com relação aos títulos de IgG2b, seus patamares foram equivalentes para ambos os grupos (Figuras 12C e 12D).

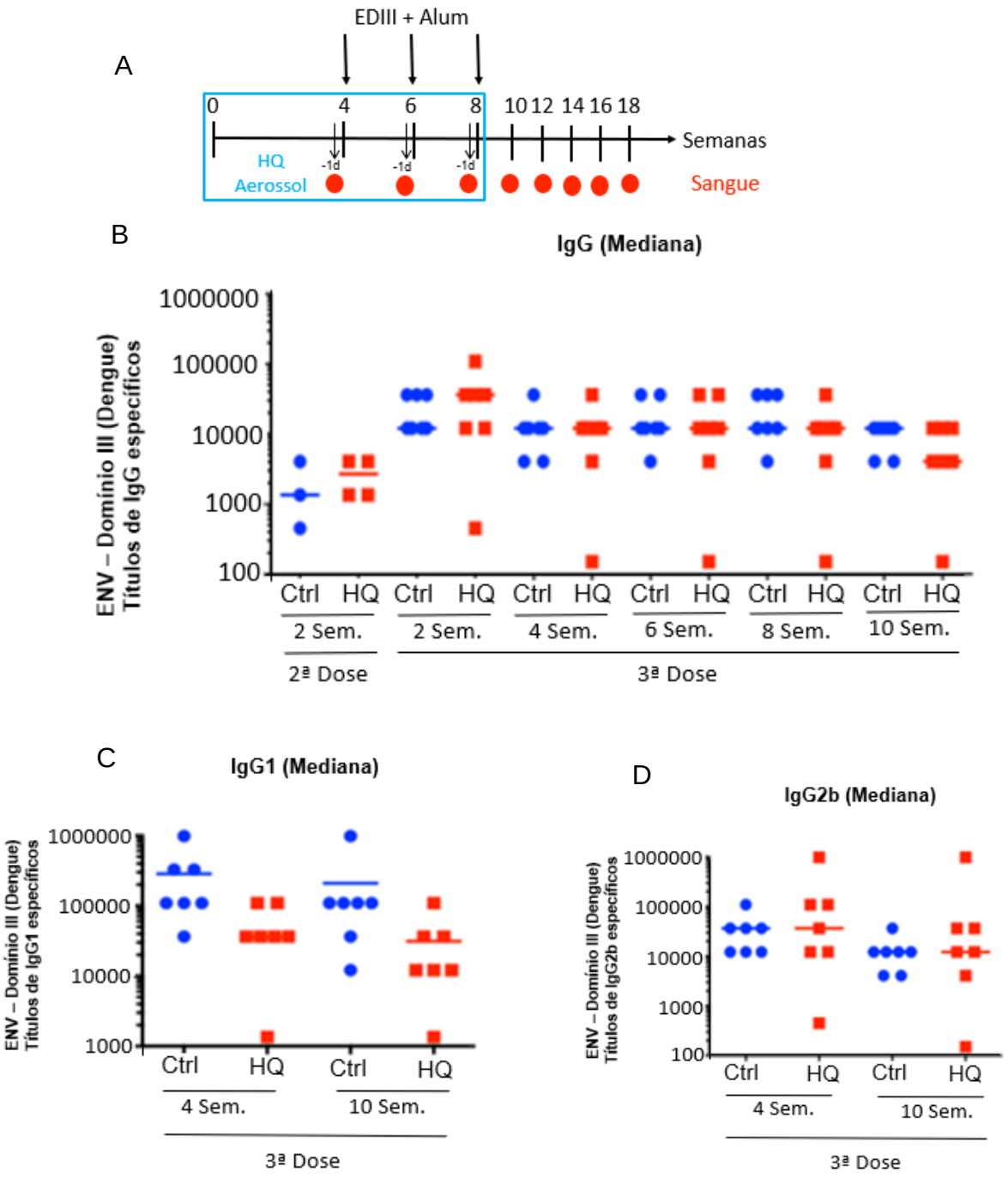


Figura 12 - A exposição por 8 semanas com 2500 ppm de HQ apresentou uma redução não significativa na capacidade de resposta humoral induzida por vacinação para IgG1. A) Escala de tempo especificando o período de exposição à HQ, imunizações e coletas de sangue. B) Os títulos de IgG anti-EDIII foram quantificados por ELISA nas semanas 2, após a segunda dose e posteriormente até a semana 10 após a última dose da vacina. Os resultados apontaram que há um pico na resposta, na semana 2 após a última dose. Os títulos de IgG anti-EDIII se mantiveram até a semana 8, e na semana 10 é nítido uma queda nos títulos de IgG anti-EDIII. 8C e 8D) Dosagem dos títulos de IgG1 e IgG2b, na semana 4 e 10 após a última dose. Nenhum deles apresentaram diferenças significativas (n=7/grupo). Os dados representam a mediana entre os grupos controle e HQ. p>0,05.

Em uma próxima etapa, quisemos quantificar o número de células que secretam IgG-específicos à EDIII através da técnica de ELISPOT. Para padronizarmos o ensaio e obtermos imagens satisfatórias dos *spots* na placa, foi realizado o *coating* da placa utilizando a EDIII em concentrações variadas de 1 a 20ug/mL. Sendo assim, 10ug/ml foi a melhor testada para o *coating* da placa. (Dados não mostrados). Desta forma, com o objetivo de quantificar essas células específicas ao antígeno EDIII, sob à influência da exposição pela HQ, realizamos o ensaio de ELISPOT com células do baço, medula óssea e timo dos animais vacinados 10 semanas após a 3ª dose da vacina. Verificamos que o grupo controle possuía mediana em torno de 55 Células Secretoras de Anticorpos (ASC)/milhão de esplenócitos. Já o grupo HQ apresentou mediana em torno de 30 ASC/milhão de esplenócitos (Figura 13A). Curiosamente, o grupo HQ apresentou maior número destas células na medula óssea e no timo, com mediana em torno de 20 ASC/milhão de células para medula óssea e 10 ASC /milhão de timócitos, já o grupo controle teve mediana em torno de 5 ASC/milhão de células para médula óssea e 3 ASC/milhão de timócitos. (Figuras 13B e 13C). Entretanto, mesmo assim, não observamos diferenças significativas.

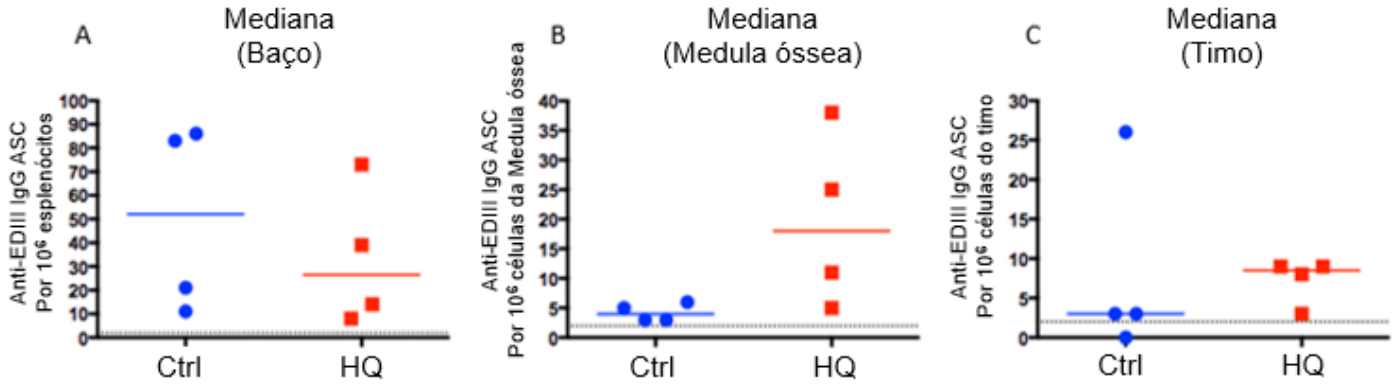
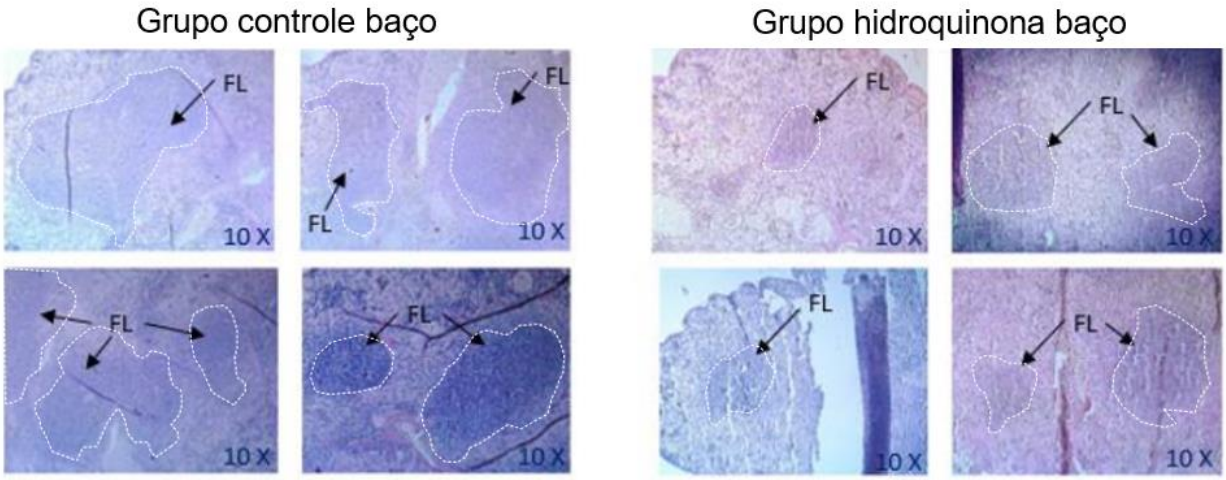


Figura 13 - A exposição com a HQ reduz não significativamente a frequência de células secretoras de anticorpos do baço mas não na medula óssea e timo. Camundongos C57BL/6 foram expostos durante 8 semanas consecutivas com 2500 ppm de HQ e vacinados com 3 doses da proteína EDIII. Seus orgãos foram removidos para o ensaio 10 semanas após a ultima dose de vacina. A) Spots do Baço (n=4 por grupo), B e C) Spots da Medula óssea e do Timo respectivamente. Neste ensaio, o limite de detecção destas células era de 2 para cada milhão de esplenócitos, timócitos ou células da medula óssea P>0,05.

Com o intuito de verificarmos as possíveis alterações histológicas nos animais expostos com 2500 ppm de HQ, alguns órgãos foram analisados na 10ª semana após a imunização com a última dose da proteína EDIII. Em coloração com hematoxilina-eosina, a análise microscópica mostrou no grupo controle que o baço desses animais apresentavam maiores folículos e aparentemente um maior número dos mesmos quando comparados ao grupo HQ. Estes eram folículos maduros com zona central clara, o que pode indicar a presença de Centro Germinativo (CG). Já o grupo HQ possuia folículos mais escuros na região central, e não se observou plasmócitos na lâmina (Figuras 14A e 14B). Em relação ao timo dos animais do grupo controle, eles possuiam uma zona medular maior, com morfologia regular e linfócitos conservados em comparação ao grupo exposto com a HQ. A zona medular do timo é importante para maturação dos linfócitos T (Figuras 15A e 15B).

A



FL: Folículos Linfoides FL: Folículos Linfoides

B)

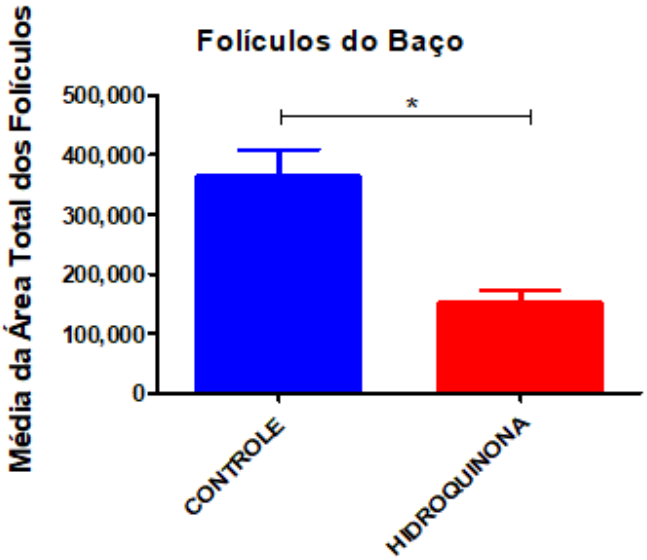
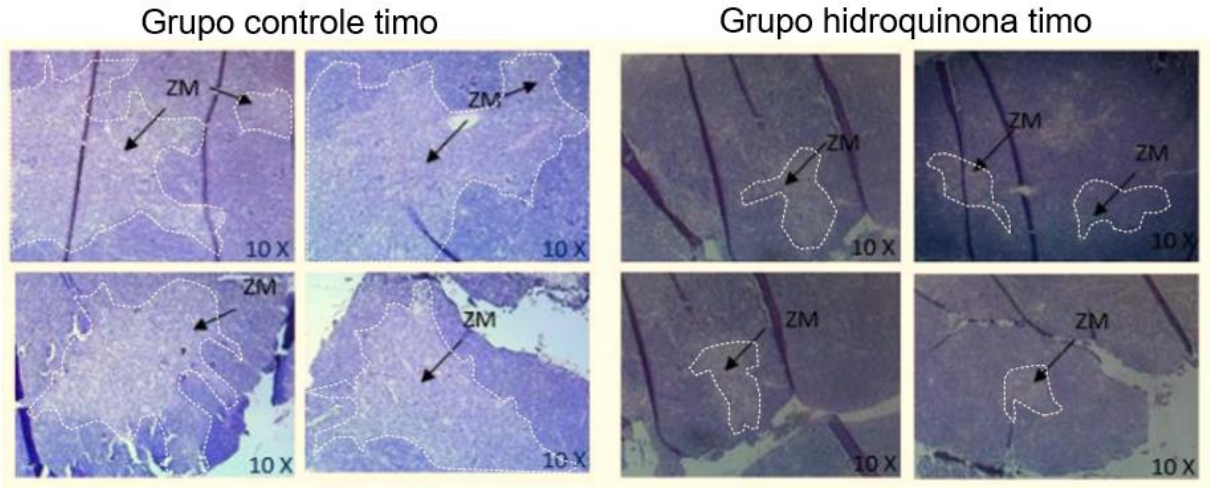


Figura 14 - A exposição com 2500 ppm de HQ diminui a área folicular no baço de camundongos vacinados com a EDIII. Histologia do Baço dos animais do grupo controle e HQ, corados com Hematoxilina e Eosina e observados ao microscópio com a objetiva de 10x. A) Imagens de cortes histológicos com o objetivo de melhor visualização dos folículos linfoides. À esquerda, observamos os folículos do grupo controle com maior área e aparentemente menor número desses folículos, sua região central é mais clara (o que indica formação de Centro Germinativo – Ref: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3733965/mod_resource/content/0/Atlas%202017.pdf). À direita, observa-se que o grupo exposto com a HQ tem área folicular menor, mais escura em seu centro e aparentemente um menor número de folículos linfoides. B) Representação gráfica da média +/- DP entre os grupos controle e HQ, com a área delimitada. Os dados são representativos de 2 animais para ambos os grupos. Foi realizado um teste *t de Student* e foi considerado uma diferença estatística os resultados com valor P (<0,05).

A



ZM: Zona Medular ZM: Zona Medular

B)

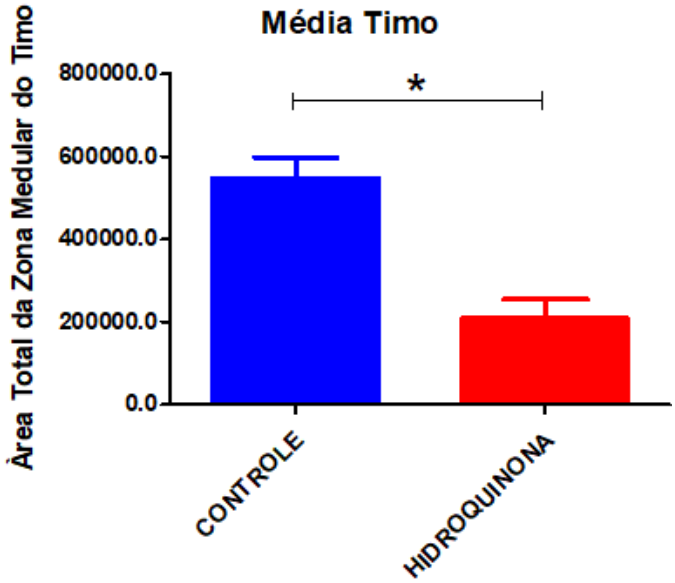


Figura 15 - A exposição com 2500 ppm de HQ diminui a área medular no timo de camundongos vacinados com a EDIII. Histologia do Timo dos animais do grupo controle e HQ corados com Hematoxilina e Eosina e observados ao microscópio com a objetiva de 10x. A) Imagens do baço do grupo controle (esquerda) mostrando uma maior área da zona medular, local importante para maturação dos linfócitos T. À direita, se observa o grupo HQ, com zona medular menor e mais escura, onde sugere que a HQ tem um efeito direto no desenvolvimento da zona medular do timo desses animais. B) Representação gráfica da média +/- DP entre os grupos controle e HQ, com a área delimitada. Os dados são representativos de 2 animais para ambos os grupos. Foi realizado um teste *t de Student* e foi considerado uma diferença estatística os resultados com valor P (<0,05).

Até aqui observamos que a HQ não alterou significativamente os títulos de anticorpos, tampouco o número de células secretoras de anticorpos nos orgãos analisados. Isso sugere que a HQ pode não afetar diretamente a resposta humoral induzida por vacina com uma proteína recombinante com esta dose e tempo de exposição, ou que seu desvio não seja duradouro, mesmo com evidências indiretas da literatura apontando o oposto. No entanto, a exposição com a HQ no nosso modelo alterou a estrutura de orgãos linfóides importantes, abrindo uma gama de indagações sobre quais mecanismos poderiam então contribuir com a geração de anticorpos contra a EDIII pelo grupo exposto com à HQ em níveis idênticos aos animais não expostos.

Para refutar tais possibilidades, utilizamos dados de transcriptomas disponíveis em plataformas públicas, associando as perturbações gênicas com o Benzeno (por ser a substância de onde provém a HQ), o cigarro (por ser o principal veiculo de exposição à HQ) e a própia HQ (Figura 16).

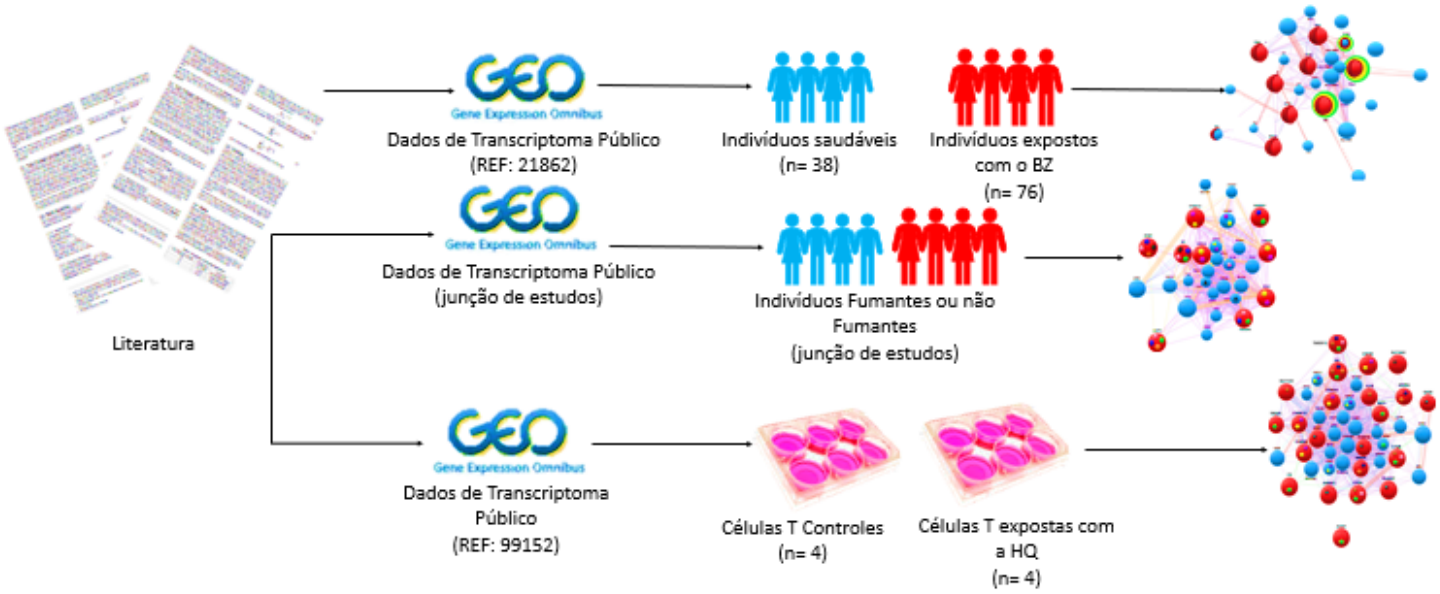


Figura 16 - Desenho experimental da análise transcriptômica. De acordo com a literatura, selecionamos estudos com o BZ, cigarro e HQ para posteriormente montarmos uma rede de interação gênica e descobrir quais genes estão envolvidos em processos referentes à resposta imune humoral.

Com o objetivo de relacionar dados públicos de expressão gênica usando a biologia de sistemas com os resultados obtidos experimentalmente, selecionamos estudos com as seguintes palavras chave em inglês na plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO-NCBI) (1): *Hydroquinone / hydroquinone b cell / hydroquinone and b cell / hydroquinone and Benzene / Benzene B cell / smokers / cigarette / smokers and B Cell / cigarette and hydroquinone / cigarette and benzene* Foram identificados 70 estudos. Após uma nova análise mais restrita levando em apreciação tópicos como (2): amostras de sangue, órgãos linfóides, estudos feitos em *Homo sapiens* e *Mus musculus*. Selecionamos um estudo com exposição com o Benzeno (GSE21892 (GSE – Identificador do Estudo)), um estudo com exposição à tB-HQ (Terc-butil-hidroquinona), que é um derivado da HQ (GSE99152) e quatro estudos com exposição ao cigarro (GSE23323; GSE47415; GSE55962; GSE87072). Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 – Resultado do estudo com o BZ obtido da plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO-NCBI)

Estudo (benzeno)	Gene expression on 144 arrays representing 125 workers exposed to arange of benzene exposures.
GSE	GSE21862
Organismo	*Homo sapiens*
Tecido	Sangue
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21862

Tabela 3 – Resultado do estudo com o HQ obtido da plataforma *Gene Expression Omnibus Database* (GEO-NCBI)

Estudo (Hidroquinona)	Transcriptomic analysis of splenic CD4+ cells from tBHQ treated
GSE	GSE99152
Organismo	*Mus musculus*
Tecido	células T CD4+ esplênicas
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE99152

Tabela 4 – Resultado dos estudos com o Cigarro obtidos da *Gene Expression Omnibus Database* (GEO-NCBI)

Estudo 1 (Cigarro)	Transcriptomics in response to cigarette smoking in humans
GSE	GSE23323
Organismo	*Homo sapiens*
Tecido	Sangue
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE23323
Estudo 2 (Cigarro)	Gene expression in male and female smokers.
GSE	GSE47415
Organismo	*Homo sapiens*
Tecido	Sangue
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE47415
Estudo 3 (Cigarro)	Systemic inflammatory response to smoking in chronic obstructive pulmonary disease: evidence of a gender effect.
GSE	GSE55962
Organismo	*Homo sapiens*
Tecido	Sangue
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE55962
Estudo 4 (Cigarro)	Gene expression profiles from PBMCs collected from chronic smokers and moist snuff consumers
GSE	GSE87072
Organismo	*Homo sapiens*
Tecido	Sangue
Plataforma	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE87072

No estudo com o BZ (GSE: 21862), selecionamos 114 amostras, sendo 38 controles e 76 expostos ao BZ, onde todas eram derivadas de homens e mulheres não fumantes. Foi importante retirar o grupo de fumantes que foram expostos ao BZ, pois isso poderia potencializar os resultados e inviabilizaria nosso objetivo que é obter

dados gênicos apenas dos indivíduos expostos ao BZ. or conseguinte, selecionamos os genes mais ou menos expressos nesse estudo classificando-os pelo valor de P de cada um deles. O valor de P divergiu para cada estudo analisado, pois o numero de variações gênicas para cada um são diferentes, e o objetivo é unir um número de genes que veridicamente foram perturbados por cada substância analisada e que realmente são significativos para o estudo. Dentre aqueles *down-regulated*, 52 no total (ver anexo 1), apenas 6 genes apresentaram relação direta com resposta imune (CEBPG, NCOA6, BATF, MT1G, HHEX e CEBPA), entretanto, não foram detectados relação com resposta humoral (Figura 17).

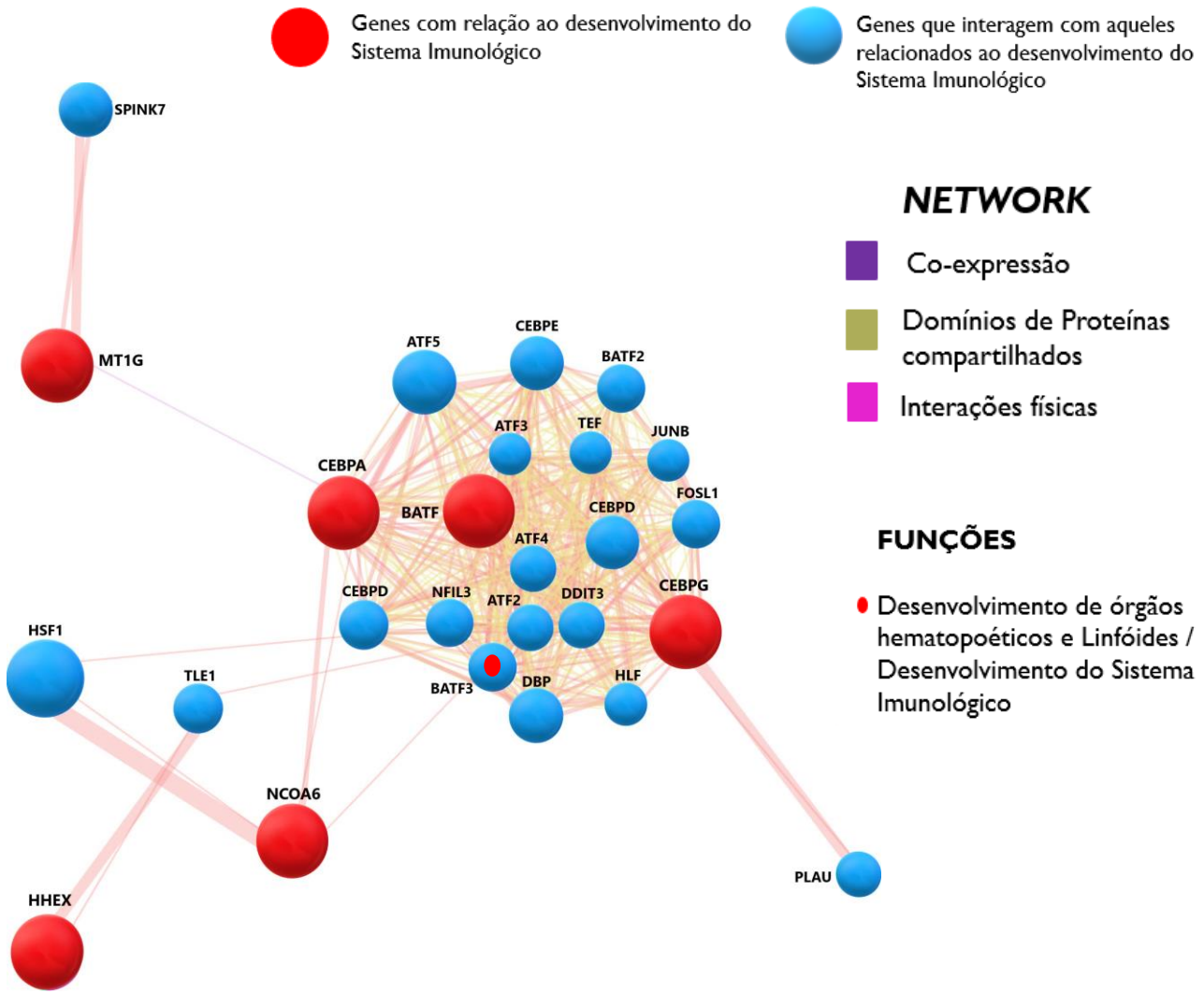
A

Genes associados com a resposta imune	Valor de p
CEBPG - *CCAAT Enhancer Binding Protein Gamma*	0,00000000176
NCOA6 - *Nuclear Receptor Coactivator 6*	0,0000136
BATF - *Basic Leucine Zipper ATF-Like Transcription Factor*	0,000059
MT1G – *M*etallothionein 1G	0,000363
HHEX - *Hematopoietically Expressed Homeobox*	0,00000503
CEBPA - *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*	0,00000229

Figura 17 – Lista de genes regulados negativamente pelo BZ que não possui relação com a resposta imune humoral. A) Dentre os 52 genes regulados negativamente no *Homo sapiens* pelo BZ, nesse estudo (GSE21862), 6 deles possuem alguma relação com o sistema imune. Dados obtidos da plataforma online *GENEmania 2019* e *GeneCard* 2019.

Posteriormente, realizamos um *network* (rede de interação gênica que evidencia as funções cruciais dos genes e a ligação entre eles) junto às principais funções conhecidas desses genes, demonstrando sua relação com o sistema imune (desenvolvimento de órgãos hematopoéticos e linfóides; Desenvolvimento do sistema imune), onde esses genes possuíam 87,76% de interações físicas entre eles (Figura 18).

