



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CÉNCIAS DA SAÚDE  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

FRANK SILVA BEZERRA

**ANÁLISE DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DA N-ACETILCISTEÍNA, DO  
ALOPURINOL E DO MERCAPTOPROPIONILGLICINA SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE  
CIGARRO**

Rio de Janeiro  
2009

FRANK SILVA BEZERRA

**ANÁLISE DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DA N-ACETILCISTEÍNA, DO  
ALOPURINOL E DO MERCAPTOPROPIONILGLICINA SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE  
CIGARRO**

Tese submetida ao programa de ciências morfológicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro para a obtenção do título de Doutor em Ciências Morfológicas.

Área de concentração: Morfologia

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão Sobrino  
Porto

Co-Orientador: Prof. Walter Araujo Zin

Rio de Janeiro  
2009

**“ANÁLISE DOS EFEITOS ANTIOXIDANTES DA N-ACETILCISTEÍNA, DO  
ALOPURINOL E DO MERCAPTOPROPIONILGLICINA SOBRE A RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE  
CIGARRO”**

**FRANK SILVA BEZERRA**

TESE SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS  
(MORFOLOGIA)

APROVADA POR:

---

Presidente, Prof. Vivaldo Moura Neto

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Farias Benjamim

---

Prof. Dr. Alysson Roncally Silva Carvalho

---

Prof. Dr. Cláudio de Azevedo Canetti

---

Prof. Dr. Luis Cristóvão de Moraes Sobrino Porto

Rio de Janeiro, RJ, Brasil  
16 de outubro de 2009

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela minha saúde, força de vontade, paciência e pela realização deste sonho.

Agradeço em segundo lugar, a família BEZERRA, em especial minha mãe, Belquice Silva Bezerra, e meu pai, Francisco Das Chagas Bezerra, fonte da inspiração inesgotável e, que, sem dúvida alguma, é a minha razão para viver. Às minhas queridas irmãs, Berenice Silva Bezerra, Belquimá Silva Bezerra, Fabíola Silva Bezerra e Fabiene Silva Bezerra, obrigado por vocês existirem, eu as amo muito! Eu também gostaria de agradecer a minha avó querida, Dona Francisca, a matriarca dessa família.

Agradeço ao Prof. Samuel dos Santos Valença, pelo companheirismo, cumplicidade, horas de experimentos noturnos, alegrias, frustrações e grandes vitórias até agora alcançadas.

Agradeço ao meu irmão Jorge Vicente Monteiro da Silva, você faz parte da minha história, obrigado por tudo.

Agradeço aos alunos de iniciação científica, Alan de Aguiar Lopes e Thiago Dos Santos Ferreira, pela contribuição e dedicação fundamental para a realização desse trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório “Os inflamados e as Reparadas”, pois através de seus conselhos, serviços e apoio, foram possíveis algumas realizações nesse trabalho.

Agradeço Akinori Cardozo Nagato e Marco Aurélio dos Santos Silva, vocês sabem o significado da palavra amizade.

Agradeço a Prof.<sup>ª</sup> Andréa Monte Alto Costa, pelos conselhos, orientações e cobranças ao longo de todo trabalho e durante a realização desta pós-graduação.

Agradeço aos técnicos Roberto, Marcelo, Fábio e Mauro do Departamento de Histologia e Embriologia, pelas atividades referentes a serviços de microtromia para o projeto de pesquisa.

Agradeço ao Prof. Walter Araujo Zin, pelos conselhos, orientações essenciais para a realização desse e de outros trabalhos.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto, que foi a pessoa responsável por tudo, desde a idealização à realização desse presente estudo. Muito obrigado Professor!

“Vossa palavra é um facho que ilumina meus passos, uma luz em meu caminho. Faço juramento e me obrigo a guardar os vossos justos decretos.”

(Salmos, cap. 118, VV. 105, 106.)

## RESUMO

### **Estudo 1**

O enfisema induzido pela fumaça de cigarro (CS) é causado por uma resposta inflamatória contínua no trato respiratório inferior. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes tem sido hipotetizado como principal caminho para o desenvolvimento do enfisema. O objetivo deste estudo é descrever os efeitos do longo tempo de exposição à fumaça de cigarro sobre o recrutamento de células alveolares, defesa do sistema antioxidante, zimografia, expressão de metaloelastase (MMP-12) e a proteína da alta mobilidade Box 1 (HMGB-1). Camundongos C57BL/6 foram expostos a fumaça de 12 cigarros por dia, durante 60 dias consecutivos. Animais ventilando em ar ambiente foram usados como grupo controle. Após o sacrificio, o lavado broncoalveolar foi obtido. Os pulmões foram removidos para análises bioquímicas e histológicas. Em comparação com o grupo controle, os animais do grupo CS apresentam um aumento significativo do influxo de macrófagos e neutrófilos significativos no BAL ( $P<0.001$ ), na elastância estática e na expressão de MMP-12 e HMGB-1. Todas as atividades das enzimas antioxidantes foram reduzidas no grupo CS. O longo tempo de exposição à fumaça de cigarro diminuiu as defesas antioxidantes com concomitante prejuízo da função pulmonar e o aumento da expressão do HMGB-1.

### **Estudo 2**

Investigamos os possíveis efeitos protetores do allopurinol (A), N-(2-mercaptopropionil)-glicina (M) e N-acetilcisteína (N) contra a lesão pulmonar causada pela exposição aguda e crônica à fumaça de cigarro (CS) em camundongos. C57BL/6 machos foram expostos a 6 cigarros por dia por 5 dias ou 12 cigarros por dia por 60 dias. Os camundongos foram tratados com veículo (CS5d e CS60d), 50 mg/kg/dia, A (CS5d+A e CS60d+A), 60 mg/kg/dia M (CS5d+M e CS60d+M) ou 60 mg/kg/dia, N (CS5d+N e CS60d+N). Camundongos ventilando em ar ambiente serviram como controle (AA5d and AA60d). A eficácia dos componentes antioxidantes foi avaliada por análises histológicas e bioquímicas. A contagem de células do lavado broncoalveolar estava diminuída nos camundongos CS5d+A, CS5d+M e CS5d+N comparada a dos camundongos CS5d. A contagem de células nos camundongos CS60d+M e CS60d+N estava similar àquela dos camundongos AA60d; o número de células nos camundongos CS60d+A foi maior. A atividade da superóxido dismutase (SOD) estava aumentada em todos os grupos tratados quando comparados aos camundongos AA5d e CS5d. Somente os camundongos CS5d+N mostraram aumento da atividade da glutatona peroxidase comparado aos camundongos AA5d. As atividades da SOD e da glutatona peroxidase nos camundongos CS60d+N não foi diferente daquele encontrado nos camundongos AA60d. M e N tiveram efeitos protetores contra estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro, em pulmão de camundongos.

**Palavras-chave:** Fumaça de cigarro, Inflamação pulmonar aguda, enfisema, estresse oxidativo.

## ABSTRACT

### Study 1

Cigarette smoke-induced emphysema is caused by continuous inflammatory response in the lower respiratory tract. The imbalance among oxidants and antioxidants has been hypothesized as a main pathway for development of emphysema. This study aimed to describe the effects of long-term cigarette smoke exposure on alveolar cell recruitment, antioxidant defense systems, gelatin zymography, metalloelastase (MMP-12) and high mobility group box-1 protein HMGB-1 expression. C57BL/6 mice were exposed to 12 cigarettes-a-day for 60 consecutive days. Animals exposed to ambient air were used as controls. After sacrifice, bronchoalveolar lavage fluid was obtained. The lungs were then removed for biochemical and histological analyses. In comparison with control group, CS animals showed significantly increased influx of alveolar macrophages and neutrophils in BAL ( $p<0.001$ ), static elastance, and MMP-12 and HMGB-1 expression. All antioxidant enzyme activities were reduced in CS group. Long-term cigarette exposure decreases antioxidant defenses concomitant with impaired lung function and rises HMGB-1 expression.

### Study 2

We investigated the effects of allopurinol (A), *N*-(2-mercaptopropionyl)-glycine (M) and *N*-acetylcysteine (N) against lung injury caused by acute and chronic exposure to cigarette smoke (CS) in mice. Male C57BL/6 was exposed to 6 cigarettes per day for 5 days or 12 cigarettes per day for 60 days. The mice were also treated with vehicle (CS5d and CS60d), 50 mg/kg/day A (CS5d+A and CS60d+A), 60 mg/kg/day M (CS5d+M and CS60d+M) or 60 mg/kg/day N (CS5d+N and CS60d+N). Mice exposed to ambient air served as controls (AA5d and AA60d). The efficacy of the antioxidant compounds was assessed by histological and biochemical analyses. Cell counts in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were decreased in CS5d+A, CS5d+M and CS5d+N mice compared to CS5d mice. Cell counts in CS60d+M and CS60d+N mice were similar to those of AA60d mice; cell numbers in CS60d+A mice were higher. Superoxide dismutase (SOD) activity was increased in all groups compared to that of AA5d and CS5d mice. Only CS5d+N mice showed increased glutathione peroxidase activity compared to AA5d mice. SOD and glutathione peroxidase activities in CS60d+N mice were not different from those of AA60d mice. Both M and N have protective effects against CS-induced oxidative stress in mouse lungs.

**Keywords:** Cigarette smoke, acute lung inflammation, emphysema, oxidative stress.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema anatômico do pulmão.....	7
Figura 2. Esquema anatômico do alvéolo.....	8
Figura 3. Esquema da estrutura alveolar.....	9
Figura 4. Esquema representativo do processo e recrutamento de macrófagos alveolares na inflamação.....	14
Figura 5. Representação esquemática da metaloproteinase-12.....	17
Figura 6. Representação esquemática dos movimentos torácicos durante a inspiração e expiração.....	19
Figura 7. Diagrama mostrando as incursões respiratórias durante a ventilação normal e durante a inspiração e expiração forçada.....	21
Figura 8. Esquema do controle da ventilação.....	23
Figura 9. Posição dos corpos carotídeos e aórticos com respeito ás artérias carótidas comuns e ao arco aórtico.....	24
Figura 10. Papeldas espécies reativas de oxigênio.....	30
Figura 11. Esquema da via de sinalização do TNF- $\alpha$ .....	35
Figura 12. Mecanismo de ativação do NF- $\kappa$ B mediado por espécies reativas de oxigênio e transcrição do gene pró-inflamatório.....	36
Figura 13. Câmara de inalação.....	43
Figura 14 . Técnica de gavagem orogástrica.....	45
Figura 15. Circuito do Ventilador Mecânico.....	59
Figura 16. Método de oclusão ao final da inspiração.....	61
Tabela 1. Análise celular e morfométrica nos camundongos controle e expostos à fumaça de cigarro do estudo 1.....	64
Figura 17. Fotomicrografias pulmonares da inflamação crônica.....	66

Figura 18. Fotomicrografias com imunomarcação contra MMP-12 e HMGB1.....	68
Tabela 2. Análise da peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes nos camundongos controle e expostos à fumaça de cigarro .....	70
Figura 19. Zimografia para as metaloproteinases do tipo 2 e do tipo 9.....	72
Figura 20. Técnica de Western Blotting para MMP-12 e HMGB1.....	73
Figura 21. Densitometria de MMP-2, MMP-12 e HMGB-1.....	74
Figura 22. Figuras com os resultados da mecânica ventilatória.....	76
Figura 23. O gráfico do lavado broncoalveolar da exposição aguda e crônica à fumaça de cigarro.....	82
Figura 24. Fotomicrografias da histoarquitetura pulmonar.....	84
Figura 25. Gráfico relacionado à densidade de volume da espaço aéreo.....	86
Figura 26. Gráficos representando a atividade da enzima superóxido dismutase durante inflamação aguda e crônica.....	88
Figura 27. Gráficos representando a atividade da enzima glutationa peroxidase durante inflamação aguda e crônica.....	90
Figura 28. Gráficos representando a atividade da enzima catalase durante inflamação aguda e crônica.....	92
Figura 29. Gráficos representando o dano oxidativo causado pela inflamação aguda e crônica.....	94

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C. – Antes de cristo

AP-1 – Proteína ativadora 1

BAL – Lavado broncoalveolar

CAT – Catalase

CI – capacidade inspiratória

CCL-2 – quimiocina ligante-2

cmH<sub>2</sub>O – centímetros de água

CPT – capacidade pulmonar total

CRF – capacidade residual funcional

CS – Cigarette smoke (fumaça de cigarro)

CV – capacidade vital

d.C – Depois de cristo

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EROs – Espécies reativas de oxigênio

Fe<sup>+2</sup> – Íon ferro

G-CSF – Granulócito – fatores estimuladores de colônias

GM-CSF – Granulócito-Macrófago – fatores estimuladores de colônias

GSH-Px – Glutationa Peroxidase

H<sup>+</sup> - Íon hidrogênio

H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Ácido carbônico

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - íon bicarbonato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio

- HMG – grupo de alta mobilidade
- HMGB1 – Proteína de alta mobilidade box 1
- $\text{HO}_2^-$  - Radical Hidroperoxila
- IL1- $\beta$  – Interleucina-1-beta
- IL-6 – Interleucina-6
- k – constante elástica
- KB - Quilo bite
- KDa – Quilo Dalton
- LPS – Lipopolissacarídeo constituinte da parede de bactérias gram-negativas
- LTB<sub>4</sub> – Leucotrieno 4
- M-CSF – Macrófago- fator estimulador de colônia
- MAPK – quinases de proteínas ativadas por mitógenos
- MEC – Matriz extracelular
- MMP-2 – Metaloproteinase tipo 2
- MMP-9 – Metaloproteinase tipo 9
- MMP-12 – Metaloproteinase tipo 12
- MyD88 – Fator de Diferenciação Mielóide
- NF- $\kappa$ B – Fator nuclear kappa b
- $^1\text{O}_2$  - Oxigênio Singlete
- $\text{O}_2^-$  - Ânion Superóxido
- $\text{OH}^-$  - Radical Hidroxila
- OMS – Organização mundial de saúde
- Pa – Pressão parcial
- PaCO<sub>2</sub> – Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
- PACO<sub>2</sub> - Pressão parcial de dióxido de carbono no alvéolo

Pel – Pressão de retração elástica do pulmão

PGE<sub>2</sub> – prostaglandina-E-2

Pi – Ponto de Inflexão

Pmax – Pressão máxima inicial

RAGE – Receptor de produtos avançados de glicação

RNA – Ácido ribonucléico

SOD – Superóxido dismutase

TGF-β Fator de crescimento transformante beta

TLR2 – Receptor para toll-like 2

TLR4 – Receptor para toll-like 4

TNF – α – Fator de necrose tumoral – alpha

TNFR – 1 – Receptor 1 de TNF-α

TNFR – 2 – Receptor 2 para TNF-α

TXB<sub>2</sub> – Tromboxano 2

VC – volume corrente

VR – volume residual

VRE – volume de reserva expiratória

VRI – volume de reserva inspiratória

## SUMÁRIO

1 – Introdução.....	1
2 – Revisão de Literatura.....	4
2.1 – Tabagismo.....	4
2.1.1 – A Fumaça de cigarro.....	5
2.2 – Sistema Respiratório.....	6
2.2.1 – Histoarquitetura pulmonar.....	6
2.2.2 – A inflamação e os macrófagos alveolares.....	10
2.2.3 – Matriz extracelular pulmonar.....	15
2.2.3.1 – Componentes da matriz extracelular pulmonar.....	15
2.2.4 – Fisiologia Respiratória.....	18
2.2.4.1 – Mecânica da ventilação pulmonar.....	18
2.2.4.2 – Regulação da ventilação pulmonar.....	22
2.3 – Estresse Oxidativo.....	26
2.3.1 - Oxidantes.....	26
2.3.2 - Antioxidantes.....	28
2.4 – Fator- $\alpha$ de necrose tumoral e o fator nuclear kappa $\beta$ .....	31
2.5 – Proteína de alta mobilidade Box 1.....	37
3 – Objetivos.....	40
3.1 – Objetivos Gerais.....	40
3.2 – Objetivos específicos.....	40
4 – Materiais e métodos.....	42
4.1 – Animais.....	42
4.2 – Exposição à fumaça de cigarro.....	42

4.2.1 – Estudo 1: inflamação pulmonar crônica – análise da mecânica ventilatória e da expressão de MMP-12 e HMGB-1.....	44
4.2.2 – Estudo 2: Inflamação pulmonar aguda e crônica e o tratamento com antioxidantes.....	44
4.3 – Lavado broncoalveolar.....	45
4.4 – Processamento tecidual.....	45
4.5 – Homogeneizado tecidual.....	46
4.6 – Morfometria e estereologia.....	47
4.7 – Imunohistoquímica do pulmão para MMP-12 e HMGB-1.....	47
4.8 – Dosagem de proteína.....	49
4.9 – Análise do dano oxidativo (TBARS).....	49
4.10 – Atividade de enzimas antioxidantes (SOD, GSH-Px e CAT).....	51
4.11 – Western blotting.....	54
4.12 – Zimografia.....	55
4.13 – Análise da mecânica ventilatória.....	56
4.14 – Método de oclusão ao final da inspiração.....	60
4.15 – Análise estatística.....	63
5 – Resultados e Discussão.....	64
5.1 – Estudo 1: Inflamação pulmonar crônica – análise da mecânica ventilatória e da expressão de MMP-12 e HMGB-1.....	64
5.2 – Estudo 2: Inflamação pulmonar aguda e crônica e tratamento com antioxidantes.....	80
6 – Conclusões.....	100
7 - Referências.....	101
8 - Apêndices.....	114

8.1 – Apêndice A.....	114
8.2 - Apêndice B.....	115
8.3 – Apêndice C.....	118
8.4 – Apêndice D.....	123
8.5 – Apêndice E.....	130
8.6 – Apêndice F.....	132
8.7 – Apêndice G: Artigos publicados durante o desenvolvimento da Tese de doutorado.....	135
8.8 – Apêndice H: Artigos em colaboração.....	156
8.9 – Apêndice I: Artigos publicados em Morfologia.....	158

## **1 – INTRODUÇÃO**

O cigarro é um dos maiores fatores de risco para morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (Bergen *et al.*, 1999). A fumaça do cigarro contém vários tipos de substâncias químicas incluindo hidrocarbonos aromáticos policíclicos e radicais orgânicos. Estas substâncias têm o potencial de ativar macrófagos e neutrófilos, os quais produzem espécies reativas de oxigênio. Em contrapartida, um mecanismo antioxidante é estabelecido a fim de evitar lesão no tecido pulmonar e nas células parenquimatosas por dano oxidativo (Van Der Vaart *et al.*, 2004).

O estresse oxidativo tem sido sugerido como forte contribuinte na patogênese e progressão da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Owen *et al.*, 2005). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio da fumaça de cigarro e das células inflamatórias reagem com a matriz extracelular induzindo ao dano tecidual (Perlstein *et al.*, 2006). Alterações estruturais aos componentes do pulmão contribuem para um dano irreversível do parênquima e das vias aéreas (Balasubramanian *et al.*, 2006) por ativação de fatores específicos como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) e a proteína ativadora 1 (AP-1) nas células inflamatórias (Drost *et al.*, 2005). Este processo é acompanhado por um aumento na produção e ativação de metaloproteases (MMP), que são o maior grupo de proteases conhecidas capazes de alterar a matriz extracelular e, em resposta a isto, elas têm sido sugeridas como sendo importantes no processo patológico de doenças pulmonares associado ao remodelamento tecidual (Lagente *et al.*, 2005). As MMPs mais importantes são as MMP-2, MMP-9 e a MMP-12 (Valenca *et al.*, 2004; Daheshia *et al.*, 2005; Elkington *et al.*, 2006; Gueders *et al.*, 2006). A MMP-12, em particular, é capaz de degradar

componentes da matriz extracelular, tais como a elastina, e está envolvida no remodelamento tecidual da DPOC, incluindo o enfisema (Lagente *et al.*, 2005).

Até o presente momento, não há uma droga para curar DPOC, apesar de inúmeras tentativas de produção nesse sentido. Entretanto, tem sido consenso administrar N-acetilcisteína (NAC) aos pacientes com DPOC (Rubio *et al.*, 2000; Seagrave *et al.*, 2004). A NAC é um composto tiólico, que reduz eficientemente as espécies reativas de oxigênio. Além de sua capacidade de interagir diretamente com agentes oxidantes, exerce seu efeito antioxidante indiretamente, pois serve como precursora para a síntese de glutationa e inibe o NF-κB (Dekhuijzen *et al.*, 2004).

Outros antioxidantes possuem, também, um papel importante na redução do estresse oxidativo. A xantina oxidase, uma enzima chave no catabolismo das purinas, quando em superexpressão, é uma importante fonte de moléculas com atividade oxidante. O alopurinol possui conformação estrutural semelhante às xantinas e, portanto, acaba inibindo competitivamente a xantina oxidase, com redução da produção do ânion superóxido (Biagi *et al.*, 2005). Um estudo realizado por Bryan *et al.*, 1993 mostrou que o alopurinol reduziu o influxo de neutrófilos durante a hiperóxia.

O mercaptopropionilglicina (MPG) é um antioxidante aminotiol sintético usado nos tratamentos de artrite reumatóide e em alterações hepáticas e renais. Alguns estudos mostraram que o MPG pode funcionar como agente cardioprotetor (Miki *et al.*, 1999; Date *et al.*, 2002) e radioprotetor (Ayene *et al.*, 1988; De Toranzo *et al.*, 1994). Vários outros trabalhos mostram que essa substância age como antioxidante devido a seu grupamento tiol ser um potente *scavenger* de espécies reativas de oxigênio, e mostrando-se eficiente na redução do dano tecidual pulmonar em modelos de isquemia e reperfusão (Ayene *et al.*, 1993).

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – TABAGISMO

O tabaco foi descoberto pelos índios que habitavam as Américas. O mais primitivo registro do consumo do tabaco é encontrado em artefatos do povo Maia, que viveram desde 2000 a.C. a 900 d.C.. Além dos Maias, a civilização Asteca também apreciava o tabaco (Routh *et al.*, 1998, Gately, 2002, Musk *et al.*, 2003).

O tabaco pertence ao gênero *Nicotiniana*, que contém 64 espécies descritas entre as quais a *Nicotiniana tabacum* é a espécie mais consumida pelo homem (Gately, 2002). O consumo do tabaco, na forma de cigarro, surgiu em 1840, época em que o tabaco era enrolado manualmente em papel especial e vendido nas principais cidades do mundo. Já a produção em larga escala do cigarro começou em 1881, na Inglaterra, após a invenção de uma máquina que automatizava sua produção. O início da popularização do cigarro ficou evidente nas trincheiras da Segunda Guerra Mundial pela ampla utilização pelos soldados. Sendo assim, o consumo de cigarro aumentou vertiginosamente, em especial, nos Estados Unidos da América (Musk *et al.*, 2003, Routh *et al.*, 1998).

Os inúmeros problemas de saúde causados pelo hábito de fumar, bem como a grande quantidade de fumantes, levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar o tabagismo uma epidemia, uma vez que levantamentos estatísticos recentes apontam que cerca de 1,1 bilhão de pessoas no mundo são fumantes (Hurt, 1999).

A estimativa das fatalidades associadas ao consumo de cigarro mostra que houve cerca de 4,88 milhões de mortes em escala mundial em 2000, sendo estas

associadas a distúrbios cardiovasculares, ao câncer de pulmão e à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Ezzati *et al.*, 2004).

Para 2030, as projeções da OMS alertam que as consequências do hábito de fumar causarão mais de 8 milhões de mortes a cada ano, e destas, mais de 80% ocorrerão em países em desenvolvimento (WHO, 2008)

No Brasil, um terço da população adulta fuma, correspondendo a 16.7 milhões de homens e 11.2 milhões de mulheres. Segundo as estatísticas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estimam-se 200 mil óbitos anuais relacionados ao fumo no Brasil (Ministério da Saúde, 2006).

### **2.1.1 – A FUMAÇA DE CIGARRO**

A fumaça de cigarro contém cerca de 4.800 componentes (Hoffmann *et al.*, 2001), divididos em uma fase de material particulado, com partículas que variam de 0,1 a 1 µm de diâmetro, e uma fase gasosa. Essa última fase é definida, arbitrariamente como uma porção do aerossol da fumaça produzida que não é retida pelo filtro do cigarro, o qual é constituído de fibras de vidro (Hoffmann *et al.*, 2001).

Entre os componentes presentes na fumaça de cigarro, é interessante notar a presença de pelo menos duas substâncias envolvidas diretamente no estabelecimento do processo inflamatório pulmonar, o lipopolissacárido constituinte da parede de bactérias gram-negativas (LPS) (Hasday *et al.*, 1999, Larsson *et al.*, 2004) e os radicais livres (Sobczak *et al.*, 2004). A fumaça de um cigarro pode conter cerca de 120 ng de LPS (Hasday *et al.*, 1999) e  $10^{17}$  radicais livres (Moodie *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2008).

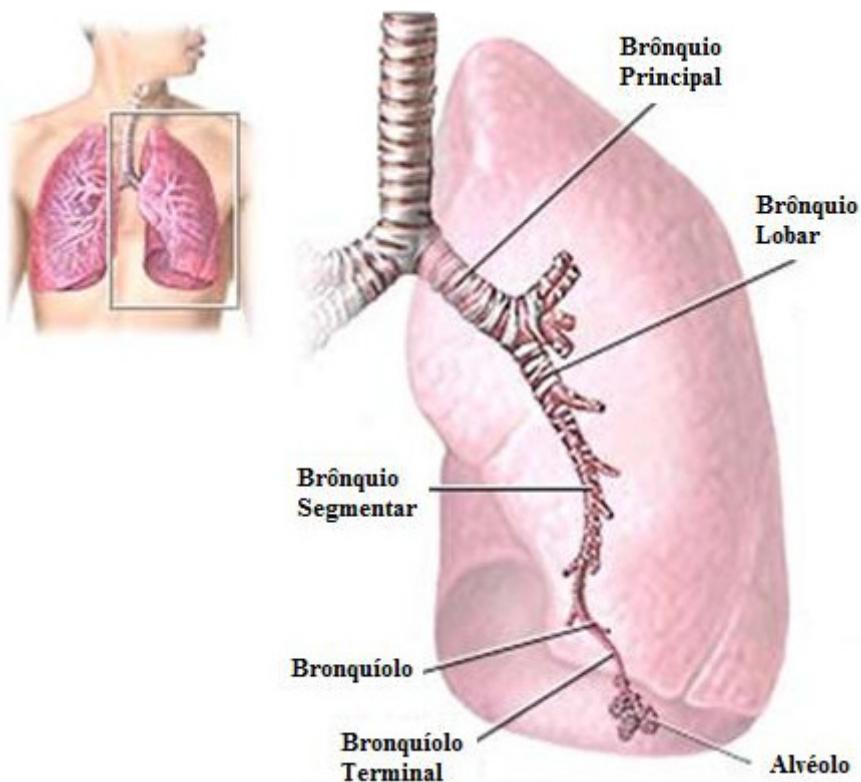
## 2.2 – SISTEMA RESPIRATÓRIO

### 2.2.1 – HISTOARQUITETURA PULMONAR

Em mamíferos, os pulmões são órgãos cuja função primária, descrita na literatura, é captar o oxigênio para o organismo e eliminar o dióxido de carbono do organismo. Para fazer esta troca de gases em seres humanos, os pulmões apresentam uma área em torno de 90 m<sup>2</sup> distribuída por aproximadamente 300 milhões de alvéolos (Stevens e Lowe, 1995, Solomon *et al.*, 1996).

O sistema respiratório é subdividido em dois maiores componentes: a porção condutora e a porção respiratória (Figura 1). A porção condutora é composta de cavidade nasal, boca, nasofaringe, faringe, laringe, traquéia, brônquios primários, brônquios secundários (brônquios lobares), brônquios terciários (brônquios segmentares), bronquíolos e bronquíolos terminais. Estas estruturas transportam, filtram, umedecem e aquecem o ar inspirado antes de ele alcançar a porção respiratória dos pulmões. A porção respiratória é composta de bronquíolos respiratórios, ductos alveolares, sacos alveolares e alvéolos. Conforme ocorre a ramificação dos bronquíolos respiratórios, o diâmetro do lúmen diminui e o número de alvéolos aumenta. Subseqüentemente às ramificações, cada bronquíolo respiratório termina em um ducto alveolar.

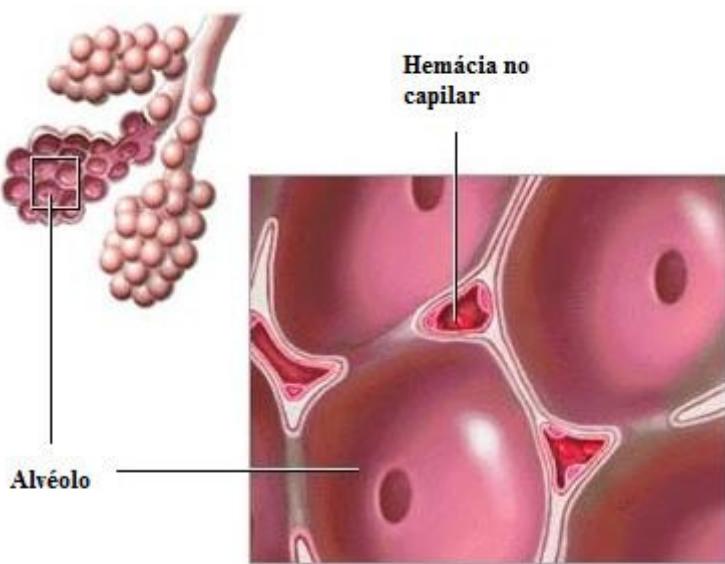
O epitélio respiratório, um epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado, é composto por seis tipos celulares: células caliciformes, células cilíndricas ciliadas, células basais, células em escova, células serosas e células do sistema neuroendócrino difuso. Todas estão em contato com a lámina basal, mas nem todas alcançam o lúmen (Gartner e Hiatt, 2007).



**Figura 1.** Esquema anatômico do pulmão. Estão destacadas as estruturas de ramificação brônquica desde o brônquio primário até o alvéolo (Adaptada de Adams' Health, 2006 - <http://www.torrentreactor.net/find/adams-atlas-of-human-anatomy>).

Alvéolos têm forma de saco, com aproximadamente 200 µm de diâmetro, localizado nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares. Os alvéolos representam a unidade funcional e estrutural primária do sistema respiratório, porque suas delgadas paredes permitem a troca de CO<sub>2</sub> por O<sub>2</sub> entre o ar contido em seus espaços e o sangue nos capilares adjacentes. No ser humano são, aproximadamente, 300 milhões de alvéolos, conferindo ao pulmão sua consistência esponjosa (Figura 2). Devido ao seu grande número, os alvéolos são freqüentemente pressionados um contra o outro, eliminando o tecido conjuntivo intersticial entre eles. Em tais áreas de contato, os espaços aéreos de dois alvéolos podem se comunicar entre si através de um poro alveolar (poro de Kohn). Esses poros provavelmente funcionam equilibrando a pressão do ar dentro dos segmentos

pulmonares. As regiões entre alvéolos adjacentes são os septos interalveolares, ocupados por um extenso leito capilar composto por capilares contínuos (Figura 3). O tecido conjuntivo do septo interalveolar é rico em fibras elásticas e fibras de colágeno tipo III. Os alvéolos repousam sobre uma proeminente lámina basal e as aberturas dos alvéolos associados a sacos alveolares são desprovidas de células musculares lisas. Seus orifícios são circundados por fibras elásticas e, especialmente, por fibras reticulares. As paredes dos alvéolos são compostas por dois tipos celulares: pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II (Gartner e Hiatt, 2007).

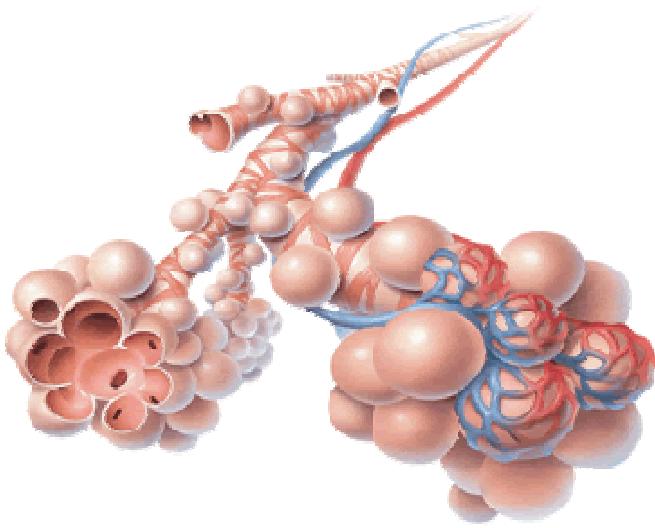


**Figura 2.** Esquema anatômico e histológico do alvéolo (Adams' Health, 2006 -

<http://www.torrentreactor.net/find/adams-atlas-of-human-anatomy>).

De acordo com Stevens e Lowe (1995), a estrutura microscópica das paredes alveolares, ou septo alveolar, é composta por endotélio capilar, membrana basal e tecido intersticial adjacente. Este último separa o endotélio das células epiteliais alveolares, contendo fibras elásticas, colágeno, células musculares lisas, mastócitos, fibroblastos, e raros linfócitos e monócitos.

Ainda há a presença de epitélio alveolar formado por pneumócitos do tipo I e II. Os pneumócitos do tipo I revestem cerca de 90% da superfície alveolar e constituem 40% da população das células totais das vias aéreas superiores. Por essa razão, a principal função atribuída a essas células é estrutural. Os pneumócitos do tipo II junto com as células do tipo I constituem cerca de 60% da população alveolar, recobrindo de 5 a 10% da superfície dos alvéolos. A principal função descrita para os pneumócitos do tipo II é a produção de surfactantes e participação no reparo do epitélio alveolar após a destruição dos pneumócitos do tipo I. Além disso, é descrito que os pneumócitos do tipo II são capazes de reconhecer e responder à presença de LPS, sugerindo que essas células podem desempenhar um papel na resposta pulmonar a agentes patogênicos (Corvol *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Esquema da estrutura alveolar. As paredes extremas estão em contato com as paredes dos capilares sanguíneos, sendo ambas permeáveis às trocas gasosas que ocorrem por difusão (Junqueira e Carneiro, 2004).

Através dos poros de Kohn ocorrem trocas de materiais entre os alvéolos possibilitando a passagem de macrófagos, que se encontram aderidos frouxamente aos pneumócitos (Stevens e Lowe, 1995).

### **2.2.2 – A INFLAMAÇÃO E OS MACRÓFAGOS ALVEOLARES**

Todos os organismos vivos, desde os procariontes até o Homem, possuem mecanismos adaptativos para responder a estímulos agressivos no sentido de manter o equilíbrio homeostático. Nos vertebrados, esta resposta inclui uma série de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas coletivamente denominadas inflamação. Na maioria das vezes, os mediadores inflamatórios (produtos de leucócitos e plaquetas ativados, do metabolismo do ácido araquidônico-prostaglandinas e leucotrienos-e das cascatas da coagulação e do complemento) agem localmente no sentido de restringir as consequências e a extensão do dano tecidual, ou ainda, dependendo da quantidade de citocinas liberadas, pode ter consequências catastróficas, na forma de choque circulatório grave. (Abbas *et al.*, 2005)

Durante o processo inflamatório agudo ocorrem diversos eventos mediados por componentes solúveis, celulares e vasculares que induzem alterações morfológicas e bioquímicas. Entre eles, podemos observar três eventos principais: (a) aumento do calibre das arteríolas, capilares e vênulas, cujo objetivo é causar um aumento de permeabilidade e de fluxo sanguíneo; (b) exsudação de líquido, incluindo proteínas plasmáticas como albumina, fatores do complemento e anticorpos, e (c) migração de leucócitos do espaço intravascular para o foco

inflamatório (Gallin *et al.*, 1992; Paul, 1998). Juntos, esses eventos caracterizam os sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, tumor, dor e perda de função.

O estímulo inflamatório induz a formação e liberação de substâncias farmacologicamente ativas, capazes de gerar mudanças na morfologia e integridade das células endoteliais (Abbas *et al.*, 2005).

A vasodilatação é uma das primeiras mudanças físicas em resposta ao estímulo inflamatório. Em situações fisiológicas, as células endoteliais funcionam como uma barreira semipermeável, restringindo às proteínas plasmáticas ao espaço intravascular. Como consequência da mudança conformacional do endotélio, ocorrem dois eventos importantes: o aumento do leito dos capilares, promovendo maior aporte sanguíneo e levando à vermelhidão e ao calor locais; e aumento da permeabilidade vascular, que ocorre por contração das células endoteliais pós-capilares e pela abertura de canais intracelulares nas próprias células endoteliais (Lampugnani e Dejana, 1997).

Como consequência das mudanças morfo-estruturais sofridas pelas células endoteliais e pelas intersticiais, suas membranas plasmáticas são rapidamente remodeladas gerando mediadores lipídicos biologicamente ativos (Stack e Dubois, 2001).

Outro mecanismo importante no processo inflamatório agudo envolve a ativação do sistema complemento com a produção de fragmentos com atividade quimiotática e de anafilaxia (Huber-Lang *et al.*, 2002).

Uma das principais funções da inflamação é recrutar os leucócitos diretamente ao local da injúria. Os leucócitos participam ativamente do processo inflamatório, ingerindo os agentes agressores, impedindo o crescimento de um eventual microorganismo patogênico, removendo restos celulares da área afetada,

degradando o tecido necrótico e iniciando a reparação tecidual (Ford-Hutchinson, 1992). O extravasamento de leucócitos da corrente sanguínea para o tecido perivascular (diapedese) ocorre através de três passos coordenados: rolamento dos leucócitos sobre a parede endotelial, adesão firma às células endoteliais e, finalmente, a transmigração para o acúmulo no sítio de injúria (Springer, 1995).

Devido ao aumento da permeabilidade vascular ocorre uma hemoconcentração que diminui a velocidade do fluxo sanguíneo local. Além disso, a agregação das hemácias desloca os leucócitos e estes, que em situações fisiológicas circulam pelo eixo central do vaso (as hemácias circulam na periferia), fluem sobre o endotélio das vênulas pós-capilares, favorecendo interações com a superfície do endotélio. Estas interações se dão através das moléculas de adesão (Pearson *et al.*, 2000).

Uma vez tendo atravessado o endotélio e penetrado nos tecidos, os leucócitos devem interagir com proteínas da matriz extracelular. À medida que as células deixam os vasos sanguíneos, elas perdem algumas de suas moléculas de superfície, como a L-selectina, que não são mais necessárias, e seguem para o foco inflamatório através de um processo chamado quimiotaxia, que pode ser definido como uma locomoção orientada de acordo com um gradiente de concentração formado por substâncias endógenas ou exógenas a partir do sítio de injúria (Devreotes *et al.*, 1988).

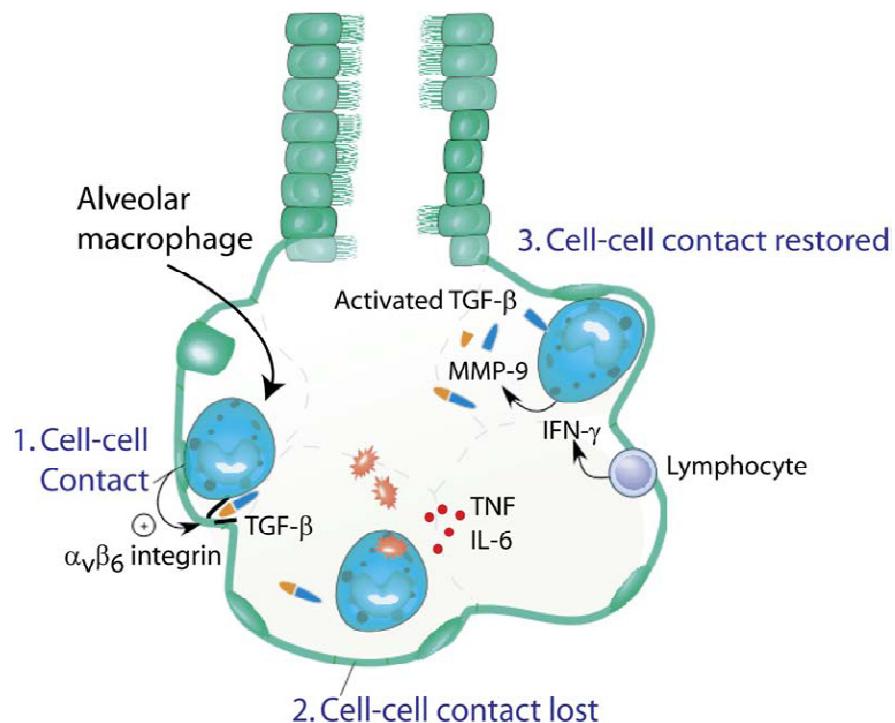
Neutrófilos e macrófagos ativados sintetizam e secretam vários mediadores pró-inflamatórios como citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), eicosanóides (LTB<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>), fatores hematopoiéticos (GM-CSF, G-CSF, M-CSF), além de moléculas efetoras microbicidas (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e NO) (Nakamura *et al.*, 2003).

Os neutrófilos são o tipo celular mais importante nas fases iniciais do processo inflamatório e formam a primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos patogênicos (Springer, 1995).

A inflamação desempenha papel central na luta contra patógenos e pode ser considerada, portanto, como um conjunto de reações biológicas cujo objetivo é restaurar a integridade do organismo. Quando a inflamação se manifesta por um curto espaço de tempo, ela tem consequências terapêuticas. Todavia, quando o estímulo inflamatório se torna crônico leva a alterações irreversíveis e permanentes sobre os tecidos (Aggarwal *et al.*, 2006).