A



B

INTERAÇÕES FÍSICAS	87,76%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	13,85%
CO-EXPRESSÃO	4,53%

Figura 18 – Network dos 6 genes *down-regulated* pelo BZ interligados apresentando algum tipo de relação com a resposta imune. A) Via dos genes *down-regulated* com relação ao desenvolvimento do sistema imune. Em vermelho são o grupo de 6 genes encontrados dentre os 52 genes *down-regulated* do estudo com o benzeno. Em azul a relação dos genes que possuem algum tipo de interação com os principais genes relacionados ao desenvolvimento do sistema imune e órgãos hematopoiéticos e linfóides. As principais funções são exibidas. B) Tabela com os resultados de co-expressão, interações físicas e domínios de proteínas compartilhados entre estes genes, mostrando que o principal *network* gênico é a interação física entre eles, com 87,76% (*GENEmania* e Paint 3D).

Em seguida, selecionamos nove genes regulados positivamente dentre os 176 genes desse mesmo estudo (ver anexo 2), classificando-os pelo valor de *P* (CCL3, IL6, TNFAIP3, CXCL8, S100A8, S100A12, SAMSN1, CLCF1 e IFNB1). Os genes *Up-regulated* foram vistos quanto sua relação com a resposta imune humoral. De acordo com a ferramenta *GeneMania,* não havia nenhuma relação direta destes genes com o termo resposta humoral, mas apenas com quimiotaxia e migração de neutrófilos, ativação e regulação da ativação de células B; ativação de células B envolvidas na resposta Imune, bem como são mostrados os genes e o seus valores de p (Figura 19).

A

Genes associados com a resposta imune	Valor de p
S100A8 - *S100 calcium binding protein A8*	0,02962
S100A12 - *S100 calcium binding protein A12*	0,000000456
CXCL8 – *C-X-C motif chemokine ligand 8*	0,00000125
TNFAIP3 - *TNF alpha induced protein 3*	0,00266
CCL3 - *C-C motif chemokine ligand 3*	0,000203
CLCF1 - *Cardiotrophin-like cytokine factor 1*	0,0000586
SAMSN1 - *SAM domain, SH3 domain and nuclear localization signals 1*	0,000032
IL6 - *Interleukin 6*	0,00000664
IFNB1 - *Interferon beta 1*	0,00000000177

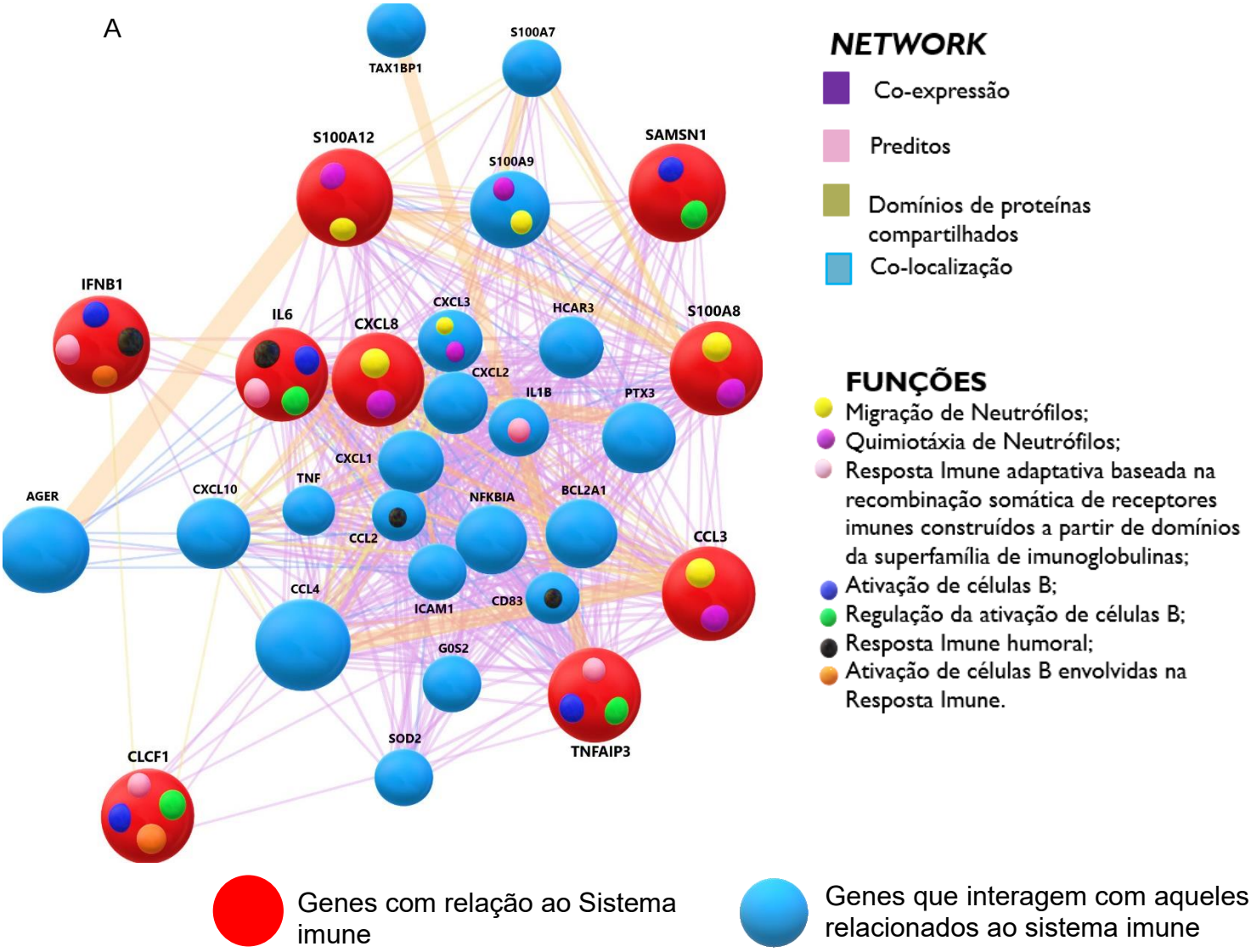
Figura 19 - Genes *Up-regulated* pelo BZ relacionados com à resposta imune e suas redes em porcentagem. A) Dentre os genes regulados positivamente no *Homo sapiens*, pelo BZ, nesse estudo (GSE21862), nove deles exercem alguma relação com a resposta imune. Dados obtidos da plataforma online *GENEmania 2019* e *GeneCard* 2019.

Um ponto crítico que deve ser elucidado aqui, é que o termo “resposta imune humoral” não aparece diretamente na plataforma *GENEmania* com relação à esses

genes. No entanto, quando esses 9 genes *up-regulated* são selecionados para construção do *network*, o gene CCL3 que codifica a quimiocina pró-inflamatória CCL3, de acordo com dados mais recentes publicados, aparece como importante devido à sua produção local pelas células B do CG, a CCL3 de alguma forma está envolvido na promoção das interações e controle direto pelas células Tfh (células T foliculares), sugerindo assim que as quimiocinas secretadas pelas células do CG podem ser importantes para direcionar suas interações com outros tipos de células e ajustar as respostas das células CG (Benet et al., 2018), podendo ter relação com a resposta imune humoral. Em relação ao gene IL-6 que é uma citocina pró-inflamatória que promove a diferenciação das células Tfh, ela já foi descrita como sendo importante para formação espontânea dos CG durante a autoimunidade sistêmica (Arkatkar et al., 2017), além de participar da diferenciação de células B e também a produção de imunoglobulinas (Faris et al., 1997; Kikichi et al., 2002; Maeda et al., 2010; Kawashima et al., 2018).

Efetuamos uma análise com o *network* explanando as principais funções descritas desses nove genes, expondo também a interação desses genes principais com outros genes que interagem com eles (Figura 20).

A



B

CO-EXPRESSÃO	79,31%
PREDITOS	9,83%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	6,84%
CO-LOCALIZAÇÃO	4,01%

Figura 20 – Network dos 9 genes *Up-regulated* pelo BZ interligados com a resposta imune. A) Via dos genes *Up-regulated* com relação a migração e quimiotáxia de neutrófilos e outros lecucócitos além de processos relacionados com ativação e regulação de células B, além de genes como o IL-6 e o INFB1 com relação a resposta imune humoral. B) Tabela com os resultados de co-expressão, genes preditos, domínios de proteínas compartilhados e co-localização, mostrando que o principal *network* gênico é a co-expressão com 79,31% (GENEmania e Paint 3D).

Outro gene crucial regulado positivamente pelo BZ, tendo envolvimento na resposta humoral é o INFB. Esse gene codifica uma citocina que pertence à família de proteínas de sinalização de interferon, liberada como parte da resposta imune inata aos patógenos. Em relação à resposta humoral, esse gene é importante no desenvolvimento dos estágios de maturação das células B, influenciando diretamente a qualidade da sua resposta (Hamilton et al., 2017).

Ademais, decidimos investigar quais dos 17.179 genes totais, provenientes do mesmo dado público de transcriptoma (GEO Ref: GSE21862), estavam entre os 10 genes mais ou menos diferentemente expressos entre os pacientes controle e os expostos ao Benzeno (Tabela 5). De novo, enquanto nenhum gene menos expresso, de acordo com os valores de Fold Change (FC) e de p, no estudo com o BZ possui relação com a resposta humoral, entre os genes mais expressos, IFNB1 e IL6 apresentaram relação com o termo resposta humoral.

Tabela 5 - Dados gerados através da plataforma GEO2R do NCBI-GEO, através do estudo GEO Ref: GSE21862.; FC: ***Fold change***.

5 genes MENOS expressos FC Negativo			5 genes MAIS expressos FC Positivo		
GENE	**LogFC**	***P***	**GENE**	**LogFC**	***P***
DEFA1B	-6,60E-01	2,49E-02	SERPINB2	1,94	3,39E-12
CNTNAP2	-6,25E-01	3,75E-05	DNAAF1	1,7	3,91E-12
CEBPA	-5,59E-01	2,04E-08	IFNB1	1,69	2,77E-10
ASGR1	-5,29E-01	2,75E-05	IL6	1,41	1,76E-07
TCIRG1	-5,23E-01	6,41E-09	IL1A	1,33	2,16E-12

Em laranja são mostrados os genes com relação à resposta imune humoral estando entre o topo dos genes IFNB1 e IL6 regulados positivamente em todo o estudo e na lista dos genes selecionados positivamente IFNB1 e IL6.

Analisamos também os genes diferencialmente expressos sob influência do cigarro que estariam relacionados com a resposta humoral e a relação desses genes compartilhados entre o cigarro e o BZ e também cigarro e HQ. Para isso selecionamos quatro estudos com o cigarro (GSE23323; GSE47415; GSE55962; GSE87072), realizados com sangue humano. Com um total de 200 amostras, selecionamos cerca 127 genes relevantes regulados negativamente e 73 genes relevantes regulados positivamente, ambos pelo valor de P (anexo 3 e 4). Os genes *down-regulated* foram vistos quanto sua relação com a resposta imune humoral e as principais redes (co-

expressão; co-localização; interações físicas e genéticas). Curiosamente, nos estudos selecionados com o cigarro, observamos que esse não regula negativamente nenhum gene relacionado “diretamente” com o termo “resposta imune humoral”, de acordo com a plataforma *GeneMania*. Entretanto, ao realizarmos uma busca mais detalhada nos artigos mais recentes, observamos que dos 12 genes selecionados regulados negativamente (HLA-DQA1, CCL5, RORA, NLRC3, NCR3, SH2D1B, TNFSF4, CD247, NCR1, KLRK1, XCL1 e EOMES), dois deles (XCL1 e TNFSF4) participam de processos relacionados com células B (Figura 21 e 22). Os outros genes possuem funções relacionados com a ativação de células T, regulação da ativação de células T, imunidade mediada por linfócitos e a regulação do Processo efetor imune (Figura 22).

A

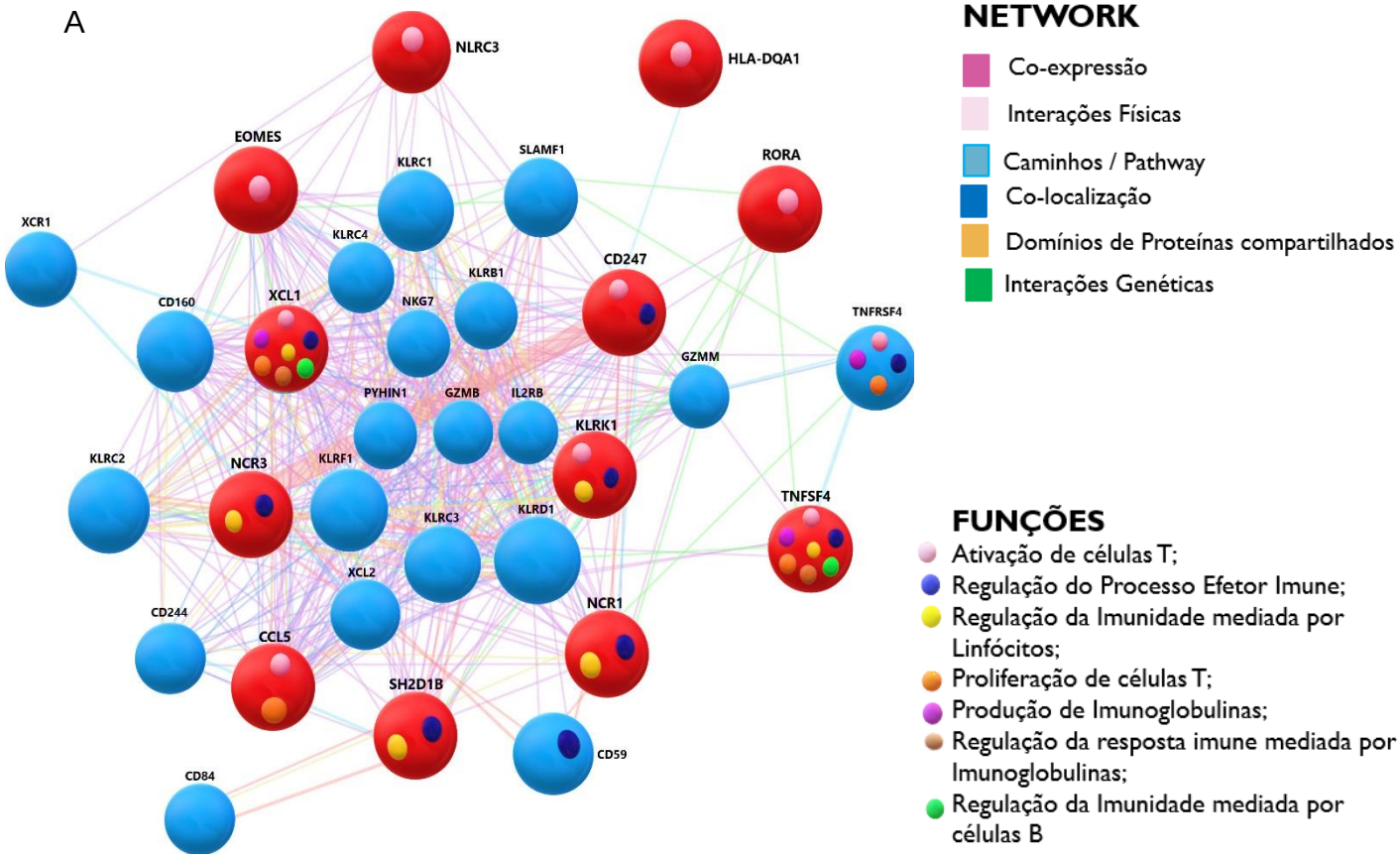
Genes associados com a resposta imune	Valor de p			
	GSE23323	GSE47415	GSE55962	GSE87072
HLA-DQA1 - *Major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1*	X	X	0,0000218	X
CCL5 - *C-C motif chemokine ligand 5*	X	X	X	0,000759
RORA – *Bora, aurora kinase A activator*	X	X	0,000384	X
NLRC3 - *NLR family CARD domain containing 3*	X	X	0,0000877	X
NCR3 - *Natural cytotoxicity triggering receptor 3*	0.020698215	0,038941023	0,00868	0,0189
SH2D1B - *SH2 domain containing 1B*	X	X	0,00123	0,00000143
TNFSF4 - *Tumor necrosis factor superfamily member 4*	X	X	X	0,00112
CD247 - *CD247 molecule*	0.00392109	0,02627196	0,00623	0,00342
NCR1 - *Natural cytotoxicity triggering receptor 1*	X	X	X	0,0000695
KLRK1 - *Killer cell lectin like receptor K1*	X	X	0,000272	X
XCL1 - *X-C motif chemokine ligand 1*	X		X	X
EOMES - ***E**omesodermin*	X	X	0,00000397	0,000169

Figura 21 - Genes Down-regulated pelo cigarro com maior associação com a ativação de células T. A) Dentre os 127 genes regulados negativamente no *Homo sapiens*, pela exposição ao cigarro nos estudos selecionados (GSE23323; GSE47415; GSE55962; GSE87072), 12 deles exercem alguma relação com a resposta imune, principalmente em relação a imunidade celular mediada por células

T. Os campos com “X” indicam que o gene correspondente não estava presente naquele estudo.

Para ficar mais nítido visualmente, efetuamos uma análise de *network* expondo as funções mais importantes descritas dos 12 genes selecionados, além de exibir as interações desses genes principais com outros genes que relacionam com eles (Figura 22).

A



Genes com relação ao Sistema imune

Genes que interagem com aqueles relacionados ao sistema imune

B

CO-EXPRESSÃO	45,54%
INTERAÇÕES FÍSICAS	41,40%
VIAS / CAMINHOS	6,45%
CO-LOCALIZAÇÃO	5,51%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,65%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,36%

Figura 22 – Network dos 12 genes *down-regulated* pelo cigarro associados com a resposta imune. A) Interações e principais funções dos genes *down-regulated* pelo cigarro, com a principal relação de ativação e proliferação de células T, poucos genes expressam alguma ligação com células B. B) Tabela com os resultados das principais interações gênicas, mostrando que o principal *network* gênico é a co-expressão com 45,54%, seguida de interações físicas com 41,40% (*GENEmania* e Paint 3D).

Em seguida, selecionamos 73 genes regulados positivamente (anexo 4) nesse mesmo estudo classificando-os também pelo valor de P. Os genes *Up-regulated* foram analisados quanto às suas relações com a resposta imune humoral, entretanto não havia nenhuma relação direta com o termo "resposta humoral" no aplicativo *GeneMania*. Desses, 14 genes (EIF2AK2, MX1, IFI44L, OASI, OASL, MX2, SLPI, RSAD2, ISGI5, OAS2, IFIT1, IFIT3, IFIT5 e HERC5) tiveram alguma relação com resposta de defesa à vírus e regulação do processo viral (Figura 23).

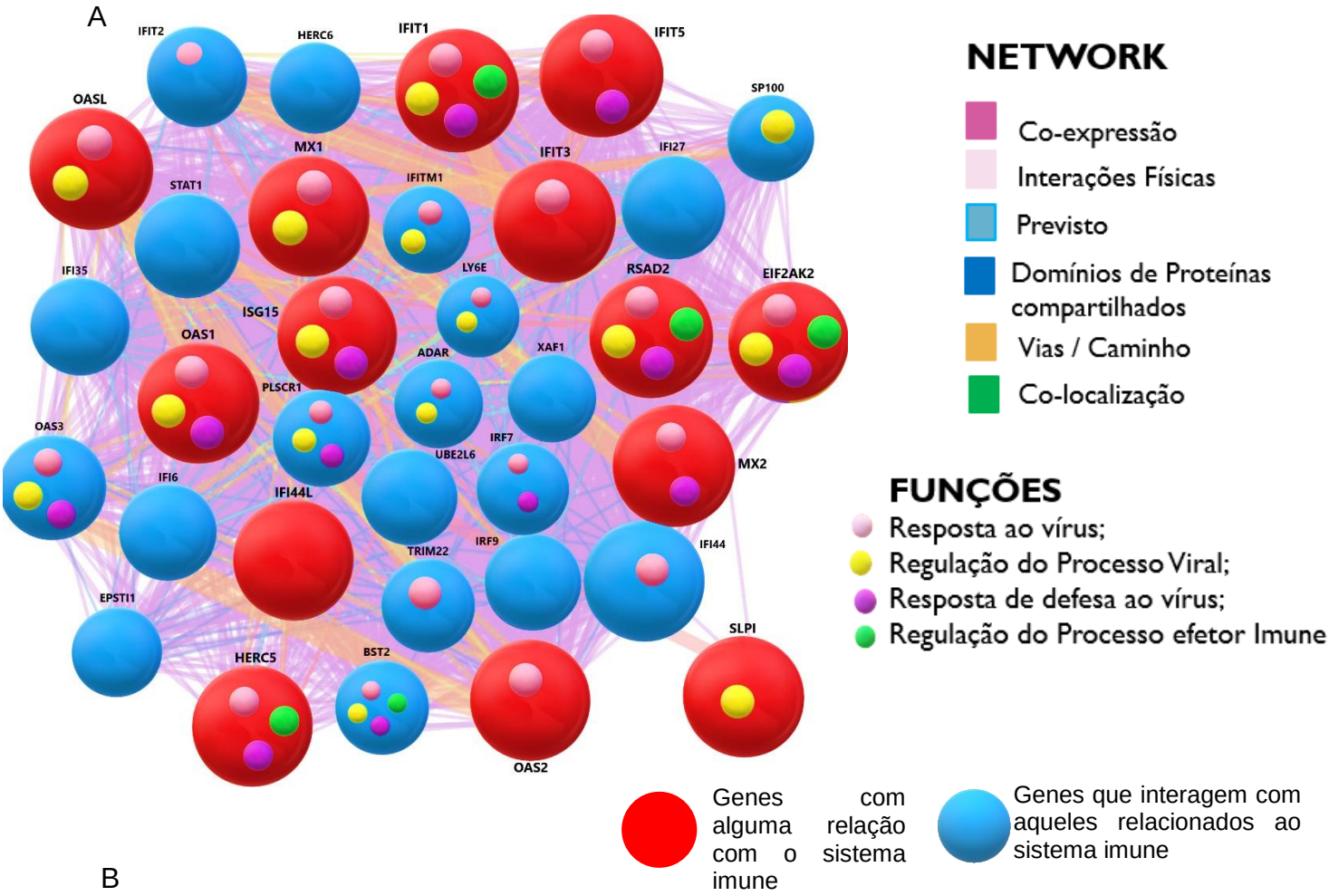
A

Genes associados com a resposta imune	Valor de p			
	GSE23323	GSE47415	GSE55962	GSE87072
EIF2AK2 - *Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2*	*X*	*X*	*0,0000562*	*X*
MX1 - *MX dynamin like GTPase 1*	*X*	*X*	*0,000913*	*X*
IFI44L - *Interferon induced protein 44 like*	*X*	*X*	*0,00485*	*X*
OAS1 - *2'-5'-oligoadenylate synthetase 1*	*X*	*X*	*0,0114*	*X*
OASL - *2'-5'-oligoadenylate synthetase like*	*X*	*X*	*0,012*	*X*
MX2 - *MX dynamin like GTPase 2*	*X*	*X*	*0,00288*	*X*
SLPI - *Secretory leukocyte peptidase inhibitor*	*0.00901588*	*0,00101743*	*X*	*X*
RSAD2 - *Radical S-adenosyl methionine domain containing 2*	*X*	*X*	*0,00225*	*X*
ISG15 - *ISG15 ubiquitin-like modifier*	*0.04196127*	*X*	*0,00076*	*X*
OAS2 - *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2*	*X*	*X*	*0,0146*	*X*
IFIT1 - *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1*	*X*	*X*	*0,034*	*X*
IFIT3 - *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3*	*0.02416215*	*X*	*0,00346*	*X*
IFIT5 - *Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 5*	*X*	*X*	*0,05*	*X*
HERC5 - *HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5*	*X*	*X*	*0,002*	*X*

Figura 23 - Genes *up-regulated* pelo cigarro associados com a resposta viral. A) Dentre os 73 genes regulados positivamente no *Homo sapiens*, e expostos com o cigarro, nos estudos selecionados (GSE23323; GSE47415; GSE55962; GSE87072), 14 deles exercem alguma relação com a resposta imune, sendo direcionados principalmente à resposta de defesa à vírus e regulação do processo viral.

A escolha desses genes se baseou, principalmente, na questão de um possível envolvimento deles com a resposta humoral, apesar do aplicativo *GeneMania* não fazer nenhuma relação desses genes com esse termo. Assim, avaliamos quais deles poderiam ter algum envolvimento com células B e nenhum deles tiveram dados publicados da relação direta com resposta humoral. Para elucidar melhor os genes com suas determinadas funções, construímos uma rede gênica (*network*) expondo as funções mais importantes descritas dos 14 genes selecionados, além de expor também a interação desses genes principais com outros genes que interagem com eles (Figura 24).

A



B

CO-EXPRESSÃO	85,63%
INTERAÇÕES FÍSICAS	8,42%
PREVISTO	2,79%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	2,29%
VIAS / CAMINHOS	0,49%
CO-LOCALIZAÇÃO	0,38%

Figura 24 – Network dos 14 genes *Up-regulated* pelo cigarro associados com a defesa viral. A) Interações e principais funções dos genes *up-regulated* pelo cigarro com as principais funções de resposta ao vírus (28,6% dos genes), regulação do processo viral (57,1% dos genes), resposta de defesa ao vírus (57,1% dos genes) e regulação do processo efetor imune (28,6% dos genes). B) Tabela com os resultados das principais interações gênicas, mostrando que o principal *network* é a co-expressão com 85,63%, seguida de interações físicas com 8,42% (*GENEmania* e Paint 3D).

Uma vez inalados, os componentes da fumaça do cigarro entram nos alvéolos pulmonares e são distribuídos pelo sistema sanguíneo para todos os tecidos através dos vasos capilares, podendo influenciar diretamente as células do sistema imune, como as células B, células T, monócitos e outros componentes ativos (Pan et al.,

2010), com seus efeitos pró-inflamatórios e imunossupressores (Stampfli & Anderson, 2009). Entre eles, destaca-se a nicotina, cuja a exposição por longo período pode induzir as células B a diminuírem a secreção de anticorpos. Além disso, ela inibe a sua proliferação e também o desenvolvimento celular, acarretando em prejuízos na supressão das funções imunes (Skok et al. 2003 , 2005 , 2007) causando danos a resposta humoral e suprimindo as funções das células B (Geng et al. 1995; Yang et al. 1999; Moszczynski et al. 2001).

Contudo, apesar do grande volume de estudos envolvendo a relação da exposição com a fumaça do cigarro e componentes como a nicotina, e a sua forte influência sobre as células do sistema imune, pouco se sabe sobre a HQ e sua relação com o perfil de expressão gênica das células imunes, especialmente as células B. Pensando nisso, selecionamos um estudo realizado em células TCD4+ na plataforma GEO-NCBI (GSE99152) realizado em *Mus musculus,* com 8 amostras, sendo 4 controles e 4 expostos com à tB-HQ (tert-Butylhydroquinone) que é um composto aromático orgânico sintético derivado da HQ. É imprescindível evidenciarmos aqui que estudos com a HQ por perfis de expressão gênicas são limitados, contendo pouquíssimos estudos publicados, onde grande parte deles são relacionados com alimentos ou o contexto dermatológico (devido a aplicação estética da HQ). Os genes mais ou menos expressos foram apontados neste estudo a partir do valor de P. Os 86 genes *down-regulated* (anexo 5), foram vistos quanto sua relação com a resposta imune humoral e as principais redes (co-expressão; co-localização; interações físicas e genéticas). Curiosamente, a tB-HQ não regula negativamente nenhum gene relacionado diretamente com a resposta imune humoral, mas apenas 8 genes (CTLA4, UBE2V1, GSK3B, PTPN11, BCL10, TAB2, NR4A1 e CD86) com relação à via de sinalização do receptor Fc, regulação positiva da ativação de células T e ativação das células T (Figura 25).

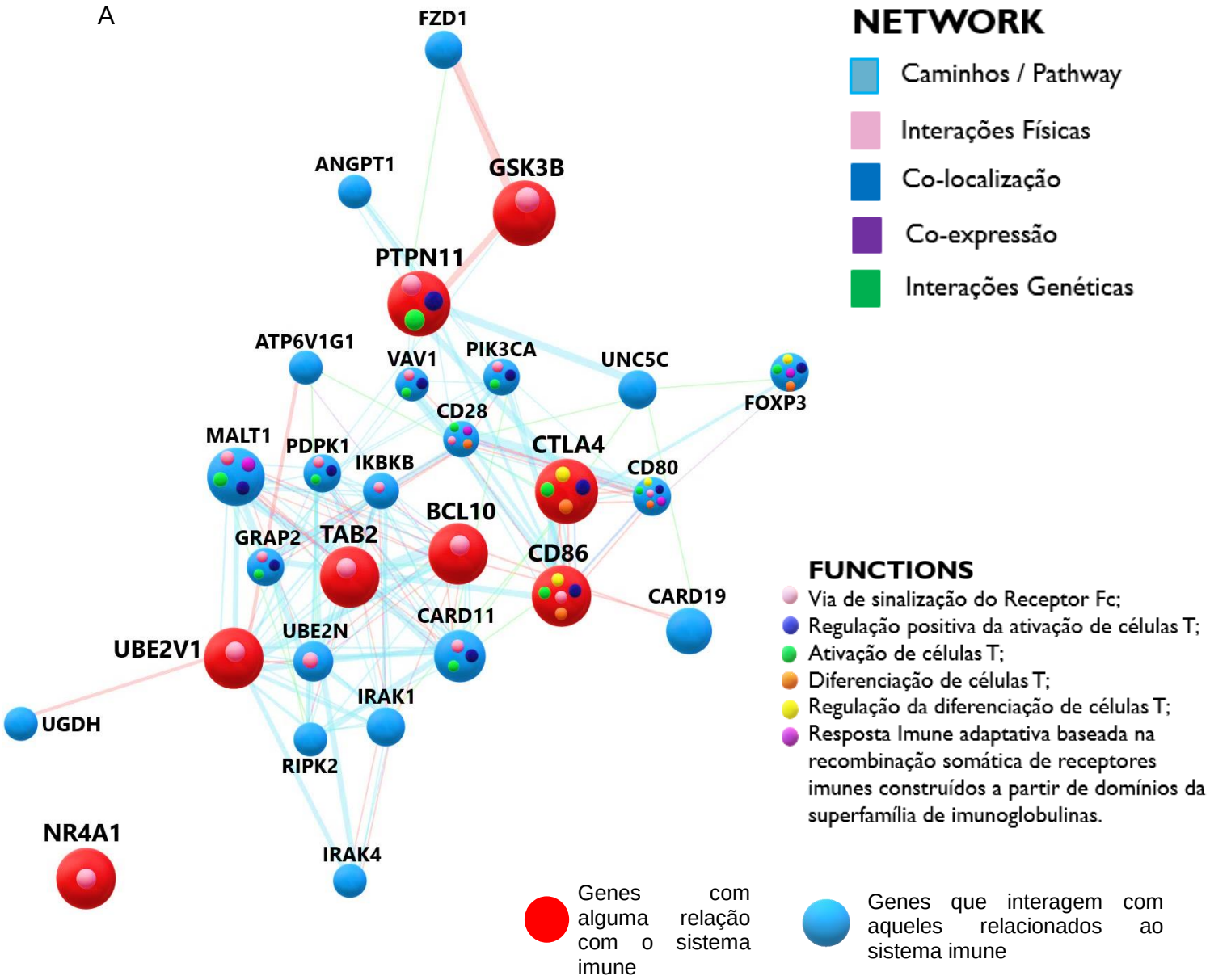
A

Genes associados com a resposta imune	Valor de p
CTLA4 - *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*	0,00822907
UBE2V1 - *Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1*	0,065982235
GSK3B – ***G****lycogen synthase kinase 3 beta*	0,005171902
PTPN11 - *Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*	0,005429195
BCL10 - *B cell leukemia/lymphoma 10*	0,00428907
TAB2 - *TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2*	0,006977736
NR4A1 - *Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1*	0,00848752
CD86 - *CD86 antigen*	0,0020326846

Figura 25 – Genes *down-regulated* pela tB-HQ estão envolvidos em processos com células T e receptor Fc. A) Apesar de nenhum gene está relacionado com à resposta imune humoral (diretamente), 8 dos 86 genes encontrados possuíam redes de interações bem definidas e funções imunes relacionas com as células T e receptor Fc.

Para dilucidar melhor os genes com suas devidas funções, mostramos suas redes gênicas (*network*), expondo as funções mais importantes descritas dos 8 genes regulados negativamente pela tB-HQ e também as interações desses genes principais com outros (Figura 26).

A



B

CAMINHOS / PATHWAY	65,01%
INTERAÇÕES FÍSICAS	31,41%
CO-LOCALIZAÇÃO	2,88%
CO-EXPRESSÃO	0,67%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,03%

Figura 26 – Network dos 8 genes *Down-regulated* pela HQ (tB-HQ) tendo relação com processos de células T. A) Interações e principais funções dos 8 genes *down-regulated*. B) Tabela com os resultados das principais interações gênicas, mostrando que o principal *network* são os caminho biológicos com 65,01%, seguida de interações físicas com 31,41% (*GENEmania* e Paint 3D).

Posteriormente, selecionamos 120 genes (anexo 6) mais expressos nesse mesmo estudo também pelo valor de P. Um total de 22 genes foram selecionados por possuírem alguma relação com sistema imune (S100A9, S100A8, BST1, S100A12, IL6, SLC11A1, IL1B, GAS6, INHBA, ACOD1, PLA2G7, C1QB, CCR1, FCERIG, HMOX1, TREM1, TNFSF13, C6, C1QA, CXCR2 e SLC16A3). Os genes *Up-regulated* foram vistos quanto sua relação com a resposta imune humoral (Figura 27) e as principais redes (co-expressão; co-localização; interações físicas e genéticas). Neste cenário observamos que a tB-HQ modula genes com relação à resposta imune humoral, e para nossa surpresa aumentou genes importantes para a migração de neutrófilos e outros leucócitos.

A

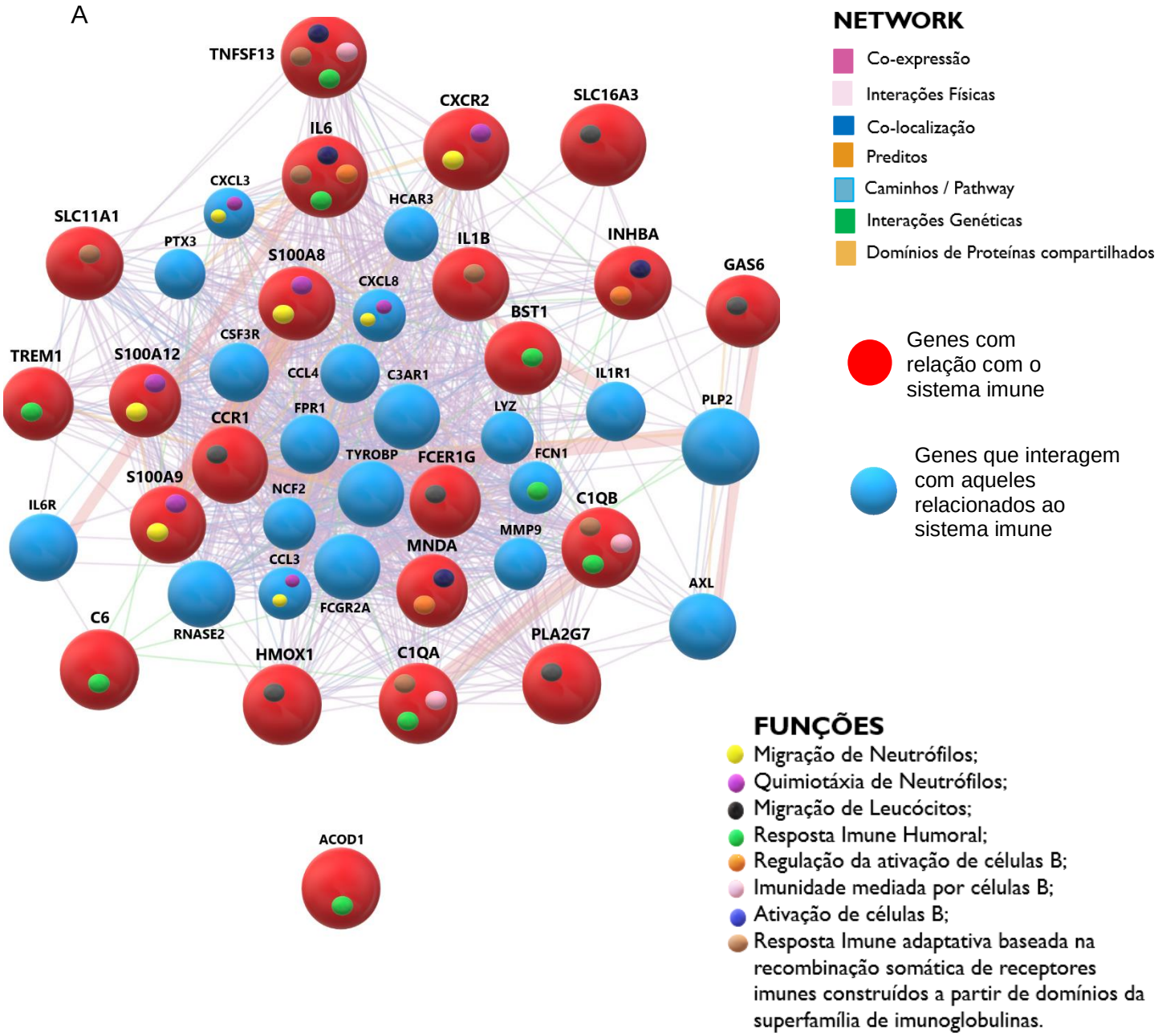
Genes associados com a resposta imune	Valor de p
S100A9 - *S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)*	0,00012153
S100A8 - *S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)*	0,00004947
BST1 – *Bone marrow stromal cell antigen 1*	0,00799589
S100A12 - *S100 calcium binding protein A12*	0,03598512
IL6 - *interleukin 6*	0,04931002
SLC11A1 - *Solute carrier family 11, member 1*	0,00390684
IL1B - *Interleukin 1 beta*	0,00408147
GAS6 - *Growth arrest specific 6*	0,00458958
INHBA - *Inhibin beta-A*	0,0073469
ACOD1 - *Aconitate decarboxylase 1*	0,00271568
PLA2G7 - *Phospholipase A2, group VII*	0,00432654
C1QB - *Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide*	0,0029763
CCR1 - *Chemokine (C-C motif) receptor 1*	0,00508396
FCER1G - *Fc receptor, IgE, high affinity I, gamma polypeptide*	0,00950766
HMOX1 - *Heme oxygenase 1*	0,04620165
TREM1 - *Triggering receptor expressed on myeloid cells 1*	0,00043989
TNFSF13 - *Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13*	0,00614105
C6 - *Complement component 6*	0,00218817
C1QA - *Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide*	0,0021161
CXCR2 - *Chemokine (C-X-C motif) receptor 2*	0,00005615
SLC16A3 - *Solute carrier family 16, member 3*	0,00266274

Figura 27 – Genes *Up-regulated* pela HQ (tB-HQ) possuem relação direta com à resposta imune humoral bem como migração e quimiotaxia de neutrófilos. A) Dados dos 120 genes *up-regulated* pela HQ (tB-HQ) relevantes, onde 21 dos 120

genes encontrados possuem relação com resposta imune humoral, migração e quimiotaxia de neutrófilos e outros leucócitos, regulação da ativação de células B e resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática de receptores imunes construídos a partir de domínios da superfamília de Ig.

Em seguida, detalhamos a rede gênica (*network*) dos 21 genes regulados positivamente pela HQ (tB-HQ), expondo suas funções mais importantes e também as interações desses genes principais com outros (Figura 28).

A



B

CO-EXPRESSÃO	69,99%
INTERAÇÕES FÍSICAS	17,16%
CO-LOCALIZAÇÃO	7,72%
PREDITOS	2,86%
VIAS / CAMINHOS	1,55%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,57%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,16%

Figura 28 – Network dos 21 genes *Up-regulated* pela HQ (tB-HQ) apresentando relação com a resposta humoral além da migração e quimiotaxia de neutrófilos A) Via dos genes *up-regulated* com as principais funções de migração e quimiotáxia de neutrófilos, migração de leucócitos, resposta imune humoral, regulação e ativação de células B, imunidade mediada por células B e a resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática de receptores imunes construídos a partir de domínios da superfamília de Ig B) Tabela com os resultados das principais interações gênicas, mostrando que o principal *network* são a co-expressão com 69,99%, seguida de interações físicas com 17,16% (*GENEmania* e Paint 3D).

Além disso, avaliamos o número de genes diferencialmente expressos no estudo com o BZ, cigarro e HQ, bem como a sobreposição dos genes regulados positivamente e negativamente em ambos os grupos (Figura 29). Observamos uma variedade no número de genes em cada estudo descrito, sendo que no estudo com o BZ (GSE21862) e o da HQ (GSE99152) o número de genes regulados positivamente foi maior em comparação aos regulados negativamente. O mesmo se observou com o cigarro (GSE23323). Já nos estudos GSE47415, GSE55962 e GSE87072, observamos o contrário, onde o número de genes regulados negativamente foram maiores (Figura 29A). Em relação ao número de genes sobrepostos entre os estudos (Figura 29B), verificamos que haviam 16 genes *up-regulated* entre ambos estudos, com sobreposição entre benzeno e hidroquinona, 2 genes entre benzeno e cigarro e mais dois genes entre cigarro e hidroquinona (Figura 29B - direita). Dentre os genes *down-regulated,* foram encontrados dois genes com sobreposição entre o cigarro e a hidroquinona e nenhum deles entre benzeno e hidroquinona ou benzeno e cigarro (Figura 29B - esquerda).

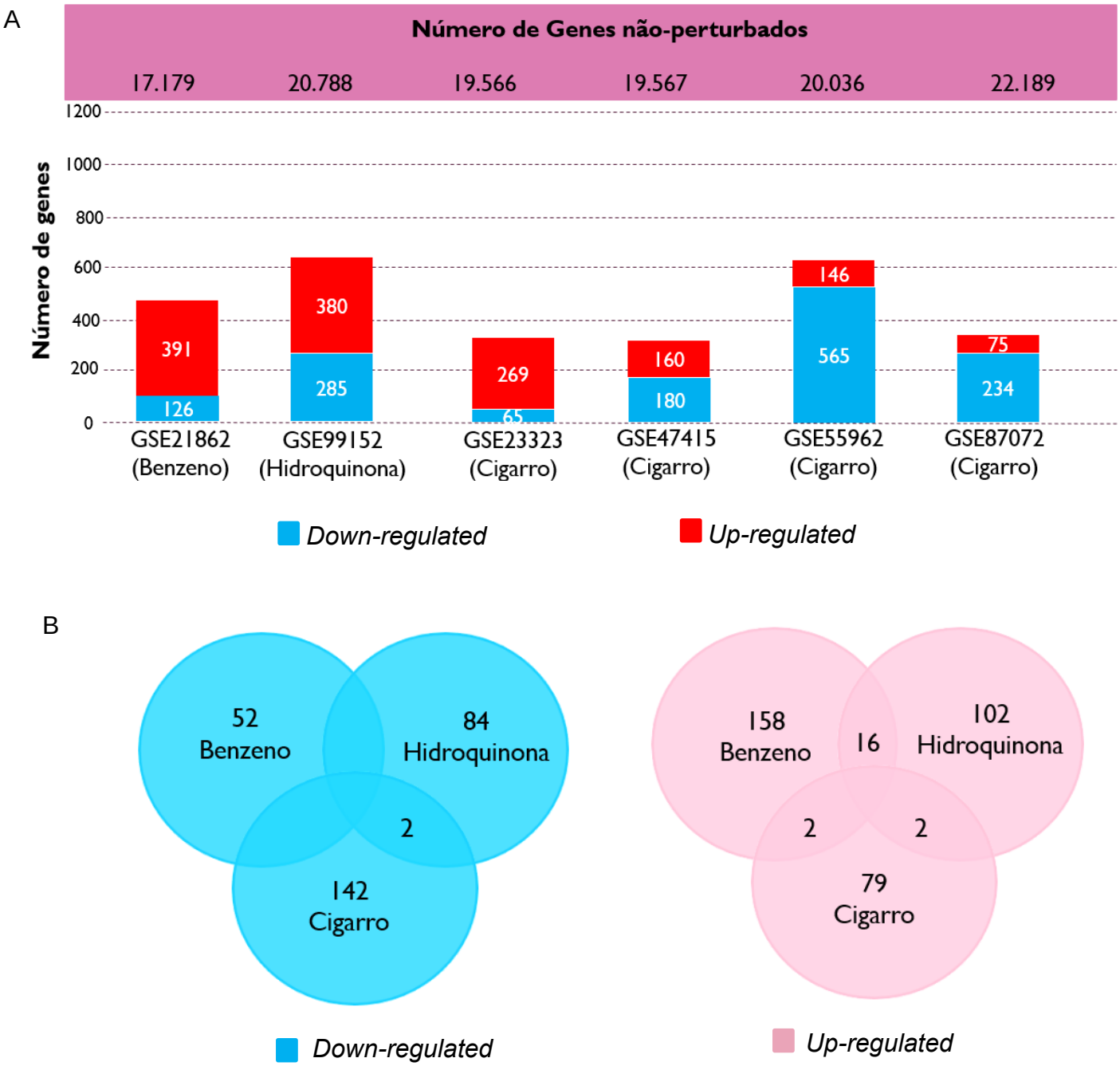


Figura 29 – Contagem de genes regulados negativamente e positivamente de transcriptoma analisados entre todos os estudos A) Número de DEGs por conjunto de dados. B) Diagrama de *Venn* com os genes regulados negativamente (esquerda) e positivamente (direita) em cada estudo e genes com sobreposição entre eles.

Observamos que havia um pequeno grupo de genes em comum com mesmo perfil de expressão nos estudo *down-regulated* entre à Hidroquinona e o cigarro (Tabela 6A). E 16 genes *up-regulated* entre benzeno e hidroquinona (Tabela 6B), além

de dois genes *up-regulated* entre HQ e Cigarro (Tabela 6C) e mais dois entre BZ e cigarro (Tabela 6D).

Tabela 6 - Genes com sobreposição entre o estudo do benzeno, cigarro e hidroquinona com suas funções

A

Genes regulados negativamente entre o cigarro e hidroquinona	
GZMA	KLRG1

Dados obtidos da plataforma *GeneMania (2018)* e *GeneCards – Human Gene Database (2018)*

B

Genes regulados positivamente entre o benzeno e hidroquinona	
AQP9	CXCL2
CXCL8	DRAM1
EDN1	G0S2
IER3	IGSF6
IL1B	IL6
NCF2	PTGS2
S100A8	S100A12
STEAP4	TLR2

Dados obtidos da plataforma *GeneMania (2018)* e *GeneCards – Human Gene Database (2018)*

C

Genes regulados positivamente entre o hidroquinona e cigarro	
HP	SLP1

Dados obtidos da plataforma *GeneMania (2018)* e *GeneCards – Human Gene Database (2018)*

D

Genes regulados positivamente entre o benzeno e cigarro	
IFIT3	OASL

Dados obtidos da plataforma *GeneMania (2018)* e *GeneCards – Human Gene Database (2018)*

Pensando na relação dos genes que possuem primeiramente alguma relação com a resposta imune humoral e também com o sistema imune geral, tanto regulados negativamente quando positivamente em todos os estudos avaliados, surgiu o seguinte questionamento: será que esses genes possuem alguma relação com genes conhecidamente expressos nas Células Secretoras de Anticorpos (ASC)? As ASCs são uma população de células que possuem baixa frequência antes de um estímulo, e que são altamente especializadas, representando o estágio final do processo diferenciação de células B e sua linhagem. Selecionamos, assim, cinco genes com expressão característica em ASCs: TRIB1, CD38, PRDM1, IRF4 e XBP1 (Shi et al., 2015; Ellebedy et al., 2016). Com o objetivo de verificar onde os genes de ASCs se agrupam e quais vias estão mais relacionadas com os genes que tiveram sobreposição, decidimos construir uma rede de interações e analisar a relação dos genes de ASCs com todos os genes sobrepostos entre os estudos com o cigarro, BZ e HQ (Figura 31). Onde observamos que a co-expressão é a via que mais se destacou, com 86,7% dos genes, seguida da co-localização com 9,30%.

A

Co-expressão	86,7%
Co-localização	9,30%
Preditos	3,49%
Interações Físicas	0,49%
Interações Genéticas	0,41%
Domínios de proteínas compartilhados	0,04%

Principais genes relacionados com Células Secretoras de Anticorpos (ASC).

Principais genes regulados negativamente nos estudos entre Hidroquinona e Cigarro com intersecção.

Genes regulados positivamente com intersecção nos estudos entre benzeno e hidroquinona.

Genes que se relacionam com os genes perturbados pelo benzeno, hidroquinona, cigarro e ASC.

B

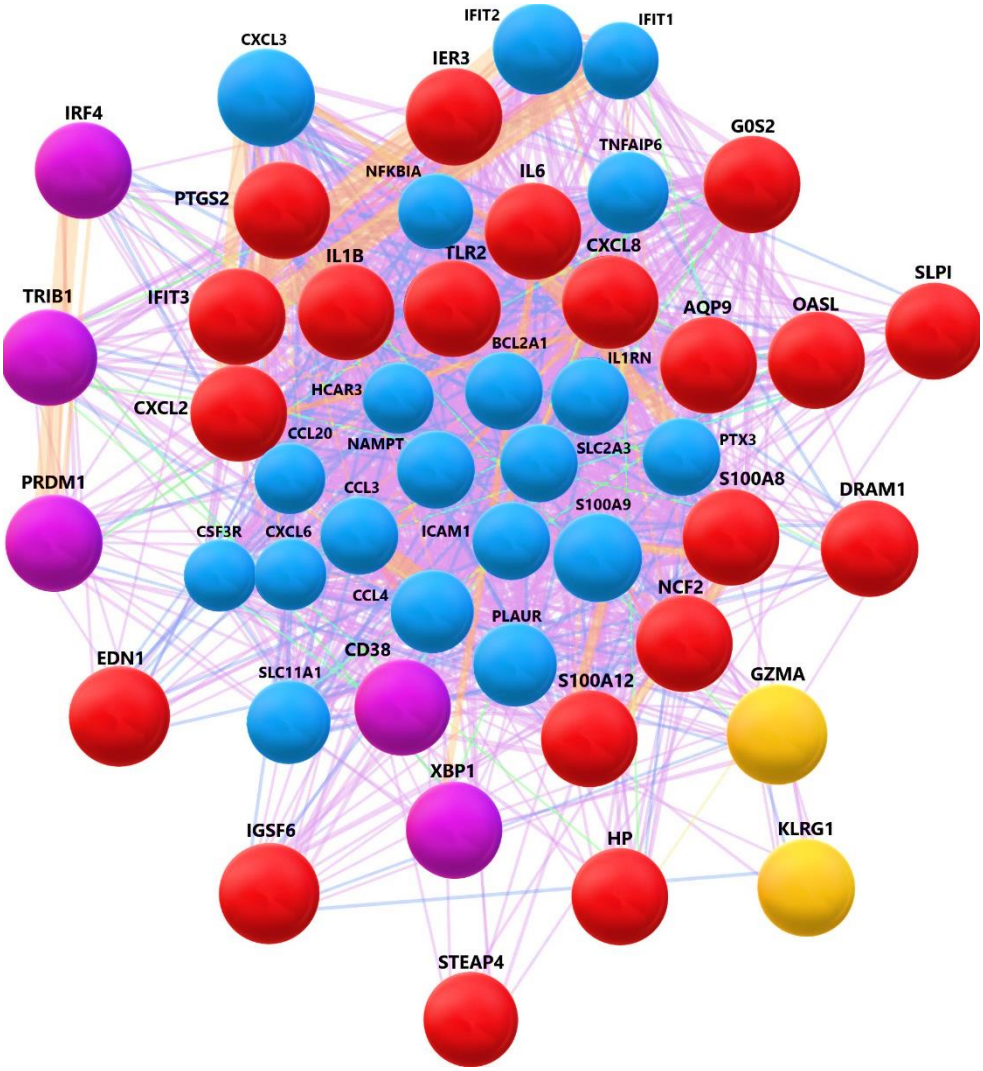


Figura 30 – Tipos de interações entre os principais genes de células secretoras de anticorpos (ASC) e os genes *up-* e *down-regulated* sobrepostos entre os estudos com o cigarro, BZ e HQ. A) Tabela com os resultados das principais interações gênicas entre os genes de ASC e os genes com intersecção entre os estudos com cigarro, BZ e HQ. Via dos genes *Down-regulated* nos estudos com à HQ

e o cigarro (amarelo ouro); genes *Up-regulated* entre os estudos com BZ e HQ (tB-HQ) (vermelho); principais genes relacionados com os genes regulados positivamente e negativamente nos estudos com o cigarro, BZ e HQ (azul claro) e os principais genes expressos em células secretoras de anticorpos (violeta). B) Interações e principais funções dos 5 genes de ASC e os genes *up-* e *down-regulated* sobrepostos entre os estudos com o cigarro, BZ e HQ. Mostrando que a co-expressão é a principal rede gênica com 86,7% seguido da co-localização com 9,30%. Dados obtidos da plataforma *GENEmania 2019* e editados no Paint 3D).

Como identificamos que a tB-HQ regula positivamente genes relacionados com migração e quimiotaxia de neutrófilos (figura 28), surgiu o interesse em saber qual a relação desses genes *up-regulated* pela tB-HQ junto com os genes de ASCs, pois sabidamente algumas publicações recentes apontam que os neutrófilos possuem um papel importante em ajudar as células B a secretarem anticorpos via produção de BAFF (fator de ativação de células B) pelos neutrófilos (Scapini et al., 2005; Scapini, P., Bazzoni, F., Cassatella, M. A. 2008; Puga et al., 2012; Musich et al., 2018). Em determinadas condições, neutrófilos migram para a zona marginal (MZ) do baço (que é uma área especializada das células B nas respostas de imunoglobulinas independentes de células T), auxiliando na resposta de células B (Puga et al., 2012). Neutrófilos de 2 diferentes fenótipos (NBH1 e NBH2) dos convencionais (Nc) são encontrados na MZ do baço. Surpreendemente, já foi observado anteriormente que os neutrófilos NBH1 induzem maior expressão do TNFSF13, regulado positivamente pela tB-HQ, em comparação aos NBH2. Este gene exibe co-expressão com o gene TNFSF13B que codifica BAFF, citocina importante na geração de ASCs (anexo 7).

Para sabermos qual a relação dos genes encontrados em cada estudo analisado aqui, com os genes descritos em ASCs, relacionamos os genes *up-* e *down-regulated* pela tB-HQ que tinham relação com migração e quimiotaxia de neutrófilos e outros leucócitos, junto com os genes que obtiveram intersecção entre os estudos com cigarro, BZ e HQ, e analisamos a porcentagem de co-expressão e co-localização desses genes com os genes de ASCs (Figura 31).

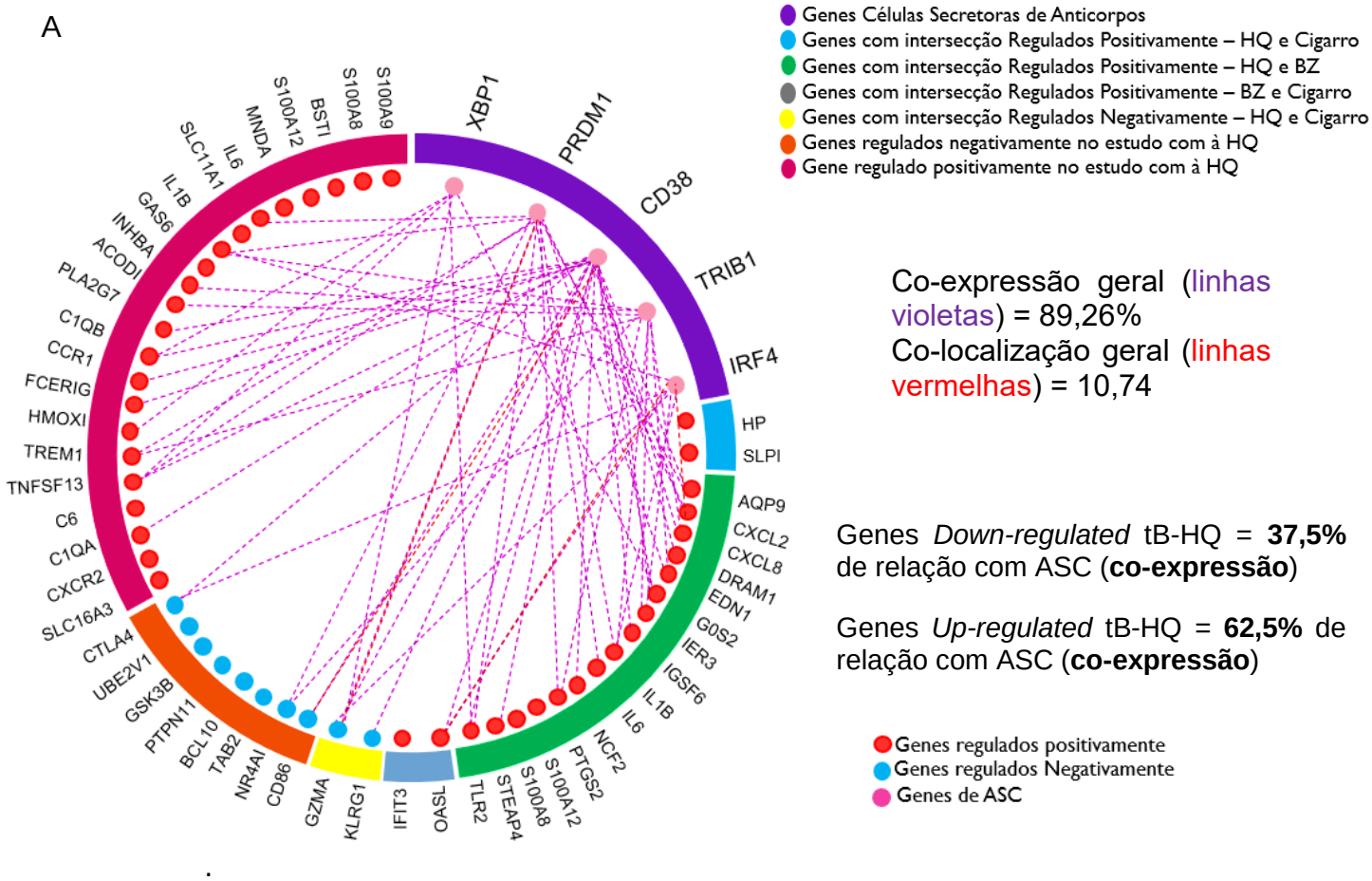
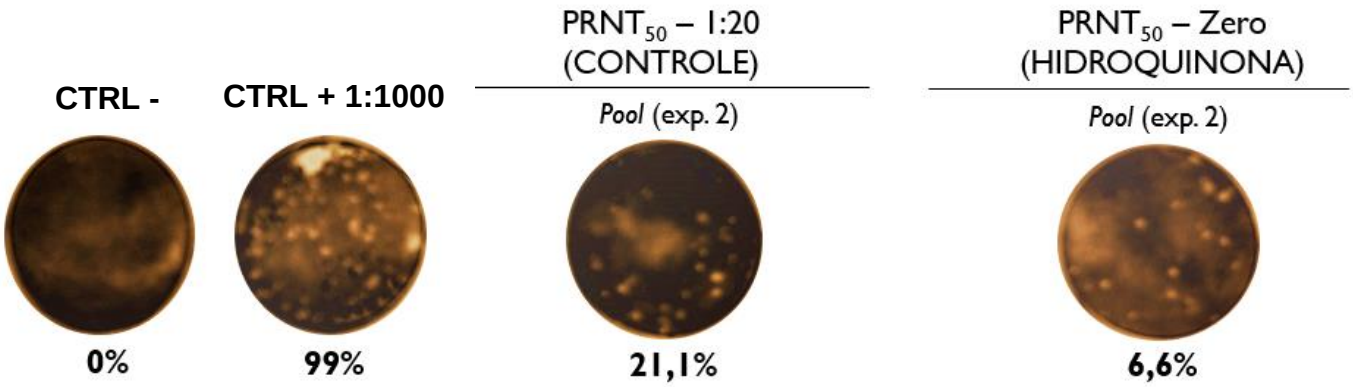


Figura 31 – Genes regulados positivamente pela HQ exibem mais de 60% de co-expressão com os genes de ASCs. A) Genes regulados positivamente e negativamente nos estudos com cigarro, benzeno e hidroquinona (intersecção) e os genes regulados positivamente e negativamente no estudo com a HQ que exibiram alguma relação com resposta imune humoral ou resposta imune geral e sua relação com genes mais expressos nas células secretoras de anticorpos. O gráfico de *Plot* mostra a relação dos genes expressos em células secretoras de anticorpos e sua relação com os genes regulados positivamente com intersecção nos estudos com a HQ e o cigarro (halo púrpura), os genes regulados positivamente com intersecção nos estudos com a HQ e BZ (halo azul marinho), genes regulados positivamente com intersecção nos estudos com o BZ e o cigarro (halo cinza escuro) e os genes regulados negativamente com intersecção nos estudos com a HQ e o cigarro (amarelo ouro), além dos genes regulados negativamente pela HQ que exibiram alguma relação com o sistema imune (laranja) e os genes regulados positivamente pela HQ que exibiram também alguma relação com o sistema imune (vermelho escuro). As principais redes gênicas avaliadas foram co-expressão e co-localização com 89,29% e 10,74%, respectivamente. Os dados foram obtidos da plataforma *GENEmania* e editados no Paint 3D.