Os macrófagos são células hematopoiéticas especializadas que se distribuem através de diferentes tecidos do corpo. Eles têm um papel central na regulação da homeostase, no remodelamento tecidual, na defesa do hospedeiro e na resposta a materiais exógenos, incluindo partículas. Uma das características funcionais dos macrófagos é que, dependendo do seu estado de diferenciação e do microambiente na qual ele encontra uma partícula, ele pode ser modificado especificamente para ter quaisquer funções necessárias para lidar de maneira mais eficaz com um estímulo particular. No pulmão, macrófagos alveolares residentes estão continuamente encontrando substâncias inaladas devido à sua posição exposta no lumen alveolar (Figura 4). Para evitar danos às células do tipo I e tipo II em resposta à抗ígenos inofensivos, eles são mantidos em um estado quiescente, produzindo poucas citocinas inflamatórias e exibindo uma atividade fagocítica reduzida, como evidenciado pela expressão do receptor fagocítico CD11b (Holt, 1978). Além disso, os macrófagos alveolares suprimemativamente a indução da resposta imune adaptativa através dos seus efeitos nas células T e células dendríticas (DCs) do alvéolo e do insterstício. Estudos recentes têm demonstrado

que a eliminação in vivo de macrófagos alveolares utilizando lipossomas preenchidos de clodronato leva a uma reação inflamatória ostensiva para partículas inofensivas e antígenos solúveis (Thepen *et al.*, 1989). Macrófagos alveolares aderem às células epiteliais alveolares (AECs) na parede alveolar sendo separadas por uma distância de apenas 0,2 a 0,5 µm das DCs intersticiais. Nos camundongos onde há a depleção de macrófagos, as DCs têm claramente reforçadas a sua função de apresentação de antígenos (Holt *et al.*, 1993). Quando misturadas com DCs in vitro, macrófagos alveolares suprimem a ativação das células T através da liberação de óxido nítrico (principalmente em roedores), prostaglandinas, interleucina-10 (IL-10), e fator de crescimento transformante β (TGF-β).



**Figura 4:** Esquema representativo do processo e recrutamento de macrófagos alveolares na inflamação (Lambrecht, 2006).

## 2.2.3 - MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR

### 2.2.3.1 – COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR PULMONAR

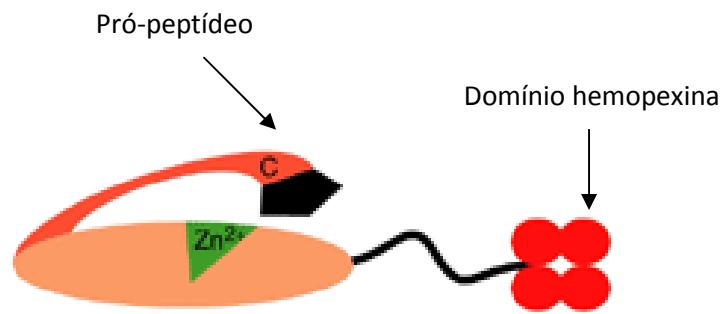
A matriz extracelular (MEC) é uma rede complexa composta por quatro grandes classes de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs) e glicoproteínas adesivas, que proporcionam um arcabouço físico para a sustentação da estrutura tecidual, determinando a hidratação e, consequentemente, o volume do tecido, criando espaços para o transporte de moléculas, organização dinâmica e resistência às forças de compressão (Dreyfuss *et al.*, 2008).

As interações entre as células e a MEC são cruciais para determinar os padrões de comportamento celular, tais como crescimento, morte, diferenciação e motilidade que, por sua vez, apresentam importância em diversos mecanismos, como morfogênese, inflamação, resposta imune, invasão parasitária, transformação celular e metástase (Dreyfuss *et al.*, 2008).

Os colágenos pertencem a uma família de proteínas intimamente relacionadas, contendo todas elas um domínio em tripla-hélice simples ou múltiplo composto por três cadeias alfa. A porção da cadeia em alfa-hélice é formada principalmente de glicina, prolina e hidroxiprolina (Brodsky *et al.*, 2005). Os colágenos tipo I, II, III, V e XI, formadores de fibrilas (Wess, 2005), são os mais abundantes no pulmão e representam cerca de 15% do peso seco desse órgão. O papel desses tipos de colágeno é fornecer limites à extensibilidade do órgão no processo da respiração (Suki *et al.*, 2005).

As fibras elásticas estão presentes na maioria dos tecidos fornecendo complacência e distensibilidade, estando largamente distribuídas em todas as estruturas do pulmão. São formadas por dois componentes distintos, a elastina, que é um material amorfó, e um componente microfibrilar denominado fibrotúbulo (Kielty *et al.*, 2002). A elastina é constituída por aminoácidos hidrofóbicos, sendo formada principalmente por glicina, lisina e prolina, que quando madura é depositada aleatoriamente no espaço extracelular. A elastina pode ser estendida rapidamente ou lentamente e voltar a sua estrutura inicial sem nenhum dano (Mithieux e Weiss, 2005). O componente microfibrilar é constituído por glicoproteínas, entre elas fibrilinas e a glicoproteína I associada a microfibrillas (Kielty *et al.*, 2005) que interagem com a elastina para a formação das fibras elásticas (Rock *et al.*, 2004). As fibras elásticas compreendem aproximadamente 18% do peso seco do pulmão. A maior quantidade está situada no parênquima e junto com as fibras colágenas forma o esqueleto da estrutura alveolar (Niewoehner *et al.*, 1977, Pierce *et al.*, 1995).

Entre as metaloproteinases, a MMP-12, também conhecida como metaloelastase, é uma enzima de 54 KDa, processada como pró-pré-enzima (com 45 KDa), que na sua forma ativa contém 22 KDa. O gene humano responsável pela sua produção sintetiza a proteína a 1.8-KB com 470 aminoácidos, sendo assim, 64% idêntica a MMP-12 do camundongo. A proteína e RNA mensageiro são encontradas nos macrófagos alveolares e têm participação clara na doença pulmonar inflamatória aguda (Belvisi *et al.*, 2003). A MMP-12 é capaz de degradar diferentes substratos, inclusive fibras elásticas (Lagente *et al.*, 2005), possuindo ação sobre a liberação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa), amplificando, dessa forma, a resposta inflamatória (Churg *et al.*, 2003;Garbacki *et al.*, 2009) (Figura 5).



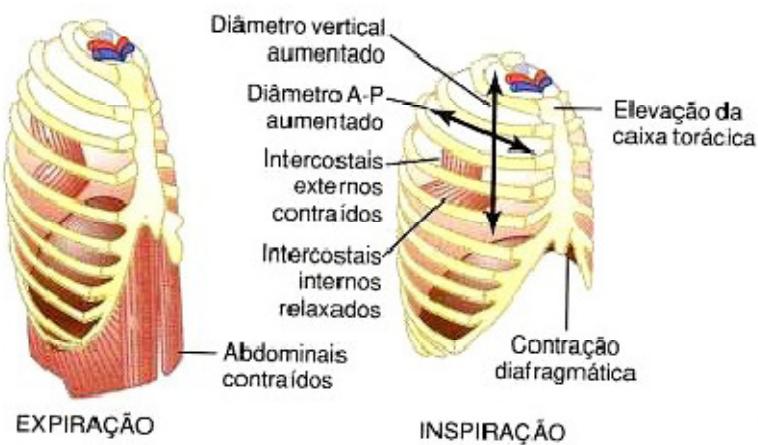
**Figura 5.** Representação esquemática da metaloproteinase-12 (Zn-zinco) (Lafleur *et al.*, 2003).

## 2.2.4 – FISIOLOGIA RESPIRATÓRIA

### 2.2.4.1 – MECÂNICA DA VENTILAÇÃO PULMONAR

Os pulmões podem ter sua forma modificada de duas maneiras: pelo movimento do diafragma e pela elevação e depressão das costelas (Guyton, 2006). Esse processo mecânico da ventilação pulmonar consiste na ação dos músculos respiratórios, em realizar o trabalho para gerar um gradiente de pressão no sistema respiratório, capaz de vencer as forças que se opõem à entrada do fluxo gasoso nos pulmões (David, 2001).

Em repouso, a respiração ocorre quase totalmente pelo movimento do diafragma (Guyton, 2002). Analogicamente, David em 2001, compara seu funcionamento na inspiração com um pistão mecânico em relação à cavidade torácica, que ao se contrair rebaixa suas cúpulas contra as vísceras abdominais, aumentando o volume da cavidade torácica, pelo aumento do seu diâmetro vertical (David, 2001). Ainda na inspiração, os músculos intercostais externos, elevam as costelas para frente (figura 6), aumentando do diâmetro lateral e ântero-posterior do tórax (West, 2002) e os músculos acessórios elevam as primeiras costelas e o esterno, num movimento denominado braço de bomba (Tortora, 2007).



**Figura. 6** – Representação esquemática dos movimentos torácicos durante a inspiração e a expiração (Moore, 2001).

O deslocamento da pleura parietal ocorre com o movimento diafragmático e das costelas. Sobretudo, o aumento de volume da cavidade torácica, reduz a pressão no espaço pleural. Tal redução de pressão é suficientemente para deslocar consigo, num deslizamento, a pleura visceral (Guyton, 2006).

Durante a ventilação, o deslocamento da parede torácica, necessita se opor, às forças da resistência, inércia e do recuo elástico dos componentes do sistema respiratório (Vieira, 1999). Quando o componente elástico é vencido, as forças geradas pelos músculos ventilatórios alteram os volumes pulmonares. Concomitantemente, conforme são geradas as alterações das pressões, as forças resistivas à passagem do ar são vencidas, criando-se um fluxo de gás. E quando as forças da inércia das estruturas do sistema são superadas acelera-se este fluxo (Emmerich, 1998).

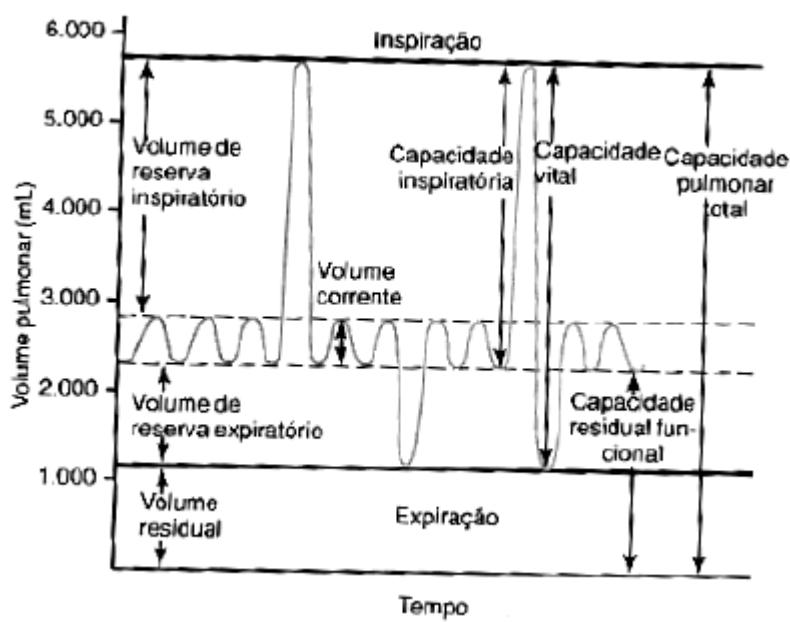
Durante o repouso, à medida que ocorre a expansão da cavidade torácica a pressão intra-pleural reduz de -5 para -7,5 cmH<sub>2</sub>O, diferença suficiente para, causar uma diminuição da pressão intra-alveolar em torno de 1 cmH<sub>2</sub>O. A *pressão transpulmonar*, diferença entre estas duas pressões (intra-alveolar e intrapleural),

varia em torno de 1 cmH<sub>2</sub>O, e para cada 1 cmH<sub>2</sub>O ocorre o deslocamento de 200 ml de volume de ar atmosférico para dentro dos pulmões (complacência pulmonar) (Guyton, 2002). A fase expiratória, no repouso, ocorre num ato passivo de retração elástica do parênquima pulmonar. Esta fase pode ser influenciada pela contração dos músculos expiratórios na necessidade de uma expiração forçada (Aires, 1999).

A complacência pulmonar refere-se ao grau de expansão dos pulmões que ocorre para cada unidade de aumento da pressão transpulmonar (Guyton, 2002), ou seja, é a propriedade que os pulmões (órgãos ocos e elásticos) possuem de aumentar seu volume quando submetidos a uma determinada pressão. Esta grandeza varia inversamente com a constante elástica ( $k$ ) dos próprios pulmões, então, quanto mais elevada for  $k$ , ou seja: quanto maior a retração elástica do parênquima pulmonar, menor será a sua complacência (Garcia, 2002). A complacência pode ser calculada dividindo-se a variação do volume pela variação da pressão (Esteban *et al.*, 1995).

Visto que na posição ortostática, os pulmões estão suspensos na cavidade torácica, fixados apenas ao mediastino, o equilíbrio inercial do seu peso requer uma pressão intrapleural menor nas regiões superiores comparadas às inferiores pulmonares. Este fato confere uma expansão alveolar por *interdependência pulmonar*, topograficamente desigual, sendo maior nas regiões superiores, comparado com os alvéolos das regiões inferiores. Logo, na inspiração, o fluxo de ar será direcionado predominantemente para as regiões inferiores pulmonares, conferindo a estes a característica de maior ventilação, enquanto a maior capacidade de armazenamento de ar no repouso é observada nas regiões superiores pulmonares (Manço, 1998; West, 2002).

Originados de momentos específicos da ventilação pulmonar, os volumes estáticos, primários, pulmonares refletem uma quantidade de volume deslocado e/ou retido nos pulmões. Os quatro volumes pulmonares são: (1) volume corrente (VC) – volume de ar inspirado ou expirado durante cada ciclo respiratório, em repouso; (2) volume de reserva inspiratória (VRI) – volume máximo adicional que pode ser inspirado a partir do final de uma inspiração em repouso; (3) volume de reserva expiratória (VRE) – volume máximo adicional que pode ser expirado após o final de uma expiração normal; (4) volume residual (VR) – volume retido nos pulmões após uma expiração forçada máxima (Silva *et al.*, 2005; Guyton, 2006).



**Figura 7** – Diagrama mostrando as incursões respiratórias durante a ventilação normal e durante a inspiração e expiração forçada

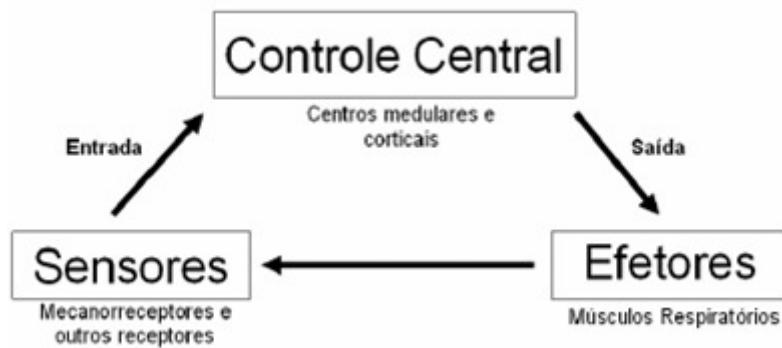
Ao descrever os eventos do ciclo pulmonar, é conveniente considerar dois ou mais dos volumes em conjunto e a partir da relação entre esses volumes pulmonares se obter quatro capacidades pulmonares (figura 7) descritos como: (1) *capacidade inspiratória* (CI) – volume máximo de ar que pode ser inspirado a partir

do final de uma expiração normal ( $CI = VRI + VC$ ); (2) *capacidade residual funcional* (CRF) – volume de ar que, após uma expiração normal, permanece nos pulmões ( $CRF = VR + VRE$ ); (3) *capacidade vital* (CV) – volume máximo de ar que pode ser expelido após a inspiração máxima ( $CV = VRE + VC + VRI$ ); (4) *capacidade pulmonar total* (CPT) – volume máximo de ar nos pulmões após um esforço inspiratório máximo ( $CPT = CV + VR$ ) (Silva *et al.*, 2005; Guyton, 2006).

#### **2.2.4.5 – REGULAÇÃO DA VENTILAÇÃO PULMONAR**

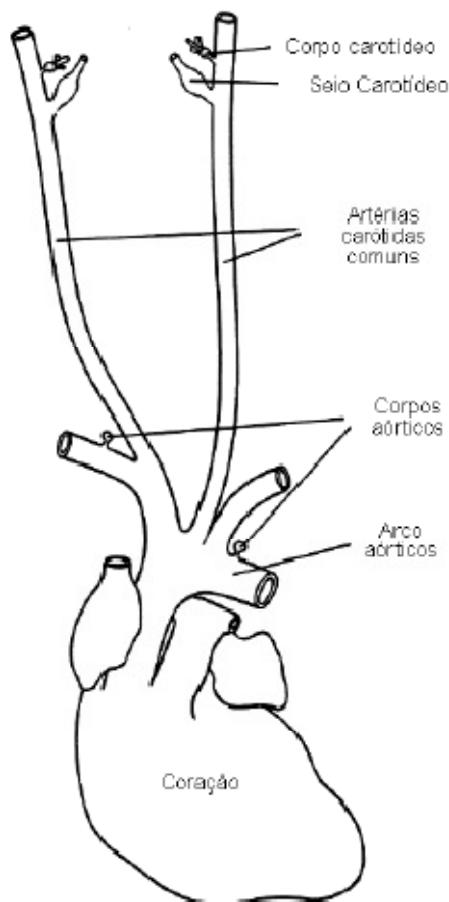
A ventilação pulmonar é ajustada pelo sistema nervoso para manter a concentração do  $O_2$  e do  $CO_2$  relativamente constantes nos alvéolos e, indiretamente no sangue (Brain, 1977; Guyton, 2002). O sistema formado por receptores e controladores relacionados com ventilação pulmonar pode ser considerado um sistema, envolvendo os seguintes componentes anatomo-fisiológicos fundamentais: os centros respiratórios localizados no tronco cerebral e os órgãos efetores da bomba ventilatória (os músculos respiratórios) (Aires, 1999). De uma forma geral, o centro respiratório, gera o ritmo respiratório, que é modificado por uma série de reflexos originados em receptores diversos, tanto ao nível periférico como central, além disso, outros centros controladores atuam sobre o ritmo respiratório fundamental, alterando-o e o produto final é a contração ordenada dos músculos envolvidos com a ventilação (Aires, 1999). As informações dos vários sensores periféricos são enviadas para um centro de controle, que tem como saída estímulos enviados aos músculos efetores. Ao alterar a ventilação pulmonar, os

músculos respiratórios reduzem as perturbações aos sensores (figura 8) (Montaldo *et al.*, 2000).



**Figura 8.** Esquema do controle da ventilação. Modificado de Montaldo, 2000.

Os estímulos periféricos são captados por receptores sensoriais, divididos em: quimiorreceptores e mecanorreceptores (Aires, 1999). Os quimiorreceptores enviam ao centro respiratório informações gasométricas do sangue. Sendo os quimiorreceptores centrais, localizados na superfície ventral do bulbo, os responsáveis pela identificação das alterações das concentrações de CO<sub>2</sub>, enquanto os quimiorreceptores periféricos, localizados nos corpos carotídeos e no arco aórtico, realizam leituras, principalmente, das alterações das concentrações de O<sub>2</sub> (figura 9) (Aires, 1999; West, 2002).



**Figura 9.** Posição dos corpos carotídeos e aórticos com respeito às artérias carótidas comuns e ao arco aórtico (modificado de Montaldo, 2000).

Os quimiorreceptores carotídeos são estimulados pela diminuição da  $\text{PaO}_2$ , e pelo aumento da concentração de  $\text{H}^+$ , promovendo estímulos aferentes ao centro respiratório que causam, por *feedback*, o aumento da ventilação pulmonar e na presença de hipoxemia, encontra-se aumentado a sensibilidade da resposta ao  $\text{CO}_2$  pelos quimiorreceptores centrais (David, 2001). Uma diminuição da ventilação alveolar aumenta a  $\text{PaCO}_2$ , e consequentemente também a  $\text{PACO}_2$ . O  $\text{CO}_2$  age como um estimulante ventilatório poderoso, onde seu aumento promove acidose no líquido cérebro-espinal, estimulando os receptores da medula, produzindo,

aumento da ventilação alveolar, corrigindo as taxas dos gases no sangue (Macnee, 1987).

Os mecanorreceptores, localizados na parede torácica respondem às mudanças no comprimento e na tensão musculares ou no movimento da parede torácica (Montaldo, 2000). Consistem em sensores proprioceptivos (fuso neuromuscular e aparelho de Golgi dos tendões dos músculos respiratórios), que apresentam respostas a um estiramento remetendo ao centro respiratório informações a respeito da apropriação das atividades ventilatórias pulmonares, através da identificação do grau de encurtamento e distensão das fibras dos músculos respiratórios (Aires, 1999).

Resumindo, o mecanismo de controle da bomba ventilatória obedece à tensão máxima muscular, ou seja, o ponto efetivo de maior de força de contração, que depende do grau de estiramento da fibra muscular. Visto isso, logo que, termina uma expiração, quanto mais desinflado o pulmão estiver maior é o grau de estiramento dos músculos inspiratórios, e, consequentemente, maior é à força do trabalho muscular (Garcia, 2002).

## 2.3 - ESTRESSE OXIDATIVO

### 2.3.1 – OXIDANTES

Os radicais livres<sup>1</sup> de oxigênio (RLOs) são átomos ou moléculas que contêm oxigênio e apresentam um elétron não-pareado na sua órbita externa, e que são capazes de reagir com outras moléculas contra as quais colidem, retirando elétrons dessas substâncias e modificando suas estruturas moleculares (Yu, 1994).

A principal via de metabolismo do oxigênio envolve sua completa redução à água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia respiratória. Se houver redução do oxigênio com um número menor de elétrons, ao longo da cadeia respiratória, haverá produção de RLOs intermediários. Os principais RLOs conhecidos são: *singlet* de O<sub>2</sub> (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hidroxila (\*OH) e superóxido (\*O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Apesar do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) não ser considerado um radical livre por definição, ele tem ações semelhantes as dos RLOs no organismo (Andrade Jr. *et al.*, 2005).

Há, contudo, a produção equivalente de antioxidantes visando neutralizar os efeitos das RLOs produzidas naturalmente no organismo. Quando esta neutralização não é possível devido a uma sobrecarga dos fatores antioxidantes, há uma situação de estresse oxidativo levando ao dano tecidual por agressão a lipídios (peroxidação lipídica), carboidratos e proteínas, além de morte celular por apoptose e necrose (Belló, 2002).

A oxidação é parte fundamental da via aeróbica e do nosso metabolismo de modo que os RLOs são produzidos naturalmente, visto que se

---

<sup>1</sup> Radical livre é um termo frequentemente definido como qualquer espécie – átomo ou molécula – que contém um ou mais elétrons desemparelhados e que é capaz de existir independentemente. Radicais livres são formados quando átomos ganham ou perdem um elétron (Matsuo e Kaneko, 2000)

encontram envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como, a peroxidação dos lipídios de membrana e a agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros *et al.*, 2006).

Durante a respiração celular o oxigênio é reduzido à água na última etapa da cadeia transportadora de elétrons (Nelson e Cox, 2000). Entretanto, por ter como característica um par de elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, o O<sub>2</sub> sofre redução de um elétron por vez, consecutivamente, estando reduzido totalmente após receber quatro elétrons sendo a etapa final catalisada pela enzima citocromo oxidase. Todavia, acredita-se que de 1 a 3 % do oxigênio utilizado na respiração celular sofre redução incompleta gerando o radical livre superóxido (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Sendo assim, o radical superóxido é formado após a primeira redução do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Ocorre em quase todas as células e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária a sistemas geradores de \*O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Halliwell *et al.*, 1990).

O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa da reação que produz o radical hidroxila (\*OH) (Reação de Fenton). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem vida longa, é capaz de atravessar camadas lipídicas, pode reagir com a membrana eritrocitária e com proteínas ligadas ao Fe<sup>++</sup> (Scott *et al.*, 1991), sendo altamente tóxico para as células. Esta toxicidade pode ser aumentada de dez para mil vezes, quando em presença de ferro (Eaton *et al.*, 1991).

O oxigênio singlete ( ${}^1\text{O}_2$ ) é forma excitada de oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O  ${}^1\text{O}_2$  tem importância em certos eventos biológicos, mas poucas doenças foram relacionadas à sua presença (Halliwell *et al.*, 1990). Embora as espécies reativas de oxigênio possam ser mediadoras de doenças, sua formação nem sempre é deletéria, como na defesa contra infecções, quando a bactéria estimula os neutrófilos a produzirem espécies reativas com a finalidade de destruir microorganismos (Floyd *et al.*, 1990; Hatherill *et al.*, 1991).

O radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^-$ ) representa a forma protonada do radical superóxido, ou seja, possui o próton hidrogênio. Existem evidências de que o hidroperoxila é mais reativo que o superóxido, por sua maior facilidade em iniciar a destruição de membranas biológicas (Halliwell *et al.*, 1990).

O radical hidroxila ( ${}^{\bullet}\text{OH}$ ) é considerado a espécie reativa de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos. A combinação extremamente rápida do  $\text{OH}^-$  com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. Além disso, a hidroxila pode inativar várias proteínas. Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (Halliwell *et al.*, 1986)

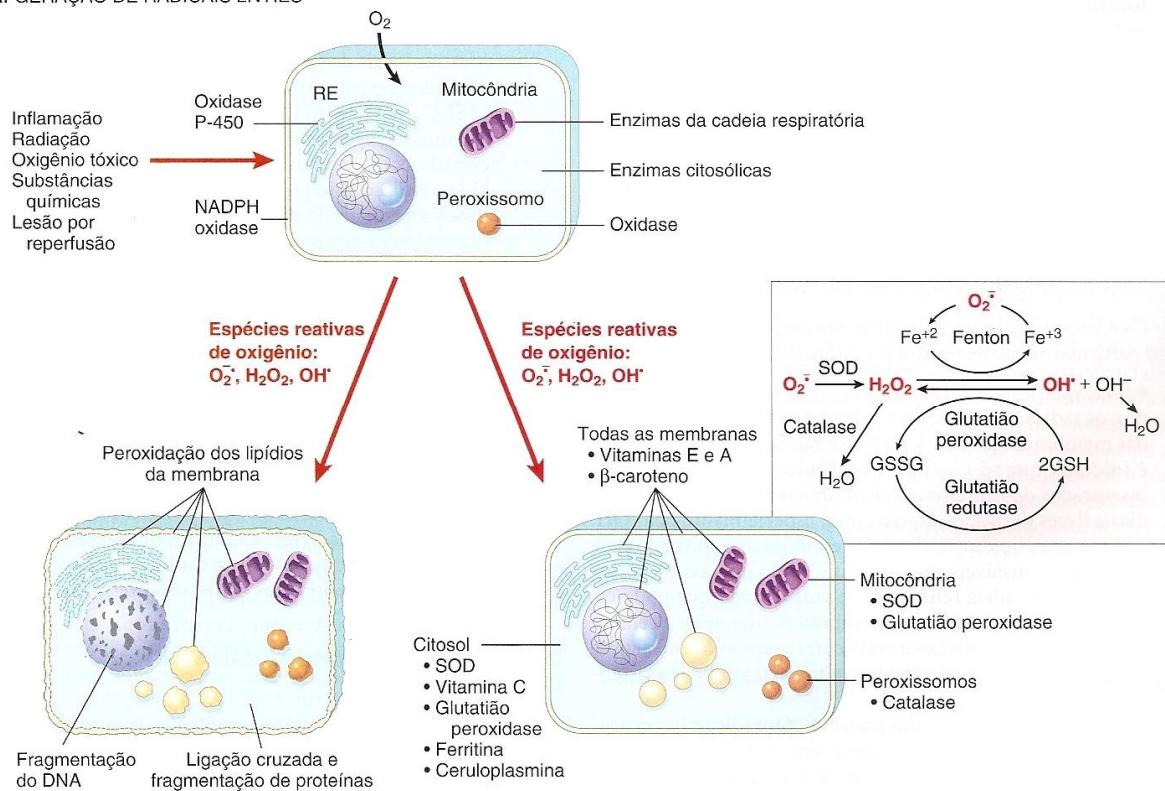
### **2.3.2 – ANTIOXIDANTES**

Substâncias que neutralizam os efeitos danosos das espécies reativas constituem o sistema de defesa antioxidante do organismo. Enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GSH-Px) são exemplos de antioxidantes endógenos que agem como primeira linha de defesa. De

forma complementar, alguns antioxidantes são absorvidos por meio da dieta, como por exemplo, o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) e o ácido ascórbico (vitamina C) (Pietta, 2000). Desta forma, o estresse oxidativo caracteriza-se por mudanças no equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo o lado oxidante (Park Hs *et al.*, 2009).

Normalmente, encontra-se nos organismos uma relação estável entre oxidantes e antioxidantes. Quando estes mecanismos falham, os mecanismos de defesa são ativados e a relação tende a ser mantida. Entretanto, se há desequilíbrio favorecido por aumento acentuado de espécies reativas, uma situação de estresse oxidativo está caracterizada. Segundo Sies (Halliwell e Gutteridge, 1999), criador do termo, o estresse oxidativo é um distúrbio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes, favorecendo o gerador de espécies reativas resultando em um dano potencial. Quando ocorre estresse oxidativo ou por diminuição de antioxidantes ou por aumento de espécies reativas, os organismos podem sofrer dano oxidativo e as alternativas são: adaptação ao estresse, reparo ao dano ou morte (figura 10) (Halliwell e Gutteridge, 1999).

## A. GERAÇÃO DE RADICAIS LIVRES



## B. LESÃO CELULAR POR RADICAIS LIVRES

## C. NEUTRALIZAÇÃO DOS RADICAIS LIVRES – NÃO OCORRE LESÃO CELULAR

**Figura 10** – Papel das espécies reativas de oxigênio na lesão celular (Adaptado de Kumar *et al.*, 2005).

## 2.4 – FATOR- $\alpha$ DE NECROSE TUMORAL (TNF- $\alpha$ ) E O FATOR NUCLEAR KAPPA $\beta$ (NF- $\kappa$ B)

O TNF $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica com aproximadamente 17kDa, produzida principalmente por macrófagos em resposta a patógenos e outros estímulos danosos (Tracey, 2002; Czura & Tracey, 2005). Possui funções que podem variar de indução a choque na sepse a necrose de tumores (Peterson *et al.*, 2005). Baixos níveis de TNF $\alpha$  contribuem para os mecanismos de imunidade inata do hospedeiro, limitando a resposta inflamatória local, controlando a invasão microbiana e promovendo o processo de cura (Tracey, 2002; Czura & Tracey, 2005; Pavlov & Tracey, 2005). Em uma resposta inflamatória normal, seus efeitos protetores e benéficos predominam, entretanto a magnitude e duração da liberação de TNF $\alpha$  são limitadas, por não ser secretado sistemicamente (Tracey, 2002).

A produção exacerbada de citocinas pode causar manifestações clínicas de doenças (Tracey, 2002; Czura & Tracey, 2005; Pavlov & Tracey, 2005), inclusive os sinais clínicos cardinais de inflamação, incluindo febre, edema, dor e vermelhidão. O aumento sistêmico de TNF $\alpha$  promove dano tecidual deprimindo a função cardíaca, induzindo trombose microvascular e mediando a síndrome sistêmica de fraqueza vascular (Tracey, 2002). Esta citocina pode também mediar à síndrome de perda muscular, conhecida como caquexia. A caquexia se manifesta como complicaçāo secundária, mas é potencialmente letal em doenças crônicas como câncer (Peterson *et al.*, 2006).

TNF $\alpha$  induz leucocitose e ativa nas células endoteliais genes de moléculas de adesão como ICAM-1 (molécula de adesão intercelular -1), VCAM-1 (molécula de adesão vascular -1) e diversas outras citocinas como CCL-2 ou MCP-1 (proteína

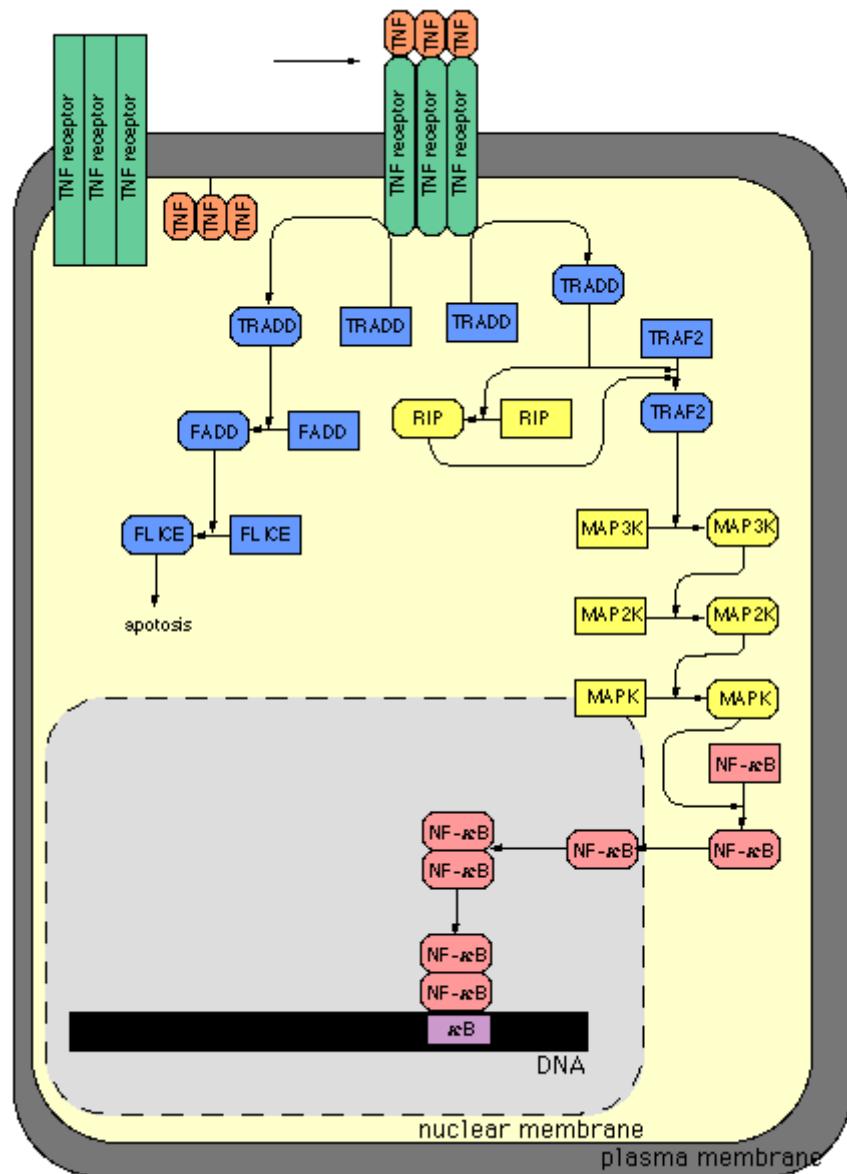
quimioatrativa de monócitos -1). Essas moléculas contribuem para o aumento da adesão de neutrófilos e monócitos ao endotélio vascular (Peterson *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2005), facilitando o rolamento, adesão, migração e ativação celular (Ransohoff *et al.*, 2003; Saeed *et al.*, 2005). O TNF $\alpha$  é capaz de amplificar e prolongar a resposta inflamatória e dano tecidual (Tracey, 2002) ativando outras células a produzir citocinas como IL-1 (interleucina -1) e HMGB1 (*high mobility group box 1*), além de outros mediadores como eicosanóides e óxido nítrico (NO), resultando, dessa forma, um o aumento da inflamação (Tracey, 2002). Anticorpos anti-TNF $\alpha$  12 têm sido utilizados na clínica no tratamento de doenças imuno-inflamatórias como artrite reumatóide e doença de Crohn (Czura and Tracey, 2005; Pavlov and Tracey, 2005).

O NF-kB, descoberto em 1986, é um fator nuclear (NF) que, uma vez ativado por agentes como lipopolissacárides, possui a capacidade de ligar-se a uma seqüência de 10 pares de bases na região promotora do gene que codifica a cadeia leve k das moléculas de anticorpo das células B (kB) (Sen, 1986).

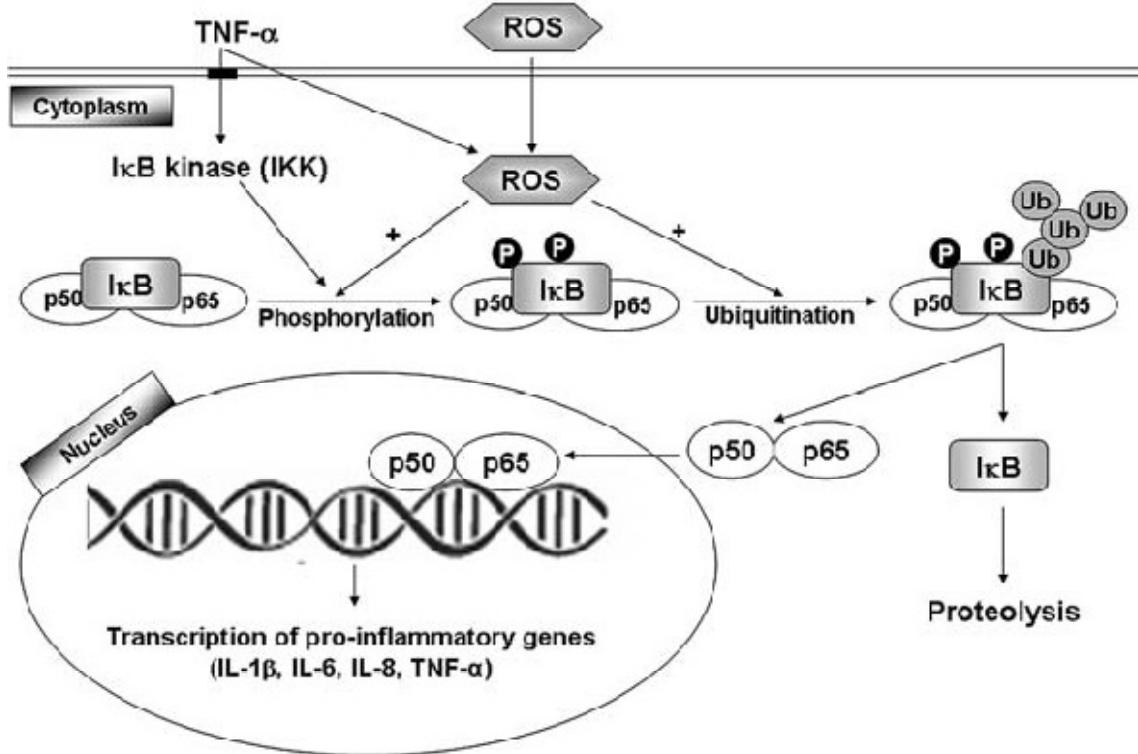
O NF-kB é um heterodímero constituído de duas subunidades: p65 (também chamada RelA) e p50. (Baeuerle e Baltimore, 1996; Siebenlist, 1997). Na literatura, o termo NF-kB autêntico designa a combinação p50/RelA. Além dessas, outras subunidades foram descritas, tais como a c-Rel, RelB, e p52, sendo provável que diferentes tipos de combinações sejam capazes de ativar diferentes genes ou ainda bloquear a transcrição do p50/RelA. As subunidades p50 e p52, sintetizadas como moléculas precursoras inativas, p105 e p100, respectivamente, formam homodímeros inibitórios da transcrição, pois se ligam a regiões promotoras sem exercer atividade, bloqueando a interação desses genes com o dímero ativo p50/RelA (Ghosh *et al.*, 1997). O fator de transcrição NF-kB é conservado na

evolução e com ação descrita em diversas células que compõem os organismos complexos, apresentando uma gama de ação superior a todos os fatores de transcrição até então caracterizados. Essa superioridade deve-se aos variados estímulos que o ativam, bem como aos inúmeros genes e fenômenos que o NF-kB regula. Independente do estímulo, parece haver participação de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) e o aumento de cálcio intracelular para a ativação do NF-kB. Quando não estimulado, o fator NF-kB encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória: o I kB. Esse complexo impede a translocação do NF-kB para o núcleo. Assim, a fosforilação e a degradação do I kB são necessárias para que ocorra a translocação (Baeuerle e Baltimore, 1996). O I kB, assim como as subunidades que compõe o NF-kB, pertence à família de proteínas Rel. Estudiosos no campo da biologia molecular clonaram genes que codificam oito proteínas da família NF-kB e sete da família I kB até o momento. Os subtipos mais estudados de proteínas inibitórias são o I kB<sub>a</sub> e o I kB<sub>b</sub>, sendo o papel do I kB<sub>a</sub> melhor caracterizado. Outras proteínas inibitórias dessa família incluem o I kB<sub>e</sub>, I kB<sub>g</sub> e o Bcl-3. A regulação da ativação do I kB<sub>a</sub> e do I kB<sub>b</sub> é diferente, o que aumenta a complexidade da ativação desse fator nuclear. Vários estímulos levam à fosforilação do I kB, que é fundamental para sua degradação. A proteína I kB fosforilada recebe a adição de ubiquitina, pela ação da ubiquitina ligase, sendo em seguida degradada pelo complexo proteossoma 26S. Isso resulta na liberação do NF-kB. Tanto o I kB<sub>a</sub> como o I kB<sub>b</sub> ligam-se ao p50, tornando a seqüência localizadora de núcleo inacessível, impedindo sua translocação (Ghosh, 1998). O desmembramento do complexo I kB/NF-kB permite o transporte do NF-kB para o núcleo, com consequente ligação desse nos genes que apresentam a seqüência regulatória GGGACTTCC junto à região promotora, levando a um aumento na expressão do gene alvo. A

fosforilação do I<sub>K</sub>B ocorre pela ação de proteínas quinase específicas, como o complexo I<sub>K</sub>B quinase (IKK), que contém duas subunidades com propriedades de quinase: IKKa e IKKb (Zandi *et al.*, 1997). O complexo IKK é capaz de discernir entre o I<sub>K</sub>B complexado e o I<sub>K</sub>B livre, explicando o fato do I<sub>K</sub>B poder acumular-se nas células onde o IKK permanece ativado (Zandi *et al.*, 1997). Vale lembrar que muitas proteínas quinase estão envolvidas nesse processo de fosforilação e que esse mecanismo não está totalmente elucidado. A implicação desse fator de transcrição como alvo terapêutico decorre da enorme quantidade de genes que sofrem regulação pelo fator NF-<sub>k</sub>B, implicados em vários processos celulares, tais como desenvolvimento, plasticidade, morte e defesa celular (figura 11 e 12)(Helenius *et al.*, 1996a; Helenius *et al.*, 1996b).