E por fim, quantificamos a capacidade funcional dos anticorpos gerados após a imunização com EDIII do animais expostos ou não com a HQ. Para isso, realizamos um ensaio de neutralização viral (PRNT) com o soro desses animais expostos à HQ e imunizados (Figura 32). Verificamos que o pool de soro dos animais expostos à HQ redução de forma menos eficaz a formação de placas no ensaio que os animais não expostos.

A



B

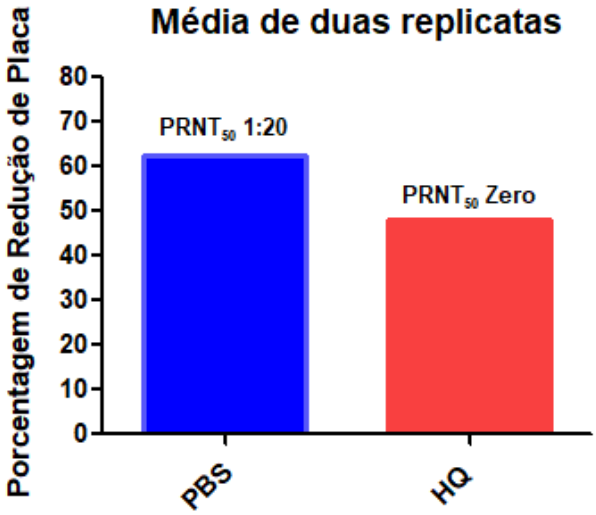


Figura 32 – A exposição com a HQ diminuiu, mas não significativamente, a capacidade de neutralização viral em ensaio de PRNT. A) Placas de PRNT mostrando os pontos de neutralização viral contra Dengue 2, onde o $PRNT_{50}$ foi de 1:20 para o grupo controle e Zero para o grupo HQ, mas sem diferenças significativas. Abaixo são as porcentagens do PRNT total mostrando que o grupo HQ possui 3x

menos capacidade neutralizante que o grupo controle. B) Média de duas replicatas mostrando a porcentagem de redução de placa. Não houve diferença estatística entre os grupos. Valor P (>0,05).

7. DISCUSSÃO

O conhecimento sobre os efeitos tóxicos de algumas substâncias, como a hidroquinona, sobre a resposta imune, principalmente aquela induzida por vacinação, ainda é pouco explorado e muito pouco conhecido. Pensando nisso, decidimos investigar esses efeitos utilizando um modelo de imunização. Considerando à importância da Dengue no contexto mundial, escolhemos um antígeno importante deste vírus para fazer esta análise. Assim, selecionamos a proteína recombinante que codificava a EDIII para indução da resposta humoral. Pelo fato de a EDIII pertencer ao envelope do vírus da Dengue e possuir um alto poder imunogênico, esse é o mais utilizado antígeno do DENV em pesquisa com imunizações (Lee et al., 2015; Campos et al, 2017; Revisado por Maeda et al, 2017).

Na tentativa inicial de avaliar a influência da HQ sobre o sistema imune, expusemos os animais com baixa dose de HQ (25 ppm), e no 5º dia foram vacinados. Não foi possível detectarmos quaisquer alterações na magnitude da resposta humoral anti-EDIII. Isso pode ser devido ao fato do tempo de exposição que foi muito curto, e também a concentração baixa da HQ utilizada no experimento.

Em um cenário similar, já havia sido observado que camundongos expostos à fumaça do cigarro por 8-16 semanas, mas imunizados com adenovírus recombinantes tiveram menores títulos de IgG e menor capacidade de neutralização viral no soro quando comparado ao grupo não exposto, apontando assim que o tempo de exposição ao poluente é fundamental para indução de imunossupressão (Robbins et al., 2004).

No contexto de exposição, é interessante verificar sobre o quão expostos à HQ as pessoas estão. Apesar de não haver dados específicos na literatura sobre as quantidades encontradas de HQ em suas diferentes fontes, sabe-se que no cigarro pode conter mais de 100 µg dessa substância em sua composição, segundo as monografias da International Agency for Research on Cancer (IARC). Já as quantidades liberadas pela fumaça do cigarro podem chegar até 72,2µg a 183,5µg de HQ pela corrente primária (fumaça central/ativo) e secundária (fumo passivo), respectivamente, levando a uma exposição significativa, tanto para fumantes ativos

quanto passivos (IARC, 1987; Kim et al., 2005; revisado por Sopori, 2002). Sendo assim, se fez necessário utilizar de outras concentrações de HQ neste modelo experimental

Por outro lado, é importante discriminarmos a exposição com o cigarro, com mais de 8700 componentes, daquela com somente a HQ. Ainda, será que o tempo de exposição justificaria essa imunossupressão não significativa entre os grupos? Será que apenas 8 semanas não foram suficientes para simular uma exposição crônica à HQ? Existem poucos dados na literatura envolvendo exposição com a HQ *in vivo* no contexto de resposta imune, muitos dos trabalhos envolvendo exposição são com fumaça do cigarro ou com o próprio benzeno, variando no número de horas de exposição até na quantidade de dias. A maioria dos resultados apresentados na literatura foram analisados através do contexto *in vitro* (Taysse et al., 1995; Kim et al., 2005; Lee et al., 2007; Choi et al., 2008).

Consequentemente, mudamos nosso protocolo de experimento com a HQ. Mais especificamente, alteramos o tempo de exposição e a concentração dessa substância para, assim, demonstrar o quanto ela poderia reduzir a capacidade da resposta imune ser induzida por uma vacina. Além disso, a troca do adjuvante Montanide ISA720 para o *Alum* devido suas características, como a menor indução de títulos de anticorpos que o Montanide e também seu licenciamento para uso em humanos (Mutiso et al, 2012; Chiang *et al.*, 2016).

Nossos resultados apresentaram-se promissores no início, apontando que uma maior exposição ao composto tóxico antes de vacinação incitava uma maior tendência à imunossupressão, a partir de doses de HQ 10x ou 100x maiores que a inicial. Isso pode ser explicado pelo fato de que provavelmente a exposição com 250 ppm possa estar muito próximo do limiar que induz imunossupressão nos animais. Por isso, o uso de 2500 ppm seria mais prudente para visualização do fenótipo em questão.

A mudança na via de imunização de s.c. para i.m. foi extraordinariamente importante, tendo em vista que na aplicação de imunobiológicos via s.c., a substância é depositada no tecido conectivo frouxo localizado abaixo da derme (Zuckerman, 2000). Sendo assim, os títulos de IgG específicos a PvMSP1-19 mais *Alum*, do grupo i.m. em comparação ao grupo s.c., aumentaram consideravelmente. Apesar de serem proteínas diferentes, a proteína PvMSP1-19 serviu para direcionar a via de inoculação de maior imunogenicidade que provavelmente a EDIII + *Alum* apresentariam (Shakya & Gili, 2015).

Partindo do princípio que alguns trabalhos utilizam-se de diferentes concentrações de HQ (Ribeiro et al., 2011 ; Macedo et al., 2006), os títulos de IgG total dos animais expostos com 2500 ppm de HQ tiveram uma maior tendência a redução dos títulos de IgG em comparação com o grupo controle. Surpreendentemente, esses mesmos animais tiveram níveis reduzidos, mas não significativos, dos títulos de IgG1, o que pode ser explicado pelo fato da exposição com a HQ afetar os títulos de anticorpos induzidos pela vacina. Sabe-se que os adjuvantes a base de alumínio estimulam de forma seletiva a resposta imune Th2 em camundongos e uma resposta mista observada em humanos (Maeda et al., 2017 ; HogenEsch, H., 2012). Desta forma fica claro que a exposição com a HQ, de alguma forma, está afetando a resposta imune gerada pela vacina de EDIII junto com o *Alum*.

Ainda partindo desse raciocínio, o grupo de Lee., 2012, obteve resultados opostos aos demonstrados neste trabalho. Foi observado que uma cultura de linfócitos T, obtidos de linfonodos de camundongos imunizados com KLH (*Keyhole limpet haemocyanin*) juntamente com *Alum*, teve um aumento nos níveis de IL-4 de forma dose dependente de HQ. É importante observamos que foram utilizados protocolos diferentes. Enquanto o experimento de Lee, 2012 foi realizado *in vitro*, nossos experimentos foram realizados *in vivo*. Além disso, a resposta Th2 foi avaliada indiretamente em nosso trabalho mediante a análise dos títulos de anticorpos IgG1, ao passo que nesse outro estudo, essa resposta foi avaliada mediante quantificação de IL-4, sendo essa descrita como uma importante citocina relacionada com as respostas de Th2. Sabendo que a resposta de Th2 é caracterizada pela secreção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 além da expressão de GATA-3 (Zhu et al., 2006; Cêtre et al., 1999; Blinder et al., 1995; Varella & Forte., 2001), para dar mais suporte aos nossos experimentos, se faz necessária a avaliação de outros fatores, tais como essas citocinas,que não foram avaliadas.

Ao analisarmos o número de células secretoras de anticorpos, através do ensaio celular de ELISPOT, verificamos que o número de células no baço foram maiores em comparação à análise feita na medula óssea e no timo, o que era esperado. Mesmo não havendo diferenças significativas no número irrisório de ASCs após 3 doses da vacinas nos diferentes orgãos analisados, o grupo exposto com a HQ apresentou uma tendência a aumentar o número de ASCs na médula óssea em comparação ao grupo controle. Dados do transciptoma realizado com a tB-HQ mostra que há uma redução na expressão de BCMA (antígeno de maturação de células B)

que é um receptor expresso em ASCs (mas não em células B maduras) e é crucial para a sobrevivência de ASCs de vida longa na medula óssea (anexo 7), (Coquery et al., 2014). Nossos dados sugerem que a HQ, de alguma forma pode afetar os locais de produção e maturação das células B, o que impactaria suas funções efetoras (Dõrner & Radbruch, 2005; Tan & Takeshi, 2017). Assim, é necessário uma avaliação mais detalhada desse fenômeno, com diferentes protocolos de tempo e outros modelos que melhor responderiam essa hipótese.

Em relação as análises histológicas, a exposição com a HQ pode prejudicar a maturação dos folículos e formação de CG, impactanto na resposta imune efetiva dos linfócitos no baço. Nossos resultados apontam para uma redução significativa na zona medular do timo, importante para a maturação de células T, nos animais expostos com a HQ. Desse modo, apesar dos nossos resultados apontarem uma igualdade na resposta imune humoral, esses dados devem ser melhores explorados para sabermos o grau de prejuízo na maturação das células B, na ativação das células B foliculares e na geração de anticorpos de alta afinidade provenientes do contato com as células T (Cerutti et al., 2013).

O baço é considerado o maior órgão imunológico secundário do organismo, sendo responsável por ampliar as reações imunes. O baço possui dois compartimentos principais: a polpa branca, onde está inclusa a zona marginal, a bainha linfoide periarteriolar e os folículos, e também a polpa vermelha, local de armazenamento de ferro, eritrócitos e plaquetas. Esses compartimentos são muito distintos na sua arquitetura, composição, organização celular e funções (Kuper et al., 2002; Balogh et al., 2004). Os folículos presentes na polpa branca são compostos principalmente por células B, células dendríticas foliculares e células T $CD4^+$ e $TCD8^+$ em menor número (Van Rees et al., 1996; Ward et al., 1999; Shieh, Shyh-Jou et al., 2014). Esses mesmos folículos ainda podem conter centros germinativos que se formam após a estimulação do antígeno, apesar da presença de poucas células (Ward et al., 1999; Mebius e Kraal, 2005). Nossos resultados apontaram que no baço dos animais do grupo controle, seus folículos eram maiores comparados ao grupo exposto com à HQ.

Já foi demonstrado que camundongos C57BL/6 expostos com 100 mg/kg de HQ via injeção I.V ou S.C, reduziu de forma significativa os níveis de celularidade nos baços e na medula óssea dos animais, corroborando com os nossos resultados de redução da área folicular no baço (Wierda and Irons, 1982). Em conjunto, nossos

resultados indicam a necessidade de um estudo mais abrangente em relação aos diversos mecanismos pelos quais a HQ afetaria a resposta imune inata e, principalmente, a adaptativa no contexto de vacinas.

Apesar da HQ atuar nos órgãos linfóides com alterações na estrutura deles, não observamos alterações nos títulos de anticorpos e nem diferenças significativas no número de células secretoras de anticorpos (ASC). Sabidamente, muitos trabalhos já demonstraram os efeitos da HQ sobre o sistema imune, como sua relação direta na resposta adaptativa, onde a HQ diminuia a atividade e funções de células imunes, além da diminuição da progressão dessas no ciclo celular (Holt, 1977; Ferson et al., 1979; Sopori et al., 1994; Li et al., 1996). Além disso, estudos *in vitro* demostraram que a HQ inibia a proliferação de linfócitos e exercia um efeito citotóxico sobre os eosinófilos, neutrófilos e em linfócitos via caspase 9/3 (Li, 1996; Lee, 2012; Yang, 2011).

Mesmo assim, nossos resultados demonstraram efeitos não esperados, em relação as imunoglobulinas avaliadas nesse estudo. Li e colaboradores (1996), observaram que fumantes crônicos apresentavam níveis séricos de imunoglobulinas significativamente reduzidas em relação aos indivíduos saudáveis, o que foi completamente diferente do que observamos. É evidente que o cigarro contém mais de 8.700 substâncias que podem estar agindo em conjunto, modulando diversas vias metabólicas e expressão gênica e proporcionando tais resultados. Outra coisa é estudar os efeitos de uma substância, dentre os vários componentes tóxicos presentes no cigarro.

Considerando os resultados apresentados até o momento, a pergunta que permanece é: quais fatores poderiam influenciar nos nossos resultados obtidos? Será que existe algum mecanismo imunocompensatório na geração de anticorpos específicos à EDIII que favorece a diferenciação e proliferação de células B em células secretoras de anticorpos nos indivíduos expostos à HQ?

Assim, decidimos investigar, através de dados públicos de transcriptoma, essa relação usando a biologia de sistema a partir de estudos com o BZ (GSE 21862), cigarro (GSE23323; GSE47415; GSE55962 e o GSE87072) e um estudo com a HQ (GSE 99152). Observamos no estudo com o BZ que dos 52 genes regulados negativamente, apenas seis deles possuíam uma relação com o sistema imune, mesmo o termo resposta humoral não aparecendo em nenhum momento.

Observamos ainda que esses genes apresentaram 51,01% de interações físicas entre eles, indicando assim que suas proteínas trabalham juntas para realizar uma determinada tarefa específica (Avery e Wasseman, 1992). Essas interações podem ser longas (formação de complexos proteicos) ou de curta duração (quando as proteínas sofrem modificações, como por exemplo a fosforilação de uma proteína alvo por uma proteína quinase). Outro ponto importante é a co-expressão com 42,98%. Essas interações são importantes para realização de processos biológicos importantes para entendermos as funções biológicas dos genes (Bebek, 2016) e como a HQ pode modular essas alterações gênicas.

Dentre os genes regulados negativamente, destacamos o gene HHEX que é um fator de transcrição importante para o desenvolvimento de células-tronco hematopoiéticas definitivas (HSCs) e células B. Quando superexpresso, está relacionado à indução de leucemia de células T. Esse gene já foi relatado que a diminuição da sua expressão causa a perda progressiva de linfócitos B na circulação (Jacob et al., 2015). Já o gene BATF (fator de transcrição ativador de células B) pertence à superfamília ativadora da proteína 1, sendo crucial para ativação de células B e células T (Betz et al., 2010; Xu et al., 2016). Dentre as principais funções descritas pela plataforma *GeneMania* podemos destacar desenvolvimento de órgãos hematopoiéticos e Linfóides e alguma relação com o desenvolvimento do Sistema Imunológico (BATF e HHEX) (Tawana et al., 2016; Avellino e Delwel, 2017).

Com relação aos genes regulados positivamente pelo BZ, nove deles possuíam relação com a resposta imune geral. Sendo que os genes IFNB1, IL-6, TNFAIP3 e XLCF1 têm relação direta com a resposta imune geral baseado na superfamília de Ig. Os genes IFNB, IL-6, SAMSN1 e CLCF1 estão envolvidos na ativação de células B, regulação da ativação de células B e resposta humoral, conforme descritos anteriormente (Maeda et al., 2010; Arkatkar et al., 2017; Benet et al., 2018). Esses resultados indicam que o BZ modula vários genes associados com a resposta imune humoral (Schiffman et., 2018), além da co-expressão ser o *network* mais predominante nesses genes com 79,31%, indicando assim sua importância para a resposta imune.

Na tabela 5 podemos perceber que o IL-6 faz parte do 5 genes mais regulados positivamente. Este gene é importante para as células B, pois já foi descrito que a ausência de sua expressão anula a formação espontânea do Centro Germinativo (CG) no modelo de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) em camundongo, resultando na

perda de autoanticorpos permutados por classe e proteção contra autoimunidade sistêmica (Arkatkar et al., 2017), além de outras funções como o aumento da produção de IgG em células B (Maeda et al., 2010).

No estudo com o cigarro, enquanto os principais genes *down-regulated* tiveram relação direta com as células T, os genes *up-regulated* que demonstraram uma maior relação com defesa antiviral. A co-expressão foi o *network* mais expresso nos genes *down-regulated*, com mais de 80% em relação as outras vias. Os genes *down-regulated* pelo cigarro mostraram sua alta importância para a modulação das repostas mediadas por células T (Sullivan et al., 2012; Zajacova et al, 2018), sendo que o prejuízo a esses genes podem comprometer a resposta humoral (Tangye et al., 2002; McHugh, 2017).

Dentre os genes regulados negativamente pelo cigarro, temos o gene HLA-DQA1 (Complexo Principal de Histocompatibilidade, Classe II, DQ Alfa 1). Moléculas de classe II são expressas em células apresentadoras de antígeno APCs, como os Linfócitos B, células dendríticas e macrófagos (GHR, 2019). Zajacova e colaboradores, 2018 observaram que haviam diferenças na expressão dos alelos do gene DQA1 e DQB1 em células do sangue periférico, monócitos e linfócitos B. Suportando assim a ideia de que o nível de expressão dos alelos de HLA de classe II é o resultado de fatores promotores e específicos de células, ou seja, se o BZ modula positivamente a expressão de HLA-DQA1, esse pode favorecer as células B em suas atividades como APC além das células dendríticas e os macrófagos.

Ainda não obstante a esse tópico, o gene CCL5, um dos vários genes de quimiocinas que formam uma superfamília de proteínas secretadas envolvidas em processos imunorregulatórios e inflamatórios, também exerce um efeito sobre as células B. Já foi demonstrado que camundongos nocaute dessa quimiocina *e animais do tipo* selvagem que tiveram a neutralização de CCL5 apresentaram níveis reduzidos de células secretoras de anticorpos IgA e IgG específicos para *T. cruzi*. Isso sugere que a produção de CCL5 por células B atua de maneira autócrina para aumentar a proliferação e secreção total de IgM, e que a CCL5 pode ser um importante co-activador geral de células B (Sullivan et al., 2012).

Concomitante a esses achados, foi demonstrado que o CD84 se submete à fosforilação da tirosina e o recrutamento das proteínas contendo o domínio SH2. Essas são codificadas pelo gene SH2D1B, também regulado negativamente pelo

cigarro. Ambos os genes podem atuar na ativação de células B, em particular, nas células B de memória (Tangye et al., 2002).

Outro fator interessante é que o gene TNFSF4 que codifica o OX40L. Já foi bem elucidado como sendo crucial para o desenvolvimento e ativação de células T. No entanto, animais *knockout* para OX40L em células B tiveram respostas humorais primárias e secundárias reduzidas em relação ao grupo controle após a imunização com antígenos dependentes de T, expondo, assim, a importância desse gene para resposta humoral (McHugh, 2017).

Já os genes *up-regulated* pela exposição ao cigarro exibiram funções mais específicas com relação a defesa antiviral, mesmo alguns trabalhos evidenciando as graves consequências de uma infecção viral para os fumantes (Arcavi & Benowitz, 2004; Bauer et al., 2013), além do agravamento de doenças como DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica) (Tan et al., 2013). Em similar análise dos *networks* gênicos, a co-expressão também obteve um maior empenho nas interações entre os genes, apresentando mais de 85% das relações entre eles.

Em relação ao estudo com a tB-HQ (GSE99152), curiosamente a exposição com poluente não demonstrou regular nenhum gene correlacionado diretamente com a resposta imune humoral. Todavia, esses genes com expressão alterada apresentaram uma relação com a via de sinalização do receptor Fc, regulação positiva da ativação de células T e ativação das células T (Figura 25), dados também observados em outros estudos que mostraram as relações desses genes regulados negativamente com as células B. Por exemplo, o gene CTLA4 que controla as respostas das células B pela regulação das células Tfh, Tfr e Treg (Sage et al., 2014), o gene GSK3 que exerce um papel crucial na promoção da sobrevivência de células B *naive* (Jellusova et al., 2017), o gene BCL-10 que é necessário para o desenvolvimento de células B foliculares, células B1 e células B da zona marginal (Fischer et al., 2004) e o gene CD86 que é indispensável para interações das células B com as células T na geração de respostas mais robustas na ativação de células T (Shahinian et al., 1993). Tendo em vista que o principal network apresentado pelos genes *down-regulated* foi a co-expressão com mais de 44%, isso reforça os efeitos desses genes para as células B (Suvas et al., 2002). Já o gene GSK3B glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) exerce um papel importante na promoção da sobrevivência de células B *naive* (Jellusova et al., 2017).

Outro gene regulado negativamente pela HQ é o gene BCL-10 que codifica a proteína BCL10 (adaptador de sinalização imune).Esse é um gene necessário para o desenvolvimento de células B foliculares, células B1 e células B da zona marginal (MZ) e, além disso é importante para a sinalização de lipopolissacarídeos (LPS) e ativação de NF-kB (Fischer et al., 2004). Um importante gene indispensável em se tratando de células B é o CD86, esse gene codifica uma proteína de membrana do tipo I que é um membro da superfamília das imunoglobulinas (Ig), sendo também conhecida como B7-2. O CD86 é expresso principalmente em APCs, incluindo células B, células dendríticas e os macrófagos. Enquanto as células B naive expressam baixos níveis de CD86, esse quadro se inverte após a estimulação do receptor BCR (Freeman et al., 1993). Contudo, um dos pontos cruciais do CD86 é que essa proteína, em células B, interage com o CD28 de uma célula T (interação importante para uma boa ativação das células T) (Shahinian et al., 1993), fazendo que ocorra o aumento da expressão de CD40L nas células T e secreção de IL-4. Isso favorece recombinação de troca de classe para IgG1 nas células B (Borriello et al., 1997; Warren et al., 1999).

Sob outra perspectiva, os genes regulados positivamente pela tB-HQ modula a expressão de genes com ligação direta à resposta humoral. Além de relação com a resposta imune humoral, regulação e ativação de células B, imunidade mediada por células B e a resposta imune adaptativa baseada na recombinação somática de receptores imunes construídos a partir de domínios da superfamília de imunoglobulinas, curiosiamente, eles também aumentaram a expressão de genes relacionados com a migração e quimiotaxia de neutrófilos e outros leucócitos (Figura 28). Novamente, a co-expressão foi a função que mais predominou entre estes genes, totalizando 69,99% das interações.

Um possível questionamento é que não avaliamos diretamente os genes regulados negativamente ou positivamente pela própria HQ, mas sim de derivados dessa substância, a tB-HQ. Como é sabido, existe uma população de neutrófilos (NBH2) com a capacidade de auxiliar as respostas de células B. Sendo assim, hipotetizamos que essas células poderiam disparar um mecanismo imunocompensatório que aumentaria os títulos de anticorpos no grupo HQ. Por conseguinte, quais as possibilidades de a própria HQ não regular positivamente genes cruciais no processo de migração e quimiotaxia de neutrófilos? Trabalhos publicados no contexto *in vivo* com exposição à HQ demonstraram que a exposição com essa substância aumenta a frequência de neutrófilos na corrente sanguínea (Ribeiro et al.,

2011) e favorece a migração dos neutrófilos para locais de inflamação (Heluany et al., 2018).

Os neutrófilos formam umas das primeiras linhas de defesa do hospedeiro contra patógenos invasores. Rapidamente, esses neutrófilos são mobilizados para os locais de infecção, onde organizam as defesas do hospedeiro através de mecanismos de remoção do microrganismo por fagocitose. Dentre eles, um grupo de neutrófilos, com fenótipo diferente dos neutrófilos convencionais, são encontrados na zona marginal do baço e auxiliam na ativação das células B, culminando com a produção de anticorpos em resposta aos antígenos independentes de células T (Puga et al., 2011). Após a infecção ou imunização, os neutrófilos são as células que são mais mobilizadas para os órgãos linfóides secundários (Maletto et al., 2006; Chtanova et al., 2008), locais onde as células B e T sofrem diferenciação e ativação em células efetoras (Buettner e Bode, 2012). , Neutrófilos ativados possuem a capacidade de através da secreção de APRIL que facilita a proliferação e ativação de linfócitos B (Huard et al., 2008). Além disso, BAFF e IL-21 também são liberadas pelos neutrófilos (Mohr et al., 2009; Coquery et al., 2014). Ainda, já foi demonstrado que neutrófilos esplênicos humanos induzem a a produção de anticorpos e troca de classes pelas células B da zona marginal, através de um mecanismo envolvendo esses fatores (Puga et al., 2011).

De maneira geral, a literatura ainda traz dados muito limitados ou insuficientes sobre o perfil de expressão gênica em se tratando da exposição com a HQ. Estudos envolvendo sua relação com a resposta humoral são escassos e não trazem abordagens como o qual foi proposto por esse trabalho.

Em um modelo de exposição com a HQ seguido de indução de artrite reumatóide em camundongos, a HQ favorecia um maior influxo de neutrófilos na cavidade sinovial em comparação ao grupo controle (Heluany et al., 2018), corroborando com os resultados observados dos genes que estão envolvidos no processo de migração de neutrófilos. Outros trabalhos também apontaram uma maior ativação de neutrófilos em termos de toxicidade da HQ, como uma quantidade aumentada de CD18 e neutrófilos ativados encontrados na circulação de ratos expostos com essa substância (Ribeiro et al., 2011). Dados obtidos de animais imunizados com a vacina da gripe e expostos às mesmas concentrações de HQ apontam não a ver diferenças no número de neutrófilos no baço entre os grupos analisados. No entanto, o fenótipo desses neutrófilos não foram analisados

profundamente (Fabris et al., dados não publicados). Considerada a frequência das nossas análises transcriptômicas com o BZ, tanto como a tB-HQ, esses dados demonstram que a migração de neutrófilos pode ser facilitada através da expressão aumentada de genes envolvidos nesse processo. Desta forma, é necessário um estudo mais detalhado sobre essas células e seus mecanismos de ação no nosso modelo.

Em nossos dados, a exposição com a HQ alterou de forma significativa a estrutura dos órgãos linfóides, mas não o número de células secretoras de anticorpos muito menos os títulos das imunoglobulinas avaliadas, gerando grandes indagações acerca de possíveis mecanismos imunocompensatórios envolvidos nesse processo. Qual seria a relação desses genes perturbados pela tB-HQ com os nossos experimentos?

Recentemente, foi demonstrado que, em um modelo de imunização com proteínas recombinantes em macacos résus, os neutrófilos atuavam diretamente ajudando as célula B nas suas funções efetoras. Células B de macacos imunizados e infectados foram ativadas e sofreram troca de classe e produziram anticorpos quando co-cultivadas com células polimorfonucleares (consistindo principalmente de neutrófilos). A ajuda dependente do contato entre essas células foi fundamental, conferindo, assim, uma maior capacidade dos neutrófilos em contribuir para a resposta imune humoral (Musich et al., 2018). Puga et al., 2012 demonstrou também que os neutrófilos esplênicos formavam estruturas semelhantes as NETs (armadilhas extracelulares de neutrófilos, do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*) que interagem com as células B de zona marginal. Essa interação induzia a troca de classes de imunoglobulinas, hipermutação somática e produção de anticorpos pela ativação de células B da zona marginal, via mecanismo que envolvia BAFF e APRIL e a citocina IL-21. Nossos resultados também apontaram que a tB-HQ regula positivamente o gene TNFSF13 (Figura 28) que possui co-expressão com o gene TNFSF13B, codificador da proteína BAFF (anexo 7).

Dessa forma, será esse o mecanismo imunocompensatório que melhor explicaria nossos resultados? Tentando elucidar melhor esse processo, e dar mais fundamento a nossa hipótese, decidimos investigar, através de uma meta-análise, a distribuição dos genes em cada grupo BZ, cigarro e HQ (tB-HQ), e identificamos genes importantes que foram sobrepostos negativamente e positivamente entre os mesmos (Figuras 29 e 30).

Sabidamente, estudos descrevendo o perfil transcricional das células B estão sendo cada dia mais explorados. Através de estudos recentes e correlação com outros estudos, investigamos se os genes regulados positivamente e negativamente com a tB-HQ, BZ e cigarro e que tinham intersecção entre eles, apresentavam alguma relação com os principais genes descritos em ASCs (TRIB1, IRF4, CD38, XBP1 e PRDM1) (Shi et al., 2015; Ellebedy et al., 2016). Ao avaliar todos os genes mais expressos nas ASCs contra os genes sobrepostos positivamente e negativamente nos estudos e os genes regulados pela HQ (tB-HQ) que expressaram funções de migração e quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos (Figura 28), observamos que sua principal rede de interação foi a co-expressão. Essa tipo de interação representava 86,7%, seguida de co-localização com 9,30%. Mas quais foram os genes que exibiram a co-expressão e co-localização com os genes de ASC? A relação dos genes de ASCs com todos os genes sobrepostos nos estudos e os genes regulados pela HQ (tB-HQ) pode ser visualizada na figura 32. Dentre os genes regulados positivamente pela HQ, inclusive com aqueles que tiveram as principais funções de migração e quimiotaxia de neutrófilos, cerca de 62,5% deles tinham co-expressão com os genes de ASCs. Quanto aos genes regulados negativamente, somente 37,5% eram co-expressos com os genes de ASCs (Figura 31). Isso sugere que quando esses genes são aumentadamente expressos, e faz com que ocorra a migração de neutrófilos, ocorra também a co-expressão dos genes de ASCs. o que poderia favorecer uma sinergia entre as funções destas células, estimulando a geração de anticorpos observada em nosso modelo. Apesar dos animais expostos com a HQ terem apresentados títulos de anticorpos similares com o grupo controle, em alguns animais, o pool de soro obtido dos expostos à HQ tiveram uma tendência a menor capacidade de neutralização viral que o pool de soro dos anomais controles (Figura 32). Neste caso, ambos os grupos de animais apresentaram títulos de PRNT menor que os observado anteriormente (Maeda et al., 2017). Vários fatores adicionais podem ter influenciado nos títulos de PRNT dos animais expostos com a HQ, tais como a própria influência da exposição com esse agente tóxico para as células do sistema imune, pois conforme relatado anteriormente, a HQ compromete as funções dos linfócitos B (Taysse et al., 1995; Kim et al., 2005; Lee et al., 2007; Choi et al., 2008).

Em síntese, é relevante destacar que os dados gerados pela biologia de sistema sugerem que os trabalhos publicados apontam as consequências da exposição à HQ, através de uma substância derivada da mesma (tB-HQ). Com base

nisso, pudemos sugerir um possível mecanismo imunocompensatório induzido com a exposição à HQ. No entanto, os mecanismos exatos subjacentes à geração dos títulos identicos de anticorpos no grupo exposto com à HQ e o grupo controle permanecem ainda pouco esclarecidos. Isso levanta questões diretas como: qual seria o fenótipo dos neutrófilos no baço destes animais expostos à HQ? Se eles, de fato, ajudam as células B na geração de anticorpos, via BAFF? Se a HQ pode afetar as funções efetoras desses anticorpos por mecanismos diretos ou indiretos? À vista disso, é imprescindível que novas investigações sejam realizadas para entendermos os processos pelas quais a HQ age sobre a resposta imune humoral.

8.0 CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a exposição à HQ por um período mais longo de exposição (28 + 28 dias), baseado em protocolos estabelecidos para a fumaça do cigarro, antes do estímulo ao sistema imune (vacinação), pode realmente provocar alterações na capacidade de resposta de células B. Visto por meio da redução da área folicular no baço, e redução da zona medular do timo observados nos animais expostos com a HQ. Detectamos ainda uma tendência à diminuição nos títulos de IgG e IgG1 especifico à EDIII, e da capacidade de neutralização viral em alguns animais expostos com a HQ. Os procedimentos realizados mostram que a diminuição dos títulos de IgG específicos à EDIII, gerados após estímulo pela imunização, foi inversamente proporcional às concentrações de HQ inaladas por cada grupo. Podendo-se, logo, supor que quanto mais um camundongo é exposto à essa substância, mais vulnerável tornaria seu sistema imune aos diferentes estímulos. Assim, um ponto importante a ser explorado após esta análise é se indivíduos altamente expostos à HQ, como fumantes, responderiam de forma menos eficaz à vacinas ou infecções virais. Para explorar as diversas possibilidades desses questionamentos, se faz necessário mais estudos para mensurar a extensão dos danos provocados pela exposição à HQ no sistema imune, tanto em relação à resposta humoral como celular, no contexto de imunizações virais.

9.0 ASPECTOS ÉTICOS

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CEUA FCF-USP nosº 506 e 561).

10.0 DISSEMINAÇÃO E AVALIAÇÃO

Os resultados deste estudo foram disseminados na forma de apresentações em diversos eventos científicos, o qual foi premiado com uma menção honrosa na XXIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, que contemplou naquela semana a LIII Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, X Simpósio Anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas e XV Campanha de Diabetes realizada em outubro de 2018 na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Também foi utilizado em aulas de programas de pós-graduação, e em defesa de tese.

11.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIRA, S. et al. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.*, v. 24, p. 783-801, 2006.

ALEXIS,N. P et al. Circulating CD11b expression correlates with the neutrophil response and airway mCD14 expression is enhanced following ozone exposure in humans. *Clinical Immunology*. v. 111, n. 1, p. 126 – 131. 2004. Disponível em:<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521661603003450?via%3Dihub>.

ALLISON, S. L., et al. Mutational evidence for an internal fusion peptide in flavivirus envelope protein E. *J. Virol*., v. 75, p. 4268–4275, 2001.

ANDE, J-M, P et al. Clearing the Smoke around the TB-HIV Syndemic: Smoking as a Critical Issue for TB and HIV Treatment and Care. *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease.* n. 19.9, p. 1003–1006. 2015

ARCAVI, L. & BENOWITZ, L. N. Cigarette Smoking and Infection. *Arch Intern Med*., v. 164, p. 2206-2216. 2004

ARKATKAR, et al. B cell–derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine.,* v. 214, p. 3207-3217, 2017.

ARKATKAR, T. et al., B cell–derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *Journal of Exp. Medicine. v. 215, n. 10. 2017*

ARKATKAR, T. et al., B cell–derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *Journal of Exp. Medicine. v. 215, n. 10. 2017*

ARKATKAR, T., et al. B cell–derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. Journal Exp. Med., v. 2014, 2017.

Avellino, R. & Delwel, R. Expression and regulation of C/EBPa in normal myelopoiesis and in malignant transformation. *Blood*., v. 129, n. 15, 2017.

AVERY, D. T. et al. B cell-intrinsic signaling through IL-21 receptor and STAT3 is required for establishing long-lived antibody responses in humans. J Exp Med, v. 207, n. 1, p. 155-71, Jan 2010.

AVERY, L. A. & WASSEMAN, S. Ordering gene function: the interpretation of epistasis in regulatory hierarchies. *Sep.,* v. 8, p. 312-6, 1992

BALOGH, P; HORVATH, G., and SZAKAL, A. K. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem*. v. 52, n.1287–98. 2004

BASSO, K. & DALLA-FAVERA,R., et al. Chapter 7 - BCL6: Master Regulator of the Germinal Center Reaction and Key Oncogene in B Cell Lymphomagenesis. *Advances in Immunology.,* v. 105, p. 193-210, 2010.

BATISTA, F. D. & HARWOOD, N. E. *The who, how and where of antigen presentation to B cells. Nature Rev. Immunol.* v. 9, p. 15–27, 2009.

BAUER, C. M. T., et al. The influence of cigarette smoking on viral infections: translating bench science to impact COPD pathogenesis and acute exacerbations of COPD clinically*. Chest.*, v.143, p. 196-206, 2013.

BEBEK, G. Identifying Gene Interaction Networks. *Methods Mol Biol.,* v. 850, p. 483–494, 2016.

BENET, Z. L., et al. CCL3 Promotes Germinal Center B Cells Sampling by Follicular Regulatory T Cells in Murine Lymph Nodes. Front. Immunol., v. 9, 2018.

BERTRAM, K. M et al. Molecular regulation of cigarette smoke induced-oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells: implications for age-related macular degeneration. *Am. J. Physiol.* Cell Physiol. v. 297, p. 1200–1210. 2009

BETZ, B. C., et al. Batf coordinates multiple aspects of B and T cell function required for normal antibody responses. *Journal of experimental medicine*., v. 207, p. 933-42, 2010.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of Dengue. Nature, v. 496, n. 7446, p. 504-7, Apr 25 2013.

BIEDERMANN, L. et al. Smoking Cessation Induces Profound Changes in the Composition of the Intestinal Microbiota in Humans. Plos ONE. v. 8 (3) e. 59260. 2013.

BLINDER, J.; et al. Downregulation of intragraft IFN-gamma expression correlates with increased IgG1 alloantibody response following intrathymic immunomodulation of sensitized rat recipients. Transplantation. v. 60, p. 1516 – 1524. 1995.

BORRIELLO, F., et al. M. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity., v.* 6, p. 303-313, 1997.

BRASIL. Cigarro mata mais de 5 milhões de pessoas, segundo OMS. Governo do Brasil. 2014. Disponível em: http://www.brasil.gov.br/saude/2014/08/cigarro-mata-mais-de-5-milhoes-de-pessoas-segundo-oms. Acesso em 12 Agosto de 2017.

BRESSANELLI, S., et al. Stiasny K, Allison SL, Stura EA, Duquerroy S, Lescar J, Heinz FX, Rey FA. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J*. v. 23, p. 728–738, 2004.

BRODIN, P. & DAVIS, M. M. Human immune system variation. *Nature Reviews Immunology*., v. 17, p. 21–29, 2017.

BUETTNER, M. and BODE U., Lymph node dissection—understanding the immunological function of lymph nodes. *Clin Exp Immunol,* v. 169, p. 205–12. 2012

CAMPOS, J. L. S et al. DNA-immunisation with Dengue virus E protein domains I/II, but not domain III, enhances Zika, West Nile and Yellow Fever virus infection. Plos One. 2017

CASTRO, S.M; CHAKRABORTY, K; GUERRERO-PLATA, A. Cigarette smoke suppresses TLR-7 stimulation in response to virus infection in plasmacytoid dendritic cells. Toxicol In Vitro. 2011 Aug; v. 25(5) p. 1106-13. 2011

CEFARMA. Toxicologia. Disponível em:< http://www.cefarma.com.br/arquivos/ppc_t7/ppc_t7_tx_aula_introdutoria_toxicologia_parte2.pdf>. Acesso em 29 Ago. 2017

CERUTTI, A., et al. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat Rev Immunol*. v. 13, p. 118-32. 2013.

CERUTTI, A.; COLS, M.; PUGA, I. Activation of B cells by non-canonical helper signals. EMBO Rep, v. 13, n. 9, p. 798-810, Sep 2012.

CERUTTI, A.; PUGA, I.; COLS, M. New helping friends for B cells. Eur J Immunol, v. 42, n. 8, p. 1956-68, Aug 2012.

CÊTRE, C.; et al. Profiles of Th1 and Th2 Cytokines after Primary and Secondary Infection by *Schistosoma mansoni* in the Semipermissive Rat Host. Infect. Immun. v. 67, n. 6, p. 2713 – 2719. 1999.

CHE, N., et al. Impaired B Cell Inhibition by Lupus Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Is Caused by Reduced CCL2 Expression. J Immunol., v,15, n, 193, p. 5306-5314. 2014.

CHE, N., et al., Impaired B cell inhibition by lupus bone marrow mesenchymal stem cells is caused by reduced CCL2 expression. *J Immunol.* v. 15;193(10):5306-14. 2014

CHE, N., et al., Impaired B cell inhibition by lupus bone marrow mesenchymal stem cells is caused by reduced CCL2 expression. *J Immunol.* v. 15;193(10):5306-14. 2014

CHIANG, C. Y. et al. Immunogenicity of a novel tetravalent vaccine formulation with four recombinant lipidated Dengue envelope protein domain IIIs in mice. Scientific Reports, v. 6, p. 30648, 07/29/online 2016. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1038/srep30648 >. Acesso em 17 de Nov. 2017

CHOI, J. M et al. Hydroquinone, a Major Component in Cigarette Smoke, Reduces IFN-γ Production in Antigen-Primed Lymphocytes. Archives of Pharmaceutical Research. v. 31, n. 3. P. 337-41, 2008. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18409047>.

CHTANOVA T., et al. Dynamics of neutrophil migration in lymph nodes during infection. *Immunity*, v. 29, p. 487–496, 2008.

CLINGAN, J.M, & MATLOUBIAN, M. B Cell–Intrinsic TLR7 Signaling Is Required for Optimal B Cell Responses during Chronic Viral Infection. J Immunol. 2013. v. 191 (2) p. 810 -818.

CLOEZ-TAYARANI, I. & CHANGEUX, J. P. Nicotine and serotonin in immune regulation and inflammatory processes: a perspective. *J Leukoc Biol*. v. 81, p. 599–606, 2007.

COCONI-LINARES, N, et al. Targeting of envelope domain III protein of DENV type 2 to DEC-205 receptor elicits neutralizing antibodies in mice. *Vaccine.* v. 31, p. 2366-2371. 2013

Colino, J., et al. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses *in vivo* through distinct mechanisms. *J Exp Med.,* v. 195, 2002.

COLOMBO, G. M. Pathophysiology of tobacco smoke exposure: recent insights from comparative and redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev*., v. 33, pp. 183-218. 2014

COLOMBO, G., et al. Pathophysiology of tobacco smoke exposure: Recent insights from comparative and redox proteomics. *Mass Spectrom. Rev*. v. 33, p. 183-218. 2014.

COOPER, M. D. & ALDER, M. N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell*. v.24, p. 815–822, 2006.

COQUERY, C. M., et al. Neutrophils Contribute to Excess Serum BAFF Levels and Promote $CD4^+$ T Cell and B Cell Responses in Lupus-Prone Mice. *Plos One*. v. 9, n. 7, p. 7-10, 2014.

COSTA, V. V., et al. Inflammatory and innate immune responses in Dengue infection: protection versus disease induction. *Am J Pathol*., v. 182, p. 1950–61, 2013.

CRILL, W. D & ROEHRIG, J. T Monoclonal antibodies that bind to domain III of Dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J. Virol.* 75, n. 7769 – 7773. 2001

DAL PORTO, J. M., et al. *Very low affinity B cells form germinal centers, become memory B cells, and participate in secondary immune responses when higher affinity competition is reduced. J. Exp. Med.,* v. 195, p. 1215–1221, 2002.

DAVID, W. P, WAYNE, S. S, RICHARD, D. I. Hydroquinone, a Reactive Metabolite of Benzene, Inhibits NF-κB in Primary Human CD4+T Lymphocytes*.* Elsevier. 1998

DAVIS, M. M. A Prescription for Human Immunology. *Immunity.*, v. 19; p. 835–838. 2008.

DeCAPRIO, A. P.; The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *The Journal Critical Reviews in Toxicology*. v. 29, n. 3, p. 283 – 330. 1999. Disponível em: < http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408449991349221>.

DeCAPRIO, A. P.; The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *The Journal Critical Reviews in Toxicology*. v. 29, n. 3, p. 283 – 330. 1999.

DeCAPRIO, A. P.; The Toxicology of Hydroquinone — Relevance to Occupational and Environmental Exposure. *The Journal Critical Reviews in Toxicology*. v. 29, n. 3, p. 283 – 330. 1999.

DORNER, T., RADBRUCH, A. Antibodies and B cell memory in viral immunity. Immunity; v. 27, p. 384–392. 2007

EDWARDS, A. D et al. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by $CD8\alpha^+$ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* n. 33, p.827. 2003

EL SAHILI, A.; LESCAR, J. Dengue Virus Non-Structural Protein 5. Viruses, v. 9, n. 4, Apr 24 201

ELLEBEDY, A. H., et al., Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nature Immunology.* Online publication. 2016

ELLEBEDY, A. H., et al., Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination. *Nature Immunology.* Online publication. 2016.

ENGUITA, F. J AND LEITÃO, A. L. Hydroquinone: Environmental Pollution, Toxicity, and Microbial Answers. *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 542168, 14 pages, 2013. doi:10.1155/2013/542168

EPA.; Indoor Air Quality. Disponível em: https://www.epa.gov/indoor-air-quality-iaq. Acesso em 10 de Set. de 2017

FAHIMI, H et al. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines. *Applied Microbiology and Biotechnology.* p. 1 – 20. 2018

FARIS, M et al. "Involvement of Stat3 in interleukin-6-induced IgM production in a human B-cell line" *Immunology* v. 90, p. 350-7, 1997.

FATIMA, K. & SYED, N. I. Dengvaxia controversy: impact on vaccine hesitancy. *J Glob Health.* v. 8, 2018.

FERSON, M et al. Low natural-killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. Int. J. Cancer v. 23, p. 603–609. 19797

FERSON, M.; EDWARDS, A.; LIND, A.; et al. Low natural-killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int. J. Cancer*. v. 23, p. 603–609. 1979

FERSON, M.; EDWARDS, A.; LIND, A.; et al. Low natural-killer-cell activity and immunoglobulin levels associated with smoking in human subjects. *Int. J. Cancer*. v. 23, p. 603–609. 1979.

FIETTA, P.; COSTA, E.; DELSANTE, G. Interleukins (ILs), a fascinating family of cytokines. Part I: ILs from IL-1 to IL-19. Theor Biol Forum, v. 107, n. 1-2, p. 13-45, 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. Patogenia das infecções pelos vírus do Dengue. Medicina de Ribeirão Preto, cap. I, v. 32, p. 15-20, 1999a.

FIGUEIREDO, L. T. M. Vacinas contra Dengue. Medicina de Ribeirão Preto, cap. II, v. 32, p. 21-25, 1999b

FISCHER, K-D., et al. New roles for Bcl10 in B-cell development and LPS response. *TRENDS in Immunology*., v. 25, n. 3, 2004

FREEMAN, G. J., et al. Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation. *Science*., v. 262, p. 909-911, 1993.

GATTO, D. & BRINK, R. The germinal center reaction*. Journal of Allergy and Clinical Immunology.,* v. 126, n. 5, p. 898-907. 2010.

GENG, Y., et al. Effects of nicotine on the immune response. I. Chronic exposure to nicotine impairs antigen receptor-mediated signal transduction in lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*., v. 135, p. 268–278, 1995.

GERMAIN, R. N. & SCHWARTZBERG, P. L. The human condition: an immunological perspective. Nat Immunol., v. 12, p. 369-72, 2011.

GHR, 2019. HLA-DQA1 gene. Disponível em: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/HLA-DQA1>. Acesso em 23 de jan. de 2019

GOMES, A. L. et al. Classification of Dengue fever patients based on gene expression data using support vector machines. PLoS One, v. 5, n. 6, p. e11267, Jun 23 2010.

GOMES, A. V. et al. Demethylation profile of the TNF-alpha promoter gene is associated with high expression of this cytokine in Dengue virus patients. J Med Virol, v. 88, n. 8, p. 1297-302, Aug 2016.

GREEN, A. M. et al. Innate immunity to Dengue virus infection and subversion of antiviral responses. J Mol Biol, v. 426, n. 6, p. 1148-60, Mar 20 2014.

GREEN, S. & ROTHMAN, A. Immunopathological mechanisms in Dengue and Dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis*., v. 19, p. 429–36. 2006.

GROMOWSKI, G, W et al. Characterization of Dengue Virus Complex-Specific Neutralizing Epitopes on Envelope Protein Domain III of Dengue 2 Virus. *Journal of Virology.* n. 82.17, p. 8828–8837. 2008

GUBLER, D. J. & MELTZER, M. Impact of Dengue/Dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv Virus Res*. v. 53, p. 35–70, 1999.

GUIDUCCI C., et al. RNA recognition by human TLR8 can lead to autoimmune inflammation. *J Exp Med.,* v. 16 p. 2903-19, 2013.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. Nat Rev Microbiol, v. 8, n. 12 Suppl, p. S7-16, Dec 2010.

GUZMAN, M. G., et al. Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers*., v. 2, n. 16055, 2016.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. Lancet, v. 385, n. 9966, p. 453-65, Jan 31 2015.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. Lancet, v. 385, n. 9966, p. 453-65, Jan 31 2015.

HALSTEAD, S. B, et al. The burden of Dengue infection. *Lancet*. v. 369, p. 1410–1, 2007.

HALSTEAD, S. B. Safety issues from a Phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent Dengue vaccine. Journal Human Vaccine and Immunotherapeutics. 2018

HALSTEAD, S. B. Safety issues from a Phase 3 clinical trial of a live-attenuated chimeric yellow fever tetravalent Dengue vaccine. Hum Vaccin Immunother. v. 14, p. 2158–2162, 2018.

HAMILTON, J.A., et al. Cutting Edge: Endogenous IFN-β Regulates Survival and Development of Transitional B Cells*. J Immunol*., 2017.

HASHIMOTO-KATAOKA et al., Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PNAS.* n. 112 (20) p. 2677-2686. 2015

HEALTHMAP, 2019. HealthMap Reporter. Disponível em: <https://www.healthmap.org/Dengue/pt/>. Acesso em Acesso em 12 de jan. 2019.

HECHT, S. S., EVA Szabo. Fifty Years of Tobacco Carcinogenesis Research: From Mechanisms to Early Detection and Prevention of Lung Cancer. Cancer prevention research. v. 7.1 p. 1–8. 2014

HEDLI, C.; An Overview of Benzene Metabolism Robert Snyder and Christine. Environmental Health Perspectives. v. 104, n. 6, p. 1165 – 1171. 1996. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1469747/pdf/envhper00349-0052.pdf>.

HELUANY, C. S. et al., Hydroquinone exposure worsens the symptomatology of rheumatoid arthritis. Chemico-Biological Interactions. v. 291, p. 120 – 127. 2018

HELUANY, C. S. et al., Hydroquinone exposure worsens the symptomatology of rheumatoid arthritis. Chemico-Biological Interactions. v. 291, p. 120 – 127. 2018.

HO, L. J. et al. Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. J Immunol, v. 174, n. 12, p. 816372, Jun 15 2005.

HO, L. J. et al. Infection of human dendritic cells by Dengue virus causes cell maturation and cytokine production. J Immunol, v. 166, n. 3, p. 1499-506, Feb 01 2001.

HOFFMAN, W., et al. B Cells, Antibodies, and More. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*., v. 11, p. 137-54, 2015.

HOFFMANN, J. & AKIRA, S. Innate immunity. *Curr Opin Immuno., v.* 25,2013.

HOGENESCH, H. Mechanism of Immunopotentiation and Safety of Aluminum Adjuvants. Frontiers in Immunology. v. 3, 406. http://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00406. Acesso em 04 de jan. 2018.

HOLT, P. G. & KEAST, D.; Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol*. v. 41, p. 205–216. 1977.

HOLT, P. G.; KEAST, D.; Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric contaminants in man and experimental animals. *Bacteriol*. v. 41, p. 205–216. 1977

HOLT, P. G; KEAST, D. Environmentally induced changes in immunological function: acute and chronic effects of inhalation of tobacco smoke and other atmospheric

contaminants in man and experimental animals. Bacteriol. Rev. v. 41, p. 205–216. 1977.

HUARD, B., et al., APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. *J Clin Invest,* v. 118: p. 2887–2895. 2008

IARC MONOGRAPHS. Hydroquinona. Disponível em: < https://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-30.pdf>. Acesso em 21 Ago. 2017

INABA, K., et al. Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. J. Exp. Med. v. 172*, p.*631*–640. 1990*

INCA. Evidências Científicas sobre Tabagismo para Subsídio ao Poder Judiciário. Disponível em: http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/comunicacao/Tabagismo_para_Subsidio_Poder_Judiciario.pdf. Acesso em 17 de ago. 2017

INCHEN. Hydroquinone. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/sids/sids/123319.pdf. Acesso em 12 Set. 2017

INGULLI, E., et al. In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4⁺ T cells. J. Exp. Med. v. 185*, p.* 2133*–2141,* 1997.

INOUE, Y., et al. Analysis of the effects of hydroquinone and arbutin on the differentiation of melanocytes. Biol *Pharm Bull.*, v. 36, p. 1722-30, 2013.

JACOB, J. T., et al. A crucial role for the homeodomain transcription factor Hhex in lymphopoiesis. *Blood*., v.125, p. 803-814, 2015.

JANEWAY, C. A. Jr., et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science; 2001. The generation of diversity in immunoglobulins. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27140/

JANEWAY, C. A. Jr., et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Science. The generation of diversity in immunoglobulins. 2001.

JANEWAY, C., et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5 Ed. New York: *Garland Science;* 2001. The generation of diversity in immunoglobulins. Acesso em 25 de Dez de 2018.

JARRETT, M.; BURNETT, R, T; POPE, C. A. Long-Term Ozone exposure and mortality. The New England Journal of Medicine. v. 95, n. 36, p. 1085 -1095. 2009.

JELLUSOVA, J., et al. GSK3 is a metabolic checkpoint regulator in B cells. Nat Immunol., v. 18, p. 303–312, 2017.

JITOBOAN, K., et al. Actin Interacts with Dengue Virus 2 and 4 Envelope Proteins. *PLoS ONE*., v. 11, ed. 0151951, 2016.

KAMENYEVA, O., et al. Neutrophil Recruitment to Lymph Nodes Limits Local Humoral Response to *Staphylococcus aureus. Plos One*. v. 11, n. 4, 2015.

KANAI, R. et al. *Crystal structure of west nile virus envelope glycoprotein reveals viral surface epitopes. J. Virol.,* v. 80, p. 11000–11008, 2006.

KAWASAKI, T. & KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Frontiers in immunology.,* v. 5, 2014.

KAWASHIMA, T et al. The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilacticiK*15 and the clinical impact in a randomized trial. *Scientific Reports*, v. 8, n. 5065, 2018.

KELSALL, B. L. et al. Dendritic cells at the host-pathogen interface. Nat Immunol, v. 3, n. 8, p. 699702, Aug 2002.

KHETARPAL, N.; KHANNA, I. Dengue Fever: Causes, Complications, and Vaccine Strategies. J Immunol Res, v. 2016, p. 6803098, 2016.

KIKUCHI, T et al. IL-6 enhances IgE-dependent histamine release from human peripheral blood-derived cultured mast cells. *Cytokine*, v. 20, n. 5, p. 200-209, 2002.

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. Immunology Letters. v. (99), p. 24–29, 2005. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15894107>.

KING, A.G; LANDRETH, K. S; WIERDA, D. Bone marrow stromal cell regulation of Blymphopoiesis. II. Mechanisms of hydroquinone inhibition of pre-B cell maturation. J Pharmacol Exp Ther. 1989 Aug. v. 250(2) p. 582-90. 1989

KING, A.G; LANDRETH, K. S; WIERDA, D. Hydroquinone inhibits bone marrow pre-B cell maturation in vitro. Mol Pharmacol. 1987 Dec. v. 32(6) p. 807-12. 1987

KLEIN, D. E., et al., Structure of a Dengue Virus Envelope Protein Late-Stage Fusion Intermediate. *J Virol.*, v. 87, p. 2287–2293. 2013.

KRZYZAK, L., et al. CD83 Modulates B Cell Activation and Germinal Center Responses. *J. Immunol.*, v. 1, n. 196, p. 3581-3594. 2016.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition by the innate immune system. Int Rev Immunol, v. 30, n. 1, p. 16-34, Feb 2011.

KUPER, D. F., et al. Immune System. In Handbook of Toxicologic Pathology. *Academic Press.* Vol. 2, p. 585–646., 2002

KUTUBUDDIN, M. et al. Recognition of helper T cell epitopes in envelope (E) glycoprotein of Japanese encephalitis, west Nile and Dengue viruses. Mol Immunol, v. 28, n. 1-2, p. 149-54, Jan-Feb 1991.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Naturel. v. 227, p. 680 -685, 1970

LAURETI, M et al. Flavivirus Receptors: Diversity, Identity, and Cell Entry. *Frontiers in immunology* vol. 9 2180. 26 Sep. 2018, doi:10.3389/fimmu.2018.02180

LAN, Q., et al. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*., v. 306, p.1774–1776, 2004.

LEE, J et al. Enhanced performance of an innovative Dengue IgG/IgM rapid diagnostic test using an anti-Dengue EDI monoclonal antibody and Dengue virus antigen. *Scientific Reports*. v. 5, n. 18077. 2015

LEE, J. S et al. A Multi-country Study of the Household Willingness-to-Pay for Dengue Vaccines: Household Surveys in Vietnam, Thailand, and Colombia. PLOS Neglected Tropical Disease. n. 9, ed. 3886. 2015

LEE, J. S.; YANG, E. J.; KIM, I. S.; Hydroquinone-induced apoptosis of human lymphocytes through caspase 9/3 pathway. *Molecular Biology Reports*. v. 39, p. 6737–6743. 2012

LEE, J. S.; YANG, E. J.; KIM, I. S.; Hydroquinone-induced apoptosis of human lymphocytes through caspase 9/3 pathway. *Molecular Biology Reports*. v. 39, p. 6737–6743. 2012.

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. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17464197>.