**Figura 11.** Esquema da via de sinalização do TNF- $\alpha$  (<http://www.grt.kyushu-u.ac.jp/spad/pathway/tnf.html>)



**Figura 12.** Mecanismo de ativação do NF-κB mediado por espécies reativas de oxigênio e transcrição do gene pró-inflamatório (Rajendrasozhan *et al.*, 2008)

## 2.5 – PROTEÍNA DE ALTA MOBILIDADE BOX 1 (HMGB-1)

HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) ou proteína de alta mobilidade box 1, pertence à família das proteínas nucleares HMG (*high mobility group*). As HMGs foram descobertas em 1973, por Goodwin e assim chamadas, devido à sua rápida migração em géis de poliacrilamida, caracterizando, assim, uma marcante mobilidade eletroforética. Muito abundante nas células, cerca de 1 milhão de cópias/célula, é altamente conservada entre os mamíferos: entre ratos e camundongos há 100% de similaridade, entre humanos e roedores há 98% (Yang *et al.*, 2005). Proteínas tipo HMGB1 também são encontradas em leveduras, bactérias e plantas (Yang *et al.*, 2005).

A HMGB-1 foi inicialmente caracterizada como uma proteína nuclear não-histona, com peso molecular de 25kDa. Além disso, a HMGB1 tem como funções nucleares estabilizar a formação do nucleossomo, facilitar/regular a transcrição gênica e modular a atividade de receptores esteroidais (Yang *et al.*, 2005).

Em 1999, a atenção à HMGB-1 foi alavancada quando Tracey e colaboradores (Wang *et al.*, 1999) detectaram essa proteína nuclear em soro de pacientes com sepse, nos quais o aumento nos níveis de HMGB-1 foi relacionado com a diminuição da sobrevivência. Este foi um trabalho inicial que motivou pesquisas que visassem conhecer as conexões entre HMGB-1 e resposta inflamatória.

A HMGB-1 é considerada uma citocina de expressão tardia quando comparada com o tempo e liberação de citocinas clássicas como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Wang *et al.*, 1999). Ela pode ser encontrada no espaço extracelular a partir de dois processos. Pode ser ativamente secretada por células que participam do processo inflamatório, como macrófagos (Andersson *et al.*, 2000), células dendríticas (Dumitriu

*et al.*, 2005) e até células endoteliais (Fiuza *et al.*, 2003; Mullins *et al.*, 2004) e tumorais (Kuniyasu *et al.*, 2005) ou pode ser liberada por necrose celular, quando há perda de todo conteúdo celular para o meio (Scaffidi *et al.*, 2002). Para que a HMGB-1 seja secretada ela precisa sair do núcleo e deve sofrer acetilações nos resíduos de lisina. No entanto, a proteína pode permanecer no citoplasma. A hiperacetilação impede o transporte de volta ao núcleo (Bonaldi *et al.*, 2003).

Quando no espaço extracelular, seu sinal é transduzido a partir de sua ligação com receptores plasmáticos. Até hoje três tipos já foram encontrados e, em alguns modelos experimentais, cascatas de sinalização já foram descritas. O primeiro descrito foi o RAGE, que foi inicialmente relacionado como receptor para anfotericina (HMGB-1 em neuritos). Sabe-se que a ação de HMGB-1 via RAGE ativa o fator nuclear κB (NF-κB *nuclear factor kappa b*) por meio das quinases de proteínas ativadas por mitógenos (MAPK *mitogen-activated protein kinases*) tendo como resultados produção de citocinas e a sobrevivência celular (Yang *et al.*, 2005). Também pode ocorrer a ligação de HMGB-1 com receptores tipo Toll 2 e 4 (TLR2 e TLR4 *toll-like receptors*). Esta cascata também culmina com ativação de NF-κB, mas por uma rota dependente de MyD88, resultando em transcrição de genes pró-inflamatórios (Yu *et al.*, 2006), respostas similares ao efeito de lipopolissacarídeo (LPS *lipopolysaccharide*). Entretanto muitos resultados encontrados não podem ser relacionados a nenhum desses três receptores, sugerindo que há outros receptores para HMGB1 ou que há sinergismos na sinalização (Lotzel e Tracey, 2005).

Especula-se que níveis séricos baixos de HMGB-1 poderiam mediar efeitos benéficos ao organismo (Lotzel e Tracey, 2005; Limana *et al.*, 2005). A HMGB-1 possui atividade tecido-específica como outras citocinas e a elucidação dos

processos pelos quais esta proteína controla as respostas inflamatórias poderão trazer novas perspectivas para o tratamento de doenças.

### 3 – OBJETIVOS

#### 3.1 – OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica à fumaça de cigarro por 5 e 60 dias no parênquima pulmonar de camundongos e estudar a ação de drogas antioxidantes administradas por via oral.

#### 3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

❖ Estudo 1— Inflamação Pulmonar Crônica:

- Avaliar o infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarro.
- Avaliar o estresse oxidativo através de mensuração da atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Glutationa peroxidase (GSH-Px) e Catalase (CAT).
- Avaliar o dano oxidativo através da mensuração do malondialdeído.
- Avaliar a histoarquitetura pulmonar, analisando a deposição de fibras de elastina do sistema elástico.
- Avaliar a expressão de MMP-12 e HMGB-1.
- Avaliar a atividade gelatinolítica das proteínas encontradas no tecido pulmonar.
- Analisar a mecânica ventilatória de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias.

- Analisar, por meio da estereologia, a integridade do tecido pulmonar quanto às densidades de volume e de superfície de alvéolos (septos e espaços alveolares).

❖ **Estudo 2— Inflamação Pulmonar Aguda e Crônica:**

- Analisar e comparar o influxo de células inflamatórias para o parênquima pulmonar em animais expostos à fumaça de cigarro e naqueles que serão tratados com N-acetilcisteína, Alopurinol ou Mercaptopropionilglicina.
- Observar a histoarquitetura pulmonar, analisando a deposição de fibras de elastina do sistema elástico.
- Analisar o dano oxidativo, sob a forma de peroxidação lipídica, nos extratos pulmonares.
- Analisar, por meio da estereologia, a integridade do tecido pulmonar quanto às densidades de volume e de superfície de alvéolos (septos e espaços alveolares).
- Avaliar o estresse oxidativo através de mensuração da atividade de enzimas antioxidantes: Superóxido dismutase (SOD), Glutationa peroxidase (GSH-Px) e Catalase (CAT).

## 4 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 – ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 machos, com 8 semanas de idade, acondicionados em grupos de seis animais por caixa, no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia, UERJ, com temperatura e umidade controladas a  $21\pm2^{\circ}\text{C}$  e  $50\pm10\%$ , respectivamente, submetidos a ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19h - 7h) e exaustão 15 min/h. Durante todo o período de experimento, os animais receberam ração padrão balanceada e água *ad libitum*. Os protocolos de manuseio e experimentação seguiram o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, publicado pelo “US National Institutes of Health” (publicação nº 85-23, revisado in 1985). O projeto deste trabalho foi submetido à Comissão de Ética para Trabalhos com Animais de Experimentação – IBRAG – UERJ (Nº de Protocolo 037/2009).

### 4.2 – EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

Durante cinco ou sessenta dias, através da utilização de uma câmara de inalação de fumaça de cigarro, os animais foram expostos a um total de 6 ou 12 cigarros comerciais por dia, divididos em três vezes ao dia (manhã, tarde e noite, quatro cigarros por inalação). Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de vidro de 60 ml com a qual se injetou fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa terminou com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Um cigarro gerou aproximadamente 1l de fumaça que foi diluído em 30l (capacidade da câmara). A

concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% durante 6 minutos por cigarro. Após este período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça e, por um minuto, os animais tinham contato com o ar ambiente, quando então, o procedimento se repetia com os demais cigarros (Valenca *et al.*, 2004). Os animais ventilando em ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle (Figura 13).



**Figura 13** – Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).

#### **4.2.1 – ESTUDO 1: INFLAMAÇÃO PULMONAR CRÔNICA – ANÁLISE DA MECÂNICA VENTILATÓRIA E DA EXPRESSÃO DE MMP-12 E HMGB-1**

Os animais foram divididos em dois grupos (n=10 por grupo):

- **Grupo controle (C)** — camundongos ventilando em ar ambiente;
- **Grupo Exposição à Fumaça de Cigarro (CS)** — camundongos expostos à fumaça de 12 cigarros por dia, durante 60 dias;

#### **4.2.2 – ESTUDO 2: INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA E CRÔNICA E O TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES**

Os animais foram divididos em cinco grupos (n=20 por grupo):

- **Grupo controle (C)** — camundongos expostos ao ar ambiente;
- **Grupo Exposição à Fumaça de Cigarro (CS)** — camundongos expostos à fumaça de 6 ou 12 cigarros por dia, durante 5 ou 60 dias, respectivamente;
- **Grupo Exposição à Fumaça de Cigarro + N-acetilcisteína (CSN)** — camundongos expostos à fumaça de 6 ou 12 cigarros por dia, durante 5 ou 60 dias, tratados com N-acetilcisteína (60 mg/.kg-1.dia-1);
- **Grupo Exposição à Fumaça de Cigarro + Alopurinol (CSA)** — camundongos expostos à fumaça de 6 ou 12 cigarros por dia, durante 5 ou 60 dias, tratados com alopurinol (50 mg/.kg-1.dia-1);
- **Grupo Exposição à Fumaça de Cigarro + Mercaptopropionilglicina (CSM)** — camundongos expostos à fumaça de 6 ou 12 cigarros por dia, durante 5 dias, tratados com mercaptopropionilglicina (60 mg/.kg-1.dia-1).

Todas as drogas foram administradas pela manhã, uma hora antes da exposição à fumaça de cigarro via gavagem orogástrica, diluídas em soro fisiológico (Figura 14).



**Figura 14.** Técnica de gavagem orogástrica

#### **4.3 - LAVADO BRONCOALVEOLAR**

Imediatamente após o sacrifício, o tórax de cada animal foi aberto para a realização do lavado broncoalveolar. O pulmão direito foi clampeado, a traquéia canulada e o pulmão direito foi lavado com 1,5ml de solução salina (3 x 500µl). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Após o término de todos os grupos, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM mod. 243M, São Paulo, Brasil) a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer.

#### **4.4 - PROCESSAMENTO TECIDUAL**

Após a realização do lavado broncoalveolar, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. O pulmão direito foi

clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traquéia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH<sub>2</sub>O por 2 minutos. O pulmão esquerdo então foi removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, o material foi processado da seguinte forma: banho de em água corrente por 30 minutos; banho em álcool a 70% e 90% por 1 h cada etapa; 2 banhos em álcool a 100% por 1 h cada; 2 banhos de xilol de 1 h cada; 2 banhos em parafina de 1 h cada e inclusão em parafina.

Após processamento de rotina e inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados a quatro micrômetros de espessura, os quais foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise histopatológica e resorcina-fucsina de Weigert para visualização das fibras do sistema elástico.

#### **4.5 - HOMOGENEIZADO TECIDUAL**

Em seguida à retirada do pulmão esquerdo para histologia, o pulmão direito foi imediatamente removido e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Depois, o órgão foi homogeneizado (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras ajustado para 1,5ml com tampão fosfato. Essas amostras foram armazenadas em freezer para posterior análise bioquímica.

#### **4.6 – MORFOMETRIA E ESTEREOLOGIA**

O número total de macrófagos e neutrófilos alveolares foi estimado contando-se dez campos aleatórios em duas lâminas não identificadas. Os campos foram observados com a objetiva de 20x através de um monitor (Philips mod. PV461/781, Manaus, Brasil) ligado a um sistema de vídeo-microscopia (câmera de vídeo colorida JVC mod. TK-C380, Osaka, Japão e microscópio Carl Zeiss mod. Axiolab, Oberkochen, Alemanha) com área total de  $24.640\mu\text{m}^2$ . Para estimar as densidades de volume de espaço aéreo total e de fibras do sistema elástico, 10 campos aleatórios foram contados em cada lâmina através de um sistema-teste composta por 16 pontos. Este sistema-teste foi acoplado à tela do monitor. O número total de pontos que interceptavam os espaços aéreos e as fibras elásticas foi contado para estimar as densidades de volume ( $Vv$ ) dessas estruturas  $Vv = Pp/Pt$ , onde  $Pp$  são os pontos contados e  $Pt$  são os pontos totais do sistema teste. A densidade de volume de espaço aéreo total ( $Vv_{air}$ ) foi estimada em lâminas coradas com HE e a densidade de volume das fibras do sistema elástico ( $Vv_{fe}$ ) foi estimada em lâminas coradas com Weigert. A quantificação das densidades de volumes foi realizada em lâminas não identificadas por dois investigadores em tempos distintos.

#### **4.7 - IMUNOHISTOQUÍMICA DO PULMÃO PARA MMP-12 E HMGB-1**

O tecido pulmonar dos animais foi processado conforme descrito acima até a etapa de corte. Após esta etapa, as lâminas receberam 3 banhos em xilol para a retirada da parafina e foram hidratadas pela imersão por 5 minutos nas soluções de álcool 100%, álcool 90% e álcool 70%. Em seguida a lâminas foram lavadas com

água destilada e incubadas com uma solução de metanol a 3% com H<sub>2</sub>O (v/v) por 15 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada em tampão fosfato (pH 7,4). A seguir, foi feita uma incubação do material em tampão fosfato 1% de albumina sérica bovina (BSA). As lâminas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato por 5 minutos cada. Após a lavagem foi adicionada uma solução de tampão fosfato contendo 1% de BSA e anticorpo monoclonal de cabra contra MMP-12 ou HMGB-1 de camundongos na concentração de 200 µg/mL por 30 minutos. Esta etapa foi finalizada com 3 banhos nas lâminas por 5 minutos cada com tampão fosfato. A seguir, foi feita uma incubação com uma solução de tampão fosfato contendo 1 % de BSA e 200 µg/mL de anticorpo policlonal de coelho (conjugado a uma peroxidase) contra anticorpo de cabra, por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com 3 banhos de tampão fosfato por 5 minutos cada. O material foi imerso em uma solução de tampão fosfato contendo 3'-3-diaminobenzina na concentração de 5 mg/mL por 5 minutos e em seguida lavada em água. Os tecidos foram contracorados com hematoxilina de Mayer por 20 segundos e em seguida, desidratados nas soluções de álcool a 70%, 90% e 100% e clareados com imersão em xilol por 30 segundos. O processo foi finalizado com a montagem das lâminas utilizando laminina e entelan. Os tecidos foram observados no microscópio (Olympus P2-BHCRA,EUA), com objetiva da 40 vezes. Cinco campos aleatórios foram escolhidos seguidamente para contagem dos macrófagos alveolares.

#### **4.8 – DOSAGEM DE PROTEÍNA**

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomasie brilhante azul, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorbância de 465nm para 595nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Uma curva padrão foi produzida através de concentrações crescentes da proteína albumina (0,5-10µl) em triplicata.

#### **4.9 – ANÁLISE DO DANO OXIDATIVO (TBARS)**

O dano oxidativo foi mensurado pela concentração de malondialdeído (MDA) usando o método do TBARS. O dano em lipídios de membrana é determinado pela formação de subprodutos da lipoperoxidação (malondialdeído-MDA), que são substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico formada durante a peroxidação em sistemas de membranas e microssomos. MDA reage com o TBA gerando um produto colorido róseo lido em espectrofotômetro (532nm) (Draper *et al.*, 1993).

Para a realização do método do TBARS foram utilizados os seguintes reagentes: TCA, tampão para TBA, TMP e TBA. A seguir observamos o protocolo para preparo dos reagentes:

a) Tampão:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2,17 \text{ g (7H}_2\text{O)}$

- 1,44 g (2 H<sub>2</sub>O)

- 0,26 g (1 H<sub>2</sub>O)

KCl (140mM) – 5,22g

Obs.: diluir em 250 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar o pH (7,4), completar o volume final ate 500 ml. Guardar em geladeira.

b) TBA: 0,67% (preparar na hora: 670 mg de TBA para 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada (preferencialmente miliq)

Obs.: Colocar o TBA + H<sub>2</sub>O em um Becker revestido com papel alumínio. Agitar no agitador magnético com aquecimento.

c) TCA: 10% de ácido tricloroacético

d) TMP (1,1,3,3 – tetrametoxipropano)

D – 0,997 g/ml

PM – 167,2 g

6,09 M = 0,0061 moles/ml

Obs.: padrão de uso é  $2 \times 10^{-9}$  moles/ml

- Dissolver 10 µl de TMP em 500 µl de H<sub>2</sub>O destilada = solução A (agitar e esperar 2 min), ( $12,2 \times 10^{-6}$  moles/ml).
- 100 µl de solução A e dissolver em 4900 µl de H<sub>2</sub>O destilada = solução B (agitar e esperar por 2 min), ( $244 \times 10^{-9}$  moles/ml).
- 41 µl de solução B e dissolver em 5000 µl de H<sub>2</sub>O destilada = solução de uso (2 nmoles/ml)
- Guardar em frasco âmbar, conservar em geladeira.

As amostras de homogeneizado de pulmão (400 µl) foram desproteinizadas com 800µl de ácido tricloroacético 10% e centrifugado a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos. Então 1000 µl do sobrenadante foram misturados a 1000 µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. A mistura foi aquecida por 60 min a 100º C e após resfriado a temperatura ambiente. A absorbância da fase orgânica contendo o cromógeno rosa formado foi mensurada espectrofotometricamente a 532nm. O método foi padronizado com concentrações crescentes de MDA. Os resultados foram expressos in nMol/mg proteína.

Curva Padrão:

Curva	[TMP] em nmol	[TMP] em µl	Quantidade de KPE	Volume de TBA	Volume Final
BCO	X	X	1000 µl	1000 µl	2000 µl
1	0,02	20 µl	980 µl	1000 µl	2000 µl
3	0,1	100 µl	900 µl	1000 µl	2000 µl
5	0,5	500 µl	500 µl	1000 µl	2000 µl
7	1,0	1000 µl	X	1000 µl	2000 µl

#### 4.10 – ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES (SOD, GSH-Px E CAT)

Homogeneizados de tecido pulmonar foram utilizados para determinar as atividades de enzimas importantes no processo de defesa antioxidante tecidual.

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do radical superóxido (Hollander *et al.*, 2000). Está presente na matriz mitocondrial (Mn-SOD), no citosol (CuZn-SOD) e no meio extracelular. O produto resultante da reação catalisada pela SOD é o peróxido de hidrogênio que deve ser retirado do meio o mais rápido

possível. Uma unidade de enzima é definida pela quantidade transformada em 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto. A atividade enzimática será estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm). A adrenalina é oxidada pelo ânion superóxido para formar um produto róseo, adrenocromo.

Para a mensuração da atividade da SOD foram utilizados os seguintes reagentes: Tampão glicina, adrenalina e catalase. A seguir observa-se o protocolo de preparo dos reagentes:

- a) Adrenalina (PM = 333g): Fazer uma solução a 60 mM em água destilada e acrescentar HCl fumegante (para 1 ml de água = 15  $\mu\text{l}$  de HCl)
- b) Catalase: 0,0024 g/ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada
- c) Tampão Glicina: 0,75 g em 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada

Obs.: Diluir a glicina em 150 ml de água destilada e ajustar o pH para 10,2 com NaOH 1N, após completar o volume numa proveta para 200 ml. A leitura foi realizada nas seguintes etapas:

- a) 20  $\mu\text{l}$  de catalase + 1940  $\mu\text{l}$  de tampão glicina (em temperatura ambiente) = branco

Colocar 40  $\mu\text{l}$  de adrenalina e ler em 180 segundos com intervalos de 10 segundos.

- b) 20  $\mu\text{l}$  de catalase + amostra (20, 40 ou 60  $\mu\text{l}$ ) + 1940  $\mu\text{l}$  de tampão glicina

Colocar 40  $\mu\text{l}$  de adrenalina e ler como dito anteriormente.

A adrenalina foi preparada na hora e a leitura realizada em um tempo de 180 segundos, com intervalo de 10 segundos e comprimento de onda de 480 nm. O resultado é representado por U/mg de proteína.

A atividade da GSH-Px determinada pela mensuração da oxidação do NADPH a uma absorbância de 340nm em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, representada por µmol/min/mg de proteína. Foram utilizados os seguintes reagentes para a realização da técnica: tampão fosfato, glutationa redutase (GR – from yeast), glutationa reduzida (GSH), NADPH, NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ázida sódica. Foi adicionado na cubeta 1000 µl de tampão fosfato + 200 µl de amostra + 200 µl de GR + 200 µl de GSH + 50 µl de ázida sódica. Para facilitar a pipetagem, foi misturado previamente, em um outro tubo, as quantidades de tampão, GR, GSH e ázida que foram utilizadas no experimento, e então desta solução foi alicotado 1450 µl na cubeta. A solução foi então pré-incubada por 10 minutos (esse passo é importante para que a glutationa redutase possa ter suas cisteínas reduzidas e recupere sua ação). Posteriormente, foi acrescentado 200 µl de NADPH, tendo início a leitura. O decaimento foi monitorado por 3 minutos e em seguida foram acrescentados 200 µl de peróxido de hidrogênio e a leitura realizada em 5 minutos, com registros a cada 10 segundos.

A atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decréscimo de peróxido de hidrogênio a uma absorbância de 240nm, representada por U/mg de proteína. Foram utilizados os seguintes reagentes: Tampão Fosfato e peróxido de hidrogênio, que foram preparados de acordo com o protocolo a seguir:

a) Tampão fosfato (PBS):

NaCl (136, 9 mM) - 8,0086 g (anidro PA)

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,27 mM) - 0,0383 g (anidro)

- 0,48 g (2 H<sub>2</sub>O)

- 0,0724 g (7 H<sub>2</sub>O)

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,1 mM) - 0,1496 g (anidro PA)

Obs.: Diluir em água destilada com volume final de 1000 ml (conservar em geladeira)

- b) Tampão com peróxido = 25 ml de tampão para 40 µl de peróxido de hidrogênio

Após preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro, onde o tampão com peróxido foi alicotado juntamente com cada uma das amostras em cubeta de quartzo (1940 µl e 60 µl, respectivamente). Foram anotados os decaimentos nos tempos 0, 30 e 60 segundos.

O teor protéico total é médio e amostras do tecido do pulmão direito realizado pelo método de Bradford (Bradford *et al.*, 1976).

#### **4.11 – WESTERN BLOTTING**

O lobo superior do pulmão direito foi utilizado para analisar a expressão de MMP-12 e HMGB-1. Depois de macerado o conteúdo foi adicionado de 100 µL de tampão de lise, agitado, sonicado durante 1 minuto e conservado em gelo durante 10 minutos. Realizou-se uma centrifugação a 1500 x g (4.700 RPM) por 10 minutos a fim de separar as proteínas de debris. O sobrenadante foi, então, coletado, identificado e estocado a 70º C. As amostras foram corridas em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% por 2 horas. A eletrotransferência foi realizada com utilização de membrana PVDF. Cada membrana foi incubada com anticorpo primário policlonal para MMP-12 e HMGB1 (Santa Cruz Biotechnology). Para revelação, segue-se a incubação das membranas com um kit contendo anticorpo secundário

biotinilado conjugado a estreptavidina (Santa Cruz Biotechnology). Diaminobenzidina foi usado como cromógeno. Os controles negativos foram feitos, substituindo o anticorpo primário por soro de cabra.

#### **4.12 – ZIMOGRAFIA**

A mesma quantidade protéica do extrato citoplasmático foi incubada em tampão de amostra não redutor e submetido à eletroforese em 10% SDS-PAGE contendo 1,6 mg/ml de gelatina ou elastina (Bio Rad) como substrato. Após eletroforese, os géis foram lavados duas vezes, por 30 minutos, em solução aquosa de 2% de Triton X-100 e incubados por 16 h a 37°C em tampão de ativação composto por 10 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 5 mM de CaCl<sub>2</sub>. A seguir, os géis foram corados com Coomassie blue R 250 (Bio Rad). As proteínas com atividade gelatinolítica foram observadas como bandas negativas.

#### 4.13 – ANÁLISE DA MECÂNICA VENTILATÓRIA<sup>2</sup>

Vinte quatro horas após a última inalação, os animais foram sedados com diazepam (1mg i.p.), em seguida pesados (balança Filizola, modelo BR, Indústrias Filizola AS, SP, Brasil) e, então, anestesiados com pentobarbital sódico (20 mg/kg i.p.).

Depois de anestesiados, os animais foram colocados em uma pequena mesa sob foco cirúrgico em decúbito dorsal, sendo seus membros fixados por esparadrapo. Os membros superiores foram mantidos horizontalmente abduzidos em 90 graus em relação ao corpo e aos membros inferiores estendidos em diagonal. Após o posicionamento cirúrgico, foi realizada traqueostomia com introdução de jelco 20 G com 33 mm de comprimento e 1,1 mm de diâmetro interno, sendo a cânula fixada à traquéia por meio de fios de algodão. Os animais foram paralisados com trietiliodeto de galamina (2 mg/kg), por administração intraperitoneal.

Os camundongos foram, então, acoplados à prótese ventilatória e ventilados por um ventilador de fluxo constante (Samay VR15, Universidad de La Republica, Montevideu, Uruguai) com frequência de 100 incursões respiratórias por minuto e um volume corrente ( $V_T$ ) de 0,2 mL.

Após a adaptação ao respirador, os animais foram submetidos à incisão cirúrgica por tesoura na linha média do abdome justo abaixo do apêndice xifóide. A incisão foi estendida, superficialmente, ao longo da parede torácica sobre o esterno, sendo, então, a pele do animal retirada por tração lateral. A seguir, a incisão abdominal foi estendida lateralmente, para a esquerda e para a direita, seguindo o bordo inferior das costelas, até atingir a linha axilar anterior, bilateralmente. As vias aéreas foram ocluídas ao final da expiração. Neste tempo, foi possível visualizar o

---

<sup>2</sup> Realizado apenas nos animais do estudo 1.

diafragma. Justo antes da perfuração do diafragma, a cânula traqueal foi conectada ao transdutor de pressão. Após a seção do diafragma, a elevação da pressão representava a pressão de retração elástica do pulmão. Tal valor pressórico foi aplicado ao sistema como pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de aproximadamente 2 cmH<sub>2</sub>O, a fim de evitar o desenvolvimento de colapso pulmonar e atelectasias (Saldiva *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 1993). Após retirar o diafragma, a parede torácica foi removida em bloco por incisões longitudinais bilaterais ao nível da linha axilar anterior, em toda sua extensão, e seção transversal abaixo das clavículas.

O ventilador foi ajustado previamente para gerar, quando desejado, uma pausa de 5 segundos ao final da inspiração. Foram tomados cuidados especiais na manutenção do volume ( $V_T = 0,2\text{ mL}$ ) e fluxo ( $V' = 1\text{ mL/s}$ ) constantes em todos os animais, a fim de evitar os efeitos de diferentes fluxos, volumes e duração da inspiração nas variáveis medidas (Kochi *et al.*, 1988a, 1988b; Similowski *et al.*, 1989).

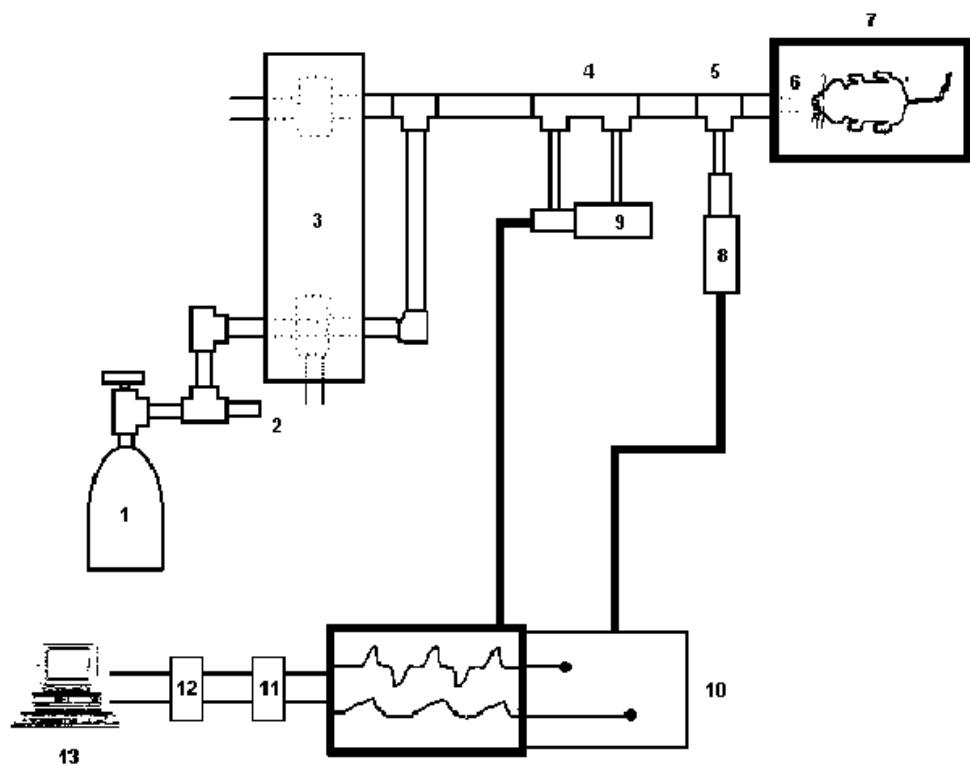
O tubo traqueal foi conectado a um pneumotacógrafo para pequenos animais, descrito por Mortola e Noworaj (1983), sendo o respirador acoplado à outra extremidade do pneumotacógrafo. Este é constituído por cânula metálica com duas saídas laterais conectadas a um transdutor diferencial de pressão, Validyne MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA), para medida de fluxo aéreo e volume corrente. Por intermédio de outra saída lateral, a via aérea foi conectada a um transdutor diferencial de pressão Valydine MP 45-2 (Engineering Corp, Northridge, CA, EUA) para medida da pressão traqueal (Ptr).

Uma vez que não existiram modificações abruptas no diâmetro do nosso circuito, provavelmente foram evitados erros de medida da resistência ao fluxo

(Chang e Mortola, 1981; Loring *et al.*, 1979). O espaço morto do equipamento foi de 0,3 mL. Todos os sinais foram condicionados e amplificados num polígrafo Beckman tipo R (Beckman Instruments Schiller Park, IL, EUA). Os sinais de pressão e fluxo foram passados por meio de filtros Bessel de 8 pólos (902LPF, Frequency Devices, Haverhill, MA, EUA), convertidos de analógico para digital (DT-2801A, Data Translation, Malboro, MA, EUA) e armazenados em computador. Todos os dados foram coletados usando o software LABDAT (RHT-InfoData Inc., Montreal, Quebec, Canadá) (Figura 15).

Durante os experimentos evitou-se ao máximo a manipulação da cânula traqueal com aspirações e insuflações, para eliminar possíveis interferências sobre os parâmetros medidos.

A mecânica respiratória foi obtida pela captação de 15 ciclos respiratórios, pelo método da oclusão ao final da inspiração, descrito a seguir.



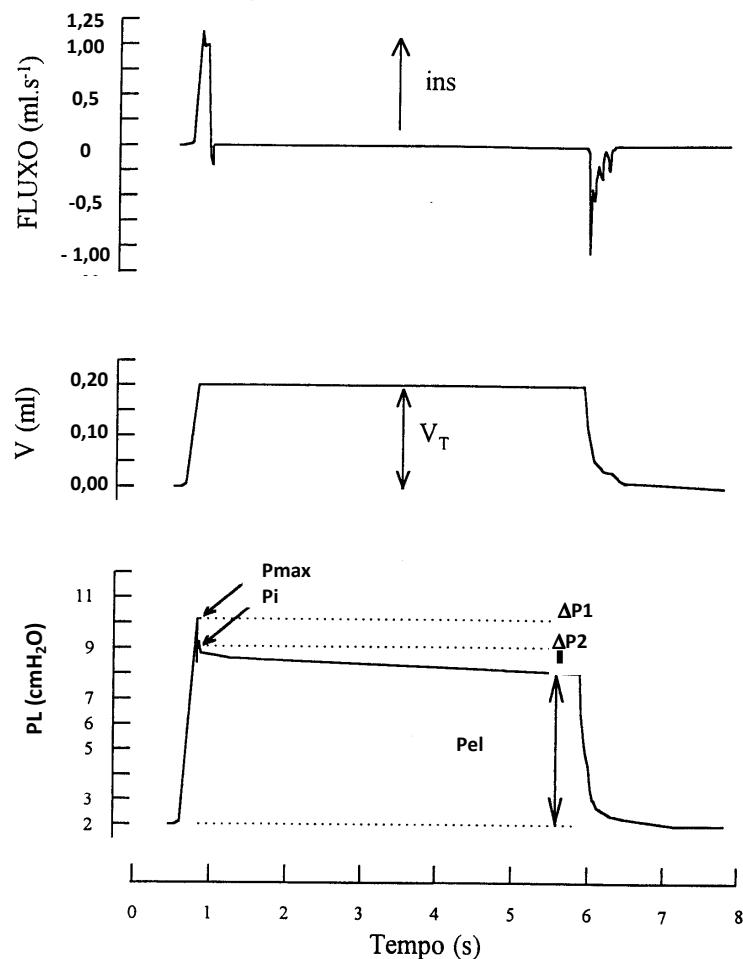
**Figura 15 – Montagem experimental consistindo de:**

- 1 - Cilindro de ar comprimido.
- 2 - Válvula redutora de pressão.
- 3 - Ventilador de fluxo inspiratório constante composto por duas válvulas solenóides.
- 4 - Pneumotacógrafo.
- 5 - Peça T para medida de pressão nas vias aéreas.
- 6 - Cânula traqueal.
- 7 - Mesa cirúrgica.
- 8 - Transdutor diferencial de pressão para medida de pressão transpulmonar.
- 9 - Transdutor diferencial de pressão para medida de fluxo.
- 10 - Polígrafo de oito canais com amplificação dos sinais de fluxo e pressão transpulmonar.
- 11 - Filtros.
- 12 - Conversor analógico-digital de 12 bits.
- 13 - Microcomputador.

#### 4.14 – MÉTODO DE OCLUSÃO AO FINAL DA INSPIRAÇÃO

A mecânica respiratória foi avaliada pelo método de oclusão ao final da inspiração (Bates *et al.*, 1985), que permite analisar, separadamente os componentes elástico, resistivo e viscoelástico e/ou inhomogêneo do sistema respiratório (Figura 16).

No animal com o tórax aberto, a  $P_{tr}$  é, na realidade, a pressão transpulmonar (PL). Após a oclusão das vias aéreas ao final da inspiração, sob fluxo constante, ocorre uma queda súbita da PL até um ponto de inflexão ( $P_i$ ) a partir do qual o decaimento da pressão assume caráter mais lento, atingindo um platô em sua porção terminal. Esta fase de platô corresponde à pressão de retração elástica do pulmão ( $P_{el}$ ). A diferença de pressão ( $\Delta P_1$ ) que caracteriza a queda rápida inicial, representada pela diferença entre a pressão máxima inicial ( $P_{max}$ ) e o ponto a partir do qual a queda se torna mais lenta ( $P_i$ ), corresponde ao componente viscoso pulmonar. A segunda variação de pressão ( $\Delta P_2$ ), representada pela queda lenta, do  $P_i$  ao platô ( $P_{el}$ ), reflete a pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico (“*stress relaxation*”) e/ou inhomogêneo (“*pendelluft*”) do tecido pulmonar. A soma de  $\Delta P_1$  e  $\Delta P_2$  fornece a variação total de pressão resistiva no pulmão ( $\Delta P_{tot}$ ).



**Figura 16 – Método de Oclusão ao Final da Inspiração.** Registros dos sinais de fluxo aéreo, volume ( $V$ ) e pressão transpulmonar ( $PL$ ) em função do tempo. Os pulmões foram ventilados com volume corrente de 0,2 mL e fluxo aéreo de 1 mL/s. O platô foi alcançado após uma pausa inspiratória de 5 s. Após a oclusão das vias aéreas, há uma queda rápida na  $PL$  ( $\Delta P1$ ) que corresponde a  $P_{max} - P_i$ , pressão dissipada para vencer o componente viscoso do pulmão, seguida por uma queda lenta ( $\Delta P2$ ), pressão dissipada para vencer os componentes viscoelástico e/ou inhomogêneo do pulmão, até um ponto de equilíbrio elástico, representada pela pressão de retração elástica pulmonar ( $P_{el}$ ). A linha de base do registro de pressão corresponde à pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH<sub>2</sub>O (neste animal).

A elastância estática (Est) do pulmão foi, então, obtida dividindo-se Pel pelo volume corrente. Para a realização da oclusão, o aparelho utiliza uma válvula com tempo de fechamento definido (10ms). Como este fechamento não é absolutamente instantâneo, o volume nunca cai a zero imediatamente após a oclusão, propiciando, assim, a existência de um pequeno fluxo. Este fluxo é responsável pelo aumento do volume pulmonar e, consequentemente, de Pi e Pel. Por isso, foi feita uma correção de acordo com Kochi *et al.* (1988a).

As seguintes fórmulas foram utilizadas na análise da mecânica pulmonar:

$$\Delta P_1 = P_{max} - P_i$$

$$\Delta P_2 = P_i - P_{el}$$

$$\Delta P_{tot} = \Delta P_1 + \Delta P_2$$

$$Est = P_{el} / V_T$$

$$Edyn = P_i / V_T$$

$$\Delta E = Edyn - Est$$

$$Cst = V_T / P_{el}$$

Onde:

$\Delta P_1$  = variação de pressão gasta para vencer o componente viscoso pulmonar

$\Delta P_2$  = variação de pressão dispendida para vencer o componente viscoelástico e/ou inhomogêneo pulmonar

Pmax = pressão pulmonar máxima atingida

Pi = pressão pulmonar no ponto de inflexão

Pel = pressão de retração elástica pulmonar

Est = elastância estática do pulmão

Edyn = elastância dinâmica do pulmão

$\Delta E$  = diferença entre as elastâncias dinâmica e estática pulmonares

$V_T$  = volume corrente

Cst= complacência estática

A resistência total do equipamento ( $Req$ ), incluindo a cânula traqueal, foi previamente aferida pela aplicação de fluxos de ar ao sistema, com concomitante registro das variações de pressão ( $\Delta P$ ). Uma vez que  $R = \Delta P / V'$ , a resistência do equipamento corresponde ao coeficiente angular da curva  $\Delta P \times V'$ . A  $Req$ , constante até fluxos de 26 mL/s (bem acima da faixa de fluxo utilizada no presente experimento), foi de 0,12 cmH<sub>2</sub>O/mL/s. A variação de pressão determinada pelo equipamento ( $\Delta Peq = Req \cdot V'$ ) foi subtraída das pressões resistivas do pulmão, de tal forma que os resultados representam suas propriedades mecânicas intrínsecas.

A capacidade residual funcional foi mensurada através do método Sherle (1970). Nesse método, colocamos sobre uma balança um recipiente contendo salina isotônica e o pesamos (peso inicial  $P_1$ ). Depois colocamos o órgão dentro do recipiente sem tocar em suas paredes (suspensos por um fio no caso de órgãos sólidos).

#### **4.15 – ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. As diferenças das variáveis entre os grupos foram testadas pela análise de variância One-way ANOVA. As diferenças intergrupais foram testadas a partir do pós-teste de Newmann-Keuls. As diferenças significativas foram consideradas quando  $P < 0,05$ .

As análises estereológicas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis e as análises entre os grupos foram feitas utilizando-se o pós-teste de Dunn. Diferença significativa é considerada quando  $P < 0,05$ .

## 5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 – ESTUDO 1: INFLAMAÇÃO PULMONAR CRÔNICA – ANÁLISE DA MECÂNICA VENTILATÓRIA E DA EXPRESSÃO DE MMP-12 E HMGB1

A contagem das células do lavado broncoalveolar (BAL) é mostrada na tabela 1. A quantidade de macrófagos alveolares e neutrófilos (células  $\times 10^3/\text{mL}$ ) estava aumentada ( $p<0,001$ ) no grupo exposto à fumaça de cigarro (CS) ( $413,8 \pm 30,6$  e  $63,2 \pm 6,0$ ) em relação ao grupo controle ( $158,4 \pm 15,0$  e  $4,6 \pm 2,0$ , respectivamente).