LEE, J. Y.; YANG, E. J.; KIM, I. S.; Hydroquinone-induced apoptosis of human lymphocytes through caspase 9/3 pathway. Molecular Biology Reports. v. 39, p. 6737–6743. 2012

LEE, S. H. et al. PIAS3 suppresses acute graft-versus-host disease by modulating effector T and B cell subsets through inhibition of STAT3 activation. Immunol Lett, v. 160, n. 1, p. 79-88, Jul 2014.

LI, K., et al., Increased leukemia-associated gene expression in benzene-exposed workers. *Nature.,* v. 5359, 2014.

LI, Q.; et al. Inhibition of human T-lymphoblast proliferation by hydroquinone. Toxicol. Appl. Pharmacol. v. 139, p. 317–323. 1996. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806848 >.

LI, Q.; et al. Inhibition of human T-lymphoblast proliferation by hydroquinone. Toxicol. *Appl. Pharmacol*. v. 139, p. 317–323. 1996.

LI, Q.; et al. Inhibition of human T-lymphoblast proliferation by hydroquinone. Toxicol. *Appl. Pharmacol*. v. 139, p. 317–323. 1996.

LIANG, Z. et al. Activation of Toll-like receptor 3 impairs the Dengue virus serotype 2 replication through induction of IFN-beta in cultured hepatoma cells. PLoS One, v. 6, n. 8, p. e23346, 2011.

LINDBLAD, E. B. Aluminium adjuvants—in retrospect and prospect. *Elsevier.* v. 22, p. 27 – 28. 2004

LIU, Y et al. Vaccines and Immunization Strategies for Dengue Prevention. *Emerging Microbes & Infections* 5.7 e77–. 2016

LUGADE, A. A et al. Cigarette smoke exposure exacerbates lung inflammation and compromises immunity to bacterial infection. J. Immunol, v. 192, n. 11, p. 5226-5235, 2014. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752444>

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427181>.

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. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897770>.

MAEDA, D, L, M, F et al. Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. Front Immunol. v. 8, e. 1175. 2017.

MAEDA, K. et al. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood Journal*. v. 115, p. 4699-4706. 2010

MAEDA, K. et al. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood Journal*. v. 115, p. 4699-4706. 2010

MAEDA, K., et al. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood*., v. 115, p. 4699-4706, 2010.

MAEDA, K., et al. IL-6 increases B-cell IgG production in a feed-forward proinflammatory mechanism to skew hematopoiesis and elevate myeloid production. *Blood*., v. 115, p. 4699-4706, 2010.

MAGNANI, D. M. et al. Potent Plasmablast-Derived Antibodies Elicited by the NIH Dengue Vaccine. Manuscript Posted Online 6 September 2017. Disponível em: http://jvi.asm.org/content/early/2017/08/24/JVI.00867-17.

MALAVIGE, G et al. Dengue Viral Infections. *Postgraduate Medical Journal*. n. 80.948, p. 588–601. 2004

MALETTO, B. A., et al. Presence of neutrophil-bearing antigen in lymphoid organs of immune mice. *Blood*, v. 108, p. 3094–102. 2006

MANCUSO, G. et al. acterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells. *Nat Immunol*., v. 10, p. 587-94, 2009.

MARTIN, F. & KEARNEY, J. F., et al. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* v. 2, p. 323-35, 2002.

MARTIN, F., et al. Identification of gene expression signature for cigarette smoke exposure response—from man to mouse. *Human and Experimental Toxicology*, v. 34, p. 1200–1211, 2015.

MARTINA, B. E.; KORAKA, P.; OSTERHAUS, A. D. Dengue virus pathogenesis: an integrated view. Clin Microbiol Rev, v. 22, n. 4, p. 564-81, Oct 2009.

McCREA, K. A et al. Altered cytokine regulation in the lungs of cigarette smokers. Am. J. Respir. Crit. Care Med. v. 150, p. 696–703. 1994.

McHALE, C. M., et al. Global gene expression profiling of a population exposed to a range of benzene levels. *Environ. Health Perspect*., v. 119, p. 628–634, 2010.

McHUGH, J. OX40L-expressing B cells promote SLE. *Nature Reviews Rheumatology*., v. 13, p. 572, 2017.

MEBIUS, R. E E KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nature Immunology.* v. 5, p. 6060–616. 2005

MEDZHITOV R. P. recognition theory and the launch of modern innate immunity. *J. Immunol.,* v. 191, 2013.

MELO, M. N. Interaction of the Dengue Virus Fusion Peptide with Membranes Assessed by NMR: The Essential Role of the Envelope Protein Trp101 for Membrane Fusion. J. of Molecular Biology, v. 392, n. 3, 2009.

MELO, M. N. Interaction of the Dengue Virus Fusion Peptide with Membranes Assessed by NMR: The Essential Role of the Envelope Protein Trp101 for Membrane Fusion. J. of Molecular Biology, v. 392, n. 3, 2009.

MODIS Y et al., A ligand-binding pocket in the Dengue virus envelope glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:6986–6991

MODIS Y et al., Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*., v. 427, p. 313–319, 2004.

MODIS, Y et al. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion*. Nature.* n. 427, p. 313–319. 2004

MODIS, Y. et al. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, v. 427, p. 313-319, 2004.

MODIS, Y. et al. Structure of the Dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, v. 427, p. 313-319, 2004.

MODIS, Y. O. S., CLEMENTS, D. & HARRISON, S. C. *A ligand-binding pocket in the Dengue virus envelope glycoprotein. Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 100, p. 6986–6991. 2003

MOHR, E., et al., Dendritic cells and monocyte/macrophages that create the IL-6/APRIL-rich lymph node microenvironments where plasmablasts mature*. J Immunol,* v. 182: p. 2113–23. 2009

MONTEIRO, R. C., et al. “A Comparative Study of the Efficacy of 4% Hydroquinone vs 0.75% Kojic Acid Cream in the Treatment of Facial Melasma” *Indian journal of dermatology.,* v. 58, n. 2, 2013.

MONTOJO, J. et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics*. v.26(22):2927-8. 2010

MONTOJO, J., et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics.*, v. 26, p. 2927-8. 2010

MORO, A. M, et al. Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene.. *Environ Res*., v. 137, p. 349-56. 2015.

MORO, A. M. et al., Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. *Environ Res*. 137: 349-56. Epub 2015/01/21. pmid: 25601738. 2014

MORO, A. M. et al., Early hematological and immunological alterations in gasoline station attendants exposed to benzene. *Environ Res*. 137: 349-56. Epub 2015/01/21. pmid: 25601738. 2014

Morra, M., et al. Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.*, v. 1;20, p. 5840-52. 2001.

Moszczynski, P., et al. Immunological findings in cigarette smokers. *Toxicol Lett*. v. 118, p. 121–127, 2001.

MOTA, E. F.; LIMA, M. G. S.; MELO, D. F. Adjuvantes imunológicos: avanços e perspectivas. Ciência Animal Brasileira, v. 16, p. 79-88, 2006

MUNOZ, P. R., et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. Eur J Immunol., v. 37, p. 71-82, 2007.

MURPHY, K. Janeway's Immunobiology, London, New York, *Garland Science*, 2012.

MURPHY, K.; WEAVER, C. Janeway's immunobiology. Garland Science, 2016. ISBN 1315533243.

MUSICH, T. et al., Neutrophil Vaccination Dynamics and Their Capacity To Mediate B Cell Help in Rhesus Macaques. J. Immunol. v. 201. 2018

MUSICH, T. et al., Neutrophil Vaccination Dynamics and Their Capacity To Mediate B Cell Help in Rhesus Macaques. J. Immunol. v. 201. 2018.

MUTISO, J. M.; MACHARIA, J. C.; GICHERU, M. M. Immunization with *Leishmania* Vaccine-Alum-BCG and Montanide ISA 720 Adjuvants Induces Low-Grade Type 2 Cytokines and High Levels of IgG2 Subclass Antibodies in the Vervet Monkey (*Chlorocebus aethiops*) Model. Scan. J. of Immunology. v. 74, n. 5, p. 471 – 477. 2012.

NASIRUDEEN, A. M. et al. RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of Dengue virus infection. PLoS Negl Trop Dis, v. 5, n. 1, p. e926, Jan 04 2011.

NATURE, 2018 – Immune Systen. Disponível em: <https://www.nature.com/subjects/immune-system>. Acesso em 22 de dez. 2018

NG, C. S.; KATO, H.; FUJITA, T. Recognition of viruses in the cytoplasm by RLRs and other helicases--how conformational changes, mitochondrial dynamics and ubiquitination control innate immune responses. Int Immunol, v. 24, n. 12, p. 739-49, Dec 2012.

NIH. Benzene. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/benzene#section=Top>. Acesso 15 Set. 2017

NILUSHI, S. S & ULFKLEIN. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology.,* v. 15, p. 137–148, 2015.

Nuture. Future Dengue Fever Treatments. 2011. Disponível em: https://www.nature.com/scitable/topicpage/future-Dengue-fever-treatments-22404960. Acesso em 01 de março de 2018

NYTIMES, 2019. Drug Company Under Fire After Revealing Dengue Vaccine May Harm Some. Disponível em: < https://www.nytimes.com/2017/12/17/health/sanofi-Dengue-vaccine-philippines.html>. Acesso em 26 de janeiro de 2019.

O´NEILL, L. A. J. et al. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*., v. 13, p. 453–460, 2013.

OH, J, Z. et al. TLR5-Mediated Sensing of Gut Microbiota Is Necessary for Antibody Responses to Seasonal Influenza Vaccination. *Immunity*. v. 41.3, p.478–492. 2014

OKADA, T. et al. *Antigen-engaged B cells undergo chemotaxis toward the T zone and form motile conjugates with helper T cells. PLoS Biol.* v. 3, e. 150, 2005.

ONLINELIBRARY. Hydroquinone [MAK Value Documentation, 1998]. disponível em: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600418.mb12331e0010/abstract. Acesso em 20 Ago. 2017

OSHA. Hydroquinone. Disponível em: < https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_246890.html>. Acesso em 02 de Março de 2018

PADMA, M. & SINGH, M. Endotoxin limits informations for preclinical research. Novartis Vaccine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, n. 6, 2008.

PAN et al. Impact of female cigarette smoking on circulating B cells in vivo: the suppressed *ICOSLG, TCF3*, and *VCAM1* gene functional network may inhibit normal cell function. *Immunogenetics* v. 62, p. 237-51, 2010.

PAN, F., et al. Impact of female cigarette smoking on circulating B cells in vivo: the suppressed ICOSLG, TCF3, and VCAM1 gene functional network may inhibit normal cell function. *Immunogenetics,* v. 62, p. 237-51, 2010.

PEREIRA, R e KUNH, R, J. Structural proteomics of Dengue vírus. *Science direct.* n. 11, v. 4. 2008

PINEDO, F.J; FARSKY, S.H. Efeitos da Hidroquinona sobre atividades funcionais das sélulas endoteliais e de neutrófilos. In: Programa de pós-graduação em análises químicas e toxicológicas, 2009, Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9141/ tde-15012010-130114/pt-br.php >. Acesso em: 06 nov. 2016

PONS, M et al. Cigarette smokerelated hydroquinone induces filamentous actin reorganization and heat shock protein 27 phosphorylation through p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. Am J Pathol, v. 177 p.1198–1213. 2010

PONS, M; MARIN-CASTAÑO, M. E. Cigarette smoke-related hydroquinone dysregulates MCP-1, VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium in vitro and in vivo. PLoS ONE, v. 6: e16722. 2011

PYATT, D. W; STILLMAN, W. S; IRONS, R. D. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF-kappa B in primary human CD4+ T lymphocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 1998 Apr; v. 149(2) p.178-84. 1998

QI, H., et al. *SAP-controlled T-B cell interactions underlie germinal centre formation. Nature*., v. 455, p. 764–769, 2008.

RADBRUCH et al.,Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nature Reviews Immunology* v. 6, p. 741–750. 2006

RESENDE, F. C. B. et al. Vaccine adjuvants: possibilities for use in humans or animals. Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia, v. 27, p. 116-124, 2004.

REVIHAAP Project. WHO. Review of evidence on health aspects of air pollution. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/193108/REVIHAAP-Final-technical-report-final-version.pdf?ua=1>. Acesso em 11 de Set. 2017

REY, F. A, et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 A resolution. *Nature*., v. 375, p. 291–298, 1995.

RIBEIRO, A. L et al. In vivo hydroquinone exposure alters circulating neutrophil activities and impairs LPS-induced lung inflammation in mice. Toxicology, 288(1-3): 1-7, 2011.

RIBEIRO, A. L. T., 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* 288, 1–7 (2011).

ROBBINS, C. S. Cigarette Smoke Decreases Pulmonary Dendritic Cells and Impacts Antiviral Immune Responsiveness. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. v. 30, n. 2, 2004.

_____. Fact sheet: Dengue and Severe Dengue. World Health Organization, 2016. Disponível em: < http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/ >.

ABBAS, Abul K; LICHTMAN, Andrew H; Pillai, Shiv. Imunologia Celular e Molecular. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. 1458 p. p. 24 -65

ROSE, W. A II et al. Commensal Bacteria Modulate Innate Immune Responses of Vaginal Epithelial Cell Multilayer Cultures. *Plos One.* n.7. e.32728. 2012

ROSEMAN et al. The effect of smoking and alcohol consumption on markers of systemic inflammation, immunoglobulin levels and immune response following pneumococcal vaccination in patients with arthritis. *Arthritis Research & Therapy.* 2012

SAGE, P. T., et al. The coinhibitory receptor CTLA-4 controls B cell responses by modulating T follicular helper, T follicular regulatory, and T regulatory cells. *Immunity*., v. 18, p. 1026-39, 2014.

SAHA, S. P et al. Cigarette smoke and adverse health affects: An overview of research trends and future needs. International Journal of Angiology. v. 16, p. 77 – 83. 2007. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733016/

SANTOS, M. V. C. et al. Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. Revista Brasileira de Saúde Ocupacional. v. 42,

p. 1-6. 2017. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/rbso/v42s1/0303-7657-rbso-42-e13s.pdf>.

SCAPINI, P. et al. Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases. *Blood, v.* 105, n. 830–837. 2005.

SCAPINI, P.; BAZZONI, F.; CASSATELLA, M. A. Regulation of B-cell-activating factor (BAFF)/B lymphocyte stimulator (BLyS) expression in human neutrophils*. Immunol Lett*. v. 116, n. 1–6. 2008

SCHAFFNER, F.; MATHIS, A. Dengue and Dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. Lancet Infect Dis, v. 14, n. 12, p. 1271-80, Dec 2014.

SCHIFFMAN, C. et., Identification of gene expression predictors of occupational benzene exposure. *PLoS ONE* 13(10): e0205427. 2018

SCHIFFMAN, C. et., Identification of gene expression predictors of occupational benzene exposure. *PLoS ONE* 13(10): e0205427. 2018

SCHIFFMAN, C., et al. Identification of gene expression predictors of occupational benzene exposure. *PLoS ONE*., v. 13. 2018.

SCHLOSSER, M. J, SHURINA, R. D, and Kalf, G. F. Metabolism of Phenol and Hydroquinone to Reactive Products by Macrophage Peroxidase or Purified Prostaglandin H Synthase. *Environmental Health Perspectives*. n. 82, n. 229–237. 1989

SHAHINIAN, A. K. et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*., v. 261, p. 609-612, 1993

SHAKYA, A. K.; GILl, H. S.; A comparative study of microneedle-based cutaneous immunization with other conventional routes to assess feasibility of microneedles for allergy immunotherapy. Vaccine. p. 4060 – 4064. v. 33. n. 33 2015. Disponível em: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X15008312>.

SHI, W. et al., Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nature Immunology.* v. 16, n. 6. 2015

SHI, W. et al., Transcriptional profiling of mouse B cell terminal differentiation defines a signature for antibody-secreting plasma cells. *Nature Immunology.* v. 16, n. 6. 2015.

SHIEH, SHYH-JOU et al. “Counting CD4(+) and CD8(+) T cells in the spleen: a novel in vivo method for assessing biomaterial immunotoxicity.” *Regenerative biomaterials* v. 1,1, p. 11-6. 2014

SHIMADA, A.L et al. In vivo hydroquinone exposure causes tracheal hyperresponsiveness due to TNF secretion by epithelial cells. Toxicol Lett, v. 211(1) p. 10-7. 2012a.

SHIMADA, A.L et al. In vivo hydroquinone exposure impairs MCP-1 secretion and monocyte recruitment into the inflamed lung. Toxicology, v. 296(1-3) p.20-6, 2012b.

SHINALL, S. M et al. Identification of murine germinal center B cell subsets defined by the expression of surface isotypes and differentiation antigens*. J Immunol*. v.164, p. 5729–5738. 2000

SHUKLA, V & LU, R. IRF4 and IRF8: Governing the virtues of B Lymphocytes. *Frontiers in biology*., v. 9, n. 4, p. 269-282, 2014.

SILVEIRA, G. F et al. Human T Lymphocytes Are Permissive for Dengue Virus Replication. *J Virol*. v. 92(10):e. 02181-17. 2018.

SIMMONS, C. P. et al. Early T-cell responses to Dengue virus epitopes in Vietnamese adults with secondary Dengue virus infections. J Virol, v. 79, n. 9, p. 5665-75, May 2005.

SIRCAR, K., et al. Carbon Monoxide Poisoning Deaths in the United States, 1999 to 2012. *The American journal of emergency medicine*. n. 33.9, p. 1140–1145. 2015

SKOK, M. V., et al. Functional nicotinic acetylcholine receptors are expressed in B lymphocyte-derived cell lines. *Mol Pharmacol*. v. 64, p. 885–889, 2003.

SKOK, M. V., et al. Nicotinic receptors regulate B lymphocyte activation and immune response. *Eur J Pharmacol.* v. 517, p. 246–251, 2005.

SKOK, M. V., et al. The role of nicotinic receptors in B-lymphocyte development and activation. *Life Sci., v.* 80, p. 2334–2336, 2007.

SNYDER, R. Benzene and Leukemia. Critical Reviews in Toxicology, 32(3): 155-210, 2002.

SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. Drug Metabolism Reviews, 36(3-4):531-47, 2004

SONI, C et al. B cellintrinsic TLR7 signaling is essential for the development of spontaneous germinal centers. J Immunol. v. 193(9) p.4400-14, 2014

SONTHEIMER, R. D. et al., C1q: Its Functions within the Innate and Adaptive Immune Responses and its Role in Lupus Autoimmunity. *Journal of Investigative Dermatology*. v. 125, n. 1, p. 14-23. 2005

SONTHEIMER, R. D., et al. C1q: Its Functions within the Innate and Adaptive Immune Responses and its Role in Lupus Autoimmunity. Journal of Investigative Dermatology., v, 125, n, 1, p, 14-23. 2005.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. Nat Rev Immunol, v. 2(5) p. 372-7, 2002

SOPORI, M. L; GOUD, N. S; KAPLAN, A. M. Immunotoxicology and immunopharmacology (eds Dean) p. 413–433. 1994

SOPORI, M. L; GOUD, N. S; KAPLAN, A. M. *Immunotoxicology and immunopharmacology* (edsDean) p. 413–433. 1994

SOPORI, M. L; GOUD, N. S; KAPLAN, A. M. *Immunotoxicology and immunopharmacology* (edsDean) p. 413–433. 1994.

SOUZA, H. S. F. et al., Early Dengue virus interactions: the role of dendritic cells during infection. *Virus Research.,* v. 223, p. 88-98, 2016.

STABBERT, R., et al. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicology in Vitro.,* v. 42, p. 222-246, 2017.

STABBERT, R. R et al., Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicol. Vitro*, v. 42 pp. 222-246. 2017

STABBERT, R. R et al., Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicol. Vitro*, v. 42 pp. 222-246. 2017

STABBERT, R. R., et al. Studies on the contributions of smoke constituents, individually and in mixtures, in a range of in vitro bioactivity assays. *Toxicol. Vitro*, v. 42, p. 222-246. 2017.

STAMPFLI, M. P; ANDERSON. G. P. How cigarette smoke skews imune responses to promote infection, lung disease and cancer. Nat Ver Immunol. v. 9(5); p. 377 – 384, 2009.

STEPHENSON, J. R. Understanding Dengue pathogenesis: implications for vaccine design Bull. *World Health Organ.*, v. 83, p. 308-314, 2005.

STILLS, H. F. Jr. Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. Ilar J. 2005; v. 46(3), p. 280–293, 2005.

SUKUPOLVI-PETTY et al. Type- and subcomplex-specific neutralizing antibodies against domain III of Dengue virus type 2 envelope protein recognize adjacent epitopes. *J. virol.* 2007

SULLIVAN, N. L., et al. Importance of the CCR5-CCL5 axis for mucosal *Trypanosoma cruzi*protection and B cell activation. J Immunol., v. 187, p. 1358–1368, 2012.

SUNIT SINGHI, N. K et al. lDengue and Dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit. *J. Pediatr*., v. 83, 2007.

SUVAS, S., et al. Distinct Role of CD80 and CD86 in the Regulation of the Activation of B Cell and B Cell Lymphoma. *The Journal of Biological Chemistry.,* v. 277, p. 7766-7775, 2002.

TABATA, H et al. Ligation of HLA-DR Molecules on B Cells Induces Enhanced Expression of IgM Heavy Chain Genes in Association with Syk Activation. *Journal of Bio. Chem*. 2000

TABATA, H., et al. Ligation of HLA-DR Molecules on B Cells Induces Enhanced Expression of IgM Heavy Chain Genes in Association with Syk Activation. *Journal of Biological Chemistry*., v. 275, n. 45, p. 34998–35005. 2000.

TALAY, O et al., IgE^{+} memory B cells and plasma cells generated through a germinal-center pathway. *Nature Immunology.* v. 13, p. 396–404. 2012

TAN, J. K. H., and TAKESHI, W. Stromal Cell Subsets Directing Neonatal Spleen Regeneration. *Scientific Reports*. v. 7 e. 40401. 2017

TAN, W. C, et al. Epidemiology of respiratory viruses in patients hospitalized with near-fatal asthma, acute exacerbations of asthma, or chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med*. v. 115, p. 272–277, 2013.

Tangye, S. G., et al. CD84 is up-regulated on a major population of human memory B cells and recruits the SH2 domain containing proteins SAP and EAT-2. *Eur. J. Immunol.* v. 32, p. 1640–1649, 2002.
TANGYE, S. G.; COOK, M. C.; FULCHER, D. A. Insights into the role of STAT3 in human lymphocyte differentiation as revealed by the hyper-IgE syndrome. J Immunol, v. 182, n. 1, p. 21-8, Jan 2009.

Tawana, K. *CEBPA*-Associated Familial Acute Myeloid Leukemia (AML). Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47457/. Acesso em 21 de dez. de 2018

TAYSSE, L.; TROUTAUD, D.; KHAN, N. A.; Deschaux, P.; Structure-activity relationship of phenolic compounds (phenol, pyrocatechol and hydroquinone) on natural lymphocytotoxicity of carp (Cyprinus carpio). Toxicology. v. 98, n. 1-3), p. 207-214, 1995. Disponível em: < https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7740548>.

TEETS, F. D. et al. Origin of the Dengue virus outbreak in Martin County, Florida, USA 2013. Virol Rep, v. 1-2, p. 2-8, March-June 2014.

THE TELEGRAPH – Philippines immunisation rates plummet amid Dengue vaccination scare. Disponível em: < https://www.telegraph.co.uk/news/2018/02/05/philippines-immunisation-rates-plummet-amid-Dengue-vaccination/>. Acesso em 26 de janeiro de 2019

TISMAN, G; HERBERT, V. In Vitro Myelosuppression and Immunosuppression by Ethanol. Journal of Clinical Investigation. v. 52.6, p. 1410–1414, 1973.

TOBIAS, et al. Enhanced and long-term immunogenicity of a Her-2/neu multi-epitope vaccine conjugated to the carrier CRM 197 in conjunction with the adjuvant Montanide. BMC cancer. v. 17, e. 118. 2017

TSAI, Y. T. et al. Human TLR3 recognizes Dengue virus and modulates viral replication in vitro. Cell Microbiol, v. 11, n. 4, p. 604-15, Apr 2009.

TSE, T. W. Hydroquinone for skin lightening: safety profile, duration of use and when should we stop. *Journal of Dermatological Treatment.* v. 25, n. 272 – 275. 2010

TURKISTANY, S. A. & DEKOTER, R.P, The transcription factor PU.1 is a critical regulator of cellular communication in the immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).*, v. 59, p. 431-40, 2011.

UBOL, S.; HALSTEAD, S. B. How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. Clin Vaccine Immunol, v. 17, n. 12, p. 1829-35, Dec 2010.

URCUQUI-INCHIMA, et al., Interplay between Dengue virus and Toll-like receptors, RIG-I/MDA5 and microRNAs: Implications for pathogenesis. *Antiviral Res.*, v. 147, p. 47-57, 2017.

VAN REES, E. P., SMINIA, T., and DIJKSTRA, C. D. Structure and Development of the Lymphoid Organs. In: Pathobiology of the Aging Mouse. *ILSI Press* .Vol. 1, pp. 173–187.,1996

VARELLA, P. P. V; FORTE, W, C, N. Citokines: a review. Rev. Bras. Aler. E Imunopatologia. v. 24(4), p. 146-154. 2001

WAHALA, W. M.; SILVA, A. M. The human antibody response to Dengue virus infection. Viruses, v. 3, n. 12, p. 2374-95, Dec 2011.

WANG, J et al. Cigarette smoke inhibits BAFF expression and mucosal immunoglobulin A responses in the lung during influenza virus infection. Respiratory Research. 2015

WANG, L. et al. Gene expression profiling identifies IRF4-associated molecular signatures in hematological malignancies. PLoS One, v. 9, n. 9, p. e106788, 2014.

WANG, R et al. Airway epithelial expression of TLR5 is downregulated in healthy smokers and smokers with chronic obstructive pulmonary disease. J Immunol. 2012 Sep 1; v. 189(5) p. 2217-25. 2012

WARD, J. M., et al. Thymus, Spleen, and Lymph Nodes. In Pathology of the Mouse. *Cache River Press* .pp. 333–60., 1999.

WARREN, W. D., et al. Regulation of the germline immunoglobulin Cγ1 promoter by CD40 ligand and IL-4: dual role for tandem NF-κB binding sites. *Mol. Immunol*., v. 36, p. 31-44, 1999.

Weiskopf, D. M.A. Comprehensive analysis of Dengue virus-specific responses supports an HLA-linked protective role for CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,* v. 110 p. E2046-2053, 2013.

WHITEHEAD, S. S., et al., 2007. Prospects for a Dengue virus vaccine. Nature Reviews Microbiology., v. 5, p. 518–528, 2017.

WHO, 2019. Dengue and severe Dengue. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Dengue-and-severe-Dengue. Acesso em 05 de jan. 2019.

WHO. Dengue vaccine research. Disponível em: < http://www.who.int/immunization/research/development/Dengue_vaccines/en/>. Acesso em 28 de janeiro de 2018

WHO. Global strategy for Dengue prevention and control 2012-2020. World Health Organization: World Health Organization 2012.

WIERDA, D and IRONS, R.D. Hydroquinone and catechol reduce the frequency of progenitor B lymphocytes in mouse spleen and bone marrow. *Immunopharmacology*, v. 4, pp. 41-54. 1982

WILBUR, S. *et al. ATSDR evaluation of potential for human exposure to benzene. Toxicol. Ind. Health*., v. 24, p. 399–442, 2008.

WILKER, P. R. et al. *Transcription factor Mef2c is required for B cell proliferation and survival after antigen receptor stimulation. Nature Immunol.,* v. 9, p. 603–612 2008.

WILLIS, S. N., *et al. Transcription factor IRF4 regulates germinal center cell formation through a B cell-intrinsic mechanism. J. Immunol.,* v. 192, p. 3200–3206, 2014.

WRAMMERT, J.; et al. Rapid and Massive Virus-Specific Plasmablast Responses during Acute Dengue Virus Infection in Humans. J. Virol. p. 2911 – 2918. v. 86. n. 6. Mar. 2012. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3302324/.

XU, Z., et al. “B Cell-Activating Transcription Factor Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Anti-Major Histocompatibility Complex-Induced Obliterative Airway Disease” American journal of transplantation: *official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*., v. 16, p. 1173-82, 2016.

YANG, E. J. et al. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. Toxicology in Vitro, v. 25, n. 1, p. 131–137, 2011

YANG, E. J. et al. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 1, p. 131–137, 2011

YANG, E. J. et al. The pro-apoptotic effect of hydroquinone in human neutrophils and eosinophils. *Toxicology in Vitro*, v. 25, n. 1, p. 131–137, 2011

YANG, Q., et al. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis.,* v. 20, p. 1769–1775, 1999.

YING, C. Y., et al. *MEF2B mutations lead to deregulated expression of the oncogene BCL6 in diffuse large B cell lymphoma*. *Nature Immunol*., v. 14, p. 1084–1092, 2013.

YUAN, Z. et al., Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)-mediated Bcl-2 induction prolongs macrophage survival. *J Biol Chem.* v. 23;289(21):15118-29. 2014

YUAN, Z. et al., Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)-mediated Bcl-2 induction prolongs macrophage survival. *J Biol Chem.* v. 23;289(21):15118-29. 2014

YUAN, Z., Triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM-1)-mediated Bcl-2 induction prolongs macrophage survival. *J Biol Chem.*, v. 23, n. 289, p.15118 - 15129. 2014.

Zajacova, M., et al. Expression of HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes in B lymphocytes, monocytes and whole blood. *Int J Immunogenet*., v. 45, p. 128-137, 2018.

ZAKERI, A. & RUSSO, M. Dual Role of Toll-like Receptors in Human and Experimental Asthma Models. *Front Immunol*. v. 9, p. 1027. 2018

ZHANG, Y. et al. *Conformational changes of the flavivirus e glycoprotein. Structure*., v. 12, p. 1607–1618, 2004.

ZHU, J et al. GATA-3 promotes Th2 responses through three diferente mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. Cell Research. v. 16, p. 3 – 10. 2006.

ZUCKERMAN, J. N. “The Importance of Injecting Vaccines into Muscle : Different Patients Need Different Needle Sizes.” BMJ : British Medical Journal, v. 321.7271, p. 1237–1238. 2000.

MIAGOSTOVICH, M. P et al., Diagnosis of dengue by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*., v. 92(5), p. 595 - 599. 1997

MIAGOSTOVICH, M. P et al., Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol.,* v. 16 (4), p. 204 – 208. 1997

ARAÚJO, F. M et al., Detection of the dengue non-structural 1 antigen in cerebral spinal fluid samples using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay. *J Virol Methods.,* v. 177 (1), p. 128 – 132. 2011

LIMA, D. M et al., A DNA vaccine candidate encoding the structural prM/E proteins elicits a strong immune response and protects mice against dengue-4 virus infection. *Vaccine.,* v. 29 (4), p. 831 – 838. 2011

SALAZAR, M. I et al*.,* Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. *BMC Microbiol.,* v. 7. 2007

BHOOPAT, L et al., Immunohistochemical characterization of a new monoclonal antibody reactive with dengue virus-infected cells in frozen tissue using immunoperoxidase technique. *Asian Pac J Allergy Immunol.,* v. 14(2), p. 107 – 113. 1996

LUM, L. C et al. Dengue encephalitis: a true entity? *Am J Trop Med Hyg.,* v. 54(3), p. 256 – 259. 1996

THISYAKORN, U et al., Dengue infection with central nervous system manifestations. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.,* v. 30(3), p. 504 – 506. *1999*

TAVARES, F. N et al., Complete genetic characterization of a Brazilian dengue virus type 3 strain isolated from a fatal outcome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 101(3), p. 307 – 313. *2006*

SOARES, C. N et al., Meningitis determined by oligosymptomatic dengue virus type 3 infection: report of a case. *Int J Infect Dis*., v. 14(2), p. 150 – 152. 2010

LI, G. H et al., Neurological Manifestations of Dengue Infection. *Front Cell Infect Microbiol*., v. 7, p. 449. 2017

NISHIYA, T et al., TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem*., v. 280, p. 37107–

37117. 2005

VAN DER SCHAAR, H. M. et al. Characterization of the early events in dengue virus cell entry by biochemical assays and single-virus tracking. *J Virol*. v. 81, p. 12019–12028. 2007

LINDENBACH, D., e C. M. RICE. *Flaviviridae*: the viruses and their replication, p. 991-1041. Fields virology, 4th ed. 2001

Anexos

Anexo 1 – Dados dos 52 genes *down-regulated* pelo Benzeno

Genes	Nome	Valor de P
YPEL2	yippee like 2	0,000000248
C16ORF87	chromosome 16 open reading frame 87	0,0000000435
YOD1	YOD1 deubiquitinase	0,0000641
EAF2	ELL associated factor 2	0,000148
ASB13	ankyrin repeat and SOCS box containing 13	0,000205
NCOA6	nuclear receptor coactivator 6	0,0000136
IFT57	intraflagellar transport 57	0,000326
PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase 4	0,0000711
SLC30A1	solute carrier family 30 member 1	0,0000221
BLOC1S1	biogenesis of lysosomal organelles complex 1 subunit 1	0,0000547
DERA	deoxyribose-phosphate aldolase	0,000283
RPS7	ribosomal protein S7	0,0000000137
HHEX	hematopoietically expressed homeobox	0,00000503
FAM96A	family with sequence similarity 96 member A	0,00000557
KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	0,000256
CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein alpha	0,00000229
ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	0,000293
LMO2	LIM domain only 2	0,0000453
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein delta	0,000000176
ATF5	activating transcription factor 5	0,00445
SUMF1	sulfatase modifying factor 1	0,000499
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein beta	0,00223
CLIC4	chloride intracellular channel 4	0,0049
MT1E	metallothionein 1E	0,00283
ADI1	acireductone dioxygenase 1	0,00247
TLE1	transducin like enhancer of split 1	0,0064
MT1F	metallothionein 1F	0,00261
TOR3A	torsin family 3 member A	0,000194
UBE2J1	ubiquitin conjugating enzyme E2 J1	0,000311

MT1G	metallothionein 1G	0,000363
CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein gamma	0,00000000176
RBBP8	RB binding protein 8, endonuclease	0,00252
SNX3	sorting nexin 3	0,00000147
JCHAIN	joining chain of multimeric IgA and IgM	0,00574
MARCH1	membrane associated ring-CH-type finger 1	0,0000187
COMMD3	COMM domain containing 3	0,000000998
PRDX4	peroxiredoxin 4	0,00000462
ATF4	activating transcription factor 4	0,000216
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	0,00372
YPEL2	yippee like 2	0,000000248
RNF135	ring finger protein 135	0,0000812
LAMTOR1	lysosomal adaptor, MAPK and MTOR activator 1	0,000193
RRAS	related RAS viral (r-ras) oncogene homolog	0,000247
BATF	basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3	0,00059
MT1X	metallothionein 1X	0,000374
SNRPF	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	0,0000849
CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein epsilon	0,0024
YWHAH	tryptophan 5-monooxygenase activation protein eta	0,000104
ARRDC4	arrestin domain containing 4	0,000328
SMAD6	SMAD family member 6	0,000000433
RSL1D1	ribosomal L1 domain containing 1	0,0000832
AP1S1	adaptor related protein complex 1 sigma 1 subunit	0,000246

CO-EXPRESSÃO	42,98%
INTERAÇÕES FÍSICAS	51,01%
CO-LOCALIZAÇÃO	1,10%
PREDITOS	3,49%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,07%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	1,34%

Anexo 2 – Dados dos 176 genes *Up-regulated* pelo Benzeno

Genes	Nome	Valor de P
MTF1	metal regulatory transcription factor 1	0,0000398
HCAR3	hydroxycarboxylic acid receptor 3	0,000314
GBP1	guanylate binding protein 1	0,000000931
NFKBIZ	NFKB inhibitor zeta	0,00064
UPB1	beta-ureidopropionase 1	0,000000000176
RALGDS	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	0,0000354
DOT1L	DOT1 like histone lysine methyltransferase	0,000036
FFAR2	free fatty acid receptor 2	0,000000232
GPR84	G protein-coupled receptor 84	0,0000103
SOD2	superoxide dismutase 2, mitochondrial	0,0000000684
PLEK	pleckstrin	0,000000588
GBP2	guanylate binding protein 2	0,0000000863
LYZ	lysozyme	0,01561
CLCF1	cardiotrophin-like cytokine factor 1	0,0000586
ATP6V1B2	ATPase H+ transporting V1 subunit B2	0,00000196
IFNB1	interferon beta 1	0,00000000177
PRG2	proteoglycan 2, pro eosinophil major basic protein	0,000000328

ADORA2A	adenosine A2a receptor	0,0000000238
LDLR	low density lipoprotein receptor	0,0000547
ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	0,00000201
GCH1	GTP cyclohydrolase 1	0,00000000000082
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase	0,01107
TNFSF14	tumor necrosis factor superfamily member 14	0,0000000128
GPR132	G protein-coupled receptor 132	0,000000452
SLC11A2	solute carrier family 11 member 2	0,000000153
ZBTB17	zinc finger and BTB domain containing 17	0,0000000468
RNF125	ring finger protein 125	0,0000212
CCL3	C-C motif chemokine ligand 3	0,000203
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4	0,00000219
NFKB1	nuclear factor kappa B subunit 1	0,0000000178
S100A12	S100 calcium binding protein A12	0,02988
DSCR4	Down syndrome critical region 4	0,00000427
ZC3H12A	zinc finger CCCH-type containing 12A	0,000261
SLC39A8	solute carrier family 39 member 8	0,000000521
TMEM88	transmembrane protein 88	0,0000015
CYB5D1	cytochrome b5 domain containing 1	0,000000132
HK2	hexokinase 2	0,000119
IFIT3	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	0,00000069
TRIP10	thyroid hormone receptor interactor 10	0,0000979
FCN1	ficolin 1	0,002255
MSC	musculin	0,0000000053
NOCT	nocturnin	0,00000361
ZNF264	zinc finger protein 264	0,000000381
IFIT2	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 2	0,00000124
RASGEF1B	RasGEF domain family member 1B	0,000258
SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase acid like 3A	0,0000376
TNFAIP6	TNF alpha induced protein 6	0,00000000623

IL1B	interleukin 1 beta	0,00286
SLAMF7	SLAM family member 7	0,000000783
ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6	0,0000675
ZBTB43	zinc finger and BTB domain containing 43	0,000164
CTRC	chymotrypsin C	0,000363
SPAG5	sperm associated antigen 5	0,0000187
CARD17	caspase recruitment domain family member 17	0,00000097
SERPINB2	serpin family B member 2	0,0000000000428
PTX3	pentraxin 3	0,00000000000092
NFKB1A	nuclear factor kappa B subunit 1	0,0000000178
SAMSN1	SH3 domain and nuclear localization signals 1	0,0000032
IGSF6	immunoglobulin superfamily member 6	0,0000172
HSH2D	hematopoietic SH2 domain containing	0,00000000133
DRAM1	DNA damage regulated autophagy modulator 1	0,0000000255
IL36G	interleukin 36, gamma	0,00000426
RNF144B	ring finger protein 144B	0,0000019
EDN1	endothelin 1	0,000000162
PELI1	pellino E3 ubiquitin protein ligase 1	0,000000027
TNFAIP3	TNF alpha induced protein 3	0,00266
PRDM8	PR/SET domain 8	0,000182
CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor alpha subunit	0,0000131
RNF19B	ring finger protein 19B	0,000000834
TNFSF8	tumor necrosis factor superfamily member 8	0,0000806
CLN8	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	0,00000207
HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2	0,000227
TNIP1	TNFAIP3 interacting protein 1	0,0000000097
IL6	interleukin 6	0,00000664
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8	0,00141
PPP1R15A	protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A	0,000000038
SLC1A3	solute carrier family 1 member 3	0,00000236
IL1A	interleukin 1 alpha	0,000000000307

RNF166	ring finger protein 166	0,000157
MFSD2A	major facilitator superfamily domain containing 2A	0,000000207
NABP1	nucleic acid binding protein 1	0,000000929
CCL20	C-C motif chemokine ligand 20	0,0000000527
ITPKB	inositol-trisphosphate 3-kinase B	0,000266
BCL2A1	BCL2 related protein A1	0,0311
EIF4E	eukaryotic translation initiation factor 4E	0,0000306
CXCR3	C-X-C motif chemokine receptor 3	0,000356
SERPINB9	serpin family B member 9	0,00000114
ZNFX1	zinc finger NFX1-type containing 1	0,000000000172
HCAR2	hydroxycarboxylic acid receptor 2	0,0000411
B4GALT5	beta-1,4-galactosyltransferase 5	0,00000342
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	0,000000222
PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	0,00000000679
NAMPT	nicotinamide phosphoribosyltransferase	0,000827
MAP3K8	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	0,00000369
BASP1	brain abundant membrane attached signal protein 1	0,000000075
SLC9A8	solute carrier family 9 member A8	0,000000788
MTF1	metal regulatory transcription factor 1	0,0000398
AKNA	AT-hook transcription factor	0,00000000885
DNAAF1	dynein axonemal assembly factor 1	0,000000000474
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	0,0000000899
CD55	CD55 molecule (Cromer blood group)	0,000424
IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	0,0000000000938
TRAF1	TNF receptor associated factor 1	0,000000000125
BAZ1A	bromodomain adjacent to zinc finger domain 1A	0,0000000499
STEAP4	STEAP4 metalloreductase	0,0000254
PAFAH2	platelet activating factor acetylhydrolase 2	0,000000468
DCUN1D3	defective in cullin neddylation 1 domain containing 3	0,000000133
TTPAL	alpha tocopherol transfer protein like	0,0000000143

NINJ1	ninjurin 1	0,0000305
IFNGR2	interferon gamma receptor 2	0,000202
G0S2	G0/G1 switch 2	0,01799
LCP2	lymphocyte cytosolic protein 2	0,000000401
TLR2	toll like receptor 2	0,0000000497
NRIP3	nuclear receptor interacting protein 3	0,0000626
SLC12A7	solute carrier family 12 member 7	0,0000513
UBTD2	ubiquitin domain containing 2	0,0000139
C2CD4B	C2 calcium dependent domain containing 4B	0,000278
P2RX4	purinergic receptor P2X 4	0,0000000186
IER3	immediate early response 3	0,00000237
RELB	RELB proto-oncogene, NF-kB subunit	0,00406
ADAD2	adenosine deaminase domain containing 2	0,000000000247
SH2D2A	SH2 domain containing 2A	0,000235
STARD8	StAR related lipid transfer domain containing 8	0,00000302
SPAG9	sperm associated antigen 9	0,00000554
ARL5B	ADP ribosylation factor like GTPase 5B	0,0000000895
FAM177A1	family with sequence similarity 177 member A1	0,0000119
CXCL10	C-X-C motif chemokine ligand 10	0,0000496
F3	coagulation factor III, tissue factor	0,000000204
S100A8	S100 calcium binding protein A8	0,02962
IRAK2	interleukin 1 receptor associated kinase 2	0,0000000149
AQP9	aquaporin 9	0,000000000125
OXSR1	oxidative stress responsive 1	0,0000000176
OLR1	oxidized low density lipoprotein receptor 1	0,00000476
PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	0,000235
FRMD7	FERM domain containing 7	0,0000000184
MARCKS	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	0,00000519
ICAM1	intercellular adhesion molecule 1	0,0000198
NCF2	neutrophil cytosolic factor 2	0,013

IL23A	interleukin 23 subunit alpha	0,00000657
EHD1	EH domain containing 1	0,0000000402
KCNJ2	potassium voltage-gated channel subfamily J member 2	0,0000000000784
SLC2A6	solute carrier family 2 member 6	0,000000194
GK	glycerol kinase	0,0000329
OTULIN	OTU deubiquitinase with linear linkage specificity	0,000367
NFE2L2	nuclear factor, erythroid 2 like 2	0,0000449
ITGA5	integrin subunit alpha 5	0,0000524
DUSP5	dual specificity phosphatase 5	0,00088
ZBP1	Z-DNA binding protein 1	0,00000028
ENTPD4	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 4	0,000204
ABL2	ABL proto-oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase	0,0000000189
PPP1R10	protein phosphatase 1 regulatory subunit 10	0,0000000000827
VPS37C	VPS37C, ESCRT-I subunit	0,00000174
NFKB2	nuclear factor kappa B subunit 2	0,0000000549
SDC4	syndecan 4	0,00000841
MAFB	MAF bZIP transcription factor B	0,00251
EREG	epiregulin	0,0000304
ETV3	ETS variant 3	0,000202
CSGALNACT2	chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 2	0,0000133
MVD	mevalonate diphosphate decarboxylase	0,0000015
CHST7	carbohydrate sulfotransferase 7	0,0000126
TNF	tumor necrosis factor	0,0000114
PNP	purine nucleoside phosphorylase	0,000411
ZFP36	ZFP36 ring finger protein	0,00111
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	0,000000546
ADM	adrenomedullin	0,000000366
SLC7A5	solute carrier family 7 member 5	0,000146
NFKBID	NFKB inhibitor delta	0,00000206

RIN2	Ras and Rab interactor 2	0,00000534
CXCL2	C-X-C motif chemokine ligand 2	0,000275
CD83	CD83 molecule	0,00000028
JUNB	JunB proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit	0,00169
CSF2	colony stimulating factor 2	0,000108
PLAU	plasminogen activator, urokinase	0,0000113
DENND5A	DENN domain containing 5A	0,00000000397
CLEC5A	C-type lectin domain family 5 member A	0,0000000192
TBC1D7	TBC1 domain family member 7	0,0000672

CO-EXPRESSÃO	**86,27%**
INTERAÇÕES FÍSICAS	9,05%
CO-LOCALIZAÇÃO	2,73%
VIAS	0,99%
PREDITOS	0,79%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,17%

Anexo 3 – Dados dos 127 genes *down-regulated* pelo Cigarro

- Na sequência, de cima para baixo, são mostrados os valores de P correspondente aos genes de cada estudo, GSE23323; GSE47415; GSE55962 e GSE87072, respectivamente. “X” indica que determinado gene não estava presente naquele estudo.

Genes	Nome	Valor de P
KLRF1	Killer cell lectin like receptor F1	0.01195507 0.00445224 0.000671 0,00000049
SDPR	Serum deprivation response	0.08195991 0.03298765 0.00813 0.00992
NKG7	Natural killer cell granule protein 7	0.00162754 0.09306895 0.0154 0,000000492
GUCY1A3	Guanylate cyclase 1 soluble subunit alpha	X 0.0020422 0.0028 X
CHORDC1	Cysteine and histidine rich domain containing 1	X X 0.000677 X
ZNF322A	Zinc finger protein 322	X X 0.000166 X

HLA-DQA1	Major histocompatibility complex, class ii, dq alpha 1	X X 0,006399089 X
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3	0.073037047 0.038234747 0,038234747 0.0265
KLRB1	Killer cell lectin like receptor B1	0.028247859 0.00770592 0,0000205 0,00770592
PDLIM1	PDLIM1 interacting kinase 1 like	0.017892873 0.031087297 0.00173 0.0733
SPRY1	Sprouty RTK signaling antagonist 1	X 0.00867126 0.0476 0.0123
ARHGAP5	Rho gtpase activating protein 5	0.03309888 0.01545181 0.00123 0.015
HEMGN	Hemogen	0.04988436 0.00857385 0.0225 0.0165
KIR3DL1	Killer cell immunoglobulin like receptor, three Ig domains and long cytoplasmic tail 1	0.06386029 0.037139802 0.0104

		0.00028
FGFBP2	Fibroblast growth factor binding protein 2	0.00083844 0.00901984 X 0,00901984
KLRD1	Killer cell lectin like receptor D1	0.00326408 0.009766628 X 0,009766628
GUCY1B3	Guanylate cyclase 1 soluble subunit beta	X 0.00084829 X X
CDKN1C	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	0.00001722 0.44120768 X 0.0185
GAS1	Growth arrest specific 1	X 0.00237976 0.0478 0.0176
DLGAP1	DLG associated protein 1	X 0.03841889 0.0147 0.0601
ISM2	Isthmin 2	X 0.016303688 0.00076 0.0271
XCL1	C-X-C motif chemokine ligand 17	X 0.00253137

		0.0675 0.0806
GZMH	Granzyme H	0.00481924 0.50875931 0.0665 0.000442
TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor 3	0.02101452 0.02855058 X 0.00055
GPR18	G protein-coupled receptor 18	0.09478213 0.02864161 0,02864161 0.0754
CLDN5	Claudin 5	X 0.00032648 0.0181 0.0185
FAM43A	Family with sequence similarity 43 member A	0.086475954 0.027704239 0,027704239 0.0648
S1PR5	Sphingosine-1-phosphate receptor 5	0.00016167 X 0.00225 X
PPBP	Pro-platelet basic protein	0.018108695 0.00019269 0.0152 0.0661

GZMA	Granzyme A	0.01926617 0.0395866 0,0395866 0.01926617
CX3CR1	C-X3-C motif chemokine receptor 1	0.00058184 0.025395661 0.000593 0.0323
PROZ	Protein Z, vitamin K dependent plasma glycoprotein	X 0.00375567 0.0131711 0.0284
ITGB3	Integrin subunit beta 3	0.017478798 0.00579501 0.0227 0.00628
HOPX	HOP homeobox	X 0.0466925 0,0466925 X
GZMB	Granzyme B	0.03360245 0.018466087 0.0259 0.03360245
PGRMC1	Progesterone receptor membrane component 1	0.05540073 0.03262389 0.0117 0.0168
KLRC1	Killer cell lectin like receptor C1	0.012943574 0.07846147 0.0146

		X
ASPN	Asporin	X 0.00388958 0.0219 0.0456
CTTN	Cortactin	X 0.00742277 0.00797 0.00713
CD160	CD160 molecule	0.00383646 0.05079372 0.00217 2.55e-05
PDGFD	Platelet derived growth factor D	X 0.31987476 0.322 0.00383646
CD81	CD81 molecule	0.01814089 0.0070662693 0.000824 0.0224
TBX18	T-box 18	X 0.02469696 0.0209 0.00638
PTCRA	Pre T-cell antigen receptor alpha	0.00387319 0.00233072 0.00936 0.00789
HDC	Histidine decarboxylase	0.023257369 0.00019847

		0.0259 0.00529
ST13	Progesterone receptor-associated p48 protein	X X 0,010788737 X
MYBL1	MYB proto-oncogene like 1	X 0.023992211 0.000403 0.000668
TMEM40	Transmembrane protein 40	0.02204069 0.0001505 0.0352 X
KLRC3	Killer cell lectin like receptor C3	0.0094521174 0.028151005 0.0285 0.00166
KLRK1	Killer cell lectin like receptor K1	0.013817936 0.03948256 0.000272 X
DNM3	Dynamin 3	0.0079725827 0.00199101 0.0195 0.00749
HGD	Homogentisate 1,2-dioxygenase	0.07354226 0.03030193 0.018 0.0109
KIR2DL2	Killer cell immunoglobulin like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 2	0.05017155

		0.015148746 X 0.000148
FCER1A	Fc fragment of ige receptor Ia	0.046017884 0.05833995 0,005833995 0.24
CCL4	C-C motif chemokine ligand 4	0.03633344 0.0093068488 X 0.0318
FAM81B	Family with sequence similarity 81 member B	X 0.01504963 0.00795 0.00136
GP1BA	Glycoprotein Ib platelet alpha subunit	X X 0.0132 0.0138
ADRB2	Adrenoceptor beta 2	0.05003837 0.0075264895 0.030226 0.000546
SPON2	Spondin 2	X X X 0.00210098
MCUR1	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1	X 0.00476835 X 0.0158

TBX21	T-box 21	0,0000023 0.28756029 0.00417 0.00002844
RAMP1	Receptor activity modifying protein 1	0.010673615 0.00115757 0.00913743 0.0185
TSPAN13	Tetraspanin 13	0.0079020885 0.033233803 0,033233803 0.0252
ACRBP	Acrosin binding protein	0.03378563 0.00037243 0.0491 X
CLIC3	Chloride intracellular channel 3	0.0014134 0.00022951 0.00931 0.0014134
ADGRG1	Adhesion G protein-coupled receptor G1	0.00064201 X X X
CLEC1B	C-type lectin domain family 1 member B	0.014257002 0.0009691 0.021 0.00164
FAXDC2	Fatty acid hydroxylase domain containing 2	0.011597922 0.0009905 X

		0.00414
SFRS2B	Serine and arginine rich splicing factor 8	X X 0.0007905 X
TAS2R46	Taste 2 receptor member 46	X 0.01669049 0.00192 X
SAMD3	Sterile alpha motif domain containing 3	0.00039395 0.007125129 0.00525 0.000287
MATK	Megakaryocyte-associated tyrosine kinase	0.00261284 0.0035183 0.000109 0.00261284
TMEM130	Transmembrane protein 130	X 0.00846233 0.00401 0.00812
RHOBTB3	Rho related BTB domain containing 3	X 0.0384199 0.00398 X
DGKB	Diacylglycerol kinase beta	X 0.0108532 0.000353 0.0285
KLRC2	Killer cell lectin like receptor C2	X X

		0.0076 X
TUBB1	Tubulin beta 1 class VI	0.06526808 0.00512764 0.0400598 0.00984
CACNA2D2	Calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 2	0.0307462 0.02633873 0.000711 0.0307462
TNFSF4	Tumor necrosis factor superfamily member 4	0.039536905 0.04523034 0.016 0.00112
PRTFDC1	Phosphoribosyl transferase domain containing 1	X 0.00031196 0.0167 0.0421
CBARP	CACN beta subunit associated regulatory protein	X 0.0003386 X 0.00693
ABCB5	ATP binding cassette subfamily B member 5	X 0.01175929 0.0127 0.00785
PTGDR	Prostaglandin D2 receptor	0,00000000863 0.06414302 0.00193 X
CDK2AP1	Cyclin dependent kinase 2 associated protein 1	0.23344799

		0.00030476 0.0163 0.00223
FASLG	Fas ligand	X 0.0098371 0.0482 0.00147808
FGB	Fibrinogen beta chain	X 0.00230045 0.0606 0.0218
ANK2	Ankyrin 2, neuronal	0.00247985 0.035930922 0,0105 0.468
ENPP5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)	X 0.0083799879 0.0156 3.83e-06
SYTL2	Synaptotagmin like 2	0.50750027 0.24492834 0,0083799879 0.0641
CA2	Carbonic anhydrase 2	0.00047793 0.00273274 0.0199 0.0183
KLRG1	Killer cell lectin like receptor G1	0.0068581828 0.0084525028 0.000165 0.00272

SH2D1B	SH2 domain containing 1B	0.00416467 0.00133599 X 0.00416467
PDGFA	Platelet derived growth factor subunit A	0.78209366 0.00801978 0.00762 0.00623
CXCR6	C-X-C motif chemokine receptor 6	X 0.0038616 0.00777 0.0359
C1orf186	Chromosome 1 open reading frame 186	0.0050287093 0.02186886 0.000352 X
RORA	RAR related orphan receptor A	0.012334257 0.008745357 0.000384 0.0172
PRF1	Perforin 1	0.00036667 0.26548625 0.0127 0.00036667
DHH	Desert hedgehog	0.0065920208 0,00407 0.228 0.854
OLIG1	Oligodendrocyte transcription factor 1	0.0331679 0.19994209 0,019994209

		0.747
LENEP	Lens epithelial protein	X 0,0335 0.00699 0.0335
IGF2BP3	Insulin like growth factor 2 mrna binding protein 3	0.07989102 0.00011747 0.00698 0.00283
AKR1C3	Aldo-keto reductase family 1, member C3	0.011786013 0.00012249 0.0117 8.1e-05
PF4	Platelet factor 4	0.02823852 0.011786013 0.0114 0.00705
ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S type	0.009846289 0.00272095 0.023 0.0134
FSTL1	Follistatin like 1	0.0071597178 0.00063342 X 0.0295
NMUR1	Neuromedin U receptor 1	0.00017372 0.02692962 0.000725 0.023
CMTM5	CKLF like MARVEL transmembrane domain containing 5	0.01423167 0.00094906

		0.0225 0.0487
MLH3	Mutl homolog 3	X 0.00491894 X 0.000276
NRGN	Neurogranin	0.09692924 0.00622993 0.0164 0.00673
SMOX	Spermine oxidase	0.025510042 X 0.0004428 0.0139
NLRC3	NLR family CARD domain containing 3	0.03579315 0.010533119 0,010533119 0.00813
SSBP3	Single stranded DNA binding protein 3	0.020272562 0.013076477 0.000441 0.000284
GATA2	GATA binding protein 2	X 0.00038917 X 0.00626
PTGDS	Prostaglandin D2 synthase	0,00000000123 0.02720486 0.0208 1.23e-09

PRKAR2B	Protein kinase camp-dependent type II regulatory subunit beta	0.06523722 0,00004262 X 0.0123
MYLK	Myosin light chain kinase	0.04667671 0.00114622 0.0123 X
NDP	NDP, norrin cystine knot growth factor	X 0.04248087 0.0109173 0.00525
RFTN2	Raftlin family member 2	X 0.00994632 0.00024 0.00653
SLC9C1	Solute carrier family 9 member C1	X 0.00144588 X X
GNLY	Granulysin	0.03261128 0.04920848 0.0255 0.000432
GZMM	Granzyme M	0.00487379 0.006201182 0.00111 0.00487379
CST7	Cystatin F	0.0054077069 0.0052571287 0.00618

		0.0054077069
CPA3	Carboxypeptidase A3	0.032701393 0.00235468 0,00806 0.00804
C5orf53	(IGIP) iga inducing protein	X X 0,0000159 X
EHD3	EH domain containing 3	0.01218821 0.0120404 0.0216 0.0134
CDK11A	Cyclin dependent kinase 11A	X X 0.00106 X

Tabela com os genes down-regulated pelo cigarro. Na sequência de cima para baixo são os valores de P correspondente dos genes de cada estudo, GSE23323; GSE47415; GSE55962 e GSE87072, respectivamente. “X” indica que determinado gene não estava presente naquele estudo.

CO-EXPRESSÃO	**88,72%**
CO-LOCALIZAÇÃO	5,50%
INTERAÇÕES FÍSICAS	3,62%
VIAS	1,32%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,42%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,30%
PREDITOS	0,11%

Anexo 4 – Dados dos 73 genes *Up-regulated* pelo Cigarro

- Na sequência, de cima para baixo, são mostrados os valores de P correspondente aos genes de cada estudo, GSE23323; GSE47415; GSE55962 e GSE87072, respectivamente. “X” indica que determinado gene não estava presente naquele estudo.