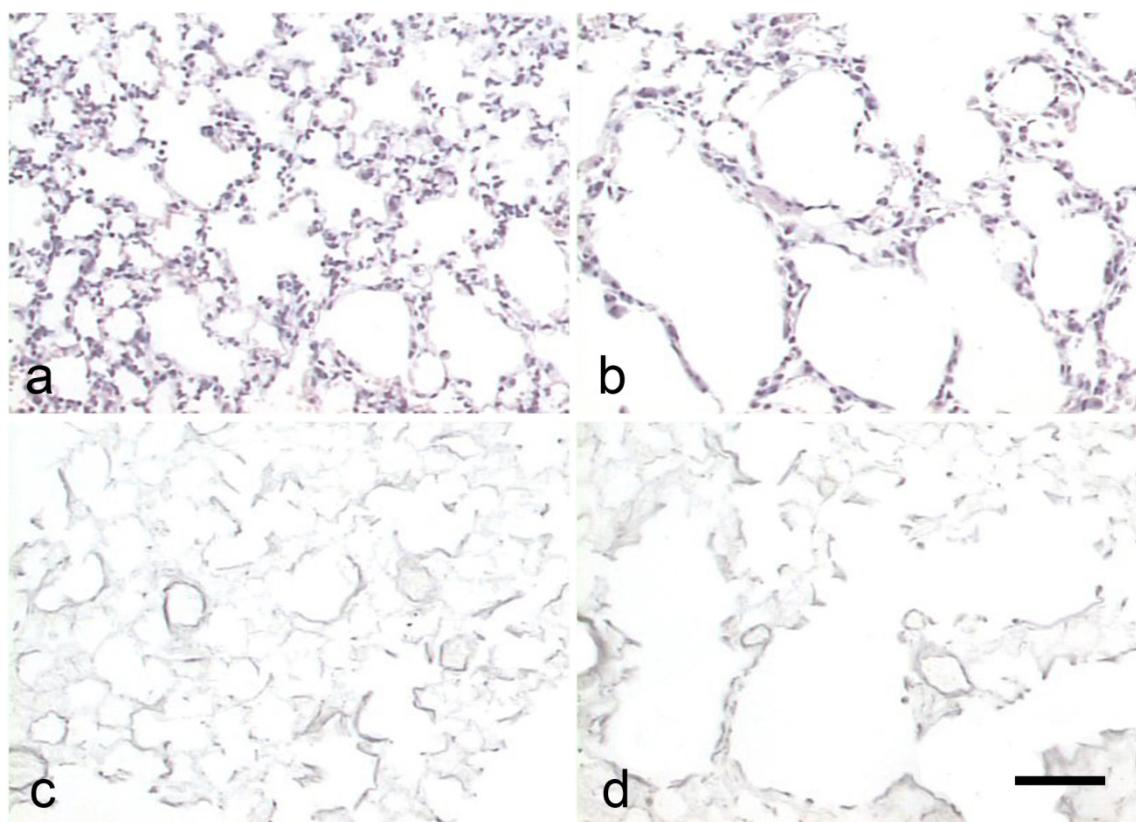
**Tabela 1.** Análise celular e morfométrica nos camundongos controle e expostos à fumaça de cigarro

<b>Grupos</b>	<b>Camundongos</b>	
	<b>controle</b>	<b>Camundongos CS</b>
<b>Macrófagos (céls <math>\times 10^3/\text{mL}</math>)</b>	$158,4 \pm 15,0$	$413,8 \pm 30,6^{***}$
<b>Neutrófilos (células <math>\times 10^3/\text{mL}</math>)</b>	$4,6 \pm 2,0$	$63,2 \pm 6,0^{**}$
<b>Lm (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	$28,5 \pm 1,2$	$36,8 \pm 2,2^*$
<b>Vvair (%)</b>	$60,8 \pm 1,6$	$74,2 \pm 2,7^{**}$
<b>Vvef (%)</b>	$16,4 \pm 0,6$	$10,2 \pm 0,7^{**}$

**Tabela 1:** Macrófagos alveolares e neutrófilos do lavado broncoalveolar e análise morfométrica determinada pelo diâmetro alveolar médio (Lm), densidade de volume dos espaços alveolares (Vvair) e densidade de volume de fibras elásticas (Vvef) nos camundongos controle e expostos à fumaça de cigarro (CS). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão ( $n = 9$  para contagem de células e  $n = 6$  para morfometria em cada grupo). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

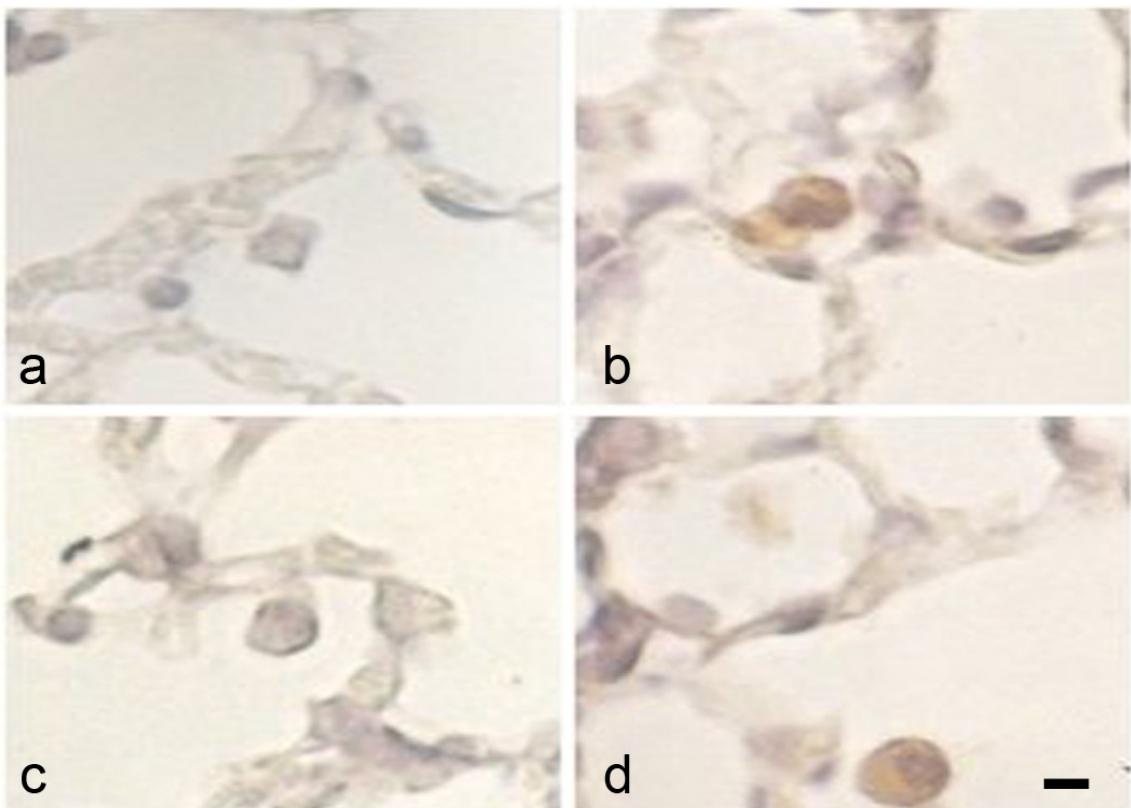
Análises morfométricas do pulmão com mudanças histológicas (Tabela 1). Em relação aos camundongos do grupo controle, Lm estava aumentado no grupo CS ( $36,8 \pm 2,2$  vs.  $28,5 \pm 1,3$   $\mu\text{m}$ ,  $P<0,05$ ), como também Vvair ( $74,2 \pm 2,7$  vs.  $60,8 \pm 1,7\%$ , respectivamente,  $P<0,01$ ), enquanto Vvef estava diminuído ( $10,20 \pm 0,66$  vs.  $16,40 \pm 0,60\%$ , respectivamente,  $P<0,05$ ).

O grupo controle apresentou alvéolos normais com septos alveolares delgados e poucos macrófagos alveolares (Figura 17a), e as fibras elásticas foram observadas como finas no septo alveolar (Figura 17c). O grupo CS mostrou um aumento dos espaços aéreos e um aumento dos septos alveolares (Figura 17b), macrófagos alveolares foram mais numerosos e as fibras elásticas foram rompidas nos septos alveolares (Figura 17d).



**Figure 17:** Fotomicrografias de tecido pulmonar corados com hematoxilina e eosina (painéis **a** e **b**) ou orceína (para visualização de fibras elásticas, painéis **c** e **d**). Painéis **a** e **c** são representativos do grupo controle; imagens **b** e **d** exibem grupo CS. A barra horizontal preta corresponde a 120  $\mu\text{m}$ .

Imunomarcações em secções do pulmão foram feitas para localizar MMP-12 and HMGB-1 (Figura 18). No grupo controle, a expressão ausente de MMP-12 (Figura 18a) era notável. No grupo CS, os macrófagos alveolares positivos para MMP-12 foram observados (Figura 18b). O grupo controle com expressão ausente de HMGB1 (Figura 18c) foi notável, enquanto o grupo CS os macrófagos alveolares foram positivos (Figura 18d).



**Figure 18:** Fotomicrografias pulmonares de imunomarcação para MMP-12 (**a** e **b**) e HMGB-1 (**c** e **d**) nos grupos controle (**a** e **c**) e CS (**b** e **d**). No grupo controle, a expressão de MMP-12 foi ausente ou discreta. O grupo CS apresentou macrófagos alveolares positivos para MMP-12 juntamente houve uma discreta marcação no tecido epitelial (figura **b**). O tecido pulmonar do grupo controle expressou discretamente HMGB-1 (figura **c**), quando no grupo CS, a expressão de HMGB-1 foi positiva em macrófagos alveolares e no tecido ao redor dos septos alveolares (figura **d**).

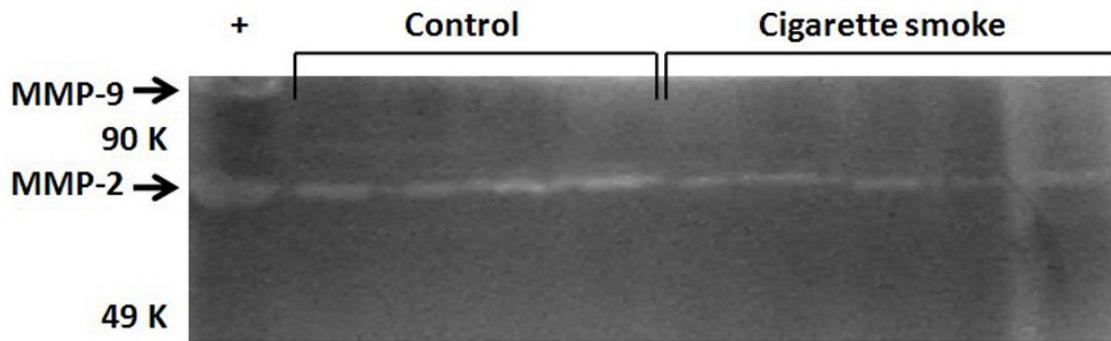
Análises bioquímicas de peroxidação lipídica e da atividade de enzimas antioxidantes foram realizadas em homogeneizados pulmonares (Tabela 2). Peroxidação lipídica (MDA equivalentes – nM/mg proteína) do grupo CS estava reduzida ( $0,56 \pm 0,03$ ) quando comparada com o grupo controle ( $0,88 \pm 0,05$ ). Todas as atividades das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GSH-Px) foram também diminuídas ( $p < 0,05$ ) no grupo CS quando em comparação com o grupo controle: Os valores de CAT (U/mg proteína), SOD (U/mg proteína) e GSH-Px (mM/min/mg proteína) no grupo controle foram  $0,38 \pm 0,03$ ,  $41.71 \pm 1.75$  e  $0,74 \pm 0,02$ , enquanto a quantidade deles  $0,23 \pm 0,01$ ,  $31.17 \pm 1.72$  e  $0,51 \pm 0,05$ , respectivamente, no grupo CS.

**Tabela 2.** Análise da peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes nos camundongos controle e expostos à fumaça de cigarro (CS)

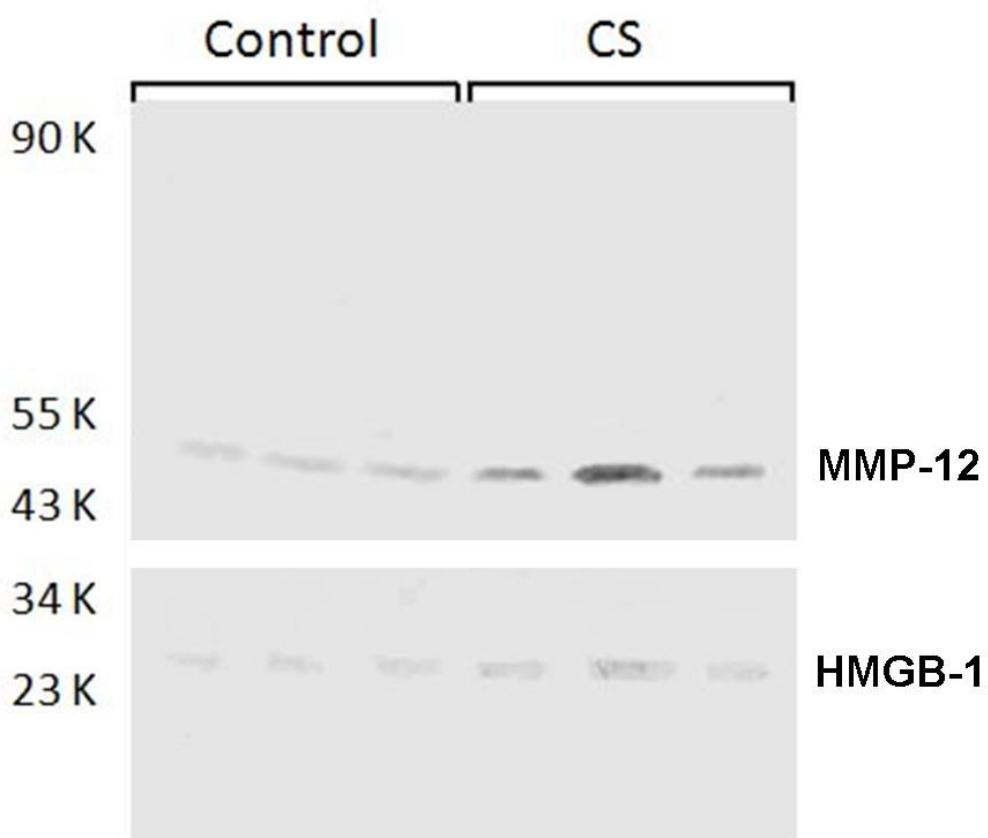
<b>Grupos</b>	<b>Camundongos</b>	<b>Camundongos</b>
	<b>Controle</b>	<b>CS</b>
<b>Malondialdeído (nM/mg ptn)</b>	0,88 ± 0,05	0,56 ± 0,03**
<b>Superóxide dismutase (U/mg ptn)</b>	41.7 ± 1.7	31.1 ± 1.7*
<b>Catalase (U/mg ptn)</b>	0,38 ± 0,03	0,23 ± 0,01*
<b>Glutationa peroxidase (mM/min/mg ptn)</b>	0,74 ± 0,02	0,51 ± 0,05*

**Tabela 2:** Análise bioquímica de homogeneizados pulmonares para peroxidação lipídica (malondialdeído), catalase, superóxido dismutase and glutationa peroxidase nos grupos controle e expostos à fumaça de cigarro. Os dados foram expressos em média ± erro padrão ( $n = 7$  em cada grupo). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

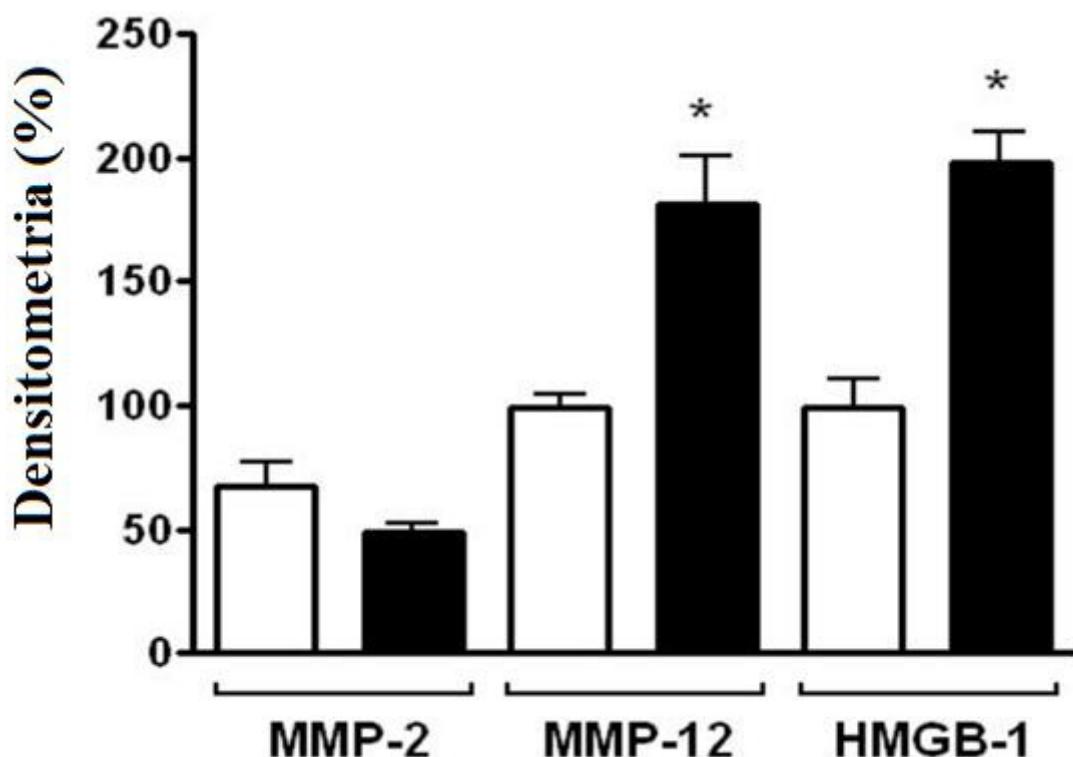
Foi realizada zimografia do homogeneizado pulmonar (Figura 19). A atividade de MMP-9 não foi detectada. Embora a atividade de MMP-2 estivesse mais intensa no grupo CS do que o grupo controle, nenhuma diferença estatística foi encontrada (Figura 19). A técnica de Western blotting foi realizada no homogeneizado pulmonar (Figura 20). A MMP-12 estava expressa, principalmente no grupo exposto à fumaça de cigarro (CS) quando comparadas desse grupo com os animais do grupo controle. A expressão de HMGB-1 estava mais evidente no grupo CS quando comparado com o grupo controle. A densitometria das bandas correspondentes foi mostrada na figura 21.



**Figura 19:** Zimografia (análise de MMP-9 e MMP-2) no homogeneizado pulmonar nos grupos controle (C) e expostos à fumaça de cigarro (CS). Bandas brancas (MMP-9 ou MMP-2) representam o consumo de gelatina por gelatinases no tecido pulmonar. Para o controle positivo (placenta). Foram utilizadas quatro amostras do grupo controle e cinco amostras do grupo CS.



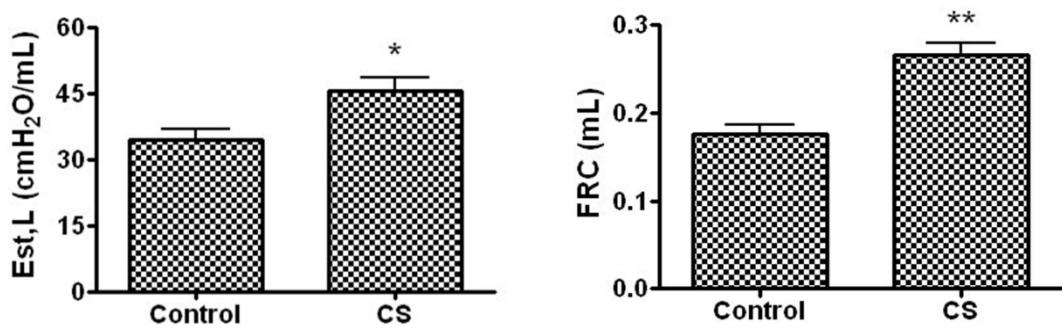
**Figure 20:** Técnica de Western blotting para MMP-12 e HMGB-1 nos homogeneizados pulmonares dos camundongos do grupo controle e do grupo CS. Bandas pretas representam a localização da ligação do antígeno-anticorpo após a eletroforese e transferência de proteínas para uma membrana de nitrocelulose. Foram utilizadas três amostras do grupo controle e três amostras do grupo fumaça de cigarro para MMP-12 e HMGB-1.



**Figure 21:** Densitometria das bandas de zimografia e western blotting nos grupos controle (colunas brancas) e expostos à fumaça de cigarro (colunas pretas). Densitometria foi realizada por meio do número de amostras de acordo com as figuras 19 e 20.

A densitometria foi realizada por meio do número de amostras de acordo com os gráficos da figura 21.

A análise da mecânica pulmonar foi realizada com animais anestesiados (Figura 22).  $\text{Est,L}$  ( $\text{cmH}_2\text{O/mL}$ ) estava aumentada ( $p<0,05$ ) no grupo CS ( $45.61\pm2.98$ ) quando comparada com os animais do grupo controle ( $34.47\pm2.23$ ). A capacidade residual funcional ( $\text{mL}$ ) também estava aumentada ( $p<0,01$ ) no grupo CS ( $0,26\pm0,01$ ) em comparação com o grupo controle ( $0,17\pm0,01$ ).



**Figure 22:** Mecânica pulmonar no grupo controle e exposto à fumaça de cigarro (CS). Est,L – elastânci a estática pulmonar. FRC – capacidade residual funcional. Dados foram expressos em média ± erro padrão ( $n = 4$  em cada grupo). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

Nossos resultados mostram que a longa exposição à fumaça de cigarro induziu o desenvolvimento de enfisema em camundongos, como previamente demonstrado por Valenca *et al.* 2006 e Valenca *et al.* 2004. Porém, este é o primeiro trabalho associando enfisema e o aumento da expressão de HMGB1 em camundongos. A HMGB-1 foi primeiramente identificada como uma proteína ligada ao DNA, mas mais recentemente dados apontam para uma propriedade pró-inflamatória (Klune *et al.* 2008). Nosso estudo não demonstrou uma evidência que HMGB1 promove a inflamação, se é uma consequência ou se está envolvida em todo o processo. Os resultados também demonstraram um componente importante no estresse oxidativo concomitantes à expressão de MMP-12, uma sabida metaloproteinase envolvida com o enfisema em camundongos (Hautamaki *et al.* 1997). De maneira interessante, dois mecanismos para explicar o enfisema pulmonar, isto é, a teoria do desequilíbrio oxidantes/antioxidantes e proteinases/antiproteases, estão sugeridos no mesmo estudo.

O recrutamento de macrófagos no BAL é conhecido por ser ativado por vários componentes da CS com os radicais livres (Pryor e Stone 1993). Uma exposição contínua de CS leva a estímulos quimiotáticos para macrófagos e, estas células foram encontradas em grandes quantidades no BAL do grupo CS. O influxo de macrófagos também foi encontrado em estudos prévios do nosso grupo (Valenca *et al.* 2004).

A peroxidação lipídica, um componente importante em pacientes com DPOC (Rahman e Adcock 2006), foi mensurado pelo TBARS. Havia uma diminuição na peroxidação lipídica no pulmão dos camundongos expostos à CS. Outros métodos para analisar a peroxidação lipídica como 4-hidroxinoneal e isoprostanos, também são utilizados para mensurar a peroxidação lipídica. Entretanto, o método de TBARS

é descrito como o mais usado para a avaliação da peroxidação lipídica (Draper e Hadley 1990). Mostramos resultados similares aos estudos prévios de Valenca *et al.* (2006). Nós acreditamos que a exposição continua em longo prazo de CS causa a destruição severa do parênquima pulmonar (Figura 19) resultando em um tecido não responsivo só para peroxidação lipídica analisada por TBARS. Portanto, sugerimos outro caminho para peroxidação lipídica em nosso desenho experimental relacionado com formação do radical peroxila - a análise de isoprostanos. TBARS é propenso a reagir depois de formação do radical alcoxila (Niki e Yoshida 2005; Niki *et al.* 2005). Em contraste, a exposição em curto prazo aumentou a peroxidação lipídica sem destruição do parênquima pulmonar (Valenca *et al.* 2008). O desequilíbrio oxidante/antioxidante é também conhecido por ter um papel importante na patogênese da DPOC pela ativação do fator nuclear kappa-B mediada por oxidantes (Rahman, 2006). Além disso, a exposição da CS diminuiu as atividades de CAT, SOD e GSH-Px (Valenca *et al.* 2008). A CS contribui adicionalmente com oxidantes e estimula a inflamação aumentando a produção de radicais livres, principalmente o anion superóxido ( $O_2^-$ ), um mediador das respostas fisiopatológicas que leva ao desenvolvimento do enfisema (Pryor e Stone 1993). Acreditamos que o aumento da produção de  $O_2^-$  via CS afetou diretamente a atividade de SOD, prejudicando a oxidação de  $O_2^-$  para  $H_2O_2$ . Inicialmente, a glutationa peroxidase é a enzima antioxidante primária, que limpa peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos (Flohe e Gunzler 1984), acreditamos que regulação estava baixa nesta situação, como a atividade estivesse reduzida após 60 dias de exposição à CS. No pulmão, a catalase está localizada principalmente em macrófagos alveolares e no epitélio (Fridovich e Freeman, 1986). A atividade da catalase estava profundamente reduzida no grupo CS, indicando, possivelmente que após a destruição do

parênquima pulmonar, as células epiteliais restantes foram danificadas pelo fator oxidativo intracelular, mostrando, assim, uma diminuição significativa da atividade da catalase.

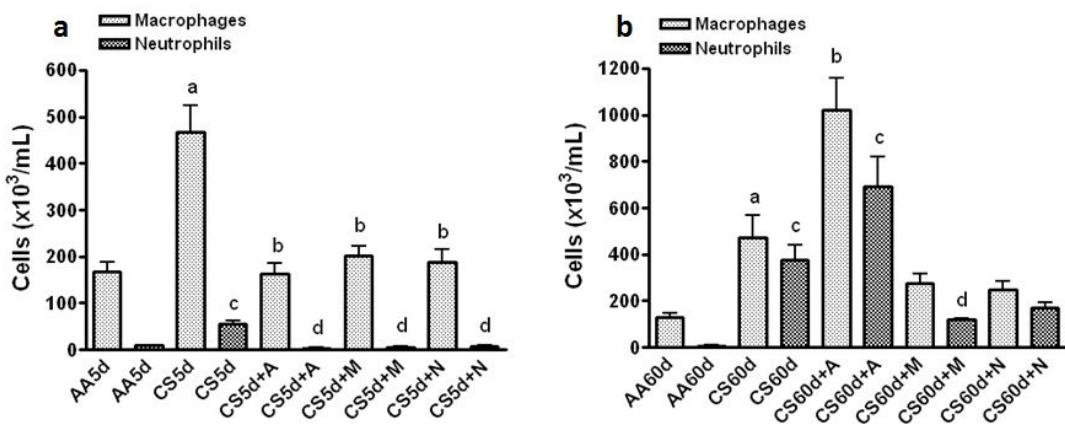
O enfisema pulmonar em camundongos foi associado à expressão e à atividade de MMP-12 (Hautamaki *et al.* 1997). Nós encontramos um aumento de expressão de MMP-12 no grupo CS, principalmente na imunomarcação para macrófagos alveolares, que poderia ter associação com a destruição septal com o aumento do diâmetro alveolar médio, como representado pelo aumento do Lm. Embora as gelatinases (MMP-9 e MMP-2) fossem importantes na patogênese do enfisema induzido pela CS em humanos (Segura-Valdez *et al.* 2000), nós não encontramos atividades da MMP-9 e MMP-2 após exposição crônica a CS em camundongos.

A mecânica pulmonar foi comprometida pela exposição à CS, provavelmente devido a um rompimento da cadeia de fibras elásticas (Figura 17d), que em associação levou a um aumento da elastância estática. A capacidade residual funcional também foi aumentada no grupo CS, em accordância com a fisiopatologia do enfisema (Ross *et. al.* 1962).

## 5.2 - ESTUDO 2: INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA E CRÔNICA E O TRATAMENTO COM ANTIOXIDANTES

A figura 23a mostra os efeitos das drogas antioxidantes no número de células do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos expostos ao ar ambiente (AA5d) ou à fumaça de cigarro (CS) por 5 dias (CS5d). Camundongos do grupo CS5d apresentaram um aumento ( $p<0,001$ ) tanto de macrófagos alveolares ( $466,6 \pm 56,7 \times 10^3$  células/mL) quanto de neutrófilos ( $54,8 \pm 7,7 \times 10^3$  células/mL) comparados com camundongos AA5d ( $166,8 \pm 20,8 \times 10^3$  macrófagos/mL e  $8,4 \pm 1,7 \times 10^3$  neutrófilos/mL). Camundongos tratados com alopurinol (CS5d+A), N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M) ou N-acetilcisteína (CS5d+N) tiveram redução em números ( $p<0,001$ ) tanto de macrófagos alveolares ( $163,1 \pm 22,4$ ;  $201,8 \pm 20,5$  e  $187,8 \pm 27,4$ , respectivamente todos valores  $\times 10^3$  céls/mL quanto de neutrófilos comparados aos camundongos CS5d. A figura 23b mostra os efeitos das drogas antioxidantes no número de células do lavado broncoalveolar de camundongos expostos ao ar ambiente (AA60d) e expostos à fumaça de cigarro (CS60d) por 60 dias. Camundongos CS60d apresentaram aumento tanto do número de macrófagos alveolares ( $473,9 \pm 93,5 \times 10^3$  células/mL;  $p<0,05$ ) quanto de neutrófilos ( $376,4 \pm 61,5 \times 10^3$  células/mL;  $P<0,001$ ) comparados aos camundongos AA60d ( $126,9 \pm 22,4 \times 10^3$  células/mL e  $7,0 \pm 1,8 \times 10^3$  células/mL, respectivamente). Camundongos tratados com alopurinol (CS60d+A) tiveram aumento no número de macrófagos ( $1023,0 \pm 135,1 \times 10^3$  células/mL;  $P<0,001$ ) e neutrófilos ( $690,5 \pm 127,1 \times 10^3$  células/mL;  $P<0,001$ ) comparados aos camundongos AA60d; estes aumentos foram também significantes quando comparados com CS60d ( $P<0,001$  e  $P<0,05$ , respectivamente). Os números de macrófagos alveolares ( $277,0 \pm 37,6 \times 10^3$

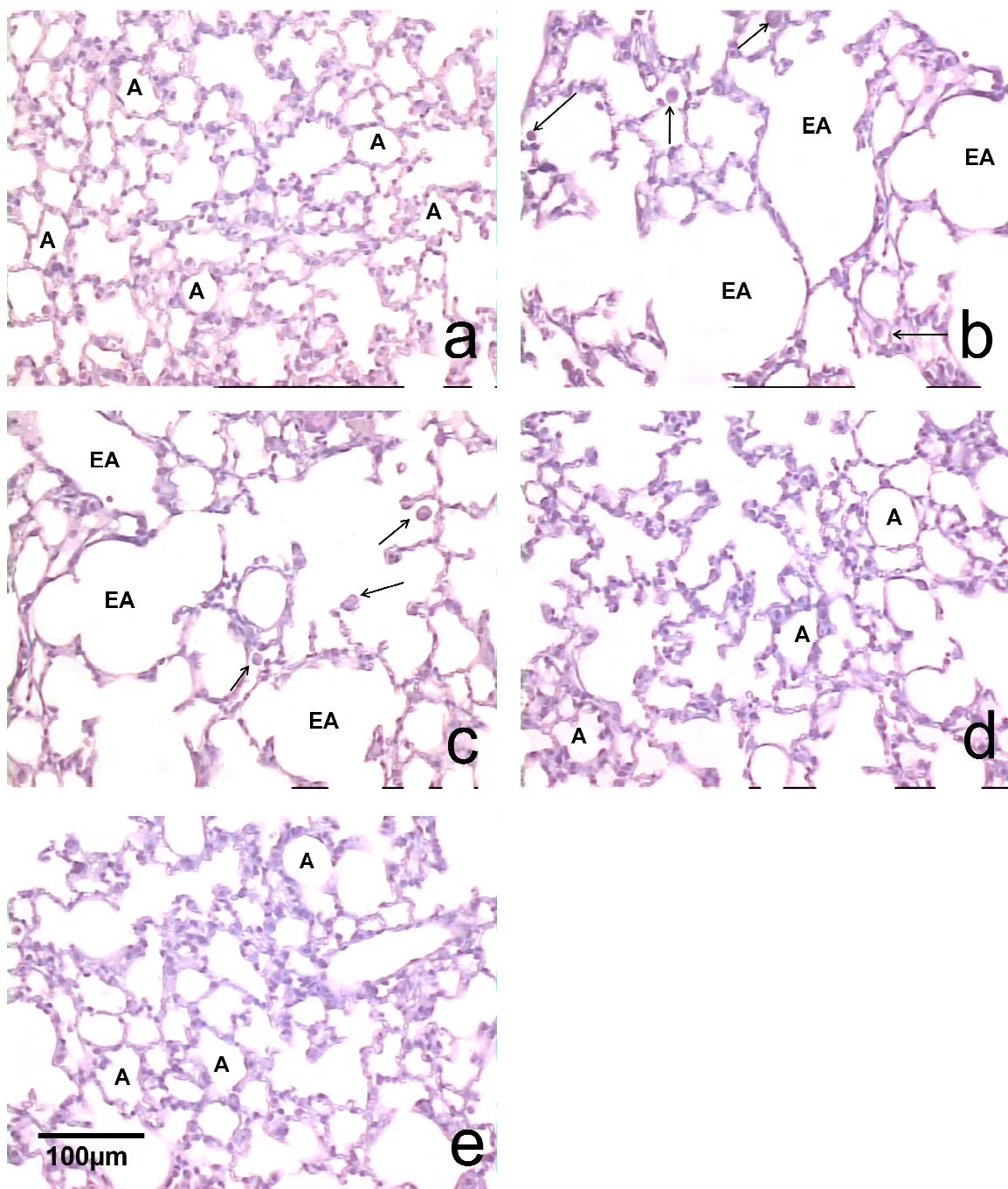
células/mL ou  $245,8 \pm 39,5 \times 10^3$  células/mL) e neutrófilos ( $118,0 \pm 8,0 \times 10^3$  células/mL ou  $168,4 \pm 24,4 \times 10^3$  células/mL) em camundongos tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M) ou N-acetilcisteína (CS60d+N) foram reduzidos comparados à AA60d. Todavia, exceto em um caso, as diferenças não foram significantes. A única exceção foi a contagem de neutrófilos do grupo CS60d+M, o qual foi significantemente reduzido ( $P<0,05$ ) comparado ao grupo CS60d.



**Figura 23a:** Contagem de células do lavado broncoalveolar de camundongos depois da exposição ao ar ambiente ou à fumaça de cigarro. Camundongos expostos ao ar ambiente por 5 dias (AA5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com veículo (CS5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com alopurinol (CS5d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com N-acetilcisteína (CS5d+N). **a** =  $p<0.001$  em comparação com AA5d. **b** =  $p<0.001$  em comparação com **a** e **b** para contagem de macrófagos alveolares. **c** =  $p<0.001$  quando comparado com AA5d. **d** =  $p<0.001$  quando comparado com CS5d. **c** e **d** para contagem de neutrófilos ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados estão expressos com média  $\pm$  erro padrão.

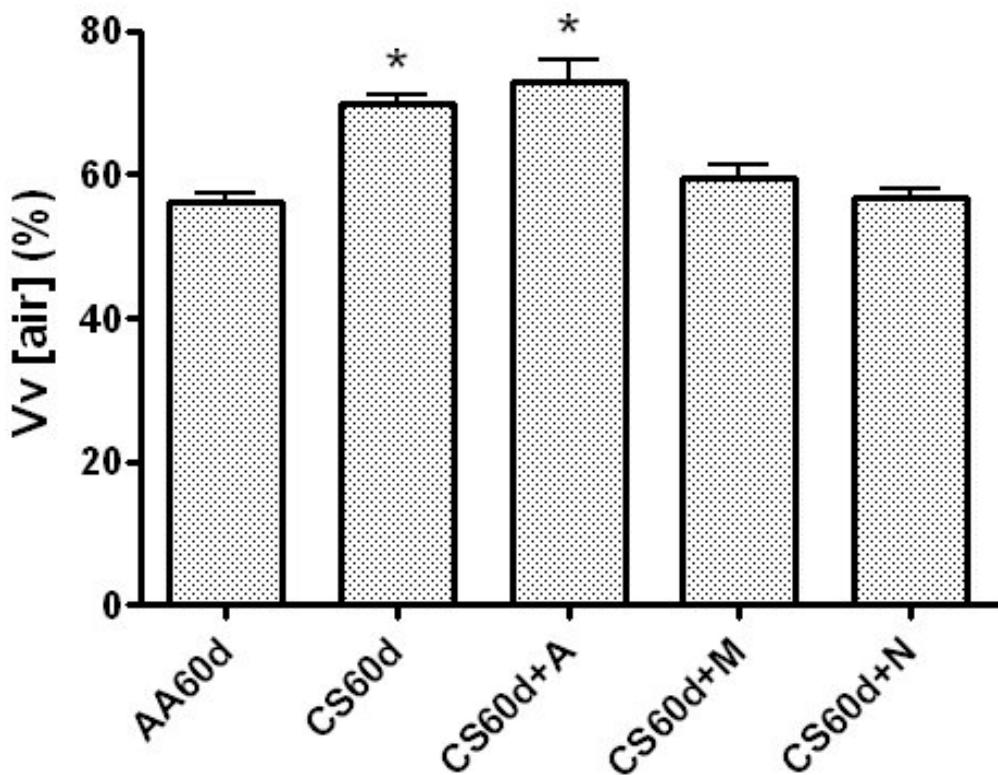
**Figura 23b:** Contagem de células do lavado broncoalveolar de camundongos depois da exposição crônica ao ar ambiente ou à fumaça de cigarro. Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com N-acetilcisteína (CS60d+N). **a** =  $p<0.05$  em comparação com AA60d. **b** =  $p<0.001$  em comparação com AA60d e CS60d. **a** e **b** para contagem de macrófagos alveolares. **c** =  $p<0.001$  quando comparado com AA60d. **d** =  $p<0.05$  quando comparado com CS60d. **c** e **d** para contagem de neutrófilos ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados estão expressos com média  $\pm$  erro padrão.

A histologia do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (AA60d) exibiu septos alveolares delgados e alvéolos normais (figura 24a), considerando que a histologia do pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias (CS60d) apresentou mudanças no parênquima pulmonar caracterizadas por destruição dos septos alveolares, alargamento dos alvéolos e presença de macrófagos alveolares (figura 24b). Essas condições observadas no grupo CS60d foram caracterizadas como indicadoras de enfisema nos camundongos. A histologia do pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias não induziu modificações no parênquima pulmonar (não mostradas/visualizadas). Entretanto, um aumento no número de macrófagos e neutrófilos foi observado nos alvéolos. Septos alveolares e alvéolos estavam histologicamente normais nos grupos controle, fumaça de cigarro e tratados. A histologia do pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A) foi similar ao do camundongo do grupo CS60d (figura 24c). Não obstante, a histologia do pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M) ou N-acetilcisteína (CS60d+N) foi similar aos camundongos do grupo AA60d (figura 24d e 24e, respectivamente).



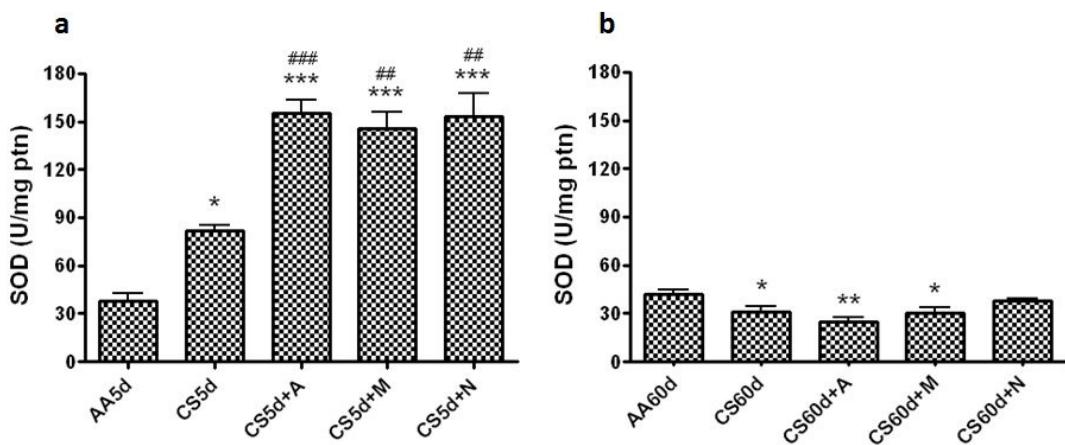
**Figura 24:** Fotomicrografias do parênquima pulmonar. **a)** camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); **b)** camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); **c)** camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); **d)** camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); **e)** camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N). **A** = alvéolo normal; **setas** = macrófagos alveolar; **EA** = espaços alveolares aumentados; 400x de ampliação; H&E.

O Vv [air] não foi determinado nos camundongos expostos à fumaça de cigarro por cinco dias. O Vv [air] dos camundongos expostos ao ar ambiente (AA60d) foi  $56.14 \pm 1.12$  (Figura 25). O Vv [air] dos camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias aumentou quase 14% ( $69.89 \pm 1.20$ ;  $p<0,05$ ) quando comparado ao do grupo AA60d. O tratamento com allopurinol (CS60d+A) também aumentou o Vv [air] em quase 17% ( $73.01 \pm 1.49$ ;  $p<0,05$ ) quando comparado com o do grupo AA60d. No entanto, o Vv [air] de camundongos tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M) ou N-acetilcisteína (CS60d+N) ( $59.66 \pm 1.65$  e  $56.70 \pm 1.38$ , respectivamente) foi similar ao grupo AA60d ( $56.14 \pm 1.12$ ).



**Figure 25:** Densidade de volume do alvéolo (Vv [air]). Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N). \*  $P<0.05$  quando comparados com AA60d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão.

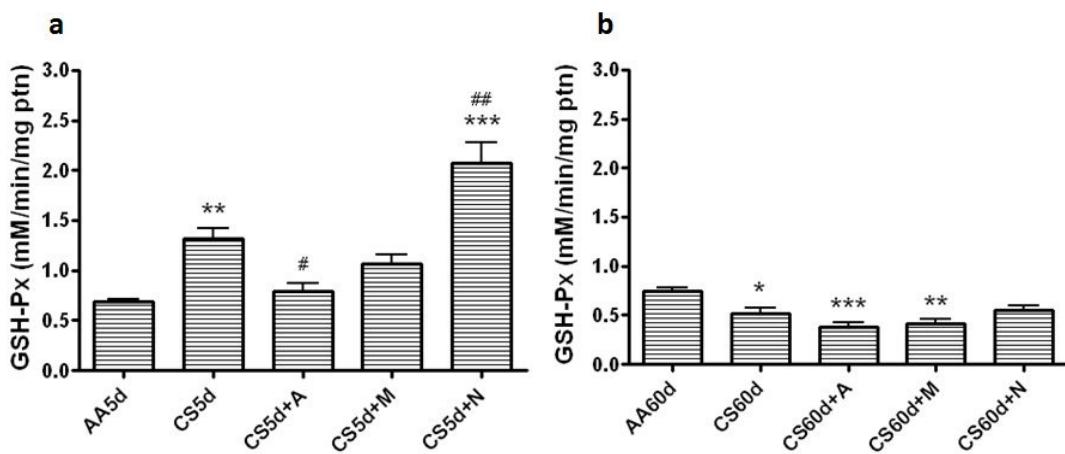
A figura 26a mostra os efeitos das drogas antioxidantes na atividade da SOD (U/mg proteína) de camundongos expostos ao ar ambiente (AA5d) e fumaça de cigarro por 5 dias (CS5d). A atividade da SOD estava alta nos camundongos CS5d ( $82,0 \pm 2,8$ ;  $P<0,05$ ) quando comparada aos camundongos AA5d ( $38,0 \pm 4,3$ ). Contudo, a atividade da SOD nos grupos CS5d+A ( $155,3 \pm 8,4$ ), CS5d+M ( $145,7 \pm 10,4$ ) e CS5d+N ( $153,3 \pm 14,4$ ) estava mais alta que nos grupos AA5d ( $P<0,001$ ) e CS5d ( $P<0,001$  para CS5d+A,  $P<0,01$  para ambos CS5d+M e CS5d+N). A figura 26b mostra os efeitos das drogas antioxidantes na atividade da SOD (U/mg proteína) dos camundongos expostos ao ar ambiente (AA60d) e à fumaça de cigarro por 60 dias (CS60d). A atividade da SOD foi显著mente menor nos grupos CS60d ( $31,1 \pm 1,7$ ;  $P<0,05$ ), CS60d+A ( $25,0 \pm 2,2$ ;  $P<0,01$ ) e CS60d+M ( $30,2 \pm 3,7$ ;  $P<0,05$ ) do que no grupo AA60d ( $41,7 \pm 1,7$ ). No entanto, a atividade da SOD no grupo CS5d+N não foi diferente da dos grupos AA60d e CS60d.