Genes	Nome	Valor de P
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein	0.007979045 0.08395868 0.0135 0.00614
FAM83E	Family with sequence similarity 83 member E	0.00160027 0.01039101 0.0228 0.00938
NAIP	NLR family apoptosis inhibitory protein	0.007979045 0.008395868 0.0135 0.00614
SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	0.02782105 0,00790803 0,0261 0,0000000163
NEK2	NIMA related kinase 2	X 0,00007428 0.0169 0,0474
EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 2	X X 0,0000562 X
NHLH2	Nescient helix-loop-helix 2	X

		0.00262335 0.0366 0.0285
CCNE2	Cyclin E2	X 0.00076671 0.0212 0.0152
PCDHGA3	Protocadherin gamma subfamily A, 3	X 0.00024227 0.0294 0.0367
RSAD2	Radical S-adenosyl methionine domain containing 2	0.05065947 0.1639732 0.00225 0.0129
SCN5A	Sodium voltage-gated channel alpha subunit 5	X 0.00688677 0.0118 X
ZP1	Zona pellucida glycoprotein 1	X 0.0051395 0.000119 X
LRRC70	Leucine rich repeat containing 70	0.00020819 X X X
MX1	MX dynamin like gtpase 1	X 0.07560337 0.000913 X

KCNJ13	Potassium voltage-gated channel subfamily J member 13	X 0,00001885 0.00785 X
OTOP2	Otopetrin 2	0.0031563 X X 0.00807
OMG	Oligodendrocyte myelin glycoprotein	X 0.0307501 0.00433 X
ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	0.04196127 X 0.00076 X
AMELX	Amelogenin, X-linked	X 0.00535781 0.000455 X
SLC32A1	Solute carrier family 32 member 1	0.03896378 0.03508106 0.0197 X
TRPC4	Transient receptor potential cation channel subfamily C member 4	X 0.00090253 X X
IFI44L	Interferon induced protein 44 like	X 0.07725587 0.00485

		X
GPR15	G protein-coupled receptor 15	X 0,00001984 0,00000184 0,0000000000063
OLAH	Oleoyl-ACP hydrolase	X 0.02804853 0.029554 X
KRT17	Keratin 17	0.00030241 0.0414809 X X
IFI44	Interferon induced protein 44 like	X 0.07725587 0.00485 X
HLF	HLF, PAR bzip transcription factor	0.00003974 0.70577369 0.0322 X
HP	Haptoglobin	0.0366698 X 0.000122 X
C19orf59	Mast cell expressed membrane protein 1	X X 0.000201 X
AGR2	Anterior gradient 2, protein disulphide isomerase family member	X 0.00515528 0.00876

		X
GLRA1	Glycine receptor alpha 1	X 0.00074127 0.0175 X
HERC5	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase 5	X 0.0994654 0.002 X
OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1	X X 0.0114 X
TSPAN7	Tetraspanin 7	X 0.00646345 0.000273 X
MARC2	Mitochondrial amidoxime reducing component 2	X 0.00215681 X 0.0274
C20orf173	Chromosome 20 open reading frame 173	X 0.03772344 0.0021 X
IFIT3	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 3	0.02416215 X 0.00346 X
ACOX2	Acyl-coa oxidase 2	0.00284594 X

		0.00722 0.00948
C1QC	Complement C1q C chain	X 0.00486558 0.0169 X
TRPM8	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 8	X 0.04729443 0.000776 X
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase like	0.05411906 X 0.012 X
PLEC	Pleckstrin 2	X 0.02669068 X X
LRRN3	Leucine rich repeat neuronal 3	X 0.00639393 X 0,00000261
PALMD	Palmdelphin	X 0.0063819 0.00376 X
IFIT1	Interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1	X X 0.00752 X
SAMD7	Sterile alpha motif domain containing 7	X

		0.01312961 0.000278 X
KRT7	Keratin 76	X 0.00016244 0.0494 X
KRTAP4-6	Keratin associated protein 4-6	X 0.00079498 X X
IFI6	Interferon alpha inducible protein 6	X 0.08325724 0.00719 X
HOXD13	Homeobox D13	0.00174336 X X 0.0156
SIPA1L2	Signal induced proliferation associated 1 like 2	0.00371546 0.00419068 0.00484 X
UNC5D	Unc-5 netrin receptor D	X 0.00149605 0.00358 X
DRD1	Dopamine receptor D1	X 0.02223793 0.000374 X

MORN1	MORN repeat containing 1	X 0.00170846 0.0261 X
AHRR	Aryl-hydrocarbon receptor repressor	X 0,00001908 0.0136 0.00222
GPR61	G protein-coupled receptor 61	X 0.00387946 0,0000662 X
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	0.00901588 0.00101743 X X
GSG1	Germ cell associated 1	X 0.00142739 X X
CTTNBP2	Cortactin binding protein 2	X 0.00887769 0.00509 0,00000918
OLFM3	Olfactomedin 3	X 0.01103534 0.0413 0.0131
FUCA1	Fucosidase, alpha-L- 1, tissue	0.02514427 0.00193184 X 0.0134

GBX2	Gastrulation brain homeobox 2	X 0.023241 0.00233 X
VAX2	Ventral anterior homeobox 2	0.00167482 0.03873356 X X
KRT24	Keratin 24	X 0.00288315 0.0292 0.0908
EGFR	Epidermal growth factor receptor	0.00187931 X 0.0223 0.0874
FPR3	Formyl peptide receptor 3	0.0229181 X 0.00361 0.0291
EGFL6	EGF like domain multiple 6	X 0.02211733 0.0495 0.00575
FAM47A	Family with sequence similarity 47 member A	X 0,00008344 X X
ADAMTS17	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif 17	X 0.00640659 X

		0.00136
ADH4	Alcohol dehydrogenase 4 (class II), pi polypeptide	X 0.00036834 0.00943 X
CYP3A4	Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4	X 0.0088969 0.0146 X
RFPL2	Ret finger protein like 2	0.00005638 X 0.00275 X
PRSS37	Protease, serine 37	X 0,00002378 X X

CO-EXPRESSÃO	**43,75%**
VIAS	15,49%
INTERAÇÕES FÍSICAS	8,47%
PREDITOS	1,37%
CO-LOCALIZAÇÃO	0,85%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,36%

Anexo 5 – Dados dos 86 genes *Down-regulated* pela tB-HQ

Genes	Nome	Valor de P
KBTBD2	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0,00249971
COX6A2	Cytochrome c oxidase subunit via polypeptide 2	0,00021692
DUSP14	Dual specificity phosphatase 14	0,00058617
ITGA6	Integrin alpha 6	0,006636673
GSK3B	GSK3B interacting protein	0,005171902
SEMA3D	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	0,00699066
PLXDC2	Plexin domain containing 2	0,00028187
CLEC10A	C-type lectin domain family 10, member A	0,00009714
PAQR5	Progestin and adipoq receptor family member V	0,00040525
DNAJB6	Dnaj heat shock protein family (Hsp40) member B6	0,00501709
COL17A1	Collagen, type XVII, alpha 1	0,00188829
FRAT2	Frequently rearranged in advanced T cell lymphomas 2	0,00057309
CSNK2A1	Casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	0,012591059
OSER1	Oxidative stress responsive serine rich 1	0,00559426
CYB561A3	Cytochrome b561 family, member A3	0,00623328
HAUS2	HAUS augmin-like complex, subunit 2	0,00308939
FBXO32	F-box protein 32	0,007311
SPNS3	Spinster homolog 3	0,00637397
RGS2	Regulator of G-protein signaling 2	0,00690993
BHLHE40	Basic helix-loop-helix family, member e40	0,00200469
KBTBD2	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 2	0,00249971
ITGB4	Integrin beta 4	0,026532043
HEY1	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,00399146
DYRK3	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	0,0019214
HS3ST1	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 1	0,00160872
TGIF2	TGFB-induced factor homeobox 2	0,00725222
SPTY2D1	SPT2, Suppressor of Ty, domain containing 1 (S. Cerevisiae)	0,00347618

CCR9	Chemokine (C-C motif) receptor 9	0,00528513
CD86	CD86 antigen	0,020326846
SPIB	Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)	0,0064668
HPSE	Heparanase	0,00542523
KPNA1	Karyopherin (importin) alpha 1	0,00807222
GRB7	Growth factor receptor bound protein 7	0,00393473
PLK2	Polo-like kinase 2	0,00186623
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4	0,00822907
CCDC122	Coiled-coil domain containing 122	0,00601692
GZMA	Granzyme A	0,0003194
PER1	Period circadian clock 1	0,028637273
EPHA2	Eph receptor A2	0,00018881
UPB1	Ureidopropionase, beta	0,00014183
REL	MAS-related GPR, member A2B	0,00601654
KLK1	Kallikrein 1	0,00026348
DFFB	DNA fragmentation factor, beta subunit	0,042655093
ZFAND2A	Zinc finger, AN1-type domain 2A	0,00344127
FBXL13	F-box and leucine-rich repeat protein 13	0,00620334
TSC22D1	TSC22 domain family, member 1	0,00723469
LAMC2	Laminin, gamma 2	0,010105729
LAMB1	Laminin B1	0,00072157
PLAC8	Placenta-specific 8	0,00834892
RNASE6	Ribonuclease, rnase A family, 6	0,00655469
TNFRSF17	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 17	0,00162089
SLC41A2	Solute carrier family 41, member 2	0,00035321
ZC3H12C	Zinc finger CCCH type containing 12C	0,00012526
SLAMF9	SLAM family member 9	0,00654731
ATF3	Activating transcription factor 3	0,00282482
NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	0,005593344
HMGN3	High mobility group nucleosomal binding domain 3	0,00402134
BCL10	B cell leukemia/lymphoma 10	0,00428907

ASNS	Asparagine synthetase	0,018642404
CAPZB	Capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	0,0063953
SLCO4A1	Solute carrier organic anion transporter family, member 4a1	0,00069798
FAM222A	Family with sequence similarity 222, member A	0,00268972
CDH1	Cadherin 1	0,00094176
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	0,0848752
TAB2	Stabilin 2	11687791
DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	0,00047917
DFFA	DNA fragmentation factor, alpha subunit	0,00810282
SCML2	Sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	0,00689207
PNMA1	Paraneoplastic antigen MA1	0,00782427
YPEL4	Yippee-like 4 (Drosophila)	0,00451409
GEM	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	0,00617254
DUSP4	Dual specificity phosphatase 4	0,00047917
LAMA3	Laminin, alpha 3	0,049204654
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor subfamily G, member 1	0,00515281
UBE2V1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1	0,00659822
DUSP10	Dual specificity phosphatase 10	0,00007321
LRRC16A	Leucine rich repeat containing 16A	0,00121899
ZFYVE28	Zinc finger, FYVE domain containing 28	0,00275954
NFIL3	Nuclear factor, interleukin 3, regulated	0,00038503
KLF11	Kruppel-like factor 11	0,00406669
LAMB3	Laminin, beta 3	0,008155
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11	0,005429195
CD300C	CD300C molecule	0,00106513
ITGA7	Integrin alpha 7	0,00676748
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	0,00117496
GAPT	Grb2-binding adaptor, transmembrane	0,00750156

CO-EXPRESSÃO	**44,16%**
VIAS	20,86%
INTERAÇÕES FÍSICAS	20,75%
PREDITOS	8,77%
CO-LOCALIZAÇÃO	3,22%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	1,48%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,75%

Anexo 6 – Dados dos 120 genes *Up-regulated* pela tB-HQ

Genes	Nome	Valor de P
MMP8	Matrix metallopeptidase 8	0,0000796
TGFBI	Transforming growth factor, beta induced	0,0013093
MND1	Meiotic nuclear divisions 1	0,0329313
G0S2	G0/G1 switch gene 2	0,0002882
EMILIN2	Elastin microfibril interfacer 2	0,0007356
GDA	Guanine deaminase	0,0004933
FUT7	Fucosyltransferase 7	0,0010110
BST1	Bone marrow stromal cell antigen 1	0,0079959
HMOX1	Heme oxygenase 1	0,0462016
DDIT4	DNA-damage-inducible transcript 4	0,0072863
C1QA	Complement component 1, q subcomponent, alpha polypeptide	0,0021161
MATN1	Matrilin 1, cartilage matrix protein	0,0000294
SCRG1	Scrapie responsive gene 1	0,0032278
IER3	Immediate early response 3	0,0005466
APOC1	Apolipoprotein C-I	0,0108426
IL1B	Interleukin 1 beta	0,0040815
ARG2	Arginase type II	0,00751
COQ3	Coenzyme Q3 methyltransferase	0,000042
VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	0,0045546
PYGL	Liver glycogen phosphorylase	0,0056252
ARG1	Arginase, liver	0,0081339
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	0,00263995
HDC	Histidine decarboxylase	0,00230829
GCNT2	Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	0,00214361
HNMT	Histamine N-methyltransferase	0,0026672
NFE2	Nuclear factor, erythroid derived 2	0,00004758
IGSF6	Immunoglobulin superfamily, member 6	0,01687611
ALOX5AP	Arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	0,042057

LRP1	Low density lipoprotein receptor-related protein 1	0,001912
PPP1R3D	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3D	0,00035685
CD163	CD163 antigen	0,00776709
CSF3R	Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0,0004526
FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	0,030728
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	0,061438
INHBA	Inhibin beta-A	0,0073469
LILRA6	Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 6	0,00372811
SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	0,00015379
IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2	0,0004971
IL6	Interleukin 6	0,04931002
HACD4	3-hydroxyacyl-coa dehydratase 4	0,00813989
LRG1	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1	0,00082707
HRH4	Histamine receptor H4	0,00422027
LCN2	Lipocalin 2	0,00026163
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	0,00508396
GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0,0028517
CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	0,00654373
HS3ST2	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 2	0,00387272
ACOD1	Aconitate decarboxylase 1	0,00271568
S100A9	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	0,00012153
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	0,00046385
CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	0,00109143
B3GNT4	UDP-glcnac:betagal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4	0,00724509
RAB3IL1	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1	0,00532892
TRIM50	Tripartite motif-containing 50	0,00557576
PLA2G7	Phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	0,00432654
CD14	CD14 antigen	0,00177981
CLEC4E	C-type lectin domain family 4, member E	0,00081333

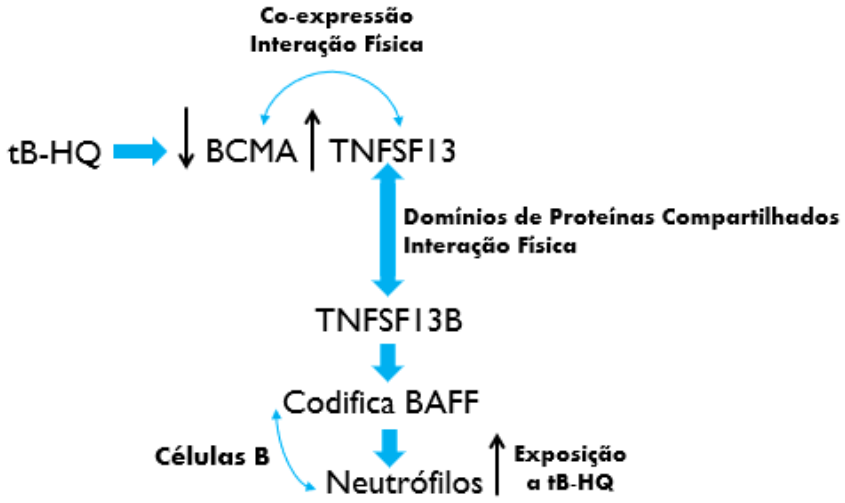
TSGA13	Testis specific gene A13	0,00331595
LHFP	Lipoma HMGIC fusion partner	0,0066709
SEPN1	Selenoprotein N, 1	0,00317537
CXCL2	Chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0,00110011
S100A12	S100 calcium binding protein A12	0,00256
MGST1	Microsomal glutathione S-transferase 1	0,00358076
DRD3	Dopamine receptor D3	0,00490106
DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1	0,00834004
IL1F9	Interleukin 1 family, member 9	0,00001537
MMP7	Matrix metallopeptidase 7	0,00280808
AQP9	Aquaporin 9	0,03254625
PILRA	Paired immunoglobin-like type 2 receptor alpha	0,00685638
EDN1	Endothelin 1	0,00311576
CXCR2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 2	0,00005615
MEIG1	Meiosis expressed gene 1	0,002849
LGMN	Legumain	0,0046759
FCGR2A	Fc receptor, igg, low affinity IIA	0,0349594
PILRA	Paired immunoglobin-like type 2 receptor alpha	0,00685638
HP	Haptoglobin	0,00029133
GZMB	Granzyme B	0,0002933
SLC16A3	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3	0,00266274
S100A8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	0,00004947
RNASE2	Ribonuclease, rnase A family, 2A (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	0,02987031
SLC11A1	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	0,00390684
TSPAN4	Tetraspanin 4	0,00229747
DMXL2	Dmx-like 2	0,00324232
SGMS2	Sphingomyelin synthase 2	0,00209158
C1QB	Complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	0,0029763
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	0,0352822

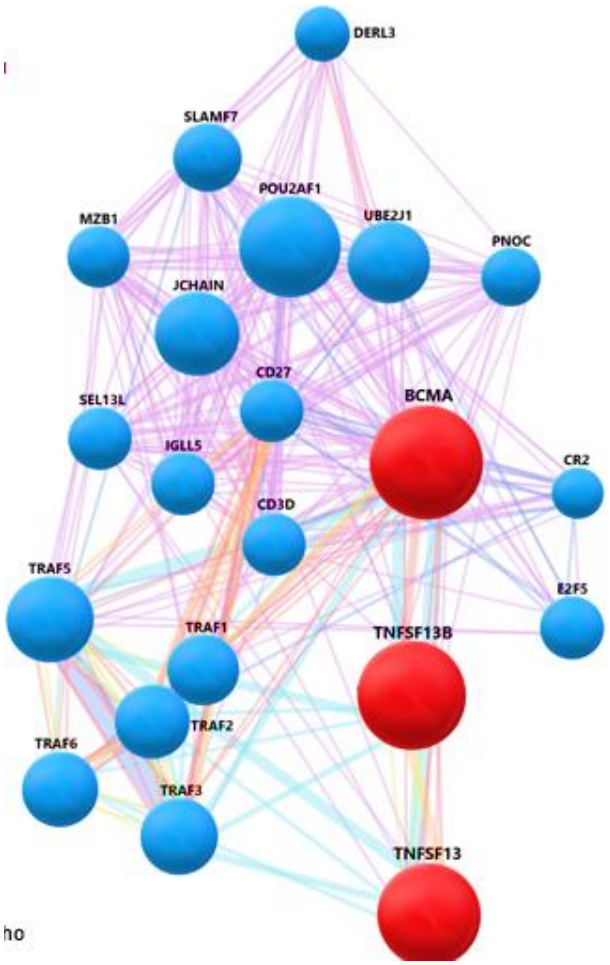
TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13	0,00614105
OSM	Oncostatin M	0,00112876
MCF2	Mcf.2 transforming sequence	0,00284302
PLIN5	Perilipin 5	0,00292651
MMP9	Matrix metallopeptidase 9	0,0000584
TLR2	Toll-like receptor 2	0,01487867
CD33	CD33 antigen	0,00259037
C6	Complement component 6	0,00218817
GJA1	Gap junction protein, alpha 1	0,000824
TRNP1	TMF1-regulated nuclear protein 1	0,0005603
APOE	Apolipoprotein E	0,00100412
NCF2	Neutrophil cytosolic factor 2	1953834
F5	Coagulation factor V	0,0062334
GAS6	Growth arrest specific 6	0,00458958
STEAP4	STEAP family member 4	0,00031724
CELA1	Chymotrypsin-like elastase family, member 1	0,00671343
FPR1	Formyl peptide receptor 1	0,0022518
C3AR1	Complement component 3a receptor 1	0,0090689
SULT1A1	Sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	0,00782242
F10	Coagulation factor X	0,00608495
MRAP	Melanocortin 2 receptor accessory protein	0,0010137
SFXN5	Sideroflexin 5	0,00331257
TNFAIP2	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	473397
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	0,0051562
ALOX5	Arachidonate 5-lipoxygenase	0,0007816
FPR2	Formyl peptide receptor 2	0,00090337
ITGA11	Integrin alpha 11	0,00801561
TMEM178	Transmembrane protein 178	0,00310638
NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	0,00661431
FCER1G	Fc receptor, ige, high affinity I, gamma polypeptide	0,00950766
IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1	0,00118417

STAC2	SH3 and cysteine rich domain 2	0,00271953
PI16	Peptidase inhibitor 16	0,0021025
ASPRV1	Aspartic peptidase, retroviral-like 1	0,00025894

CO-EXPRESSÃO	84,20%
CO-LOCALIZAÇÃO	8,95%
PREDITOS	3,29%
CAMINHOS	0,31%
INTERAÇÕES FÍSICAS	2,87%
INTERAÇÕES GENÉTICAS	0,22%
DOMÍNIOS DE PROTEÍNAS COMPARTILHADOS	0,16%

Anexo 7 – Esquema do aumento de BAFF pela exposição com a tB-HQ e rede de interações gênicas





Gene BCMA (Proteína de maturação de células B)
TNFSF13B (BAFF – Fator de Ativação de células B)
TNFSF13 (Membro da Superfamília de Ligantes do Fator de Necrose Tumoral 13)

Genes que interagem com os genes em vermelho

Interações Físicas	67,64%
Co-expressão	12,50%
Preditos	6,35%
Co-localização	6,17%
Interações Genéticas	1,40%
Domínios de proteínas compartilhados	0,59%

Anexo 8 – Ficha do Aluno - Janus

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

9136 - 9588486/1 - Andre Vinicius Nunes

Email:	andrenunes@usp.br
Data de Nascimento:	09/12/1992
Cédula de Identidade:	RG - 55247831-3 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em farmácia e Bioquímica - Universidade Nove de Julho - São Paulo - Brasil - 2015

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	30/01/2017
Início da Contagem de Prazo:	30/01/2017
Data Limite para o Depósito:	30/07/2019
Orientador Acadêmico:	Prof(a). Dr(a). Sandro Rogerio de Almeida - 30/01/2017 até 07/03/2017. Email: sandroal@usp.br
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Eduardo Lani Volpe da Silveira - 08/03/2017 até o presente. Email: eduardosilveira@usp.br
Co-orientador:	Prof(a). Dr(a). Viviane Schuch - 12/12/2018 até o presente. Email: vivischuch@gmail.com
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 30/01/2017
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 21/03/2018
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 30/01/2017

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019
Impresso em: 05/02/2019 15:54:02

Anexo 9 – Histórico Janus

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

9136 - 9588486/1 - Andre Vinicius Nunes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5793-13/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	07/03/2017	19/06/2017	15	1	100	A	N	Concluída
BMI5862-10/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia I (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/03/2017	21/06/2017	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
MCM5772-7/3	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	03/04/2017	30/04/2017	60	4	90	B	N	Concluída
ICB5724-2/2	Princípios e Aplicações da Citometria de Fluxo (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	06/04/2017	07/06/2017	90	6	80	B	N	Concluída
FBC5747-2/2	Toxicologia Forense	15/05/2017	18/06/2017	60	4	90	A	N	Concluída
FBC5780-2/4	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	07/08/2017	17/09/2017	90	0	95	R	N	Concluída
FBC5757-8/1	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	15/08/2017	27/11/2017	15	1	80	A	N	Concluída
BMI5863-9/1	Seminário Didático-Científico em Imunologia II (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	17/08/2017	29/11/2017	60	4	100	A	N	Concluída
MCM5896-2/3	HIV: Sexo, Sociedade e Ciência (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	29/08/2017	11/12/2017	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
ICB5752-1/3	Como Comunicar Sua Ciência: Melhorando a Oratória e a Empatia com o Público (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/10/2017	29/10/2017	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMI5901-1/1	Anticorpos Monoclonais na Clínica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/03/2018	20/05/2018	90	6	95	B	N	Concluída
BMM5801-6/1	Vacinas e a Microbiologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	02/04/2018	15/04/2018	60	4	100	A	N	Concluída
ICB5771-1/1	Vivências na Aplicação de Bioinformática à Imunologia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/08/2018	19/08/2018	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	32
Estágios:			
Total:	0	25	32

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 04/02/2019

Anexo 10 – Currículo Lattes - 2019

André Vinicius Nunes

Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/0726915205315273
Última atualização do currículo em 15/03/2017

Farmacêutico-Bioquímico atuante em Laboratório Clínico. Aluno do Curso de Mestrado no programa de Fisiopatologia e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP). Aperfeiçoamento Prático em Análises Clínicas pelo Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU-USP). Possue Graduação em Farmácia-Bioquímica pela Universidade Nove de Julho e Curso Técnico em Farmácia pelo Colégio Politécnico Dom Luciano (CPDL_MG). Atuou em Análises Clínicas (Imunologia/Nefelometria/Controle de Qualidade): Diagnóstico da América (DASA); BioFast Medicina (Bioquímica/Controle de Qualidade); HNSF-OSASCO com Hematologia, Uroanálise, Bioquímica e Coleta sanguínea de caratér de Urgência e Emergência. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome	André Vinicius Nunes
Nome em citações bibliográficas	NUNES, A. V.

Endereço

Endereço Profissional	Hospital Nossa Senhora de Fátima. Praça Duque de Caxias, 54 Centro 06455010 - Osasco, SP - Brasil Telefone: (11) 25751282

Formação acadêmica/titulação

2017	Mestrado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Hydroquinone effects on the immune response to viral vaccines.,Orientador: Eduardo Lani Volpe da Silveira. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Avaliação e análises toxicológicas. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Fisiopatologia e diagnóstico laboratorial. Setores de atividade: Atividades de atenção à saúde humana; Atividades de vigilância, segurança e investigação.
2015 - 2016	Aperfeiçoamento em Análises Clínicas. (Carga Horária: 1200h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Prevalência dos casos de sífilis na população atendida no HU no período de 2001 a 2015. Ano de finalização: 2016. Orientador: Célia Nunes Pinez.
2011 - 2015	Graduação em Farmácia e Bioquímica. Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil. Bolsista do(a): Prouni, PROUNI, Brasil.
2009 - 2011	Curso técnico/profissionalizante. Colégio Politécnico Dom Luciano, CPDL, Brasil. Bolsista do(a): Programa de Educação Profissional, PEP, Brasil.
2008 - 2010	Ensino Médio (2º grau). ESCOLA ESTADUAL PROFESSOR JOSEFINO BARBOSA, EEPJB, Brasil.

Formação Complementar

2015 - 2015 Extensão universitária em Análises Clínicas - Hospital Universitário. (Carga horária: 1200h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional
2017 - Atual Vínculo: , Enquadramento Funcional:

Hospital Nossa Senhora de Fátimca, HNSF, Brasil.

Vínculo institucional
2014 - Atual Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Laboratorista, Carga horária: 44

DIAGNÓSTICO DA AMÉRICA, DASA, Brasil.

Vínculo institucional
2011 - 2013 Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Técnico em Análises Clínicas, Carga horária: 44
Outras informações Rotina Analítica no setor de Imunologia.

Universidade Nove de Julho, UNINOVE, Brasil.

Vínculo institucional
2015 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Aluno Pesquisador, Carga horária: 20
Outras informações Estágio extracurricular em "Desenvolvimento de Fármacos" e "Controle de Qualidade aplicado a Pesquisa e Desenvolvimento em Fármacos e Cosméticos".

Projetos de pesquisa

2017 - Atual Hydroquinone effects on the immune response to viral vaccines.
Descrição: Cigarette smoke (CS) has been in the spotlight regarding toxicity for human and environmental health. It comprises more than 4,500 toxic substances and among them, hydroquinone (HQ) has standed out. In filtered and unfiltered cigarettes, HQ has been found in 100-300ng range. It is suggested that HQ impact directly active and passive smokers as it is a product of benzene biotransformation. Besides CS, HQ can be released from fuel burning and natural and anthropogenic sources, such as food, cosmetics, rubber, ink and oil. Literature shows that HQ presents hematotoxicity, carcinogenic effects and elicits local (lung) and systemic immunossupression. Considering the direct association between CS and HQ release, it has been demonstrated that chronic CS inhalation usually reduces several functions of the immune system, dampening innate and adaptive immune responses. Data from our research group has pointed out mice exposed to aerosol HQ present diminished innate response and inflammation induced by allergens. Also, HQ exposure aggravates collagen-inducing rheumatoid arthritis in rats. Currently, there are multiple infectious diseases striking individuals from endemic areas and vaccines are not available yet for all of them. The World Health Organization estimates that a third of human adult population is smoker. Thus, will HQ exposure influence the outcome of vaccine-eliciting immune responses? Recently, it was observed that CS-exposed C57Bl/6 mice had reduced frequency of IgG-secreting cells in the spleen and bone marrow. Consequently, those animals possessed lower antigen-specific IgG titers, increasing their susceptibility to experimental challenges. How about immune responses to viral antigens? Therefore, this project goal is to evaluate whether aerosol HQ-exposured C57Bl/6 immunized mice present alteration in the humoral and cellular response elicited by Dengue- and Hepatitis B-specific vaccines..
Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (0) / Especialização: (0) / Mestrado acadêmico: (1) / Mestrado profissional: (0) / Doutorado: (0) .

Integrantes: André Vinicius Nunes - Coordenador / Eduardo Lani Volpe da Silveira - Integrante.

Áreas de atuação

1.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: pesquisa.
2.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Análise e Controle de Medicamentos.
3.	Grande área: Ciências Biológicas / Área: Farmacologia / Subárea: Anatomia Patológica e Patologia Clínica.
4.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: pesquisa e desenvolvimento.
5.	Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmácia.

Idiomas

Inglês	Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Citações

SciELO

Total de trabalhos: 1Total de citações: 1

nunes, v a Data: 22/04/2013

Apresentações de Trabalho

1. **NUNES, A. V.**; Sousa. P, A . Monitoria de Química Geral e Orgânica. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).
2. **NUNES, A. V.**; Pai. D, J . Monitoria de Morfologia Humana e Neurociências. 2013. (Apresentação de Trabalho/Comunicação).

Inovação

Projetos de pesquisa

Outras informações relevantes

Monitor de Morfologia Humana I e II, Química Geral, Orgânica e Inorgânica.

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 17/09/2017 às 14:18:40

Imprimir currículo

Nome do aluno: André Vinicius Nunes	Código USP (Obrigatório): 9588486
Curso: (X) Mestrado ( ) Doutorado ( ) Doutorado Direto	Código da Área: 9136
Nome do Orientador: Eduardo Lani Volpe da Silveira	
E-mail: andrevinicius.nunes@gmail.com	E-mail USP: andrenunes@usp.br

DECLARAÇÃO

Declaro que o documento intitulado **"**Influência da Hidroquinona nas respostas imune humoral e celular induzida por vacina viral com proteína recombinante (Dengue)" foi escrito por mim e que as citações de outros autores estão devidamente indicadas e referenciadas no texto. Declaro, ainda, que esse documento foi submetido a análise de similaridade pela ferramenta OriginalityCheck (Turnitin) para garantir sua integridade quanto à ocorrência de plágio.

São Paulo, 17 de Julho de 2019

Assinatura do(a) Aluno(a)

De acordo,

Assinatura do(a) Orientador(a)