**Figure 26a:** Atividade da superóxido dismutase (U/mg proteína) no homeogeneizado pulmonar. Camundongos expostos ao ar ambiente por 5 dias (AA5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com veículo (CS5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com alopurinol (CS5d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS5d+N). \*  $P<0.05$  quando comparado com AA5d; \*\*\*  $P<0.001$  quando comparado com AA5d; ##  $P<0.01$  quando comparado com CS5d; ###  $P<0.001$  quando comparado com CS5d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados foram expressos em média ± erro padrão.

**Figure 26b:** A atividade da superóxido dismutase (U/mg proteína) em homogeneizado pulmonar. Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos exposto à fumaça por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N) ( $n = 5$  em cada grupo). \*  $P<0.05$  quando comparado com AA60d; \*\*  $P<0.01$  quando comparado com AA60d. Os dados são expressos em média ± erro padrão.

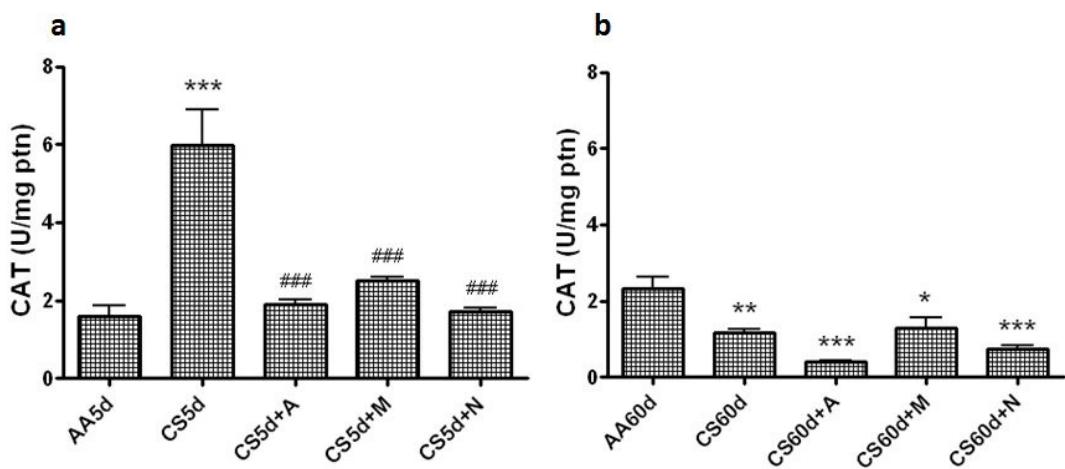
A atividade da GSH-Px (Figura 27a; mM/min/mg proteína) estava aumentada ( $P<0,01$ ) nos camundongos do grupo CS5d ( $1,32 \pm 0,09$ ) quando comparado a dos camundongos do grupo AA5d ( $0,68 \pm 0,02$ ). Os camundongos tratados com allopurinol (CS5d+A) exibiram níveis baixos de GSH-Px ( $0,79 \pm 0,07$ ;  $P<0,05$ ) quando comparados com camundongos (CS5d+N), considerando que camundongos tratados com N-acetilcisteína (CS5d+N) exibiram níveis mais altos de GSH-Px ( $2,07 \pm 0,19$ ) quando comparados com camundongos AA5d ( $P<0,001$ ) e CS5d ( $P<0,01$ ). Camundongos tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M;  $1,06 \pm 0,09$ ) não mostraram diferença na atividade da GSH-Px quando comparados com camundongos dos grupos AA5d e CS5d. A atividade da GSH-Px (Figura 27b; mM/min/mg proteína) estava reduzida em camundongos dos grupos CS60d ( $0,51 \pm 0,05$ ;  $P<0,05$ ), CS60d+A ( $0,38 \pm 0,04$ ;  $P<0,001$ ) e CS60d+M ( $0,41 \pm 0,04$ ;  $P<0,01$ ) quando comparados com AA60d ( $0,74 \pm 0,02$ ). Camundongos tratados com N-acetilcisteína (CS60d+N) exibiram uma atividade de GSH-Px ligeiramente elevada ( $0,54 \pm 0,05$ ), mas o aumento não foi significante quando comparado com a atividade da GSH-PX nos camundongos de AA60d e CS60d.



**Figure 27a:** Atividade da glutationa peroxidase (mM/min/mg proteína) em homogeneizados pulmonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 5 dias (AA5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com veículo (CS5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com alopurinol (CS5d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS5d+N). \*\*  $P<0.01$  quando comparado com AA5d; \*\*\*  $P<0.001$  quando comparado com AA5d; #  $P<0.05$  quando comparado com CS5d; ##  $P<0.01$  quando comparado com CS5d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

**Figure 27b:** Atividade da glutationa peroxidase (mM/min/mg proteína) em homogeneizados pulmonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N) ( $n = 5$  em cada grupo). \*  $P<0.05$  quando comparado com AA60d; \*\*  $P<0.01$  quando comparado com AA60d; \*\*\*  $P<0.001$  quando comparado com AA60d. Os dados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão.

A atividade da catalase (CAT) (Figura 28a; U/mg proteína) estava mais elevada ( $P<0,001$ ) no grupo CS5d ( $5,99 \pm 0,90$ ) comparado ao grupo AA5d ( $1,58 \pm 0,28$ ). No entanto, a atividade da CAT nos grupos CS5d+A ( $1,90 \pm 0,10$ ), CS5d+M ( $2,50 \pm 0,05$ ) e CS5d+N ( $1,72 \pm 0,07$ ) estava reduzida comparada a do grupo CS5d ( $P<0,001$ ). A atividade da CAT (Figura 28b; U/mg proteína) foi significativamente menor ( $P<0,01$ ) no grupo CS60d ( $1,17 \pm 0,09$ ) comparado à do grupo AA60d ( $2,31 \pm 0,31$ ). Reduções na atividade da CAT foram também observadas nos grupos CS60d+A ( $0,40 \pm 0,02$ ;  $P<0,001$ ), CS60d+M ( $1,29 \pm 0,26$ ;  $P<0,05$ ) e CS60d+N ( $0,73 \pm 0,09$ ;  $P<0,001$ ) quando comparados com grupo AA60d.

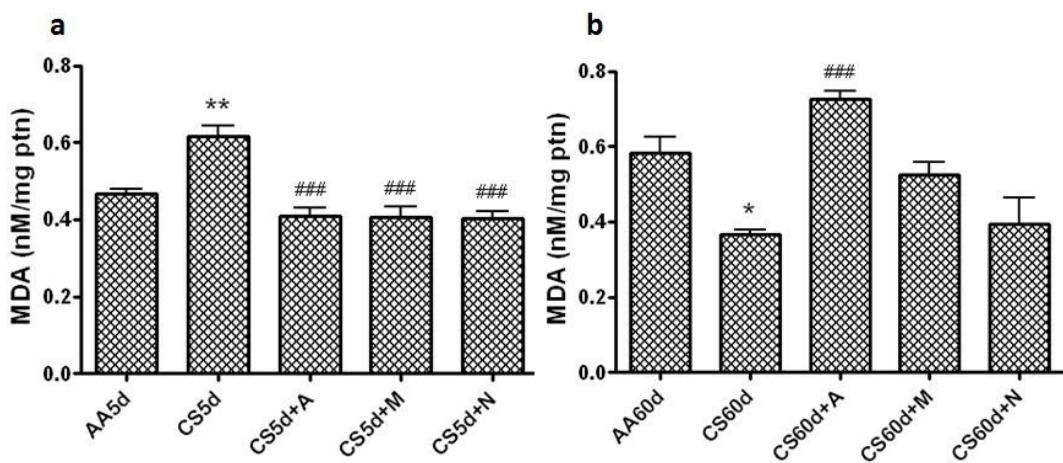


**Figure 28a:** Atividade da catalase (U/mg proteína) em homogeneizados pulmonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 5 dias (AA5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com veículo (CS5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com allopurinol (CS5d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS5d+N). \*\*\*  $P<0.001$  quando comparado com AA5d; ###  $P<0.001$  quando comparado com CS5d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados foram expresso em média  $\pm$  erro padrão.

**Figure 28b:** A atividade da catalase (U/mg proteína) em homogeneizados pumonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com allopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N). \*  $P<0.05$  quando comparado com AA60d; \*\*  $P<0.01$  quando comparado com AA60d; \*\*\*  $P<0.001$  quando comparado com AA60d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão.

A figura 29a mostra os efeitos das drogas antioxidantes em relação aos níveis de malondialdeído (MDA) (nM/mg proteína) em camundongos expostos ao ar ambiente (AA5d) e à fumaça de cigarro por 5 dias. Camundongos CS5d apresentaram aumento significante ( $P<0,01$ ) de MDA ( $0,61 \pm 0,02$ ) se comparados com camundongos AA5d ( $0,46 \pm 0,01$ ). Camundongos tratados com allopurinol (CS5d+A;  $0,40 \pm 0,02$ ), *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M;  $0,41 \pm 0,02$ ) ou *N*-acetilcisteína (CS5d+N;  $0,40 \pm 0,01$ ) mostraram reduções significantes ( $P<0,001$ ) de MDA quando comparados com camundongos CS5d.

A figura 29b mostra os efeitos das drogas antioxidantes sobre os níveis do MDA em camundongos expostos ao ar ambiente (AA60d) e expostos à fumaça de cigarro por 60 dias (CS60d). O grupo CS60d apresentou uma redução nos níveis ( $P<0,05$ ) de MDA ( $0,36 \pm 0,01$ ) quando comparado com o grupo AA5d ( $0,58 \pm 0,04$ ). Os níveis de malondialdeído em camundongos tratados com allopurinol (CS5d+A;  $0,72 \pm 0,02$ ), *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M;  $0,52 \pm 0,03$ ) ou *N*-acetilcisteína (CS5d+N;  $0,39 \pm 0,07$ ) não foram significativamente diferentes dos camundongos AA60d ou CS60d, exceto no caso dos camundongos do grupo CS60d+A, os quais exibiram aumento significante ( $P<0,001$ ) de MDA comparado com camundongos CS60d.



**Figure 29a:** Equivalente de malondialdeído (nM/mg proteína) mensurados pelo método do TBARS em homogeneizados pulmonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 5 dias (AA5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com veículo (CS5d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com alopurinol (CS5d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS5d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 5 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS5d+N). \*\*  $P<0.01$  quando comparado com AA5d; ###  $P<0.001$  quando comparado com CS5d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados foram expressos em média ± erro padrão.

**Figure 29b:** Equivalente de malondialdeído (nM/mg proteína) mensurados pelo método de TBARS em homogeneizados pulmonares. Camundongos expostos ao ar ambiente por 60 dias (AA60d); camundongos exposto à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com veículo (CS60d); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com alopurinol (CS60d+A); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-(2-mercaptopropionil)-glicina (CS60d+M); camundongos expostos à fumaça de cigarro por 60 dias e tratados com *N*-acetilcisteína (CS60d+N). \*  $P<0.05$  quando comparados com AA60d; ###  $P<0.001$  quando comparados com CS60d ( $n = 5$  em cada grupo). Os dados foram expressos em média ± erro padrão.

No presente estudo, os resultados de dois experimentos mostram respostas distintas ao tratamento com antioxidantes em camundongos expostos à fumaça de cigarro em curto e longo tempo. Nós decidimos testar a eficácia de drogas antioxidantes por causa de sua habilidade em atuar diretamente em certos produtos oxidantes na exposição aguda à fumaça de cigarro (CS). Nossa aplicação inicial de substâncias antioxidantes para bloquear ou reduzir respostas oxidativas em modelos de inflamação pulmonar em camundongos foi muito encorajador (Lanzetti *et al.*, 2008; Silva Bezerra *et al.*, 2006). Portanto, nós decidimos investigar a ação de algumas drogas antioxidantes em modelos camundongos de enfisema, em relação à lesão oxidativa ser a causa da doença. Surpreendentemente, o resultado do tratamento com as drogas antioxidante foram diferentes entre a inflamação pulmonar aguda e o enfisema. Nossos resultados, por um lado apontam para a eficácia da N-acetilcisteína na redução de algumas características de camundongos enfisematosos ainda que isso não seja uma nova descoberta (Rubio *et al.*, 2004; Cai *et al.*, 2009). Por outro lado, os resultados indicam que a capacidade do N-(2-mercaptopropionil)-glicina em reduzir algumas características de camundongos enfisematosos foi surpreendente, embora a ação benéfica da N-acetilcisteína pareça mais importante. Em contrapartida, o tratamento com o allopurinol foi prejudicial. Camundongos tratados com allopurinol e expostos à CS exibiram maior evidência de dano pulmonar do que camundongos submetidos apenas à CS no modelo crônico.

A resposta inflamatória de células é dependente de dose e tempo (Castro *et al.*, 2004). Mas no presente estudo, as células inflamatórias do lavado broncoalveolar exibiram influxo diferente do que o relatado anteriormente pelo grupo (Valenca *et al.*, 2006).

No entanto, a questão fundamental aqui é que o tratamento com drogas antioxidantes seja capaz de reduzir o influxo de células inflamatórias. Essa resposta nos ajuda a entender a ação inicial das drogas antioxidantes contra os oxidantes liberados diretamente da CS ou oxidantes liberados pela estimulação de células inflamatórias como os macrófagos e neutrófilos. Os efeitos oxidativos da CS têm sido descritos como um degrau crucial na produção e liberação de citocinas e quimiocinas (De Boer *et al.*, 2007). Nesta perspectiva, reduzir o número de células inflamatórias poderia servir para neutralizar os efeitos nocivos da sinalização excessiva na resposta inflamatória pulmonar. Entretanto, a exposição crônica à CS deve produzir um potente e continuo recrutamento de células inflamatórias que o tratamento concomitante com drogas antioxidantes possa ser ineficiente, como o mostrado aqui no caso do grupo tratado com allopurinol. Apesar do tratamento com o N-(2-mercaptopropionil)-glicina e N-acetilcisteína de fato reduzir o influxo de células inflamatórias, o tratamento com o allopurinol teve o resultado oposto, agindo como uma droga pró-oxidante. As análises histológicas confirmaram os efeitos protetores do N-(2-mercaptopropionil)-glicina e da N-acetilcisteína em comparação com o allopurinol. O Vv [air], frequentemente usado para mensurações quantitativas da integridade alveolar (Cruz-Orive e Weibel, 1981) confirmou o aumento de espaços aéreos como resultado de uma quebra de septos alveolares em camundongos expostos à CS e tratados com veículo ou allopurinol.

A quantificação do estresse oxidativo é dificultada pelo tempo de meia-vida curto das espécies reativas de oxigênio (Panus *et al.*, 1988). O uso de ferramentas para a quantificação das enzimas antioxidantes SOD, GSH-Px e CAT é um método indireto aproximado para análise do estresse oxidativo em diferentes sistemas

biológicos (Quinlan *et al.*, 1994). Aqui nós usamos métodos espectrofotométricos para quantificação de SOD, GSH-Px e CAT.

Nossos resultados para a inflamação pulmonar aguda confirmaram nossos dados publicados anteriormente (Valenca *et al.*, 2008): todas as atividades de enzimas antioxidantes estavam aumentadas nos camundongos expostos à CS (inflamação pulmonar aguda). Nós consideramos essa resposta como sendo fisiologicamente normal em células pulmonares, sejam epiteliais (residentes) sejam inflamatórias (não-residentes), para a carga de lesão oxidativa causada pela CS (inflamação pulmonar aguda).

Nossos resultados para a atividade das enzimas antioxidantes em camundongos cronicamente expostos à CS e tratados com veículo foram o oposto daqueles para a exposição aguda à CS. Toda atividade das enzimas antioxidantes foram reduzidas durante a exposição crônica à CS. Nós consideramos essa redução dos níveis enzimáticos como um resultado de depleção de células pulmonares (células residentes e não-residentes). Nesse sentido, o pulmão de camundongos expostos cronicamente à CS e tratados com N-acetilcisteína foram bem protegidos. O pulmão de camundongos expostos cronicamente à CS e tratados com N-(2-mercaptopropionil)-glicina foi protegido em menor extensão que o pulmão de camundongos tratados com N-acetilcisteína. Todavia, se os achados histológicos forem considerados como o resultado mais robusto (é necessário salientar que o enfisema tem uma definição histológica), então ambos, N-acetilcisteína e N-(2-mercaptopropionil)-glicina, protegeram o pulmão dos camundongos contra as lesões oxidativas. Embora o allopurinol fosse descrito como uma droga antioxidante, nossos resultados sugerem que a supressão, em longo prazo, de superóxido endógeno afeta negativamente os mecanismo de aderência e quimiotaxia das

células inflamatórias nas vias aéreas de camundongos expostos cronicamente à CS e/ou a dose de allopurinol usada aqui exerceu um efeito pró-oxidante, aumentando a inflamação pulmonar crônica. A SOD é a primeira enzima ativada pelo  $O_2^-$ , e a CS contribui com uma grande quantidade de  $O_2^-$  (Churg *et al.*, 2008). Nós não sabemos se o aumento da atividade da SOD estava relacionado à ação direta do  $O_2^-$  nas células pulmonares (i.e., a combinação de  $O_2^-$  e CS liberadas por células inflamatórias estimulando células residentes a produzir SOD) ou se as drogas antioxidantes estimularam a expressão de SOD por células residentes. Camundongos transgênicos que têm uma expressão aumentada de SOD foram protegidos da lesão pulmonar induzida por CS (Folz *et al.*, 1999). Em adição, SOD mRNA é seletivamente induzida em uma variedade de tipos de células pelo fator alfa de necrose tumoral (Warner *et al.*, 1991), e essa citocina é altamente expressa em células inflamatórias após exposição à CS como descrito por nós (Valenca e Porto, 2008). Também, a SOD extracelular tem sido descrita como um potente modulador inflamatório por reduzir citocinas liberadas por macrófagos, resultando em uma baixa inflamação de neutrófilos (Yasui *et al.*, 2005). O peróxido de hidrogênio é produzido após a ação da SOD (Aebi, 1984). Ambas, GSH-Px e CAT são capazes de metabolizar o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A maior enzima associada com a decomposição do  $H_2O_2$  inclui a GSH-Px e CAT (Flohe e Gunzler, 1984). Células epiteliais bronquiais primárias e macrófagos alveolares primários produzem GSH-Px em grande quantidade, considerando que a CAT é expressa principalmente por macrófagos alveolares e neutrófilos (Rahman *et al.*, 2006).

Finalmente, a peroxidação lipídica foi analisada segundo o método do TBARS. Outros métodos para a análise da peroxidação lipídica são disponíveis (por exemplo, a quantificação de F-8-isoprostanato e o ensaio direto de malondialdeído por

HPLC), contudo o método do TBARS tem sido descrito como sendo estável reproduzível e eficiente (Draper e Hadley, 1990). Nós não descobrimos indicação significante de peroxidação lipídica após exposição crônica à CS (Valenca *et al.*, 2006). Este resultado contrasta com o que foi observado após exposição aguda à fumaça de cigarro ou outros estímulos inflamatórios pulmonares (Valenca *et al.*, 2008; Nagato *et al.*, 2009) em que a peroxidação lipídica é facilmente quantificada pelo TBARS.

## 6. CONCLUSÕES

Esse estudo avaliou os efeitos da N-acetilcisteína, do Alopurinol e do Mercaptopropionilglicina sobre o processo de inflamação pulmonar em resposta à exposição à fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6. A proteção observada, através das análises histológicas, permite interpretar o tratamento com N-acetilcisteína e Mercaptopropionilglicina como eficazes em preservar a histoarquitetura pulmonar dos animais expostos a fumaça de cigarro. Esse benefício conferido pelo tratamento com N e M também pode ser observado através de menor infiltrado inflamatório nos espaços alveolares, com diminuição da presença de macrófagos e neutrófilos.

Em relação aos ensaios bioquímicos, utilizados para acessar o nível de estresse oxidativo presente nas amostras, conclui-se que as drogas foram capazes de minimizar os efeitos oxidantes proporcionados pela fumaça de cigarro somente durante os cinco dias de exposição.

Sumarizando, o nosso estudo foi o primeiro a correlacionar o aumento da expressão da HMGB-1 e o desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido pela fumaça de cigarro em camundongos C57BL/6. Todavia, outros desenhos experimentais serão realizados com o objetivo testar alvos terapêuticos no tratamento do enfisema pulmonar.

## 7 – REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman A.H. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Saunders. 2005
- Adams' Health, E. Illustrated Encyclopedia: Athsma in adults: Ed. Healthcare Center. 2006 (IN ABOUT, I.)
- Aebi, H. Catalase in vitro. Methods Enzymol, v.105, p.121-6. 1984.
- Aggarwal, B. B. *et al.* Inflammation and cancer: how hot is the link? Bioch Farmacol. v. 72, p. 1605-1621. 2006.
- Aires, M. M. Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1999
- Andersson, U., H. Wang, *et al.* High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J Exp Med, v.192, n.4, Aug 21, p.565-70. 2000.
- Andrade Jr., D. R., Souza, R. B., Santos, S. A. & Andrade, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. Journal of Brazilian Pneumology, v.31, p.60-68. 2005.
- Ayene, I. S., A. B. Al-Mehdi, *et al.* Inhibition of lung tissue oxidation during ischemia/reperfusion by 2-mercaptopropionylglycine. Arch Biochem Biophys, v.303, n.2, Jun, p.307-12. 1993.
- Ayene, S. I., R. K. Kale, *et al.* Radioprotective effect of 2-mercaptopropionyl glycine on radiation-induced lipid peroxidation and enzyme release in erythrocytes. Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med, v.53, n.4, Apr, p.629-39. 1988.
- Azeredo, C. Técnicas para o desmame no ventilador mecânico. São Paulo: Manole. 2002
- Baeuerle, P. A. e D. Baltimore. NF-kappa B: ten years after. Cell, v.87, n.1, Oct 4, p.13-20. 1996.
- Balasubramanian, V. P. e B. Varkey. Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs. Curr Opin Pulm Med, v.12, n.2, Mar, p.106-12. 2006.
- Barreiros, A. L. B. S. D., J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, v.29, n.1, p.113-123. 2006.
- Bates, J. H., M. Decramer, *et al.* Volume-time profile during relaxed expiration in the normal dog. J Appl Physiol, v.59, n.3, Sep, p.732-7. 1985.
- Belló, A. Dano oxidativo e regulação biológica pelos radicais livres. Porto Alegre: Editora Ulbra. 2002

- Belvisi, M. G. e K. M. Bottomley. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? Inflamm Res, v.52, n.3, Mar, p.95-100. 2003.
- Bergen, A. W. e N. Caporaso. Cigarette smoking. J Natl Cancer Inst, v.91, n.16, Aug 18, p.1365-75. 1999.
- Biagi, P. e L. Abate. Heart failure, oxidative stress and allopurinol. Monaldi Arch Chest Dis, v.64, n.1, Mar, p.33-7. 2005.
- Bonaldi, T., F. Talamo, *et al.* Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. Embo J, v.22, n.20, Oct 15, p.5551-60. 2003.
- Brain, J. D. The respiratory tract and the environment. Environ Health Perspect, v.20, Oct, p.113-26. 1977.
- Bryan C, L., R. E. Lewis, *et al.* Allopurinol inhibition of neutrophilic alveolar response during hyperoxia. J Appl Physiol. v.75, n.1, Jul, p.357-63. 1993.
- Brodsky, B. e A. V. Persikov. Molecular structure of the collagen triple helix. Adv Protein Chem, v.70, p.301-39. 2005.
- Cai, M. e R. Ogawa. Effects of free radical scavengers, methylprednisolone, and ulinastatin on acute xanthine and xanthine oxidase-induced lung injury in rats. Circ Shock, v.43, n.2, Jun, p.71-8. 1994.
- Cai, S., P. Chen, *et al.* Oral N-acetylcysteine attenuates pulmonary emphysema and alveolar septal cell apoptosis in smoking-induced COPD in rats. Respirology, v.14, n.3, Apr, p.354-9. 2009.
- Castro, P., A. Legora-Machado, *et al.* Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. Eur J Pharmacol, v.498, n.1-3, Sep 13, p.279-86. 2004.
- Chang, H. K. e J. P. Mortola. Fluid dynamic factors in tracheal pressure measurement. J Appl Physiol, v.51, n.1, Jul, p.218-25. 1981.
- Churg, A., M. Cosio, *et al.* Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, v.294, n.4, Apr, p.L612-31. 2008.
- Churg, A., R. D. Wang, *et al.* Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. Am J Respir Crit Care Med, v.167, n.8, Apr 15, p.1083-9. 2003.
- Corvol, H., F. Flamein, *et al.* Lung alveolar epithelium and interstitial lung disease. Int J Biochem Cell Biol, v.41, n.8-9, Aug-Sep, p.1643-51. 2009.

- Cruz-Orive L. M., Weibel E. R. Sampling designs for stereology. Journal of microscopy, v.122, p.235-257. 1981.
- Czura, C. J. e K. J. Tracey. Autonomic neural regulation of immunity. J Intern Med, v.257, n.2, Feb, p.156-66. 2005.
- Daheshia, M. Therapeutic inhibition of matrix metalloproteinases for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). Curr Med Res Opin, v.21, n.4, Apr, p.587-94. 2005.
- Date, M. O., T. Morita, *et al.* The antioxidant N-2-mercaptopropionyl glycine attenuates left ventricular hypertrophy in in vivo murine pressure-overload model. J Am Coll Cardiol, v.39, n.5, Mar 6, p.907-12. 2002.
- David, C. Ventilação mecânica da fisiologia à prática clínica. Rio de Janeiro: Revinter. 2001
- De Boer, W. I., H. Yao, *et al.* Future therapeutic treatment of COPD: struggle between oxidants and cytokines. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, v.2, n.3, p.205-28. 2007.
- De Toranzo, E. G. e J. A. Castro. Reaction of 4-hydroxynonenal with some thiol-containing radioprotective agents or their active metabolites. Free Radic Biol Med, v.17, n.6, Dec, p.605-7. 1994.
- Ding, Y. S., L. Zhang, *et al.* Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.17, n.12, Dec, p.3366-71. 2008.
- Dekhuijzen, P. N. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J, v.23, n.4, Apr, p.629-36. 2004.
- Devreotes, P. N. e Zigmond, S. H. Chemotaxis in eukaryotic cells: a focus on leukocytes and *Dictyostelium*. Annu Rev Cell Biol. v. 4, p. 649-686. 1988.
- Draper, H. H. e M. Hadley. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. Methods Enzymol, v.186, p.421-31. 1990.
- Dreyfuss, J. L. Oliveira, J. S. R. Matriz extracelular e enzimas degradatórias na hematopoiese e doenças onco-hematológicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter, v.30, n.5, Oct, p.398-405. 2008.
- Drost, E. M., K. M. Skwarski, *et al.* Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. Thorax, v.60, n.4, Apr, p.293-300. 2005.
- Dumitriu, I. E., P. Baruah, *et al.* HMGB1: guiding immunity from within. Trends Immunol, v.26, n.7, Jul, p.381-7. 2005.

- Dy, M.; Vasquez, A.; Bertoglio, J. *et al.* General aspects of cytokine properties and functions. The cytokine network and immune function. Oxford: Oxford University Press. 1999.
- Eaton, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. J Lab Clin Med, v.118, n.1, Jul, p.3-4. 1991.
- Elkington, P. T. e J. S. Friedland. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. Thorax, v.61, n.3, Mar, p.259-66. 2006.
- Emmerich, J. C. Suporte Ventilatório Conceitos Atuais. Rio de Janeiro: Revinter. 1998
- Esteban, A., F. Frutos, *et al.* A comparison of four methods of weaning patients from mechanical ventilation. Spanish Lung Failure Collaborative Group. N Engl J Med, v.332, n.6, Feb 9, p.345-50. 1995.
- Ezzati, M. e A. D. Lopez. Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000. Tob Control, v.13, n.4, Dec, p.388-95. 2004.
- Fathi, M., A. Johansson, *et al.* Functional and morphological differences between human alveolar and interstitial macrophages. Exp Mol Pathol, v.70, n.2, Apr, p.77-82. 2001.
- Fluza, C., M. Bustin, *et al.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. Blood, v.101, n.7, Apr 1, p.2652-60. 2003.
- Flohe, L. e W. A. Gunzler. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol, v.105, p.114-21. 1984.
- Floyd, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. Faseb J, v.4, n.9, Jun, p.2587-97. 1990.
- Folz, R. J., A. M. Abushamaa, *et al.* Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. J Clin Invest, v.103, n.7, Apr, p.1055-66. 1999.
- Fridovich, I. e B. Freeman. Antioxidant defenses in the lung. Annu Rev Physiol, v.48, p.693-702. 1986.
- Gallin, J. I. *et al.* Inflammations: Basic principles and clinical correlates. New York: Raven Press. 1992.
- Garbacki, N., E. Di Valentin, *et al.* Matrix metalloproteinase 12 silencing: a therapeutic approach to treat pathological lung tissue remodeling? Pulm Pharmacol Ther, v.22, n.4, Aug, p.267-78. 2009.
- Garcia, E. A. C. Biofísica. São Paulo: Sarvier. 2002

- Gately, I. *Tabacco: a cultural history of how an exotic plant seduced civilization.* v.New York, Grove Press. 2002.
- Gartner, L. E. e Hiatt, J. I. Tratado de Histologia em cores. Rio de Janeiro: Elsevier. 2007
- Ghosh, S., M. J. May, et al. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annu Rev Immunol, v.16, p.225-60. 1998.
- Gordon, S. Alternative activation o macrophages. Nat Rev Immunol. v. 3, n.1, Jan, p. 23-35. 2003.
- Gueders, M. M., J. M. Foidart, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. Eur J Pharmacol, v.533, n.1-3, Mar 8, p.133-44. 2006.
- Guyton, A. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006
- Guyton, A. C. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002
- Halliwell, B. e J. M. Gutteridge. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch Biochem Biophys, v.246, n.2, May 1, p.501-14. 1986.
- Halliwell B. e J.M. Gutteridge. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol, v.186, p.1-85. 1990.
- Halliwell B, Gutteridge. J. Free radicals in biology and medicine: Oxford: Oxford University Press. 1999
- Hasday, J. D., R. Bascom, et al. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. Chest, v.115, n.3, Mar, p.829-35. 1999.
- Haslett, C. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.5 Pt 2, Nov, p.S5-11. 1999.
- Hatherill, J. R., G. O. Till, et al. Mechanisms of oxidant-induced changes in erythrocytes. Agents Actions, v.32, n.3-4, Mar, p.351-8. 1991.
- Hautamaki, R. D., D. K. Kobayashi, et al. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. Science, v.277, n.5334, Sep 26, p.2002-4. 1997.
- Helenius, M., M. Hanninen, et al. Aging-induced up-regulation of nuclear binding activities of oxidative stress responsive NF- $\kappa$ B transcription factor in mouse cardiac muscle. J Mol Cell Cardiol, v.28, n.3, Mar, p.487-98. 1996.

- Helenius, M., M. Hanninen, *et al.* Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. Biochem J, v.318 ( Pt 2), Sep 1, p.603-8. 1996.
- Hoffmann, D., I. Hoffmann, *et al.* The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. Chem Res Toxicol, v.14, n.7, Jul, p.767-90. 2001.
- Holt, P.G., Oliver, J. *et al.* Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. J Exp Med. v. 177, n. 2, Feb 1, p. 397–407.1993.
- Holt, P. G. Inhibitory activity of unstimulated alveolar macrophages on T-lymphocyte blastogenic response. Am Rev Respir Dis. v. 118, n. 4, Oct, p. 791–793. 1978.
- Huber-Lang, M. *et al.* Generation of C5a by phagocytic cells. Am J Phatol. v. 161, n. 5, p. 1849-1859. 2002.
- Hurt, R. D. Treat tobacco dependence and "bend the trend". Bull World Health Organ, v.77, n.5, p.367. 1999.
- Iglesias R., Jha, P. *et al.* Controle do Tabagismo no Brasil. Banco Internacional para Reconstrução e Desenvolvimento. Washington: Banco Mundial. 2007.
- Jeffrey, P. K. Inflammation in chronic obstrutive lung disease. Am. J. Respir. Crit. Care Med., v.160, p.S3-S4. 1999.
- Johansson, A., M. Lundborg, *et al.* Functional, morphological, and phenotypical differences between rat alveolar and interstitial macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol, v.16, n.5, May, p.582-8. 1997.
- Junqueira, L. C. C., J. Histologia Básica: Guanabara Koogan. 2004
- Karin, M., Y. Yamamoto, *et al.* The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. Nat Rev Drug Discov, v.3, n.1, Jan, p.17-26. 2004.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, *et al.* Fibrillin microfibrils. Adv Protein Chem, v.70, p.405-36. 2005.
- Kielty, C. M., M. J. Sherratt, *et al.* Elastic fibres. J Cell Sci, v.115, n.Pt 14, Jul 15, p.2817-28. 2002.
- Klune, J. R., R. Dhupar, *et al.* HMGB1: endogenous danger signaling. Mol Med, v.14, n.7-8, Jul-Aug, p.476-84. 2008.
- Kochi, T., S. Okubo, *et al.* Chest wall and respiratory system mechanics in cats: effects of flow and volume. J Appl Physiol, v.64, n.6, Jun, p.2636-46. 1988.
- Kochi, T., S. Okubo, *et al.* Flow and volume dependence of pulmonary mechanics in anesthetized cats. J Appl Physiol, v.64, n.1, Jan, p.441-50. 1988.

Kumar V., F. N., Abbas A. K. Robbins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças. São Paulo: Elsevier. 2005

Kuniyasu, H., S. Yano, et al. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphotericin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. Am J Pathol, v.166, n.3, Mar, p.751-60. 2005.

Lafleur, M. A., M. M. Handsley, et al. Metalloproteinases and their inhibitors in angiogenesis. Expert Rev Mol Med, v.5, n.23, Sep, p.1-39. 2003.

Lagente, V., B. Manoury, et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. Braz J Med Biol Res, v.38, n.10, Oct, p.1521-30. 2005.

Lambrecht, B. N. Alveolar macrophage in the driver's seat. Immunity. 2006.

Lampugnani, M. G. e Dejana, E. Interendothelial junctions: structure, signaling and functional roles. Curr Opin Cell Biol, v. 9, p. 674-682. 1997.

Lanzetti, M., F. S. Bezerra, et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. Nutrition, v.24, n.4, Apr, p.375-81. 2008.

Larsson, L., B. Szponar, et al. Tobacco smoking increases dramatically air concentrations of endotoxin. Indoor Air, v.14, n.6, Dec, p.421-4. 2004.

Limana, F., A. Germani, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. Circ Res, v.97, n.8, Oct 14, p.e73-83. 2005.

Loring, S. H., E. A. Elliott, et al. Kinetic energy loss and convective acceleration in respiratory resistance measurements. Lung, v.156, n.1, p.33-42. 1979.

Lotze, M. T. e Tracey, K. J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol, v.5, p.331-342. 2005.

Macnee, W. Treatment of respiratory failure: a review. Journal of the Royal Society of Medicine, v.78, January. 1987.

Manço, J. C. Fisiologia e Fisiopatologia Respiratórias. Ribeirão Preto: Medicina.1998.

Matsuo M, K. T. The chemistry of reactive oxygen species and related free radicals. in Free radicals in exercise and aging. Champaign: Human Kinetics. 2000.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Tabagismo: dados e números. Tabagismo no Brasil. Disponível: <http://www.inca.gov.br/tabagismo>.

- Miki, T., M. V. Cohen, *et al.* Failure of N-2-mercaptopropionyl glycine to reduce myocardial infarction after 3 days of reperfusion in rabbits. Basic Res Cardiol, v.94, n.3, Jun, p.180-7. 1999.
- Mithieux, S. M. e A. S. Weiss. Elastin. Adv Protein Chem, v.70, p.437-61. 2005.
- Montaldo, B. C. G., K. & Zwillich, C.W. The Control of Breathing in Clinical Practice. Chest, v.117, p.205-225. 2000.
- Moodie, F. M., J. A. Marwick, *et al.* Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. Faseb J, v.18, n.15, Dec, p.1897-9. 2004.
- Mortola, J. P. e A. Noworaj. Two-sidearm tracheal cannula for respiratory airflow measurements in small animals. J Appl Physiol, v.55, n.1 Pt 1, Jul, p.250-3. 1983.
- Mullins, G. E., J. Sunden-Cullberg, *et al.* Activation of human umbilical vein endothelial cells leads to relocation and release of high-mobility group box chromosomal protein 1. Scand J Immunol, v.60, n.6, Dec, p.566-73. 2004.
- Muscoli, C., S. Cuzzocrea, *et al.* On the selectivity of superoxide dismutase mimetics and its importance in pharmacological studies. Br J Pharmacol, v.140, n.3, Oct, p.445-60. 2003.
- Musk, A. W. e N. H. De Klerk. History of tobacco and health. Respirology, v.8, n.3, Sep, p.286-90. 2003.
- Nagase, H. e J. F. Woessner, Jr. Matrix metalloproteinases. J Biol Chem, v.274, n.31, Jul 30, p.21491-4. 1999.
- Nagato, A. C., Silva, F. L. *et al.* Hyperoxia-induced lung injury is dose-dependent in Wistar rats. Experimental lung research, n.in press. 2009.
- Nakamura, Y. *et al.* Arachidonic acid cascade inhibitors modulate phorbol ester-induced oxidative stress in female ICR mouse skin: differential roles of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in leukocyte infiltration and activation. Free Radic Biol Med. v. 35, n. 9, p. 997-1007. 2003.
- Nelson DI, C. M. Lehninger principles of biochemistry. New York: Worth Publisher. 2000
- Netter, F. H. Atlas de Anatomia Humana. Ribeirão Preto: ArtMed Editora. 2004.
- Niewoehner, D. E. e J. Kleinerman. Morphometric study of elastic fibers in normal and emphysematous human lungs. Am Rev Respir Dis, v.115, n.1, Jan, p.15-21. 1977.
- Niki, E. e Y. Yoshida. Biomarkers for oxidative stress: measurement, validation, and application. J Med Invest, v.52 Suppl, Nov, p.228-30. 2005.

- Niki, E., Y. Yoshida, et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Commun, v.338, n.1, Dec 9, p.668-76. 2005.
- O'neill, L. A. e C. Kaltschmidt. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. Trends Neurosci, v.20, n.6, Jun, p.252-8. 1997.
- Owen, C. A. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Proc Am Thorac Soc, v.2, n.4, p.373-85; discussion 394-5. 2005.
- Panus, P. C., J. Shearer, et al. Pulmonary metabolism of reactive oxygen species. Exp Lung Res, v.14 Suppl, p.959-76. 1988.
- Park, H. S., Kim, S. R. et al. Impact of oxidative stress on lung diseases. Respirology, v.14, p.27-38. 2009.
- Paul, W. E. Fundamental Immunology. New York: Lippincott-Raven. 1998.
- Pavlov, V. A. e K. J. Tracey. The cholinergic anti-inflammatory pathway. Brain Behav Immun, v.19, n.6, Nov, p.493-9. 2005.
- Pearson, M. J. e Lipowsky, H. H. Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. Am J Physiol Heart Circ Physiol. v. 279, n. 4, p. H1460-H1461. 2000.
- Perlstein, T. S. e R. T. Lee. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.26, n.2, Feb, p.250-6. 2006.
- Peterson, J. M., K. D. Feeback, et al. Tumor necrosis factor-alpha promotes the accumulation of neutrophils and macrophages in skeletal muscle. J Appl Physiol, v.101, n.5, Nov, p.1394-9. 2006.
- Pierce, R. A., T. J. Mariani, et al. Elastin in lung development and disease. Ciba Found Symp, v.192, p.199-212. 1995.
- Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod, v.63, n.7, Jul, p.1035-42. 2000.
- Pryor, W. A. e K. Stone. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxy nitrate, and peroxy nitrite. Ann N Y Acad Sci, v.686, May 28, p.12-27. 1993.
- Quinlan, T., S. Spivack, et al. Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. Environ Health Perspect, v.102 Suppl 2, Jun, p.79-87. 1994.
- Rahman, I. Antioxidant therapies in COPD. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, v.1, p.15-29. 2006.
- Rahman, I. e I. M. Adcock. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur Respir J, v.28, n.1, Jul, p.219-42. 2006.

- Rajendrasozhan, S., S. R. Yang, *et al.* Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. Antioxid Redox Signal, v.10, n.4, Apr, p.799-811. 2008.
- Ransohoff, R. M., P. Kivisakk, *et al.* Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. Nat Rev Immunol, v.3, n.7, Jul, p.569-81. 2003.
- Robbins, S. L., Cotran, R. S. *et al.* Fundamentos de Robbins. Patologia estrutural e funcional. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 1996.
- Rock, M. J., S. A. Cain, *et al.* Molecular basis of elastic fiber formation. Critical interactions and a tropoelastin-fibrillin-1 cross-link. J Biol Chem, v.279, n.22, May 28, p.23748-58. 2004.
- Rodrigues, A. C., L. F. Moreira, *et al.* Effects of thoracotomy on respiratory system, lung, and chest wall mechanics. Chest, v.104, n.6, Dec, p.1882-6. 1993.
- Ross, J. C., D. E. Copher, *et al.* Functional residual capacity in patients with pulmonary emphysema. A comparative study using gas dilution and plethysmographic techniques for measurement. Ann Intern Med, v.57, Jul, p.18-28. 1962.
- Routh, H. B., K. R. Bhowmik, *et al.* Historical aspects of tobacco use and smoking. Clin Dermatol, v.16, n.5, Sep-Oct, p.539-44. 1998.
- Rubio, M. L., M. C. Martin-Mosquero, *et al.* Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. Chest, v.125, n.4, Apr, p.1500-6. 2004.
- Rubio, M. L., M. V. Sanchez-Cifuentes, *et al.* N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rats. Eur Respir J, v.15, n.3, Mar, p.505-11. 2000.
- Saeed, R. W., S. Varma, *et al.* Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. J Exp Med, v.201, n.7, Apr 4, p.1113-23. 2005.
- Saldiva, P. H., W. A. Zin, *et al.* Alveolar pressure measurement in open-chest rats. J Appl Physiol, v.72, n.1, Jan, p.302-6. 1992.
- Sen, R. e D. Baltimore. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell, v.46, n.5, Aug 29, p.705-16. 1986.
- Scaffidi, P., T. Misteli, *et al.* Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature, v.418, n.6894, Jul 11, p.191-5. 2002.
- Scherle, W. A. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. Mikroskopie, v. 26, p. 57-63. 1970.

- Scott, M. D., B. H. Lubin, *et al.* Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. J Lab Clin Med, v.118, n.1, Jul, p.7-16. 1991.
- Seagrave, J., E. B. Barr, *et al.* Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice. Exp Lung Res, v.30, n.1, Jan-Feb, p.1-15. 2004.
- Segura-Valdez, L., A. Pardo, *et al.* Upregulation of gelatinases A and B, collagenases 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. Chest, v.117, n.3, Mar, p.684-94. 2000.
- Siebenlist, U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. Biochim Biophys Acta, v.1332, n.1, Feb 22, p.R7-13. 1997.
- Shapiro, S. D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences. Curr Opin Cell Biol, v.10, n.5, Oct, p.602-8. 1998.
- Shapiro, S. D. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. Biochem Soc Trans, v.30, n.2, Apr, p.98-102. 2002.
- Silva Bezerra, F., Valenca, S. S. *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. Nutrition, v. 22, Nov-Dec, p.1192-201. 2006.
- Silva, L. C. C., Rubin, A.S. *et al.* Espirometria na prática médica. Revista AMRIGS, v.3, n.49, jul-set, p.183-194. 2005.
- Similowski, T., P. Levy, *et al.* Viscoelastic behavior of lung and chest wall in dogs determined by flow interruption. J Appl Physiol, v.67, n.6, Dec, p.2219-29. 1989.
- Sobczak, A., D. Golka, *et al.* The effects of tobacco smoke on plasma alpha- and gamma-tocopherol levels in passive and active cigarette smokers. Toxicol Lett, v.151, n.3, Aug 1, p.429-37. 2004.
- Solomon, E. P., Berg, L. R. *et al.* Biology. Saunders College Publishing\_1996.
- Springer, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol. v. 57, p. 827-872. 1995.
- Stack, E. e Dubois, R. N. Regulation of cyclo-oxygenase-2. Best Pract Res Clin Gastroenterol. v. 15, n. 15, p. 787-800. 2001.
- Stevens, A. L., J. S. Histologia. São Paulo: Editora Manole. 1995
- Suki, B., S. Ito, *et al.* Biomechanics of the lung parenchyma: critical roles of collagen and mechanical forces. J Appl Physiol, v.98, n.5, May, p.1892-9. 2005.

Thepen, T., Van, R. *et al.* Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. J Exp Med. Aug 1;170(2):499–509. 1989.

Thèze J. The cytokine network and immune function. Oxford: Oxford University Press. 1999

Tortora, G. J. Princípios de anatomia humana. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007.

Tracey, K. J. The inflammatory reflex. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.853-9. 2002.

Valenca, S. S., P. Castro, *et al.* Light cigarette smoke-induced emphysema and NFκB activation in mouse lung. Int J Exp Pathol, v.87, n.5, Oct, p.373-81. 2006.

Valenca, S. S., K. Da Hora, *et al.* Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. Toxicol Pathol, v.32, n.3, May-Jun, p.351-6. 2004.

Valenca, S. S. e L. C. Porto. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke\*. J Bras Pneumol, v.34, n.10, Oct, p.787-95. 2008.

Valenca, S. S., F. Silva Bezerra, *et al.* Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. Environ Res, v.108, n.2, Oct, p.199-204. 2008.

Van Der Vaart, H., D. S. Postma, *et al.* Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax, v.59, n.8, Aug, p.713-21. 2004.

Vieira, S. R. R. Curvas de complacência ou curvas pressão-volume na insuficiência respiratória aguda. J Pneumol, v.6, n.25, Nov-Dez. 1999.

Wang, H., O. Bloom, *et al.* HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science, v.285, n.5425, Jul 9, p.248-51. 1999.

Warner, B. B., M. S. Burhans, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha increases Mn-SOD expression: protection against oxidant injury. Am J Physiol, v.260, n.4 Pt 1, Apr, p.L296-301. 1991.

Wess, T. J. Collagen fibril form and function. Adv Protein Chem, v.70, p.341-74. 2005.

West, J. Fisiologia respiratória moderna. São Paulo: Manole. 2002

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic. The MPOWER package. 2008.  
([http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower\\_report\\_full\\_2008.pdf](http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf))

Yang, H., H. Wang, *et al.* The cytokine activity of HMGB1. J Leukoc Biol, v.78, n.1, Jul, p.1-8. 2005.

Yang, H., H. Wang, *et al.* HMG-1 rediscovered as a cytokine. Shock, v.15, n.4, Apr, p.247-53. 2001.

Yasui, K., N. Kobayashi, *et al.* Superoxide dismutase (SOD) as a potential inhibitory mediator of inflammation via neutrophil apoptosis. Free Radic Res, v.39, n.7, Jul, p.755-62. 2005.

Yu, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev, v.74, n.1, Jan, p.139-62. 1994.

Yu, M., H. Wang, *et al.* HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. Shock, v.26, n.2, Aug, p.174-9. 2006.

Zandi, E., D. M. Rothwarf, *et al.* The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. Cell, v.91, n.2, Oct 17, p.243-52. 1997.

## 8 - APÊNDICES

### 8.1 - APÊNDICE A



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



#### COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

#### C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº CEA/037/2009 sobre "Análise dos efeitos da n-acetilcisteína, do tempol, do alopurinol e do mercaptoperioglicina sobre a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro", sob a responsabilidade de **Luís Cristóvão de M. S. Porto**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **01/07/2009**. Este certificado expira em **01/07/2013**.

Rio de Janeiro, 01 de Julho de 2009.

Prof. Israel Felzenszwalb  
 CEA/IBRAG/UERJ

Israel Felzenszwalb  
 Diretor  
 IBRAG - UERJ  
 Mat. 2887-8

Profa. Patricia Cristina Lisboa  
 CEA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva  
 Profº Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ.  
 Matrícula 34765-8

/ass

■ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748  
 biologia@uerj.br

**8.2 - APÊNDICE B**

Result Content View

[http://www.abstracts2view.com/ats08/view.php?m=ATS08L\\_2213&...](http://www.abstracts2view.com/ats08/view.php?m=ATS08L_2213&...)**[Poster Board #C8] Oxidative Stress in Mouse Plasma and Lungs Induced by Cigarette Smoke and Lipopolysaccharide, [Publication Page: A468]**

*S.S. Valenca, Sci.D., F.S. Bezerra, M.Sc., A.A. Lopes, B.Sc., B.R. Souza, M.Sc., L.C. Porto, Sci.D., Rio de Janeiro, Brazil*

Short-term exposure to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS) leads to acute lung inflammation through oxidant/antioxidant imbalance. Oxidative stress results from inhalation of oxidants in CS and release of reactive oxygen species from inflammatory cells. Disturbance of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) may be involved in this process. We studied mice exposed to smoke or LPS during 5 consecutive days, measured by SOD, CAT, and GPx activities, as well as lipid peroxidation and nitric oxide levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates, and plasma. Control animals were exposed to ambient air. Exposure to CS or LPS led to a similar influx of alveolar macrophages and neutrophils into the BALF; however, hydroxyproline levels were increased only in the CS group ( $p<0.001$ ); SOD activity was increased in the BALF ( $p<0.001$ ) and lung homogenates ( $p<0.05$ ) from the CS group but was decreased in the BALF ( $p<0.05$ ), lung homogenates ( $p<0.05$ ) and plasma ( $p<0.01$ ) from the LPS group. CAT activity was increased in the BALF ( $p<0.01$ ), lung homogenates ( $p<0.001$ ) and plasma ( $p<0.05$ ) from the CS group but decreased in the BALF ( $p<0.001$ ) and plasma ( $p<0.05$ ) from the LPS group. GPx activity was reduced in the BALF ( $p<0.01$ ) and plasma ( $p<0.01$ ) from both the CS and LPS groups. Lipid peroxidation was increased in the BALF ( $p<0.001$ ) and lung homogenates ( $p<0.001$ ) from the CS group. Finally, the levels of nitrite were reduced in the CS ( $p<0.01$ ) and LPS ( $p<0.001$ ) groups. Our data show that the activity profiles of enzymes contributing to oxidant/antioxidant imbalance in the lungs differ depending on the inflammatory stimulus, and that SOD, CAT and GPx may be useful tools to analyze oxidative stress in acute lung inflammation induced by exposure to CS.

Session Info: [\*\*] Thematic Poster Session, [B65] OXIDANTS AND ANTI-OXIDANTS FROM BENCH TO BEDSIDE

Day/Date: Monday, May 19, 2008

Session Time: 8:15 AM - 4:15 PM

Poster Viewing: 10:45-12:15

Room: Area C (Halls A-B, North Building, Level 300), Metro Toronto Convention Centre

[Close Window](#)

Result Content View

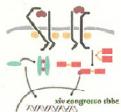
[http://www.abstracts2view.com/ats08/view.php?nu=A1S08L\\_2708&...](http://www.abstracts2view.com/ats08/view.php?nu=A1S08L_2708&...)**[Poster Board #E61] Long-Term Exposure to Cigarette Smoke Decreases Lung Function and Increases HMGB-1 Expression, [Publication Page: A728]****F.S. Bezerra, M.Sci., S.S. Valenca, Sci.D., K.M.P. Pires, M.Sci., A.C. Schmidt, W.A. Zin, Sci.D., L.C. Porto, Sci.D., Rio de Janeiro, Brazil**

Cigarette smoke (CS) induced emphysema is one of the major causes of COPD and causes an inflammatory response in the lower respiratory tract characterized by accumulation of alveolar macrophages associated with a recruitment of fewer neutrophils. The alterations of antioxidant defenses and inflammatory cytokines expression in CS smoke induced-emphysema remain largely unknown. This study aimed to describe the effects of long-term CS smoke exposure on gasometrical parameters, alveolar cell recruitment, lung mechanics (elastic recoil pressure of the lung-Pel, static pulmonary compliance-Cst, lung static elastance-Est, and elastic recoil variance-DL), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities and MMP-2, MMP-12 and HMGB-1 expression. C57Bl/6 mice (n=15) were exposed to 12 cigarettes-a-day smoke for 60 consecutive days. Animals exposed to ambient air were used as controls (n=15). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was obtained by washing the airways with saline solution (0.9% NaCl) and macrophages and neutrophils influxes were determined by cell counting (Z1 Coulter counter). Lungs were removed for biochemical analysis. PCO<sub>2</sub>, hematocrit and hemoglobin values were increased and PO<sub>2</sub> was decreased in CS group ( $p<0.05$ ). CS showed significantly increased influx of alveolar macrophages in BALF ( $p<0.001$ ). Pel, Est and DL were higher in CS ( $p<0.05$ ) and Cst lower in CS group. SOD and CAT activities were reduced, but GPx activity remained unaltered. Although MMP-2 expression did not change between groups, MMP-12 and HMGB-1 presented a 2-fold increase in their expression ( $p<0.01$ ) in CS. Our results indicate that long-term cigarette exposure leads to impaired lung function and decreased antioxidant defenses with involvement of HMGB-1 protein.

**Session Info:** [\*\*] Thematic Poster Session, [C63] MECHANISMS OF LUNG INJURY AND REPAIR**Day/Date:** Tuesday, May 20, 2008**Session Time:** 8:15 AM - 4:15 PM**Poster Viewing:** 10:45-12:15**Room:** Area E (Halls A-B, North Building, Level 300), Metro Toronto Convention Centre[Close Window](#)

### 8.3 - APÊNDICE C





**XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular - SBBC**  
**São Paulo - SP**

**Menção Honrosa**

A Comissão Organizadora atribui MENÇÃO HONROSA ao trabalho **LONG-TERM EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE DECREASES LUNG FUNCTION AND INCREASES HMGB-1 EXPRESSION** de autoria de Frank Silva Bezerra, Samuel Santos Valenca, Karla Maria Pereira Pires, Manuella Lanzetti, Wagner Alves Pimenta, Rojane Oliveira Paiva, Aline Schmith, Walter Araújo Zin e Luís Cristóvão Porto pela apresentação na forma de pôster durante o XIV Congresso da Sociedade Brasileira de Biologia Celular, realizado em São Paulo, no período de 27 a 30 de julho de 2008.

São Paulo, 30 de julho de 2008

Dra. Estela Bevilacqua

Dra. Vilma Regina Martins



Flaviviruses cause diseases like Dengue and Yellow fever. These viruses are transmitted by mosquitoes mainly in South America, Central America and Asiatic southeast, where they have a particular importance for public health. Virus-induced apoptosis is known as a consequence of an infection by flaviviruses. During apoptosis, some cellular mechanisms occur, such as activation of messengers of the apoptotic pathways. Once the mitochondrial pathway is activated, loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\text{Vm}$ ) and release of pro-apoptotic messengers through the voltage-dependent anion channel (VDAC) occur. The process by which Dengue virus induces apoptosis remains not clearly understood. Here, we investigate the Dengue-induced apoptosis process. With this aim, we infected Vero cells with DENV2 and analyzed the DNA fragmentation by TUNEL and the effect of the pancaspases inhibitor BAF. We also analyzed the  $\Delta\text{Vm}$  through fluorescence microscopy. Apoptosis is observed on the fifth day of infection with loss of  $\Delta\text{Vm}$ . We also investigated the importance of the mitochondrial pathway by VDAC inhibition. We also observed that viral RNA replication is controlled by an understood mechanism. Our real time rt-PCR results showed an increased viral RNA replication rate from the fourth day, explaining the infection effects observed only from the fifth day post infection. The present data show that Dengue virus is able to induce apoptosis from the fifth day of infection and that the mitochondrial pathway is activated, contributing partially for the cell death process induced by these flaviviruses.

sanches@bioqmed.ufrj.br

#### F-081 STUDY OF YELLOW FEVER VIRUS-INDUCED CELL DEATH

Daniel Sanches (UFRJ - IBQM), Samir Pereira da Costa Campos (UFRJ - IBQM), Diego Martins Ribeiro (UFRJ - IBQM), Luciane Pinto Gaspar (FIOCRUZ - RJ), Marcos Da Silva Freire (FIOCRUZ - RJ), Luciana Barreto Chiarini (UFRJ - IBCCF), Jerson Lima Silva (UFRJ - IBQM), Andre Marco de Oliveira Gomes (UFRJ - IBQM), Andréa Cheble de Oliveira (UFRJ - IBQM)

Flaviviruses cause diseases like Yellow fever and Dengue. These arboviruses have a particular importance for public health in South America, Central America and Asiatic southeast. Virus-induced cell death is related to a cytopathological consequence of an infection by flaviviruses, *in vivo* or *in vitro*. During programmed cell death, some cellular mechanisms occur, such as phosphatidylserine (PS) exposure and DNA condensation. If the programmed cell death type 1 (Apoptosis) is activated, occur DNA fragmentation, caspases activation and release of messengers of the apoptotic pathways. Once the mitochondrial pathway is activated, loss of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\text{Vm}$ ) occurs and caspase-9 is activated by release of pro-apoptotic messengers through the voltage-dependent anion channel (VDAC). The process by which Yellow Fever virus induces cell death remains not clearly understood. Here, we investigate the Yellow

Fever-induced cell death process. With this aim, we infected Vero cells with Yellow Fever virus using a multiplicity of infection (MOI) 1. To follow the process induced by infection, we analyzed the PS exposure and the  $\Delta\text{Vm}$  through fluorescence microscopy, using Fluorescein (FITC) – annexin V conjugate and Dioc6, respectively. We also analyzed the DNA condensation through fluorescence microscopy. The present data show that Yellow Fever virus is able to induce programmed cell death from the fifth day of infection and that the apoptotic mitochondrial pathway is probably being activated, contributing partially for the cell death process induced by these flaviviruses.  
samircampos@bioqmed.ufrj.br

#### F-082 EFFECTS OF HYPEROXIA ON WISTAR RAT LUNGS

Akinori Cardozo Nagato (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ), Milena Leonarde Kloss (FAFIS-IAENE), Frank Silva Bezerra (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ), Manuella Lanzetti (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ), Fabiano Leichsenring Silva (FAFIS-IAENE), Luís Cristóvão Porto (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ), Samuel Santos Valenca (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ)

The supplementation of oxygen is very important for patients with chronic lung diseases and heart failure. However the effects of hyperoxia is unclear. Our objective was to study the effects of short-term exposure to hyperoxia on Wistar rat lungs. The animals were divided in 3 groups: exposed to hyperoxia 10 min (O10), 30 min (O30) and 90 min (O90), together with a control group (exposed to ambient air). BAL was performed and the lungs were removed for histological or biochemical analysis. In the O10, O30 and O90 we observed an increase in the numbers of macrophages (2169.9 $\pm$ 118.0, 1560.5 $\pm$ 107.0, and 1467.6 $\pm$ 39.0) and neutrophils (396.3 $\pm$ 35.4, 338.4 $\pm$ 17.3 and 388.7 $\pm$ 11.7) when compared to control group (781.3 $\pm$ 78.3 and 61.6 $\pm$ 4.2, respectively). Lipid peroxidation was increase in O10, O30 and O90 (143 $\pm$ 7.8%, 180 $\pm$ 5.6% and 235 $\pm$ 13.7%) when compared to control group 100 $\pm$ 1.7%. The histological and stereological analyses revealed normal alveoli and alveolar septa in the control (83.5 $\pm$ 1.2% and 15 $\pm$ 1.2%), in the O10 group (81.3 $\pm$ 0.5% and 16.6 $\pm$ 0.7%) and in the O30 group (78.7 $\pm$ 0.5% and 17.7 $\pm$ 0.2%). However, in the O90 group, inflammatory cell infiltration was observed in the alveoli and alveolar septa. Red blood cells extravasated from capillaries to the alveoli (59.0 $\pm$ 1.2%), with evidence of congestion, hemorrhage, and septal edema (35.1 $\pm$ 0.6%). Hyperoxia for 90 min caused injury of the lung parenchyma, resulting in oxidative damage and inflammatory cell infiltration.  
samuelv@hotmail.com

#### F-083 LONG-TERM EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE DECREASES LUNG FUNCTION AND INCREASES HMGB-1 EXPRESSION

Frank Silva Bezerra (Laboratório de Reparo Tecidual/DHE-UERJ), Samuel Santos Valenca (LRT/DHE-

UERJ), Karla Maria Pereira Pires (DFP-UERJ), Manuella Lanzetti (LRT/DHE-UERJ), Wagner Alves Pimenta (LRT/DHE-UERJ), Rojane Oliveira Paiva (LRT/DHE-UERJ), Aline Schmith (CCS/IBCCF-UFRJ), Walter Araújo Zin (CCS/IBCCF-UFRJ), Luís Cristóvão Porto (LRT/DHE-UERJ)

Cigarette smoke (CS) induced emphysema is one of the major causes of COPD. The alterations of antioxidant defenses and inflammatory cytokines expression in CS smoke induced-emphysema remain largely unknown. This study aimed to describe the effects of long-term CS smoke exposure on gasometrical parameters, alveolar cell recruitment, lung mechanics (lung static elastance  $\gamma V$  Est, and elastic recoil variance  $\gamma V$  DL), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities and MMP-2, MMP-12 and HMGB-1 expression. C57Bl/6 mice ( $n=15$ ) were exposed to 12 cigarettes-a-day smoke for 60 consecutive days. Animals exposed to ambient air were used as controls ( $n=15$ ). After euthanasia bronchoalveolar lavage fluid (BALF), histological and biochemical analysis were performed. PCO<sub>2</sub>, hematocrit and hemoglobin values were increased and PO<sub>2</sub> was decreased in CS group ( $p<0.05$ ). CS showed significantly increased influx of alveolar macrophages in BALF ( $p<0.001$ ). Est and  $\gamma' L$  were higher in CS ( $p<0.05$ ) group. SOD and CAT activities were reduced, but GPx activity remained unchanged. Although MMP-2 expression did not change between groups, MMP-12 and HMGB-1 presented a 2-fold increase in their expression ( $p<0.01$ ) in CS. Conclusion: Our results indicate that long-term cigarette exposure leads to impaired lung function and decreased antioxidant defenses with involvement of HMGB-1 protein.  
samuelv@hotmail.com

#### F-084

#### MORPHO-FUNCTIONAL ALTERATIONS IN THE CALCANEAL TENDON OF RATS SUBMITTED TO A PROGRAM OF ECCENTRIC EXERCISE

Bernhard Jordan (Department of Cell Biology- Institute of Biology- UNICAMP), Sebastião Roberto Taboga (Department of Biology-ibilce-UNESP, SJ Rio Preto), Laurecir Gomes (Department of Cell Biology- Institute of Biology- UNICAMP), Edson Rosa Pimentel (Department of Cell Biology- Institute of Biology- UNICAMP)

The eccentric contraction is the phase of the motion where there is, despite the contraction, an enlargement in the length of the muscle. Under these conditions, muscles exhibit maximum voluntary contraction force. The purpose of this work was to analyze the effect of the tension, arisen from eccentric contraction, on the organization of the extracellular matrix and on some biomechanical properties of the tendon. Rats wistar 90 days old and weighting 300g were submitted to four weeks eccentric exercise protocol. For morphology 6 $\mu$ m sections were stained with toluidine blue (TB) or with picrosirius-hematoxylin (PSH) for polarized light microscopy. Intact tendons were used for biomechanical test. The analysis of TB stained sections of trained rats showed increments of: a) cells,

b) cells with lesser condensed chromatin, suggesting a larger transcriptional activity, c) metachromasy in the compression regions indicating accumulation of proteoglycans in that region. An enhancement of collagen bundles aggregation (PSH) was observed in trained rats. Biomechanical test using a constant traction force, showed higher relative tension in trained rats ( $15.77\pm2.77$  N/mm<sup>2</sup>) in relation to the control ( $8.98\pm3.84$  N/mm<sup>2</sup>). These differences were due to the smaller diameter observed in trained animals tendons. differences in the maximum force were not observed. Conclusion: The eccentric exercise promotes a larger organization of the collagen bundles and probably stimulates metabolic activities in tendons. Supported by CAPES and CNPq.  
bjordan@bol.com.br

#### F-085

#### HMG-COA REDUCTASE INHIBITORS PRESENT DIFFERENT EFFECTS ON RAT CUTANEOUS WOUND REPAIR

Tatiana Almeida Pádua (UERJ), Thaís Porto Amadeu (Fundação Oswaldo Cruz), Andréa Monte Alto Costa (UERJ)

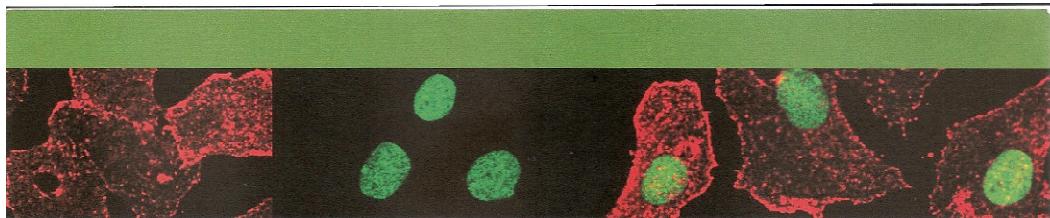
Statins are HMG-CoA reductase inhibitors that have immunomodulatory activities and pleiotropic effects but their role on wound healing is unclear. This study investigated the effects of three statins on cutaneous wound repair. Rats were separated into control (received water only), simvastatin, pravastatin and atorvastatin groups (20mg/kg/day). Statins were administrated by gavage 10 days preoperatively until the end of the experiment. Eleven days after the beginning of the treatment, an excisional wound was performed. The wound area was measured to evaluate wound contraction and reepithelialization. Fourteen days after wounding, the animals were sacrificed. Hematoxylin-eosin, toluidine blue, hydroxyproline analysis and determination of NO<sub>2</sub>- in serum were done. The wound contraction was higher in simvastatin than pravastatin, atorvastatin and control groups 7 days after wounding and in pravastatin than simvastatin, control and atorvastatin groups 14 days after wounding. The reepithelialization and NO<sub>2</sub>- level was higher in both simvastatin and pravastatin than control and atorvastatin groups. Atorvastatin presented higher and pravastatin presented lower amount of inflammatory cells in granulation tissue compared to the other groups. Hydroxyproline concentration was lower in simvastatin and atorvastatin than control group. The number of mast cells was higher in simvastatin compared to control group and in atorvastatin compared to pravastatin and control groups. Results showed that statins present different effects on cutaneous wound repair. Supported by CAPES and CNPq.  
tatiana.ap2@gmail.com

#### F-086

#### IMMUNOEXPRESSION OF GALECTIN-3 IN MOUSE PUBIC SYMPHYSIS AND INTERPUBIC LIGAMENT DURING PREGNANCY AND POST PARTUM

MARIA AMÁLIA CAVINATO NASCIMENTO, RENATA GIARDINI ROSA, SILVIO ROBERTO CONSONI,

## 8.4 - APÊNDICE D



20 a 23 de agosto de 2008  
Águas de Lindóia – São Paulo

### CERTIFICADO

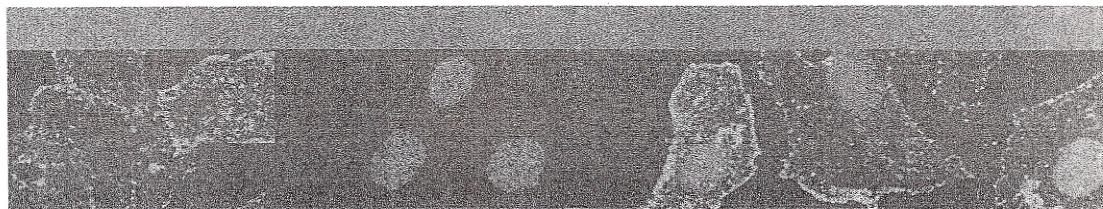
Certificamos que

o resumo 14.018  
N-ACETYL CYSTEINE AND N-(2-MERCAPTOPROPIONYL)GLYCINE BUT NO ALLOPURINOL PROTECTED MOUSE LUNG FROM CIGARETTE SMOKE-INDUCED EMPHYSEMA  
Bezerra, F. S.<sup>2,1</sup>, Schmidt, A.C.<sup>1</sup>, Silva, M. A. S.<sup>2</sup>, Trajano, E. T. L.<sup>2</sup>, Alves, J. N.<sup>2</sup>, Barroso, C. R. R.<sup>2</sup>, Pires, K. M. P.<sup>2</sup>, Valença, S. S.<sup>2</sup>, Zin, W. A.<sup>1</sup>, Porto, L. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia Respiratória, UFRJ CCS - IBCCF <sup>2</sup> Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil., foi apresentado sob a forma de painel

na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 20 a 23 de agosto de 2008.

  
Comissão Organizadora



# FeSBE 2008

20 a 23 de agosto de 2008  
Águas de Lindóia – São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 14.049

A FUMAÇA DE CIGARRO E O LIPOPOLISSACARÍDEO INDUZEM  
ESTRESSE OXIDATIVO NO PLASMA E NOS PULMÕES DE  
CAMUNDONGOS?

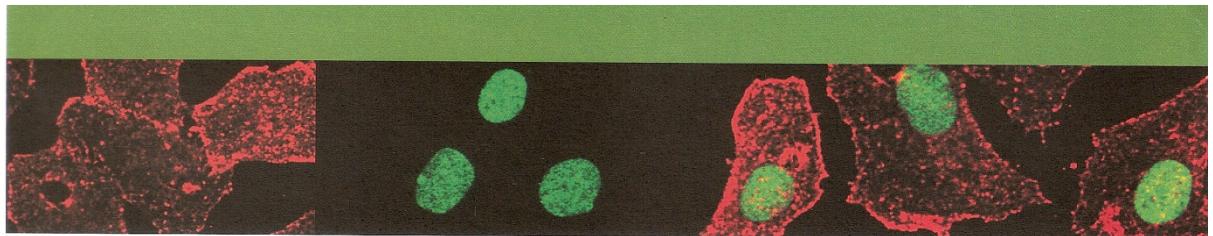
Lopes, A.A., Bezerra, F. S., Romana-Souza, B., Valença, S. S.,  
Porto, L. C.  
Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de  
Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil., foi apresentado sob a forma de  
painel

na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia  
Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP,  
de 20 a 23 de agosto de 2008.



Comissão Organizadora






# FeSBE 2008

**20 a 23 de agosto de 2008**  
Águas de Lindóia – São Paulo

## CERTIFICADO

Certificamos que

O resumo 14.013  
**EFFECTS OF N-(2-MERCAPTOPROPIONYL)-GLYCINE ON  
 OXIDATIVE STRESS INDUCED FOR CIGARETTE SMOKE  
 EXTRACT IN RAT ALVEOLAR MACROPHAGES**  
 Bandeira, A. C. B.<sup>2</sup>, Silvestre, T.<sup>3</sup>, Lanzetti, M.<sup>1</sup>, Costa, P.<sup>1</sup>, Bezerra,  
 F. S.<sup>1</sup>, Porto, L. C.<sup>1</sup>, Valença, S. S.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Faculdade de Enfermagem, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, Brasil. <sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil. <sup>3</sup> Faculdade de Biologia, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, Brasil., foi apresentado sob a forma de painel

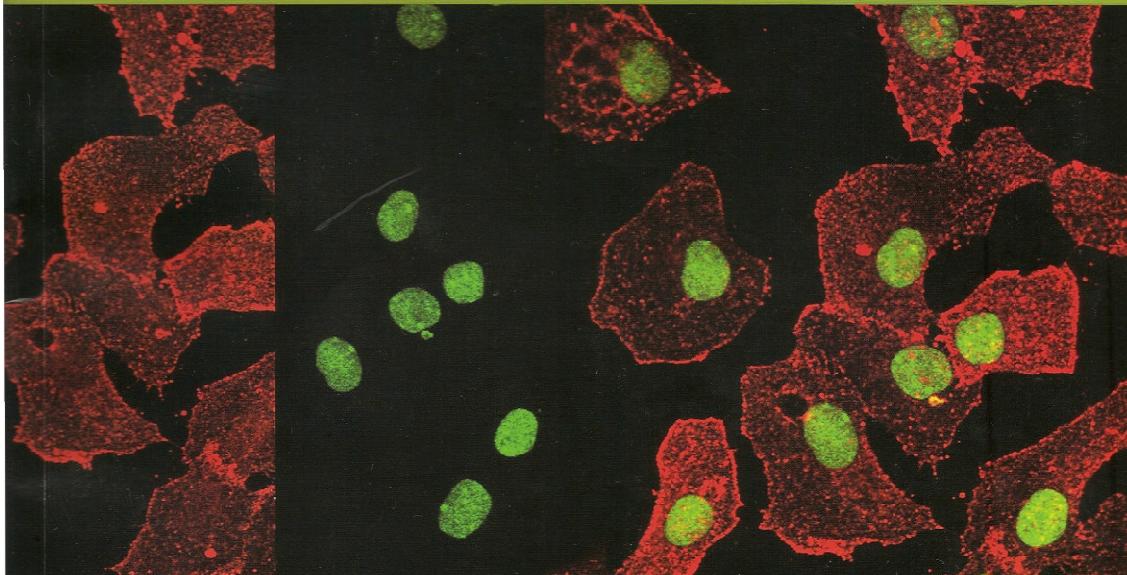
na XXIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 20 a 23 de agosto de 2008.



Comissão Organizadora



# FeSBE 2008



## Programa XXIII Reunião Anual

Federação de Sociedades de Biologia Experimental  
20 a 23 de agosto | Águas de Lindóia | SP | Brasil

XXXIII Congresso da Soc. Bras. de Biofísica (SBBF)  
XLIII Congresso da Soc. Bras. de Fisiologia (SBFis)  
XXIV Congresso da Soc. Bras. de Investigação Clínica (SBIC)  
V Congresso da Braz. Res. Assoc. in Vision and Ophthalmology (BRAVO)

### Participações

Soc. Bras. de Biologia Celular (SBBC)  
Soc. Bras. de Biociências Nucleares (SBBN)  
Soc. Bras. de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)  
Soc. Bras. de Neurociências e Comportamento (SBNeC)  
Dept. de Endocrinologia Básica da SBEM  
Soc. Bras. de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE)  
Soc. Bras. de Imunologia (SBI)  
Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)

Passos, M. A. R. da F., Passos, M. M. C. F., Lisboa, P. C., Oliveira, E. de, Bonomo, I. T., Trevenzoli, I. H., Pinheiro, C. R., Neto, J. F. N., Moura, E. G. de  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ

**13.017**  
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁCIDO AS-CÓRICO (VITC) NA SÍNTSESE DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) E NA PREVENÇÃO DA NEFROTOXICIDADE EM RATOS TRATADOS COM GENTAMICINA (GENTA).  
Moreira, M. A., Higa, E. M. S.

**13.018**  
ESTUDO DA FUNÇÃO RENAI NO MODELO DO RIM ISOLADO E PERFUNDIDO IN VITRO.  
Ajona, A. R. S.<sup>1</sup>, Bertels, I. M. V.<sup>1</sup>, Figueiredo, J. F.<sup>1</sup>, Gontijo, J. A. R.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP <sup>2</sup> DEPTO FARMACOLOGIA FAC CIENCIAS MEDICAS, UNICAMP CIDADE UNIVERSITARIA ZEFERINO VAZ

**13.019**  
EFEITO CRÔNICO DA SEPSE INDUZIDA PELO MODELO CLP SOBRE A FUNÇÃO GLOMERULAR EM RATOS  
Portella, V. G., Ribeiro, A. P. A. F., Pacheco, L. F., Diniz, L. R. L., Vieira, M. A. R.  
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG

**13.020**  
AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE LACTATO-DESIDROGENASE (LDH) EM FRAGMENTOS RENAISS CONSERVADOS  
Cardoso, C. C.<sup>1,2</sup>, Bertels, I. M. V.<sup>1,2</sup>, Ajona, A. R. S.<sup>1,2</sup>, Gontijo, J. A. R.<sup>1,2</sup>, Figueiredo, J. F.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP CIDADE UNIVERSITARIA ZEFERINO VAZ <sup>2</sup> LABORATORIO DE CONSERVAÇÃO DE ÓRGÃOS PARA TRANSPLANTE, NMCE RUA 5 JUNHO, 5

**13.021**  
EFEITO DA INIBIÇÃO DA MAP QUINASE P38 NA EVOLUÇÃO DA LESÃO RENAL INDUZIDA PELA CISPLATINA  
Francescato, H. D. C.<sup>1</sup>, Neto, A. C. de O.<sup>1</sup>, Silva, C. G. A. da<sup>1</sup>, Costa, R. S.<sup>2</sup>, Coimbra, T. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Depto. de Fisiologia/Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP/USP Avenida Bandeirantes, 3900. CEP: 14049-900. Ribeirão Preto, SP <sup>2</sup> Depto. de Patologia/ Faculdade de Medicina do Ribeirão Preto, FMRP/USP Avenida Bandeirantes, 3900. CEP: 14049-900. Ribeirão Preto, SP

**13.022**  
UNCÁRIA TOMENTOSA E A LESÃO RENAL ISQUÉMICA EM RATOS  
SILVA, N.O.<sup>2,1</sup>, DEZOTI, C.<sup>2,1</sup>, VATTIMO, M.F.<sup>2,1</sup>

<sup>1</sup> Universidade de São Paulo, USP <sup>2</sup> Escola de enfermagem da Universidade de São paulo, EEUUSP Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguilar 419 cep: 05403-000

## Biofísica Respiratória

**14.011**  
MORPHOFUNCTIONAL ATTENUATION OF ACUTE LUNG INJURY IN P2X<sub>7</sub>KNOCKOUT MICE.

Monção/Ribeiro, L. C., Cagido, V. R., Riva, D. dos R., Boroevic, R., Zin, W. A., Takiya, C. M., Faffe, D. S., Coutinho,Silva, R.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Av Brigadeiro Trompowsk s/n Ilha do

Fundão-Rio de Janeiro

**14.012**  
ALTERAÇÕES NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ISO TRAQUEAL DE RATOS POR EXPOSIÇÃO AGUDA À FULIGEM DE RESÍDUOS DO ÓLEO.

Aguiar, L. A.<sup>1</sup>, Silva, L. P. da<sup>1</sup>, Oliveira, D. C.<sup>1</sup>, Lima, C. C.<sup>1</sup>, Cavalcante, F. S. A.<sup>1</sup>, Fontelles, M. C.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>2</sup>, Leal-Cardoso, J. H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Ceará, Uece Av Parajana 1700 <sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ CCS - Bloco G - UFRJ - Ilha do Fundão CEP: 21949-900

**14.013**

FFFCFTS OF N-(2-MERCAPTOPROPIONYL)-GLYCINE ON OXIDATIVE STRESS INDUCED FOR CIGARETTE SMOKE EXTRACT IN RAT ALVEOLAR MACROPHAGES

Bandeira, A. C. B.<sup>2</sup>, Silvestre, T.<sup>3</sup>, Lanzetti, M.<sup>1</sup>, Costa, P.<sup>1</sup>, Bezerra, F. S.<sup>1</sup>, Porto, L. C.<sup>1</sup>, Valençã, S.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Faculdade de Enfermagem, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, Brasil. <sup>3</sup> Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil. <sup>3</sup> Faculdade de Biologia, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, Brasil.

**14.014**

LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO AO PÓ DE TRÍPOLI.

Machado, M. N., Schmidt, A. da C., Laks, D. M., Vieira, J. C., Saldiva, P. H. N., Faffe, D. S., Zin, W. A.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

**14.015**

CHRONIC EXPOSURE TO CIGARETTE SMOKE INDUCES HETEROGENEOUS EMPHYSEMA AND INFLAMMATION BUT NO CHANGES IN RESPIRATORY MECHANICS IN C57BL6 MICE

Magalhães, R. M., Toledo, A. C., Hizume, D. C., Moriya, H. T., Biselli, P. J., Vieira, R., Lopes, F. D., Martins, M. A.

Departamento de Clínica Médica / Faculdade de Medicina USP, FMUSP Av. Dr. Arnaldo nº 455 1º ANDAR - SALA 1216

**14.016**

BONE MARROW-DERIVED MONONUCLEAR CELLS IN A MURINE MODEL OF SILICOSIS

Maron-Gutierrez, T.<sup>1</sup>, Castiglione, R. C.<sup>1</sup>, Xisto, D. G.<sup>1</sup>, Oliveira, M. G.<sup>1</sup>, Ornellas, D.S.<sup>1</sup>, Takiya, C. M.<sup>2</sup>, Rocco, P. R. M.<sup>1</sup>, Morales, M. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ Avenida Carlos Chagas Filho, n°373, CCS, Cidade Universitária <sup>2</sup> Instituto de Ciências Biomédicas, UFRJ Avenida Carlos Chagas Filho, n°373, CCS, Cidade Universitária

**14.017**

HIPEROXYA-INDUCED A DOSE DEPENDENT LUNG INJURY IN RATS

Nagato, A. C.<sup>1</sup>, Silva, A. R.<sup>2</sup>, Silva, F. L.<sup>2,3</sup>, Bezerra, F. S.<sup>1</sup>, Paiva, R. O.<sup>1</sup>, Rodrigues, M. L. O.<sup>2</sup>, Klein, A. B.<sup>3</sup>, Porto, L. C.<sup>1</sup>, Valençã, S.<sup>1</sup>

<sup>2</sup> Faculdade de Fisioterapia - FAFIS, FAB (IAENE) Caixa postal 18, Cachoeira - BA, Brasil. <sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil. <sup>3</sup> Departamento de Fisiologia, UFRGS Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, Brasil.

**14.018**

N-ACTYL CYSTEINE AND N-(2-MERCAPTOPROPIONYL)GLYCINE BUT NO ALLO-

PURINOL PROTECTED MOUSE LUNG FROM CIGARETTE SMOKE-INDUCED EMPHYSEMA

Bezerra, F. S.<sup>2,1</sup>, Schmidt, A.C.<sup>1</sup>, Silva, M. A. S.<sup>2</sup>, Trajano, E. T. L.<sup>2</sup>, Alves, J. N.<sup>2</sup>, Barroso, C. R. R.<sup>2</sup>, Pires, K. M. P.<sup>2</sup>, Valençã, S. S.<sup>2</sup>, Zin, W. A.<sup>1</sup>, Porto, L. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Fisiologia Respiratória, UFRJ CCS - IBCCF <sup>2</sup> Laboratório de Reparo Tecidual - DHE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil.

**14.019**

PAPEL DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X EM MODELO DE SENSIBILIZAÇÃO ALÉRGICA.

Vieira, J. C., Rocha, F. M., Cagido, V. R., Riva, D. dos R., Alves, J. L. C. R., Faffe, D. S., Zin, W. A., Silva, R. C.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

**14.020**

EFEITOS DA FULIGEM DA QUEIMA DO DIESEL NA CONTRAÇÃO DO MÚSCULO ISO TRAQUEAL DE RATOS

Silva, L. P. da<sup>1</sup>, Aguiar, L. A.<sup>1</sup>, Oliveira, D. C.<sup>1</sup>, Neto, A. de F.<sup>1</sup>, Coelho-de-Souza, A. N.<sup>1</sup>, Cavalcante, F. S. A.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>2</sup>, Leal-Cardoso, J. H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Superior de Ciências Biomédicas, Uece Av. Paraná, 1700, Campus do Itaperi - Fortaleza - Ce <sup>2</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ CCS - Bloco G - UFRJ - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ

**14.021**

INVOLVEMENT OF NITRIC OXIDE PRODUCED BY cNOS ON MUCOCILIARY TRANSPORTABILITY.

Pessa, N. G., Pingue, M. C. M., Blanco, E. E. A.

Universidade Estadual de Londrina, UEL

## Diferenciação, Crescimento e Morte Celular

**18.001**

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DA APlicaÇÃO DE DIFERENTES PREPARADOS DE *Dillenia indica* (L.) ASSOCIADO À MICROCORRENTE NO PROCESSO DE CICATRIZAÇÃO DE LESÕES EM RATOS WISTAR

Esquivelotto, M. A. M., Chiosini, M. A., Santos, G. M. T., Mendonça, F. A. S., Júnior, J. R. P., Migliato, K. F.

Centro Universitário Hermínia Ometto, Uniararas Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 Araras/SP

**18.002**

CÉLULAS MESENQUIMIAIS DERIVADAS DA PLACA CORIÓNICA: UM ESTUDO SOBRE ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIFERENCIACAO.

PASSIPIERI, J. A.<sup>1</sup>, KASA-BRUNSWICK, T. H.<sup>1</sup>, CHRISTIE, B. B.<sup>1</sup>, MARTINS, A. B.<sup>1</sup>, CRUZ, I.<sup>1</sup>, BALDUÍNO, A.<sup>2</sup>, LOPES, L.<sup>3</sup>, GOLDENBERG, R. C. S.<sup>1</sup>, CAMPOS DE CARVALHO, A.C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro Pré-Natal de Diagnóstico e Tratamento, CPDT Rua das Laranjeiras, 445, Laranjeiras, Rio de Janeiro/ RJ <sup>1</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ <sup>2</sup> Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia, INTO Rua Washington Luis, 61, Centro, Rio de Janeiro

**18.003**

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO ELÉTRICA DE ALTA VOLTAGEM NA CICATRIZAÇÃO DE

Fisiológicas/Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF/Ufes Av. Marechal Campos, 1468, Maruípe. Vitória/ES. CEP. 29043-900

#### 12.039

EMBRYONIC STEM CELL TRANSPLANTATION IN RATS SUBMITTED TO ACUTE MYOCARDIAL INFARCTION.

Abreu, M. S. C.<sup>1</sup>, Werneck de Castro, J. P. S.<sup>2,1</sup>, Rocha, N. de N.<sup>1,3</sup>, Bagno, L. L. S<sup>1</sup>, Pegahna, R.<sup>1,2</sup>, Oliveira, P. F. de<sup>1</sup>, Silva, J.N.<sup>1</sup>, Albuquerque, J. P. A. C. de<sup>2,1</sup>, Louzada, R. A. N.<sup>2,1</sup>, González, S.<sup>4,5</sup>, Ferreira, A.M.R.<sup>6</sup>, Goldenberg, R. C. S.<sup>1</sup>, Campos de Carvalho, A.C.<sup>1,7</sup>

<sup>1</sup> Lab. Cardiologia Celular e Molecular, LCCM - IBCCF - UFRJ CCS - Bloco G - UFRJ - Ilha do Fundão <sup>2</sup> Lab. Biologia Muscular e do Exercício, LBME- EEFD - UFRJ Rua Carlos Chagas Filho, s/n<sup>o</sup>, Cidade Universitária, Ilha do Fundão <sup>3</sup> Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFF Rua Professor Ernani Melo, 101, Centro, Niterói, RJ <sup>4</sup> Instituto Nacional do Câncer, INC Rio de Janeiro - Centro - FIOCRUZ, FIOCRUZ Av. Brasil, 4.365 - Manguinhos <sup>5</sup> Departamento de Patologia e Clínica Veterinária, UFF Rua Vital Brasil, 64, Santa Rosa, Niterói, RJ <sup>6</sup> Instituto Nacional de Cardiologia - RJ, INC Laranjeiras, Rio de Janeiro, 22240006

#### 12.040

β-BLOQUEADORES NÃO MELHORAM A FUNÇÃO MUSCULAR ESQUELÉTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA

Júnior, C. R. B., Vanzelli, A. S., Bartholomeu, J. B., Brum, P. C., Universidade de São Paulo, USP

#### 12.041

MATERNAL PROTEIN RESTRICTION LEADS TO IMPAIRED CARDIOMYOCYTES PROLIFERATION AND HYPERTROPHY

Nalbones-Barbosa, M. N.<sup>1</sup>, Pires, K. M. P.<sup>2</sup>, Lacerda, C. A. M. de<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ <sup>2</sup> Departamento de Anatomia, LIMVIC Av. 28 de Setembro, 87 fds Vila Isabel - Rio de Janeiro

#### 12.042

EFEITOS DA METILATROPINA E DA INATIVAÇÃO DOS QUIMIORRECEPTORES CAROTÍDEOS NA BRADIARRITMIA CAUSADA PELA APNÉIA OBSTRUTIVA INDUZIDA EM RATOS ACORDADOS

Rossi, M.V., Schoorlemmer, G.H.M., Cravo, S.L.D.

Fisiologia / Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP Rua Botucatu, 862

#### 12.043

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE LOSARTAN EM CAMUNDONGOS LDL-/TRATADOS COM DIETA HIPERLIPÍDICA

Minozzi, C. T., Wanschel, A. C. B. A., Caceres, V. de M., Krieger, M. H., Grassi-Kassis, D. M.

Departamento de Fisiologia e Biofísica/Instituto de Biologia, UNICAMP Rua Monteiro Lobato, s/n, Cidade Universitária "Prof. Zeferino Vaz", 13083-862

#### 12.044

PARTICIPAÇÃO DA PKC E DOS PRODUTOS DA VIA DA CICLOOXYGENASE NA ALTERAÇÃO DA RESPOSTA À NORADRENALINA EM RATAS DIABÉTICAS

Sartoretto, S. M., Akamine, E. H., Tostes, R. de C., Carvalho, M. H. C., Fortes, Z. B. Departamento de Farmacologia/ Universidade de São Paulo, USP Av. Prof. Lineu Prestes, 1.524, sala 205- ICB I

#### 12.045

EFEITO DO TRATAMENTO COM N-ACTILCISTEÍNA NA RESPOSTA VASOMOTORA DE RATOS INFARTADOS.

Sousa, L. G. O. de, Ferreira, J. C. B., Júnior, C. R. B., Coelho, M. de A., Jordão, C. P., Bechara, L. R. G., Tanaka, L. Y., Santos, A. M. dos, Brum, P. C., Ramires, P. R. Universidade de São Paulo, USP

lo - Clínica Médica, FMUSP - LIM-20 Av. Dr. Arnaldo, 455 - 1º Andar - Sala 1210

#### 14.038

EFEITO DA N-ACTILCISTEÍNA E DA S-NITROSO-N-ACTILCISTEÍNA SOBRE DIFUSÃO DE GASES EM RATOS COM LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM

Vercelino, R.<sup>3</sup>, Tieppo, J.<sup>3</sup>, Valiatti, B. B.<sup>4</sup>, Souza, G. F. P.<sup>2</sup>, Tuñon, M.<sup>5</sup>, De Oliveira, M. G.<sup>2</sup>, Marroni, N. P.<sup>1</sup>

<sup>3</sup>Fisiologia UFRGS Rua Sarmento Leite, 500 - 2º andar - 90.050-170 - Porto Alegre - RS

- Brasil <sup>5</sup> Facultad de Biología, UNILEÓN

Campus de Vagazana s/n, 24071 León - ES

<sup>1</sup>Laboratório de Estresse Oxidativo, ULBRA

Av. Farroupilha, nº 8001 - Bairro São José

- Canoas/RS <sup>2</sup> Instituto de Química, UNICAMP Caixa Postal 6154 <sup>4</sup> Faculdade de Medicina, UFCSPA Rua Sarmento Leite, 245

- Porto Alegre, RS- CEP 90050-17

#### Biologia Respiratória

#### 14.033

THE IMPACT OF OBESITY ON AIRWAY AND LUNG PARENCHYMA REMODELLING IN A MURINE MODEL OF CHRONIC ALLERGIC ASTHMA

Saraiva, S. A., Silva, A. L. da, Reis, G. S. O., Silva, P. M. R., Parra, E. R., Capelozzi, V., Ferreira, T. P. T., Martins, M. A., Rocco, P. R. M.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ

#### 14.034

COMPARISON OF TWO different RECRUITMENT MANEUVERS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF ACUTE LUNG INJURY

Carmo, L. G. R. R. do<sup>1</sup>, Ferreira, A. R.<sup>1</sup>, Oliveira, G. P. de<sup>1</sup>, Santos, R. S.<sup>1</sup>, Santiago, V. R.<sup>1</sup>, Ornellas, D. dos S.<sup>1</sup>, Ornellas, F. M.<sup>1</sup>, Maron-Gutiérrez, T.<sup>1</sup>, Morales, M. M.<sup>1</sup>, Conde, M. B.<sup>2</sup>, Rocco, P. R. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, CCS, Ilha do Fundão <sup>2</sup> Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ, HUFFC Lab de Pesquisa Clínica em Tubercolose - Rua Rodolpho Rocco, n 255/ 6 andar

#### 14.035

EFFECTS OF BONE MARROW MONONUCLEAR CELL THERAPY IN THE AIRWAY AND LUNG PARENCHYMA REMODELING IN A MURINE MODEL OF CHRONIC ALLERGIC INFLAMMATION.

Abreu, S. C.<sup>1</sup>, Antunes, MA<sup>1</sup>, Cruz, FF<sup>1</sup>, Carmo, L. G. R. R. do<sup>1</sup>, Prota, L. F. M.<sup>1</sup>, Maron-Gutiérrez, T.<sup>1</sup>, Ornellas, D. dos S.<sup>1</sup>, Parra, E. R.<sup>2</sup>, Capelozzi, V., Teodoro, W. R.<sup>2</sup>, Morales, M. M.<sup>1</sup>, Rocco, P. R. M.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Av. Carlos Chagas Filho, s/n, Cidade Universitária, CCS- RJ - CEP: 21941-902

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, USP Av. Dr Arnaldo 455 - SP CEP: 01246-903

#### 14.036

CAPSAICIN-SENSITIVE NERVES INACTIVATION REDUCES LUNG PARENCHYMA REMODELING IN GUINEA PIGS WITH CHRONIC ALLERGIC PULMONARY INFLAMMATION

Prado, C. M.<sup>1</sup>, Rocha, G. Z. da<sup>1</sup>, Leick-Maldonado, E. A.<sup>1</sup>, Starling, C. M.<sup>1</sup>, Capelozzi, V.<sup>1</sup>, Martins, M. A.<sup>1</sup>, Tibério, I. F. L. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Terapêutica I - LIM 20, FMUSP Av. Dr Arnaldo 455 sala 1210 2

Depto de Ciências Biológicas - Diadema, UNIFESP Rua Prof. Arthur Riedel 275, 09972-270

#### 14.037

COMPARISON OF GLUCOCORTICOID AND CYSTEINYI LEUKOTRIENE RECEPTOR ANTAGONIST TREATMENTS IN THE AIRWAY REMODELLING INDUCED BY CHRONIC AIRWAY INFLAMMATION IN GUINEA PIGS

Leick-Maldonado, E. A., Prado, C. M., Martins, M. A., Tibério, I. F. L. C.

Fac. Medicina da Universidade de São Pau-

#### Diferenciação, Crescimento e Morte celular

#### 18.013

IMORTALIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS RESPOSTAS DE CÁLCIO EM ASTRÓCITOS DE RATO.

Terashima, J. Y., Muler, M. L., Morales, A. P., Han, S. W., Smaili, S. S.

CADORES INFLAMATÓRIOS NA CLAUDIÇÃO INTERMITENTE  
Albuquerque, R.M., Virginio-Magalhães, C.E., Sicuro, F.L., Bottino, D. A., Bouskela, E.  
LPM-Ciências Fisiológicas / IBRAG, UERJ  
Pav. Haroldo Lisboa da Cunha, térreo. R.  
São Francisco Xavier 524, maracanã, RJ

### Biologia Respiratória

#### 14.044

EFEITOS DO TRATAMENTO COM LASS-BIO596 E DEXAMETAZONA NA LESÃO PULMONAR INDUZIDA POR MICROCISTINA-LR  
Carvalho, G. M. C.<sup>1</sup>, Oliveira, V. R. de<sup>1</sup>, Cruz, R. C. da<sup>1</sup>, Valenca, S. S.<sup>2</sup>, Soares, R. M.<sup>1</sup>, Azevedo, S. M. F. de O. e<sup>1</sup>, Lima, L. M.<sup>1</sup>, Barreiro, E. J. de L.<sup>1</sup>, Faffe, D. S.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Estadual do Rio de Janeiro, UERJ Avenida 28 de setembro, 77- IBRAG  
<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Avenida Carlos Chagas Filho, 373- CCS-BLG-SL.G2.042

#### 14.045

ARGINASE INHIBITION MODULATES LUNG STRIP MECHANICS IN ANIMALS WITH CHRONIC PULMONARY INFLAMMATION  
Aristóteles, L. R. C. R. B.<sup>1</sup>, Starling, C. M.<sup>1</sup>, Prado, C. M.<sup>2,1</sup>, Leick-Maldonado, E. A.<sup>1</sup>, Martins, M. A.<sup>1</sup>, Tibério, I. F. L. C.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Laboratório de Terapêutica Experimental LIM20, FMUSP Av. Dr. Arnaldo 455 sala 1210 <sup>2</sup> Depto de Ciências Biológicas - Campus Diadema, UNIFESP Rua Prof. Arthur Riedel 275, 09972-270

#### 14.046

EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS ABCB1, ABCC1 E ABCG2 EM CAMUNDONGOS CS7BL/10 e BALB/c IRATIADOS COM OVALBUMINA.  
Martins, L. A. S., Silva, P. L., Abreu, S. C., Antunes, M. A., Rocco, P. R. M., Capella, M. A. M.  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ Laboratório de Fisiologia Renal, CCS, BL.C, SALA C-012

#### 14.047

EFETO DO ANETOL NA CONTRATILIDADE DO MÚSCULO LISO TRAQUEAL NA EXPOSIÇÃO AGUDA AO PARAQUAT  
Oliveira, D. C.<sup>1</sup>, Silva, L. P. da<sup>1</sup>, Aguiar, L. A.<sup>1</sup>, Macedo, A. S. de<sup>1</sup>, Coelho-de-Souza, A. N.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>2</sup>, Cavalcante, F. S. Á.<sup>1</sup>, Leal-Cardoso, J. II.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Superior de Ciências Biomédicas, ISCB Av. Paranaíba, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza-CE <sup>2</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF CCS - Bloco G - UFRJ - Ilha do Fundão

#### 14.048

EFEITOS PULMONARES DA EXPOSIÇÃO À PAPAINA  
Fernandes, S. F.<sup>1</sup>, Rocha, F. M.<sup>1</sup>, Vieira, J. C.<sup>1</sup>, Faffe, D. S.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ <sup>2</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho- IBCCF, UFRJ Ilha do fundão - Edifício Centro de Ciências da Saúde - Bloco G cep 21941.902

#### 14.049

A FUMACA DE CIGARRO E O LIPOPOLISACARÍDEO INDUZEM ESTRESSE OXIDATIVO NO PLASMA E NOS PULMÕES DE CAMUNDONGOS?  
Lopes, A.A., Bezerra, F. S., Romana-Souza, B., Valença, S. S., Porto, L. C.

Laboratório de Reparo Tecidual - DIE, UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 14.050

DOSES AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE PM2,5 INDUZEM INFLAMAÇÃO PULMONAR E ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS  
Riva, D.R.<sup>1</sup>, Magalhães, C. B.<sup>1</sup>, Laks, D. M.<sup>1</sup>, Selmi, P. B.<sup>1</sup>, Lanças, T.<sup>2</sup>, Mauad, T.<sup>2</sup>, Malm, O.<sup>1</sup>, Saldiva, P. H. N.<sup>2</sup>, Faffe, D. S.<sup>1</sup>, Zin, W. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ, IBCCF/UFRJ Av. Carlos Chagas Filho, s/n - Cidade Universitária- CCS- Sala G2-042 <sup>2</sup> Universidade de São Paulo, USP A. Dr. Arnaldo 455, sala 1145, 1 andar- Cerqueira Cesar

#### 14.051

INOS INHIBITION MODULATES LUNG TISSUE INFLAMMATION VIA OXIDATIVE STRESS PATHWAY ACTIVATION  
Starling, C. M., Prado, C. M., Lanças, T., Leick-Maldonado, E. A., Reis, F. G. dos, Aristoteles, L. R. C. R. B., Dohlnikoff, M., Martins, M. A., Tibério, I. F. L. C.  
Universidade de São Paulo, USP

#### 14.052

EFEITOS DA PREDNISONA SOBRE O SISTEMA MUCOCILIAR DE RATOS  
Oliveira, K. A. de, Nepomuceno, N. A., Soto, S. de F., Siqueira, M. M. Q., Silva, V. F. P. e, Pazetti, R., Jatene, F. B., Fernandes, P. M. P.  
Universidade de São Paulo, USP

#### 14.053

REPERCUSSÕES MORFOFUNCIONAIS E MOLECULARES PULMONARES DA HIPERCAPNIA EM MODELO EXPERIMENTAL DE SÍNDROME DO DESCONFORTO RESPIRATÓRIO AGUDO  
Nardelli, L. M.<sup>1</sup>, Rzezinski,A.<sup>1</sup>, Santiago, V. R.<sup>1</sup>, Silva, J. D.<sup>1</sup>, Maron-Gutierrez, T.<sup>2</sup>, Ornellas, D.<sup>2</sup>, Capelozzi, V.<sup>3</sup>, Morales, M. M.<sup>2</sup>, Baez-Garcia, C. S. N.<sup>1</sup>, Rocco, P. R. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Investigação Pulmonar/ IBCCF/UFRJ, LIP/IBCCF/UFRJ Rio de Janeiro <sup>2</sup> Fisiologia Celular e Molecular / IBCCF/ UFRJ, IBCCF / UFRJ Rio de Janeiro  
<sup>3</sup> Departamento de Patologia da USP, USP São Paulo

### Receptores e Mecanismos de Sinalização

#### 15.025

GPR30: A NOVEL TARGET OF ESTROGEN IN RAT SERTOLI CELLS.  
Royer, C., Lucas, T. F. G., Martins, L. A. M., Siu, E. R., Lazar, M. F. M., Porto, C. S.

Depto. de Farmacologia/Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP Rua 3 de Maio, n°100, 4ºandar, Vila Clementino, São Paulo, SP, CEP 0404420.

#### 15.026

albumin modulates Protein kinases activities in LLC-PK1 CELLS.  
Junior, C. B., Pinheiro, A. A. S., Caruso-Nevés, C.

#### 15.027

ALONGAMENTO CONTÍNUO POTENCIALIZA A EXPRESSÃO GÊNICA DA FOLISTATINA NO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATOS  
Garcia, A. S., Miyabara, E. H., Baptista, I. L., Moriscot, A. S., Aoki, M. S.  
Universidade de São Paulo, USP

#### 15.028

O RECEPTOR DO TIPO 2 PARA BRADICININA PARTICIPA DO CONTROLE DA ATIVIDADE DA CATALASE E SUPEROXIDO DISMUTASE EM CELULAS CARDIACAS DE CAMUNDONGOS.

Mendes, L. J., Duarte, H. L.<sup>1</sup>, Gioda, C. R., Pesquero, J. L., Cruz, J. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG <sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha - Belo Horizonte - MG

#### 15.029

RECEPTORES PURINÉRGICOS EM CÉLULAS SATÉLITES (GLIA) DO GÂNGLIO DA RAIZ DORSAL.

Batista, D. R., Carvalho Souza, J. L., Cassola, A. C.  
Dep. Fisiologia e Biofísica, ICB, USP Av. Prof. Lineu Prestes, 1524 - Butantã

#### 15.030

CROSS-TALK ENTRE AS VIAS DA MEK E DO CA<sup>2+</sup> INTRACELULAR EM CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS MURINAS E HUMANAS PELO ESTÍMULO POR IL-3 E GM-CSF.

Leon, C. M. M. P. de, Paredes-Gamero, E. J., Rodrigues, J. S., Ferreira, A. T.  
Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP R.Botticatu,862,2o andar, CEP 4023062, São Paulo-SP

#### 15.031

FFITTO DO T3 NA RFDIÇÃO DA COI FST-ROLEMIA É MEDIADO PELO TRSS E NÃO DEPENDE DA VIA DE ADMINISTRAÇÃO.  
Nassif, R. J., Ribeiro, M. O., Ribeiro,M.O., Nassif, R.J.

Universidade Presbiteriana Mackenzie, UPM Rua da Consolação, 930 CEP: 01302-907 - Consolação

#### 15.032

LH INDUCED DEPOLARIZATION OF MEMBRANE POTENTIAL IN MICE LEYDIG CELLS MAY FUNCTION AS A TRIGGER FOR THE SUBSEQUENT INTRACELLULAR CALCIUM INCREASE.

Costa, R. R., Aguiar, J. F., Varanda, W. A.  
Universidade de São Paulo, USP

#### 15.033

INIBIDORES DA SÍNTSEDE PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO F PROMOVEM A FOSFORILAÇÃO DAS PROTEÍNA CINASE B/AKT Ser-473 E ERK 1/2  
Garcia, T. A. M.

#### 15.034

PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF A PORE INDUCED BY RISING IN INTRACELLULAR CALCIUM

Faria, R. X., Casabulho, C. M., Reis, R. A. de M., Pons, A. H., Alves, L. A.

<sup>1</sup> Instituto Oswaldo Cruz, IOC Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Pav. 108, sala 039

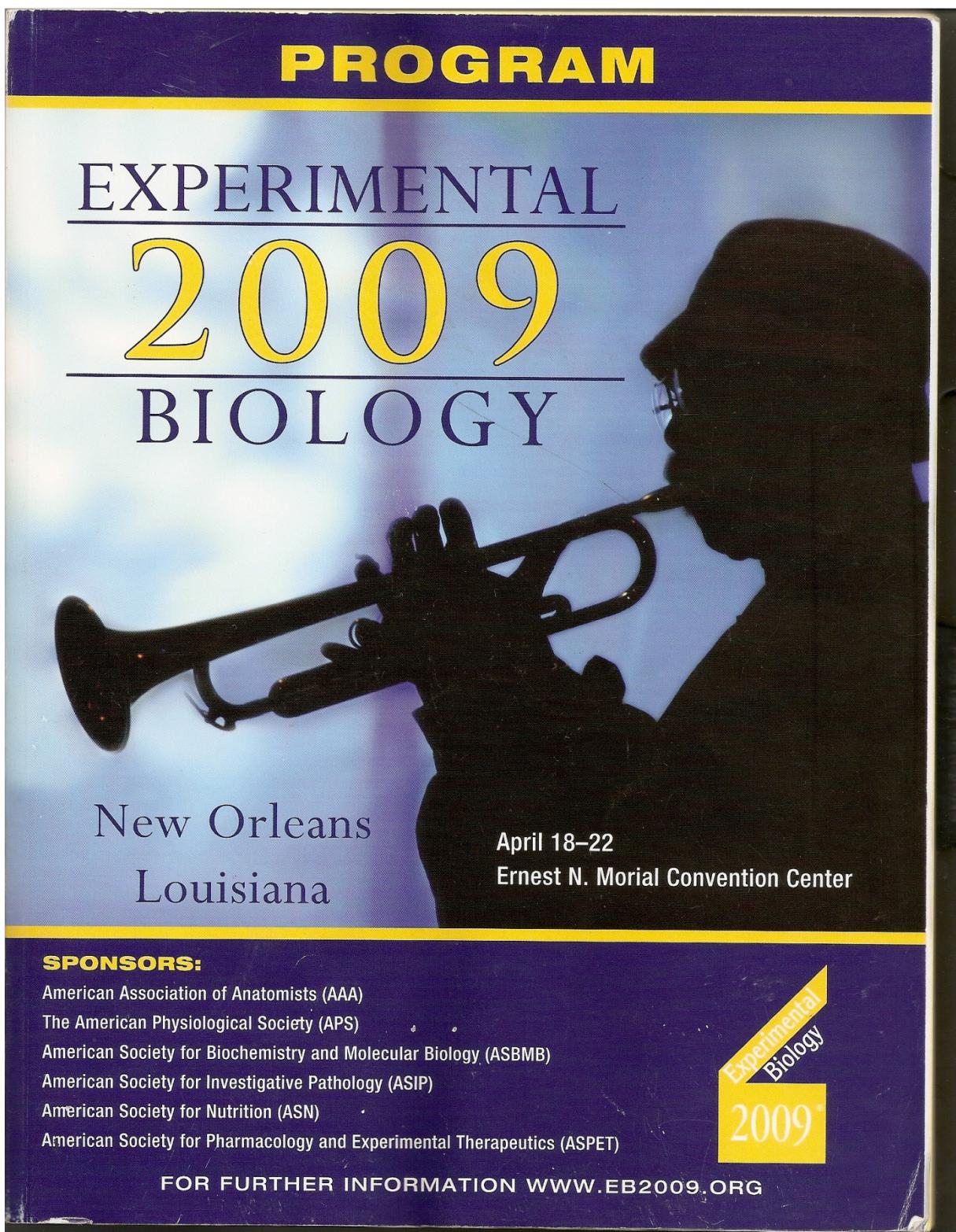
<sup>2</sup> Instituto Oswaldo Cruz, IOC Av. Brasil, 4365 - Pav Carlos Chagas, sala 11 <sup>3</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, IBCCF Avenida Carlos Chagas Filho, n°373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Blo

#### 15.035

PAPEL DO RECEPTOR B1 PARA CININAS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO CORAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Duarte, H. L., Santos, S. L.<sup>1</sup>, Fernandes, V. A., Souza, D. T. de, Silva, L. F. da, Alvarenga, G. M., Guatimosim, S., Pesquero, J. L., Pesquero, J. B., Cruz, J. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Fundação Helena Antipoff, FHA <sup>2</sup> Univer-

**8.5 - APÊNDICE E**

## PATHOLOGY

## 571. INFLAMMATION, IMMUNITY AND IMMUNOPATHOLOGY

Poster

SUN. 7:30 AM—CONVENTION CENTER, HALL ABC

Presentation time: 11:30 AM-1:30 PM

## Inflammation

B319 571.1 Nitric oxide and cytokine release induced by goat milk nutraceutical application to human immune response modulation. E. Jirillo, A. Cianciulli, F. Jirillo, A. G. D'Alessandro, T. Magrone, G. Martemucci, M. A. Panaro. Univ. of Bari and IRCCS De Bellis, Castellana Grotte, Italy.

B320 571.2 Anti-inflammatory effect of rosmarinic acid on a model of carrageenan-induced paw edema. J. P. Roche, B. M. Sepedes, M. Eduardo-Figueira, R. Bronze, C. Duarte, T. Serra, B. Silva-Lima, H. Mota-Filipe. Fac. of Pharm., Univ. of Lisbon and IBET, Oeiras, Portugal.

B321 571.3 RIP1 and inflammation mediated septic liver injury. S. McNeal, C-S. Chung, A. Ayala. Brown Univ. and Rhode Island Hosp.

B322 571.4 TNF- $\alpha$  induces VCAM-1 expression via PKC $\delta$ /Sro/EGFR transactivation linking to AP-1 and NF- $\kappa$ B in human renal mesangial cells. C-H. Chou, H-L. Hsieh, C-M. Yang. Chang Gung Univ. and Chang Gung Inst. of Technol., Taiwan.

B323 571.5 TNF- $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 expression in human synoviocytes. C-H. Chen, C-M. Yang. Chang Gung Univ., Taiwan.

B324 571.6 Comparison of histochemical methods for murine eosinophil detection in a RSV vaccine-enhanced inflammation model. M. A. Griffin, E. M. Castillo, S. M. Varga, D. K. Meyerholz. Univ. of Iowa.

B325 571.7 Immunological effects of polyphenols contained in fermented grape marc on human healthy peripheral blood cells. E. Jirillo, G. Marzulli, F. Jirillo, A. Tafaro, M. Kaneko, Y. Kumazawa, L. Amati. Natl. Inst. of Gastroenterol., Castellana Grotte (Bari), Fac. of Med., Univ. of Bari, Italy and Sch. of Sci., Kitasato Univ., Japan.

B326 571.8 Effects of Korean chaga mushroom extract on stimulation of immune response in mouse splenocytes. E. Batjargal, H. Hong, J. C. An, S-G. Hwang. Hankyong Natl. Univ. and Sangmyung Univ., Republic of Korea.

B327 571.9 New data on human cytokine changes with age. R. I. Henkin, L. Schmidt, I. Velicu. Taste and Smell Clin., Washington, DC.

B328 571.10 B cells compartment in centenarian offspring and old people. M. Bulati, G. Colonna-Romano, S. Vitello, M. Pellicano, S. Vasto, G. Candore, C. Caruso. Univ. of Palermo and Geriat. Care, ASL6, Palermo.

## 572. PULMONARY PATHOLOGY

Poster

SUN. 7:30 AM—CONVENTION CENTER, HALL ABC

Presentation time: 11:30 AM-1:30 PM

## Pulmonary Pathology

B329 572.1 NPAS3 promotes lung development by upregulating FGF signaling. M. E. Sunday, S. Zhou, S. Degan, E. Potts, W. M. Foster. Duke Univ. Med. Ctr.

## SUNDAY

B330 572.2 Ontogeny of mRNA expression of pulmonary innate immune factors. R. J. Derscheid, J. Gallup, P. B. McCray, Jr., M. R. Ackermann. Iowa State Univ. and Univ. of Iowa Carver Col. of Med.

B331 572.3 High fat diet induces airway remodeling in ApoE deficient mice: an association with an increase in circulatory and airway inflammatory factors. A. S. Naura, C. Hans, M. Zerfaoui, Y. Errami, J. Ju, H. Kim, K. Matrougui, H. A. Boulares. LSU Hlth. Sci. Ctr., New Orleans and Tulane Univ. Med. Ctr.

B332 572.4 Modulation of reactive oxygen species and MMP9 by Rac1 prevents asbestos-induced pulmonary fibrosis. S. Murthy, L. Tephly, S. Perry, A. Adamcakova-Dodd, R. Keller, N. Metwalli, Y. Wang, M. Glogauer, P. Thorne, A. B. Carter. Univ. of Iowa and Univ. of Toronto.

B333 572.5 Hyperoxia induced a time-dependent lung oxidative stress in BALB/c mice. S. S. Valenca, A. C. Nagato, F. S. Bezerra, A. A. Lopes, T. Santos, M. Lanzetti, L. C. Porto. Rio de Janeiro State Univ.

B334 572.6 Protective effects of the N-(2-mercaptopropionyl)-glycine and N-acetylcysteine on cigarette smoke-induced lung oxidative stress in mice. S. S. Valenca, F. S. Bezerra, K. M. P. Pires, M. Lanzetti, W. A. Zin, L. C. Porto. Rio de Janeiro State Univ. and Fed. Univ. of Rio de Janeiro.

B335 572.7 Dissecting the biological function of NF- $\kappa$ B2p100. L. Yang, H-F. Ding. Univ. of Toledo Hlth. Sci. Ctr. and Med. Col. of Georgia.

B336 572.8 Complex vascular lesions in the lungs of domestic fowl selected for susceptibility to pulmonary arterial hypertension: incidence, histology. R. F. Wideman, K. Hamai, M. Beyona, A. Lorenzoni, D. Cross, D. Rhoads, G. Erl, N. Anthony. Univ. of Arkansas.

B337 572.9 Immunohistochemical examination of complex vascular lesions in the lungs of domestic fowl selected for susceptibility to pulmonary arterial hypertension. K. R. Hamai, R. F. Wideman, D. Cross, D. Rhoads, N. Anthony, G. Erl. Univ. of Arkansas.

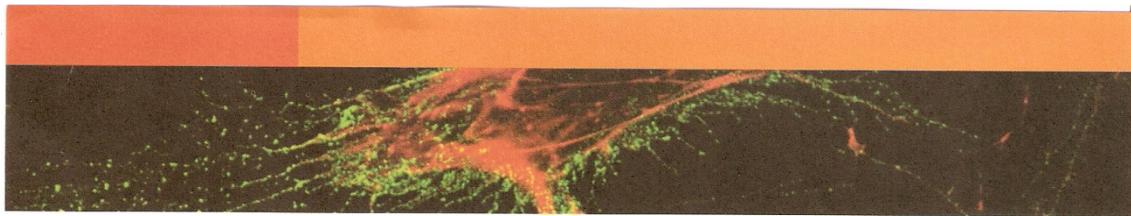
B338 572.10 Asbestos bodies in lung tissue are associated with pathologic features and patient outcome for epithelial but not non-epithelial mesothelioma treated by extrapleural pneumonectomy. W. G. Richards, J. Godleski, M. Kettler, J. Mueller, D. Sugarbaker. Brigham and Women's Hosp.

B339 572.11 MMP activation peptide detection in biological samples as a diagnostic marker of idiopathic pulmonary fibrosis. L. M. Voeghtly, N. Kaminski, T. D. Oury. Univ. of Pittsburgh.

B340 572.12 Anti-inflammatory benefits of an antibiotic via modulation of neutrophil and macrophage function: the example of tularahromycin. C. D. Fischer, J. K. Beatty, D. W. Morck, M. J. Lucas, E. J. Robb, A. G. Buret. Univ. of Calgary, Canada and Pfizer Animal Hlth., Kalamazoo.

B341 572.13 The role of MMP2 in persistent inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. J. Gosselink, S. Hayashi, W. M. Elliott, L. Xing, B. Chan, C. Wright, P. Pare, D. Sin, J. Pierce, R. Pierce, A. Patterson, J. Cooper, J. Hogg. ICAPTURE Ctr., Vancouver, Univ. of British Columbia, Washington Univ. and Univ. of Pennsylvania.

## 8.6 - APÊNDICE F



**19 a 22 de agosto de 2009  
Águas de Lindóia – São Paulo**

### CERTIFICADO

Certificamos que

o resumo 14.021

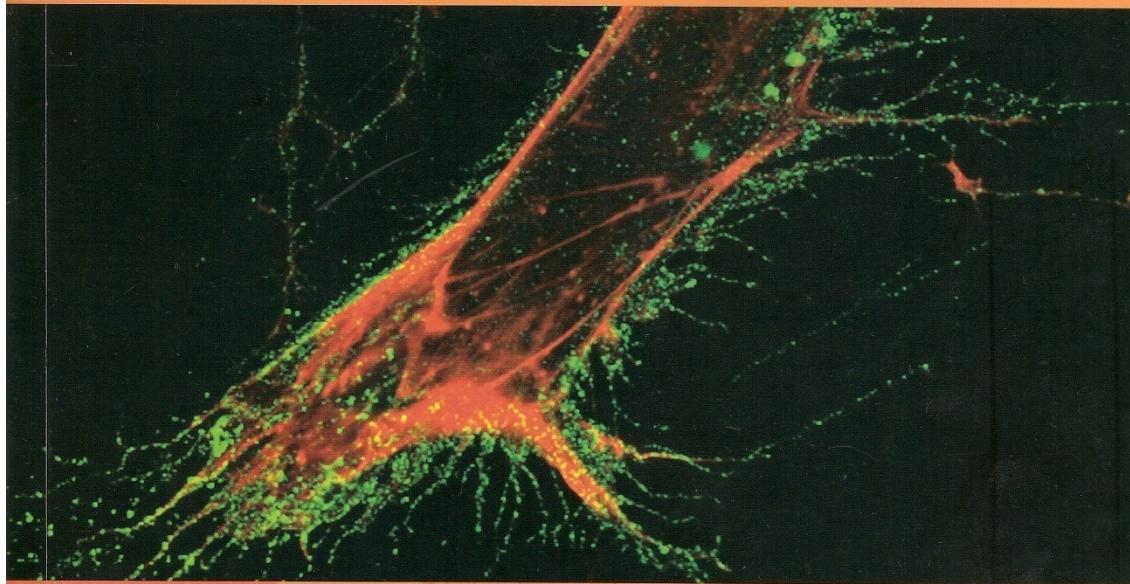
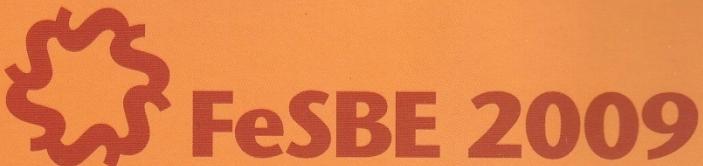
A N-ACETILCISTEÍNA REDUZIU O ESTRESSE OXIDATIVO  
INDUZIDO POR EXTRATO DE FUMAÇA DE CIGARRO EM  
MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE MANEIRA ÓXIDO NÍTRICO  
DEPENDENTE

Fonseca R<sup>1</sup>, Rueff-barroso, C. R.<sup>1</sup>, Bezerra Fs<sup>1,2</sup>, Lanzetti M<sup>1</sup>, Lopes Aa<sup>1</sup>, Ferreira Ts<sup>1</sup>, Albuquerque F<sup>1</sup>, Valença Ss<sup>1</sup>, Porto Lc<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ <sup>2</sup> Faculdade de Fisioterapia, USS foi apresentado sob a forma de painel

na XXIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, realizada na cidade de Águas de Lindóia – SP, de 19 a 22 de agosto de 2009.

  
Comissão Organizadora



**Programa XXIV Reunião Anual**  
Federação de Sociedades de Biologia Experimental  
19 a 22 de agosto | Águas de Lindóia | SP | Brasil

XXXIV Congresso Brasileiro de Biofísica (SBBF)  
XLIV Congresso Brasileiro de Fisiologia (SBFis)  
XXV Congresso Brasileiro de Investigação Clínica (SBIC)  
XXXIII Congresso Bras. de Neurociências e Comportamento (SBNeC)  
VI Congresso Braz. Res. Assoc. in Vision and Ophthalmology (BRAVO)

**Participações**

Soc. Bras. de Biologia Celular (SBBC)  
Soc. Bras. de Biociências Nucleares (SBBN)  
Soc. Bras. de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq)  
Departamento de Endocrinologia Básica da SBEM  
Soc. Bras. de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE)  
Soc. Bras. de Imunologia (SBI)  
Soc. Bras. de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL / COBEA)

**14.011**

PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NA INJÚRIA PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR VENTILAÇÃO MECÂNICA EM CAMUNDONGOS  
Pires KMP<sup>1</sup>, Lanzetti M<sup>1</sup>, Lopes AA<sup>1</sup>, Ferreira TS<sup>1</sup>, Machado MN<sup>2</sup>, Casquillo NV<sup>3</sup>, Zin WA<sup>3</sup>, Porto LC<sup>1</sup>, Valença SS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>2</sup> Departamento de Farmacologia, IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, UFPa Campus Universitário do Guamá - Setor Profissional

**14.012**

EFEITOS ANTIOXIDANTES DO PROPOLIS NA INFILTRAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS

Lopes AA<sup>1</sup>, Ferreira TS<sup>1</sup>, Nesi RT<sup>1</sup>, Alves IN<sup>1</sup>, Bandeira ACB<sup>2,1</sup>, Melo AC<sup>1</sup>, Trajano ETL<sup>1</sup>, Porto LC<sup>1</sup>, Valença SS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>2</sup> Faculdade de Enfermagem, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, R.J.

**14.013**

TERAPIA COM CÉLULAS TRONCO MONONUCLEARES DERIVADAS DE MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE LESÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR PARAQUAT

CARMO, L.G.R.R.<sup>1</sup>, ARAÚJO, I.M.<sup>1</sup>, ABREU, S<sup>1</sup>, ANTUNES, M. A.<sup>1</sup>, MORALES, M. M<sup>2</sup>, ROCCO, P.R.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Investigação Pulmonar, UFRJ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Ilha do Fundão <sup>2</sup> Laboratório de Fisiologia Celular, UFRJ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - Ilha do Fundão

**14.014**

ESTRESSE OXIDATIVO PERIFÉRICO E CAPACIDADE FUNCIONAL EM PACIENTES COM DPOC

Berger, B. R.<sup>1</sup>, Machado, N. C.<sup>1</sup>, Galant, L. H.<sup>1</sup>, Silva, L. C. C.<sup>1</sup>, Monteiro, M. B.<sup>1</sup>, Dias, A. S.<sup>1</sup>, Belló-klein, A.<sup>2</sup>, Souza-rabbió, M. P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pesquisa / Centro Universitário Metodista IPA, IPA Rua Cel. joaquim Pedro Salgado

<sup>2</sup> Fisiologia / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS Rua Sarmento Leite

**14.015**

BUFFERING OF THE ACIDOSIS INDUCED BY HYPERCAPNIA MODULATES THE INFLAMMATORY PROCESS IN LUNG AND DISTAL ORGANS IN EXPERIMENTAL ACUTE LUNG INJURY

Silva, J. D.<sup>1</sup>, Nardelli, L. M.<sup>1</sup>, Rzezinski, A. F.<sup>1</sup>, Carreira junior, H.<sup>2</sup>, Morales, M.<sup>2</sup>, AB1Saber, A.<sup>3</sup>, Teodoro, W.<sup>3</sup>, Capelozzi, V.<sup>3</sup>, Pelosi, P.<sup>4</sup>, Baez-Garcia, C.<sup>1</sup>, Rocco, P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Lab. de Investigação Pulmonar/Universidade Federal do RJ, LIP - UFRJ Inst. Biofísica Carlos Chagas Filho - RJ - BR<sup>2</sup> Lab. Biologia Celular e Molecular/UFRJ, IBCM - UFRJ Inst. Biofísica Carlos Chagas Filho - RJ - BR<sup>3</sup> Departamento de Patologia, USP São Paulo - SP - BR<sup>4</sup> Departamento de Ambiente, Saúde e Segurança/Univers Insubria, Insubria Insubria - Varese - Itália

**14.016**

EFEITOS DO EXTRATO DE AÇAI SOBRE A INFILTRAÇÃO PULMONAR AGUDA INDUZIDA POR FUMAÇA DE CIGARRO

Ferreira TS<sup>1</sup>, Lopes AA<sup>1</sup>, Nesi RT<sup>1</sup>, Trajano ETL<sup>1</sup>, Soares-de-Moura R<sup>2</sup>, Resende AC<sup>2</sup>,

Sousa PJ<sup>3</sup>, Valença SS<sup>1</sup>, Porto LC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>2</sup> Departamento de Farmacologia, IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>3</sup> Departamento de Farmácia, UFPa Campus Universitário do Guamá - Setor Profissional

**14.017**

EFEITOS RESPIRATÓRIOS DA TERAPIA COM LASSBIO596 EM MODELO DE LESÃO PULMONAR AGUDA DE ETIOLOGIA PULMONAR E EXTRAPULMONAR

Fujisaki, L., Nascimento, I., Cruz, F., Silva, J.D., Lima, LM., Barreiro, L.J., Rocco, PR.

Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Ilha do Governador - RJ

**14.018**

IMPACTO DA OBESIDADE NO REMODELAMENTO DA VIA ÁREA E PARÉNQUIMA PULMONAR EM MODELO MURINO DE INFILTRAÇÃO ALÉRGICA CRÔNICA

Saraiva SA<sup>1</sup>, Silva AL<sup>1</sup>, Abreu S<sup>1</sup>, Rez CSO<sup>1</sup>, Silva JD<sup>1</sup>, Xisto DG<sup>1</sup>, Silva PL<sup>1</sup>, Ferreira TPT<sup>1</sup>, Mauad T<sup>2</sup>, Rocco PRM<sup>1</sup>, Martins MA<sup>3</sup>, Capelozzi VL<sup>2</sup>, Silva PMR<sup>3</sup>

<sup>1</sup> IBCCF - Lab. de Investigação Pulmonar, UFRJ Av. Thompson, s/nº <sup>2</sup> Dep. de Patologia, USP Av. Doutor Arnaldo, 455 <sup>3</sup> Lab. de Farmacodinâmica, FIOCRUZ Av. Brasil, 4365

**14.019**

RESPIRATORY EFFECTS OF GLUTAMINE THERAPY IN SEPTIC UNDERNOURISHED RATS OLIVEIRA G.P., SILVA J.D., ARAUJO C.C., ROCCO P.R.M. 1 LABORATORY OF PULMONARY INVESTIGATION, IBCCF/ UFRJ, BRAZIL

Oliveira, GP, Silva, JD, Araújo, CC, Rocco, PRM

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/ UFRJ, IBCCF/UFRJ AV. Carlos Chagas Filho, Edifício CCS, Bloco G, Sala 014.- Ilha do Fundão

**14.020**

HYPEROXIA-INDUCED REDOX IMBALANCE AND DAMAGE IN THE LIVER AND BRAIN Nagato AC<sup>1</sup>, Lanzetti M<sup>1</sup>, Lopes AA<sup>1</sup>, Ferreira TS<sup>1</sup>, Bezerra FS<sup>1,2</sup>, Silva MAS<sup>2,1</sup>, Alves IN<sup>1</sup>, Trajano ETL<sup>1</sup>, Porto LC<sup>1</sup>, Valença SS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>2</sup> Faculdade de Fisioterapia, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, R.J.

**14.021**

AN-ACETILCISTEÍNA REDUZIU O ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR EXTRATO DE FUMAÇA DE CIGARRO EM MACRÓFAGOS ALVEOLARES DE MANEIRA ÓXIDO NÍTRICO DEPENDENTE

Forseca R<sup>1</sup>, Rueff-Berroso, C.R.<sup>1</sup>, Bezerra FS<sup>1,2</sup>, Lanzetti M<sup>1</sup>, Lopes AA<sup>1</sup>, Ferreira TS<sup>1</sup>, Albuquerque F<sup>1</sup>, Valença SS<sup>1</sup>, Porto LC<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Reparo Tecidual, DHE/IBRAG/UERJ Av. Prof. Manuel de Abreu, 444, R.J.<sup>2</sup> Faculdade de Fisioterapia, USS Av. Exp. Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Vassouras, R.J.

**Receptores e Mecanismos de sinalização****15.020**

EFFECTS OF GAP JUNCTION BLOCKERS ON THE P2X7 RECEPTOR AND ASSOCIATED PORC.

Alberto, A.V.P.<sup>1</sup>, Faria, R.X.<sup>1</sup>, Froes, M.M.<sup>2</sup>, Alves, L.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Oswaldo Cruz, IOC Av. Brasil 4365 <sup>2</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ Av. Brigadeiro Trompowsky

**15.021**

CARACTERIZAÇÃO POR AUTORADIORAGRAFA DE UM RECEPTOR DE MELATONINA EMBRIONÁRIO

Lima, H.C.L., Batista Jr., E.S., Sampaio, L.F.S.

Instituto de Ciências Biológicas/UFPa,

ICB/UFPa Av. Augusto Corrêa n. 1 CEP:

66075900

**15.022**

A ROLE FOR NON-MUSCLE MYOSIN II AND ITS LIGHT CHAIN PHOSPHATASE DURING PIGMENT AGGREGATION IN RED OVARIAN CHROMATOPHORES OF MACROBRACHIUM OLIFERSI (DECAPOD).

Milograna, S.R., McNamara, J.C.

Biologia, FFCLRP, USP Ribeirão Preto

**15.023**

O EFEITO DA OBESIDADE INDUZIDA POR MSG SOBRE A RESPOSTA COLINÉGICA DAS CÉLULAS CROMAFINS DA MEDULA ADRENAL DE RATOS

Andreazzi, A.E.<sup>1</sup>, Chaves, A.S.<sup>2</sup>, Goulart, E.<sup>2</sup>, Silva, S.A.<sup>2</sup>, Júnior, L.C.C.<sup>2</sup>, Garcia, R.M.G.<sup>2</sup>, Matiâlis, P.C.F.

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Celular e

Genética, UEM Avenida Colombo 5790

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, UFJF Rua José Lourenço Kelmer-Campus Universitário

**15.024**

LIVER FIBROGENESIS IN KININ B1-RECEPTOR KNOCKOUT MICE

Maxeniac-Silva, K<sup>2</sup>, Pesquero, JB<sup>2</sup>, Kouyoumdjian, M<sup>4</sup>, Borges, DR<sup>2</sup>, Nagarka, MR<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biociências, UNIFESP Av Ana Costa, 95

<sup>2</sup> Medicina, UNIFESP Rua Pedro de Toledo,

/81

<sup>3</sup> Biofísica, UNIFESP Rua Botucatu,

,862 - 7o andar <sup>4</sup> Bioquímica, UNIFESP Rua Botucatu, 862 - Ed Leal Prado

**15.025**

DISTINÇÃO DA SINALIZAÇÃO INDUZIDA POR M-CSF E G-CSF EM CULTURA DE MEDULA ÓSSEA DE LONGA DURAÇÃO

Barbosa, C.M.V., Nogueira, A., Paredes-

Camerlo, E.J., Ferreira, A.T.

Departamento de Biofísica, UNIFESP/EPM

Rua Botucatu, nº 862 - São Paulo

**15.026**

EXPRESSION OF ANDROGEN AND ESTROGEN RECEPTORS IN IMMATURE AND MATURE SERTOLI CELLS FROM RATS.

Royer, C., Lucas, T. F. G., Lázari, M. F. M.,

Porto, C. S.

Depto. Farmacologia/Universidade Federal

de São Paulo, UNIFESP R. 3 de Maio, nº100,

4º andar, Vila Clementino, São Paulo, SP,

CEP 04044020

**15.027**

RENAL EFFECTS OF ANGIOTENSIN II IS MODULATED BY 17B-ESTRADIOL.

Vives, D., Corrêa da Costa V.M., Caruso-

-Neves C.

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,

IBCCF CCS

**15.028**

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ERK1 E 2 NA MEDULA ADRENAL DE RATOS MSG

Goulart, E., Chaves, A. S., Júnior, L. C. C.,

Carvalho, R. V. H., Andreazzi, A. E., Garcia,

R. M. G., Silva, S. A.

Departamento de Biologia - Instituto de

Ciências Biológicas, UFJF - ICB Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário

- São Pedro CEP: 36036-330

## 8.7 - APÊNDICE G: ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO

Environmental Research 108 (2008) 199–204



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research  
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)



### Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide<sup>☆</sup>

Samuel Santos Valenca<sup>a,1</sup>, Frank Silva Bezerra<sup>a,1</sup>, Alan Aguiar Lopes<sup>a</sup>, Bruna Romana-Souza<sup>a</sup>, Moisés Clemente Marinho Cavalcante<sup>b</sup>, Aline Brando Lima<sup>b</sup>, Vera Lúcia Gonçalves Koatz<sup>b,†</sup>, Luís Cristóvão Porto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Tissue and Repair Laboratory, Department of Histology and Embryology, Rio de Janeiro State University, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Medical Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 12 November 2007  
Received in revised form  
2 July 2008

Accepted 7 July 2008

Available online 21 August 2008

##### Keywords:

Cigarette smoke  
Lipopolysaccharide  
Catalase  
Superoxide dismutase  
Glutathione peroxidase  
TBARS

#### ABSTRACT

Short-term exposure to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS) leads to acute lung inflammation through oxidant–antioxidant imbalance. We studied the response in mice exposed to smoke or LPS during five consecutive days, as measured by superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) activities, as well as lipid peroxidation and nitric oxide levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates, and plasma. Control mice were exposed to ambient air. Exposure to CS or LPS led to a similar influx of alveolar macrophages and neutrophils into the BALF; however, hydroxyproline levels were increased only in the CS group ( $p < 0.001$ ); SOD activity was increased in the BALF ( $p < 0.001$ ) and lung homogenates ( $p < 0.05$ ) of the CS group but was decreased in the BALF ( $p < 0.05$ ), lung homogenates ( $p < 0.05$ ) and plasma ( $p < 0.01$ ) of the LPS group. CAT activity was increased in the BALF ( $p < 0.01$ ), lung homogenates ( $p < 0.001$ ) and plasma ( $p < 0.05$ ) of the CS group but decreased in the BALF ( $p < 0.001$ ) and plasma ( $p < 0.05$ ) of the LPS group. GPx activity was reduced in the BALF ( $p < 0.01$ ) and plasma ( $p < 0.01$ ) of both the CS and LPS groups. Lipid peroxidation was increased in the BALF ( $p < 0.001$ ) and lung homogenates ( $p < 0.001$ ) of the CS group. Finally, the levels of nitrite were reduced in the CS ( $p < 0.01$ ) and LPS ( $p < 0.001$ ) groups. Our data show that the activity profiles of enzymes contributing to oxidant–antioxidant imbalance in the lungs differ depending on the inflammatory stimulus, and that SOD, CAT and GPx may be useful markers of oxidative stress in acute lung inflammation induced by exposure to CS.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Cigarette smoke (CS) is the major cause of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) in humans, the fifth leading cause of death worldwide and predicted to be the third leading cause by 2020 (Murray and Lopez, 1997). COPD includes chronic bronchitis and emphysema, and is characterized by progressive airflow

limitation and abnormal inflammatory responses in the lung (Tuder et al., 2006). CS contains high concentrations of reactive oxygen species (ROS) (Meng et al., 2006). The major ROS in CS are superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and nitric oxide (NO) (Rahman, 2005). Increased levels of ROS in the airways and lungs following inhalation of CS originate directly from oxidants in the CS and also indirectly from the release of ROS by macrophages and neutrophils infiltrating the lungs. Moreover, airway epithelial cells are another source of ROS, and type-II alveolar epithelial cells can release both  $H_2O_2$  and  $O_2^-$  (Comhair et al., 2000). This excess of ROS disturbs the balance between oxidants and antioxidants, resulting in oxidative stress.

CS strongly affects glutathione metabolism, which is an important antioxidant defense of the lungs (Reddy et al., 2002). Exposure to CS also increases the products of lipid peroxidation, as evidenced by accumulation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)—a marker of oxidative damage—in plasma, bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lungs (van der Vaart et al., 2004; Valenca et al., 2006). However, the results of

<sup>☆</sup> Funding sources: The authors are grateful to the supporting agencies Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação Universitária José Bonifácio (FUB). All procedures performed here were carried out in accordance with conventional guidelines for experimentation with animals and the local committee approved the experimental protocol (061/2006).

\* Corresponding author at: Departamento de Histologia e Embriologia, IBRAG (Centro Biomédico), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Av. 28 de Setembro, No. 87, Rio de Janeiro, CEP 20551-030, Brazil. Fax: +55 21 2587 6808.

E-mail addresses: lporto@uerj.br, lmpporto@terra.com.br (L.C. Porto).

<sup>1</sup> SSV and FSB contributed equally to this work.

† Deceased.

experiments to address the role of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in CS-related COPD and acute lung inflammation (ALI) remain contradictory. Observations made in CS-exposed mice for SOD, CAT or GPx were similar to those obtained in human studies (Domej et al., 2006). We previously showed that supplementation with antioxidants (vitamin C and E) in CS-exposed mice reduced both oxidative damage and the number of inflammatory cells expressing metalloelastase and tumor necrosis factor-alpha, suggesting a possible role of oxidants in ALI induced by CS (Silva Bezerra et al., 2006).

Lipopolysaccharide (LPS) is a component of the gram-negative bacterial cell wall and a potent endotoxin capable of activating innate immunity (Chaby et al., 2005). Acute exposure of experimental animals to LPS via intratracheal instillation or inhalation induces ALI and was associated with the development and/or progression of pulmonary injury similar to that caused by CS (Faffe et al., 2000). LPS has also been detected in cigarettes (~20 µg/cigarette) as well as in mainstream and sidestream tobacco smoke (~0.12–0.2 µg/cigarette; Hasday et al., 1999). The mechanism of LPS action involves the oxidative stress pathway in some diseases such as sepsis-related lung injury (Suntres and Shek, 1996). Previous studies suggest that disorders of oxidant-antioxidant metabolism play an important role in the development of LPS-induced lung injury in animals or humans (Gonzalez et al., 1996; Thimmulappa et al., 2006).

In this study, antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx) of BALF, lung homogenates, and plasma were compared between mice exposed to CS and mice exposed to LPS, the latter being the classical model of lung inflammation. Additionally, in mice exposed to CS we measured TBARS and hydroxyproline, which are markers of oxidative damage and ALI, respectively. We hypothesized that the influx of inflammatory cells would be similar in both models of ALI; however, because of the enormous burden of oxidants in CS compared to LPS, it was also possible that the levels of antioxidant enzymes and TBARS generated could be different between the two treatments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and animals

Thiobarbituric acid, adrenaline, NADPH, trichloroacetic acid, LPS (from *Escherichia coli* lot 55-B5), sulfanilamide, phosphoric acid, naphthylenediamide dihydrochloride, sodium nitrite and perchloric acid were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Chloramine-T, *p*-dimethylbenzaldehyde and hydroxyproline were purchased from Merck KgaA (Darmstadt, Germany). Diff-Quik was purchased from Baxter Dade AG (Dudingen, Switzerland). Bradford assay reagents were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was purchased from Veteq (Duque de Caxias, Brazil). C57BL/6 male mice were purchased from Instituto de Veterinária—Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brazil).

### 2.2. CS or LPS exposure

One group of C57BL6 male mice ( $n = 10$ ) were exposed to smoke from six commercial filtered cigarettes per day for 5 days (CS group) by using a smoking chamber described previously (Silva Bezerra et al., 2006). Briefly, animals were placed in the inhalation chamber (40 cm long, 30 cm wide, and 25 cm high), inside an exhaustion chapel. A cigarette was coupled to a plastic 60-mL syringe so that puffs could be drawn in and subsequently expelled into the exposure chamber. One liter of smoke from one cigarette was aspirated with this syringe (20 puffs of 50 mL), and the puff was immediately injected into the chamber. The animals were maintained in this smoke-air condition ( $\pm 3\%$ ) for 6 min. Then the cover was removed from the inhalation chamber, and by turning on the exhaust fan of the chapel, the smoke was evacuated within 1 min. The mice were then immediately exposed to CS from a second cigarette for 6 min, and such two-cigarette treatments were performed three times per day (morning, noon, and afternoon) resulting in 36 min of cigarette-smoke exposure from six cigarettes.

Total particulate matter in the chamber was 300 mg/m<sup>3</sup>. Immediately after CS exposure, carboxyhemoglobin (COHb) levels were measured using the method

described by Beutler and West (1984). Briefly, 1.2 mL hemolyzing solution (phosphate buffer, pH 6.85, in water, 1:10) is added to 10 µL blood, homogenized and left to stand for 10 min; 100 µL of this solution are pipetted into a test tube containing 2.3 mL reducing solution (25 mg of sodium dithionite in 20 mL of phosphate buffer, pH 6.85, prepared immediately before use), homogenized and left to stand for 10 min. Absorbance at 420 and 432 nm is read using the reducing solution as a reference. Carboxyhemoglobin concentration was obtained by an equation that considered the AR—the ratio of the absorbance values of the solution at 420 and 432 nm considering the factors (reference values) from blood bubbled with 100% carbon monoxide or 100% oxygen. CS-exposed mice had a mean COHb of 9.7 ( $\pm 1.21$  [SEM]) versus air-exposed mice with a mean COHb of 1.5 ( $\pm 0.19$  [SEM]).

A second group of animals inhaled 0.5 mg/ml LPS (3,000,000 EU/mg) dissolved in 2 mL of saline using an inhalation chamber described previously (Faffe et al., 2000), daily for 5 days. Briefly, the inhalation chamber was made with a 1-L blichner funnel adapted with conical glass tubes coupled to a manometer. Mice exposed to ambient air were used as controls ( $n = 10$ ).

### 2.3. Bronchoalveolar lavage fluid (BALF)

The animals were killed by cervical displacement. Blood was collected directly from the right side of the heart with anticoagulant (in a commercial syringe with EDTA, Biolabor Inc, Campinas, Brazil) and centrifuged at 2000g for 10 min. Cell pellets (red and white blood cells) were discarded and plasma was kept in a freezer for later biochemical analyses. Airspaces were washed with buffered saline solution (500 µL) three consecutive times in the lung (final volume 1.2–1.5 mL). The fluid was withdrawn and stored on ice. Total mononuclear and polymorphonuclear cell numbers were determined in a Zi Coulter counter (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA). Differential cell counts were performed on cytopsin preparations (Shandon, Waltham, MA, USA) stained with Diff-Quik. At least 200 cells per BALF sample were counted using standard morphologic criteria. After bronchoalveolar lavage, lungs were immediately homogenized 10% (w/v) in PBS (pH 7.3) and then centrifuged at 3000g for 5 min. Supernatants were kept at -20°C for biochemical analysis.

### 2.4. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) activities

BALF, lung homogenates, and plasma were used to determine SOD, CAT, and GPx activities. SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation as absorbance at 480 nm (Bannister and Calabrese, 1987). CAT activity was measured by the rate of decrease in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at 240 nm (Aebi, 1984). GPx activity was measured by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Flohé and Günzler, 1984). The total protein content in each sample was determined by the method of Bradford (Bradford, 1976).

### 2.5. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction as previously described by Draper et al. (1993). Briefly, the samples from BALF, lung homogenates and plasma were mixed with 1 mL of 10% trichloroacetic acid and 1 mL of 0.67% thiobarbituric acid; subsequently they were heated in a boiling water bath for 30 min. TBARS were determined by the absorbance at 532 nm and were expressed as malondialdehyde equivalents (nm/mg protein).

### 2.6. Nitrite assay

Nitrite levels in lung homogenates were determined by a spectrophotometric method based on the Griess reaction (Green et al., 1982). A total of 100 µL of sample was mixed with 100 µL of Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid and 0.1% naphthylenediamide dihydrochloride in water) and incubated at room temperature for 10 min followed by measurement of the absorbance by a plate reader at a wavelength of 550 nm. Nitrite concentrations in the samples were determined from a standard curve generated by different concentrations of sodium nitrite.

### 2.7. Hydroxyproline assay

The hydroxyproline contents in BALF samples, an index of ALI (Dhami et al., 2000), were determined by a colorimetric method as previously described (Woessner, 1961). Initially, 250 µL of each BALF sample were incubated with 500 µL of 0.05 M chloramine-T for 20 min at room temperature in test tubes. The mixture was then incubated with 500 µL of 3.17 M perchloric acid for 5 min at room temperature. Finally, the mixture was incubated with 500 µL of 20% *p*-dimethylbenzaldehyde for 20 min at 60°C. The color developed by reaction was read spectrophotometrically at 557 nm.

### 2.8. Statistical analysis

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. The number of BALF cells and the activities of SOD, CAT, GPx, TBARS, nitrite and hydroxyproline were compared among the control and CS- and LPS-exposed mice with one-way ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post-test ( $p < 0.05$ ). InStat GraphPad software was used to perform the statistical analyses (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

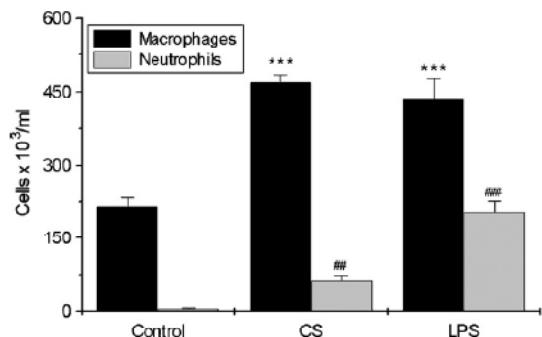
## 3. Results

### 3.1. Effect of CS or LPS exposure on lung inflammation

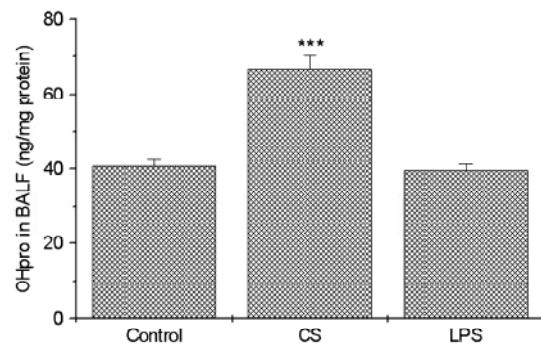
C57BL/6 mice exposed to CS showed an increase in the number of macrophages ( $p < 0.001$ ) and neutrophils ( $p < 0.01$ ) in the BALF after five consecutive days of smoke exposure when compared to the control group (Fig. 1). Exposure to LPS caused a similar increase in the number of macrophages ( $p < 0.001$ ) and a greater increase in the number of neutrophils ( $p < 0.001$ ) compared to exposure to CS (Fig. 1). In assays of the levels of hydroxyproline, which is a marker of collagen breakdown in AI, we found that the hydroxyproline content in the BALF from the CS group was markedly increased ( $p < 0.001$ ) compared to that of the control group (Fig. 2). In contrast, there was no difference in the hydroxyproline contents between the LPS and control groups (Fig. 2).

### 3.2. Effect of CS or LPS exposure on plasma and lung antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPx)

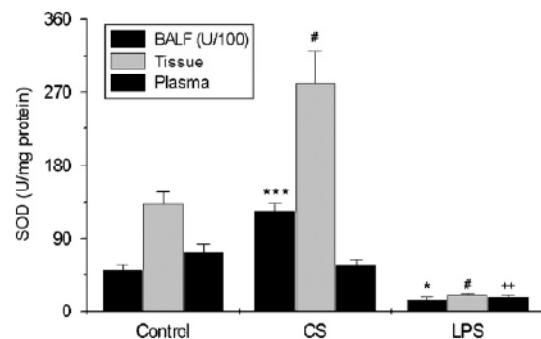
The pulmonary antioxidant defenses include enzymatic and nonenzymatic systems. SOD and CAT are the most important antioxidant enzymes responsible for the oxidative balance in the lungs; these enzymes are generally regulated by oxidative stress. As shown in Fig. 3, the SOD activity was higher in the BALF ( $p < 0.001$ ) and lung homogenates ( $p < 0.05$ ) of the CS group when compared to control group, whereas there was no difference in SOD activity in the plasma. However, in the LPS group, the SOD activity was lower in the BALF ( $p < 0.05$ ), the lung homogenates



**Fig. 1.** Influx of inflammatory cells into the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from mice exposed to cigarette smoke (CS) or LPS (lipopolysaccharide). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS, and analysis of BALF performed as described. At least 200 cells per BALF sample were counted using standard morphological criteria. Results are presented as mean $\pm$ SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference between the CS- or LPS-induced macrophage influx compared to the control group; ## ( $p < 0.01$ ) indicates a significant difference in the level of CS-induced neutrophil influx compared to the control group; ### ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference in the LPS-induced neutrophil influx compared to the control group.



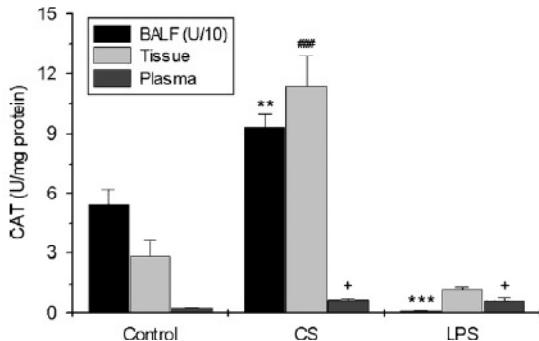
**Fig. 2.** Hydroxyproline amount in lung homogenates from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS. Hydroxyproline (ng/mg protein) was evaluated by a colorimetric assay. Results are presented as mean $\pm$ SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) indicates a significant difference between the CS-exposed group and the control group.



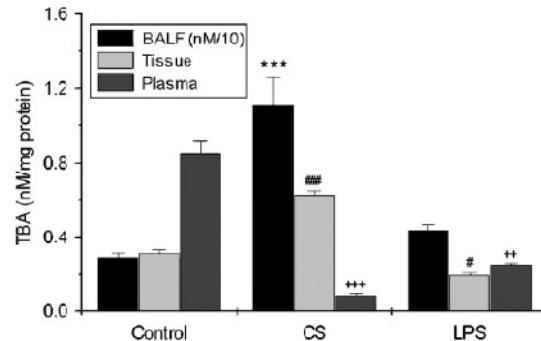
**Fig. 3.** Superoxide dismutase (SOD) activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates (tissue) and plasma from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or to LPS. SOD activity (U/mg protein) was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation. Results are presented as mean $\pm$ SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \* ( $p < 0.05$ ), # ( $p < 0.05$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) indicate the significant differences between the values obtained in BALF, tissue, and plasma, respectively, from mice exposed to LPS compared to the control group; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) and # ( $p < 0.05$ ) indicate significant differences in the values obtained from BALF and from tissue, respectively, of mice exposed to CS compared to the control group. SOD values from BALF were divided by 100.

( $p < 0.05$ ) and the plasma ( $p < 0.05$ ) when compared to the control group (Fig. 3). CAT activity of the CS group was increased in the BALF ( $p < 0.01$ ), lung homogenates ( $p < 0.001$ ) and plasma ( $p < 0.05$ ) when compared to the control group (Fig. 4). In contrast, the CAT activity of the LPS group was reduced in the BALF ( $p < 0.001$ ) and increased in the plasma ( $p < 0.05$ ), while in the lung homogenates there was no difference between the LPS and control groups.

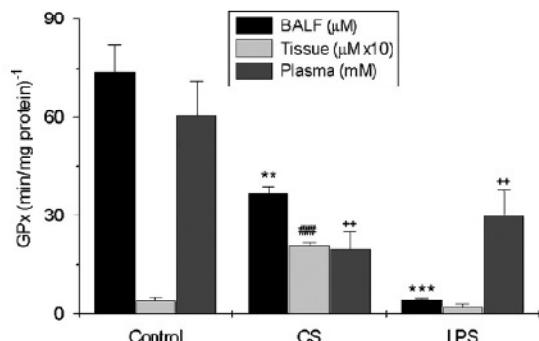
GPx, an antioxidant enzyme that reduces  $H_2O_2$  to  $H_2O$  by oxidizing glutathione, was also measured (Fig. 5). GPx activity of the CS group was reduced in the BALF ( $p < 0.01$ ) and plasma ( $p < 0.01$ ), while in the lung homogenates it was increased ( $p < 0.001$ ) when compared to the control group. Like the CS group, the LPS group showed reduced GPx activity in the BALF



**Fig. 4.** Catalase (CAT) activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates (tissue) and plasma from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS. CAT activity (U/mg protein) was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ), + ( $p < 0.05$ ) indicate the significant differences between the values obtained in BALF, tissue, and plasma, respectively, from mice exposed to CS compared to the control group; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) and + ( $p < 0.05$ ) indicate the significant differences in the values obtained from BALF and plasma, respectively, from mice exposed to LPS compared to the control group. CAT values from BALF were divided by 10.



**Fig. 6.** Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates (tissue), and plasma from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS. TBARS were determined by absorbance at 532 nm and are expressed as malondialdehyde equivalents and shown as nmol/mg protein. results are presented as mean  $\pm$  SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \*\*\* ( $p < 0.001$ ), # ( $p < 0.001$ ), ++ ( $p < 0.01$ ) indicate the significant differences between the values obtained in BALF, tissue, and plasma, respectively, from mice exposed to CS compared to the control group; # ( $p < 0.05$ ) and ++ ( $p < 0.01$ ) indicate the significant differences in the values obtained from tissue and plasma, respectively, from mice exposed to LPS compared to the control group. TBARS values from BALF were divided by 10.

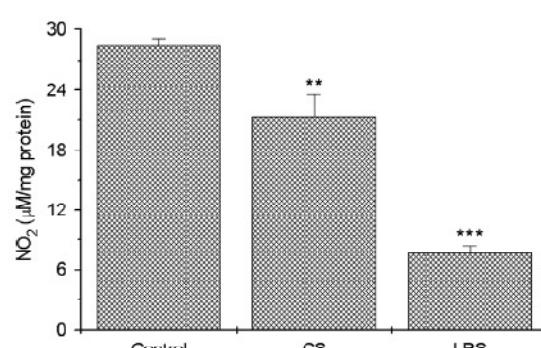


**Fig. 5.** Glutathione peroxidase (GPx) activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenates (tissue) and plasma from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS). Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS. GPx activity is expressed in  $(\text{min}/\text{mg protein})^{-1}$  and was measured by monitoring the oxidation of NADPH at 340 nm in the presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Results are presented as mean  $\pm$  SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \*\* ( $p < 0.01$ ), \*\*\* ( $p < 0.001$ ), + ( $p < 0.05$ ) indicate the significant differences between the values obtained in BALF, tissue, and plasma, respectively, from mice exposed to CS compared to the control group; \*\*\* ( $p < 0.001$ ) and ++ ( $p < 0.01$ ) indicate the values obtained from BALF and plasma, respectively, from mice exposed to LPS compared to the control group. GPx activity values from tissue were multiplied by 10.

( $p < 0.001$ ) and plasma ( $p > 0.01$ ), while in the lung homogenates there was no difference between the LPS and control groups.

### 3.3. Effect of CS or LPS exposure on plasma and lung oxidative damage

TBARS formation was evaluated to obtain an index of oxidative damage resulting from exposure to CS or LPS. As shown in Fig. 6, the CS group had an elevated TBARS content in the BALF ( $p < 0.001$ ) and lung homogenates ( $p < 0.001$ ) when compared to the control group. Interestingly, in the plasma samples, the CS



**Fig. 7.** Nitrite ( $\text{NO}_2$ ) amounts in lung homogenates from mice exposed to cigarette smoke (CS) or lipopolysaccharide (LPS) and compared to the control group. Groups of mice were exposed for 5 days to CS or LPS. Nitrite ( $\mu\text{M}/\text{mg protein}$ ) was determined by a spectrophotometric method based on the Griess reaction. Results are presented as mean  $\pm$  SEM and the significance was analyzed by ANOVA followed by the Student–Newman Keuls post hoc test; \* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) indicate the significant differences between the values obtained from mice exposed to CS and LPS, respectively, compared to the control group.

group had a lower TBARS content when compared to the control group. The LPS group had a lower TBARS content in lung homogenates ( $p < 0.05$ ) and plasma ( $p < 0.01$ ), while in the BALF there was no difference between the LPS and control groups.

### 3.4. Effect of CS or LPS exposure on lung NO

Measurement of NO in biological systems is very difficult because of its short half life. NO in lung tissue is rapidly oxidized to nitrite and/or nitrate by oxygen. Thus, to analyze the involvement of NO in ALI induced by exposure to CS or LPS, the nitrite assay was performed in lung homogenates. The nitrite concentration was lower in both the CS ( $p < 0.01$ ) and LPS ( $p < 0.001$ ) groups when compared to the control group (Fig. 7).

#### 4. Discussion

Oxidative stress is thought to play an important role in the pathogenesis of COPD, not only through direct injurious effects, but also by involvement in the cellular and molecular mechanisms that control lung inflammation (Rahman and Adcock, 2006). Oxidative stress results from an oxidant–antioxidant imbalance: an excess of oxidants and/or a depletion of antioxidants. These include oxidative inactivation of antiproteases, airspace epithelial injury and increased numbers of inflammatory cells such as macrophages and neutrophils (van der Vaart et al., 2004). In this study, we showed for the first time the activity profiles of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx in BALF, lung homogenates, and plasma in mice exposed to CS compared to mice exposed to LPS. Although recruitment of inflammatory cells to the BALF was similar after exposure to CS or LPS, the activities of SOD, CAT and GPx were different to some degree, as were the levels of hydroxyproline and TBARS.

SOD is the primary enzymatic defense in the lungs against the damaging effects of  $O_2^-$ , by converting  $O_2^-$  into  $H_2O_2$ , which is a substrate for CAT and GPx. If SOD activity is inadequate,  $O_2^-$  can interact with NO to form peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) which can react to form the potent  $\cdot OH$  and nitrogen dioxide ( $NO_2$ ) radicals, which are highly damaging to cell proteins, lipids, and DNA (Radi, 2004). Interestingly, we observed an increase of both the SOD and CAT activities in the CS group in contrast to the LPS group. This effect may depend on the time at which the enzymes are analyzed. Moreover, there are three mammalian SOD enzymes: SOD1, the copper–zinc SOD (CuZnSOD), is predominantly located in the cytosol of cells; the mitochondrial manganese SOD (MnSOD), or SOD2, is located in the mitochondria as well as the cytosol of cells; and SOD3, or extracellular SOD (eCSOD), is located mainly outside cells, where it is bound to matrix proteins such as collagen and elastin (Harju et al., 2004). CuZnSOD accounts for approximately 80% of all SOD activity inside the lung (Oury et al., 1996). Therefore, it is possible that the SOD activity assayed here may reflect one or another specific SOD, according to the tissue analyzed. This may directly influence our results, with minor bias for lung homogenates and BAL. We do not know the origin of SOD from plasma.

GPx is another important antioxidant enzyme. The alveolar epithelial lining fluid contains very high amounts of both extracellular GPx and classical GPx, in consonance with a very high amount of glutathione there (Avissar et al., 1996). In COPD patients, the levels of GPx are reduced (Tkacova et al., 2007). In our model of CS exposure, mice with ALI showed reduced GPx activity in both BALF and plasma when compared to the control group. However, GPx activity in the lung homogenates was increased. We believe that the reduced GPx activity of BALF was due to the oxidative radicals generated by inflammatory cells there and from ROS from the CS. On the other hand, our exposure model to CS may reflect an acute effect, while long-term exposure to CS could reduce GPx activity in lung homogenates, such as observed in humans.

Bronchial epithelial cells of rats exposed to CS have increased expression of the antioxidant genes encoding MnSOD and GPx (Gilks et al., 1998). This would suggest the importance of an adaptive antioxidant gene response against the injurious effects of CS. Enhanced activity of antioxidant enzymes such as SOD and CAT in smokers has also been reported (Yildiz et al., 2002). However, Kondo et al. (1994) and coworkers found that increased  $O_2^-$  generation by alveolar macrophages in elderly smokers was associated with decreased antioxidant enzyme activities, when compared to nonsmokers. In another study, circulating red blood cells from cigarette smokers were found to contain increased levels of SOD and CAT, and, despite similar levels of GPx activity,

such erythrocytes were better able to protect endothelial cells from the effects of  $H_2O_2$ , when compared to red blood cells from nonsmokers (Toth et al., 1986).

Through oxidative stress, lipid peroxidation products can activate signaling mechanisms to enhance airway inflammation (Rahman and Adcock, 2006). Polyunsaturated fats and fatty acids in cell membranes are a major target for free radical attack, resulting in lipid peroxidation, a process that may continue as a chain reaction to generate peroxides and aldehydes (van der Vaart et al., 2004; Rahman, 2005). The products of lipid peroxidation reactions can be measured in body fluids by TBARS (Diapri et al., 1993). The levels of TBARS in plasma or in BALF were significantly increased in healthy smokers and patients with acute exacerbations of COPD, compared to healthy nonsmokers (Scheffler et al., 1990). The levels of TBARS were also elevated in breath condensate and in the lungs of patients with stable COPD (Nowak et al., 1999). Here, we showed increased levels of TBARS in BALF and lung homogenates from the CS group, but not in the plasma, when compared to the control group. The duration of exposure to CS was probably too short to induce high levels of lipid peroxidation in the plasma. Interestingly, we observed reduced levels of TBARS in lung tissue and plasma from the LPS group when compared to the control, indicating that in the model used, inflammation due to inhalation of LPS is not associated with lipid peroxidation. In contrast, the inflammatory process induced by CS or LPS had a direct effect on NO production. In theory, NO present in smoke should itself be able to act as a vasodilator; however, it is likely that the bioavailability of either endogenously or exogenously produced NO is influenced by other ROS present in smoke, because  $O_2^-$  and NO rapidly combine to form the highly reactive oxidant  $ONOO^-$  (Raij et al., 2001). Kharitonov et al. (1995) and coworkers reported that CS reduced the levels of exhaled NO in active and passive smokers, suggesting that it inhibits NO production. Su et al. (1998) showed that exposure to CS extract irreversibly inhibits the levels of activity, protein and messenger RNA of NO synthase (eNOS) in endothelial cells of the pulmonary artery. Additionally, CS has been shown to cause a reduction in nitrite concentration and iNOS expression in a murine lung epithelial cell line *in vitro* (Hoyt et al., 2003). Taken together, our data suggest that alterations to NO play a role in the ALI induced by exposure to CS or LPS.

In conclusion, we found different activity profiles for the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx following exposure of mice to CS or LPS. Different doses of CS or LPS and durations of exposure have been reported in the literature in the context of oxidative stress, often making it difficult to interpret the results of different studies in a meaningful way. However, our findings obtained after 5 days of exposure by analyzing plasma and lung oxidative stress may explain the sometimes conflicting published data and suggest that SOD, CAT and GPx activities as well as oxidative damage markers may be useful in studying the effects of CS, which are distinct from those produced by LPS.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to graduate students for technical support.

#### References

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Avissar, N., Finkelstein, J.N., Horowitz, S., Willey, J.C., Coy, E., Frampton, M.W., Watkins, R.H., Khullar, P., Xu, Y.L., Cohen, H.J., 1996. Extracellular glutathione peroxidase in human lung epithelial lining fluid and in lung cells. *Am. J. Physiol.* 270, L173–L182.

- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for superoxide dismutase. Methods Biochem. Anal. 32, 279–312.
- Beutler, E., West, C., 1984. Simplified determination of carboxyhemoglobin. Clin. Chem. 30 871–874.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254.
- Chaby, R., Garcia-Verdugo, I., Espinassous, Q., Augusto, L.A., 2005. Interactions between LPS and lung surfactant proteins. J. Endotoxin Res. 11, 181–185.
- Comhair, S.A., Thomassen, M.J., Erzurum, S.C., 2000. Differential induction of extracellular glutathione peroxidase and nitric oxide synthase 2 in airways of healthy individuals exposed to 100% O<sub>2</sub> or cigarette smoke. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 23, 350–354.
- Dhami, R., Gilks, B., Xie, C., Zay, K., Wright, J.L., Churg, A., 2000. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown is mediated by neutrophils and prevented by alpha1-antitrypsin. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 22, 244–252.
- Domej, W., Foldes-Papp, Z., Flogel, E., Haditsch, B., 2006. Chronic obstructive pulmonary disease and oxidative stress. Cur. Pharm. Biotechnol. 7, 117–123.
- Draper, H.H., Squires, E.J., Mahmoodi, H., Wu, J., Agarwal, S., Hadley, M., 1993. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic. Biol. Med. 15, 353–363.
- Faffe, D.S., Seidl, V.R., Chagas, P.S., Goncalves de Moraes, V.L., Capelozzi, V.L., Rocco, P.R., Zin, W.A., 2000. Respiratory effects of lipopolysaccharide-induced inflammatory lung injury in mice. Eur. Respir. J. 15, 85–91.
- Flohe, L., Gunzler, W.A., 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods Enzymol. 105, 114–121.
- Gilks, C.B., Price, K., Wright, J.L., Churg, A., 1998. Antioxidant gene expression in rat lung after exposure to cigarette smoke. Am. J. Pathol. 152, 269–278.
- Gonzalez, P.K., Zhuang, J., Doctrow, S.R., Malfroy, B., Benson, P.F., Menconi, M.J., Fink, M.E., 1996. Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury. Shock 6 (Suppl. 1), S23–S26.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Giogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 126, 131–138.
- Harju, T., Kaarteenaho-Wiik, R., Sirvio, R., Paakkola, P., Crapo, J.D., Oury, T.D., Soini, Y., Kinnula, V.L., 2004. Manganese superoxide dismutase is increased in the airways of smokers' lungs. Eur. Respir. J. 24, 765–771.
- Hasday, J.D., Bascom, R., Costa, J.J., Fitzgerald, T., Dubin, W., 1999. Bacterial endotoxin is an active component of cigarette smoke. Chest 115, 829–835.
- Hoyt, J.C., Robbins, R.A., Habib, M., Springall, D.R., Butterly, L.D., Polak, J.M., Barnes, P.J., 2003. Cigarette smoke decreases inducible nitric oxide synthase in lung epithelial cells. Exp. Lung. Res. 29, 17–28.
- Kharitonov, S.A., Robbins, R.A., Yates, D., Keatings, V., Barnes, P.J., 1995. Acute and chronic effects of cigarette smoking on exhaled nitric oxide. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 152, 609–612.
- Kondo, T., Tagami, S., Yoshioka, A., Nishimura, M., Kawakami, Y., 1994. Current smoking of elderly men reduces antioxidants in alveolar macrophages. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 149, 178–182.
- Meng, Q.R., Gideon, K.M., Harbo, S.J., Renne, R.A., Lee, M.K., Brys, A.M., Jones, R., 2006. Gene expression profiling in lung tissues from mice exposed to cigarette smoke, lipopolysaccharide, or smoke plus lipopolysaccharide by inhalation. Inhal. Toxicol. 18, 555–568.
- Murray, C.J., Lopez, A.D., 1997. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. Lancet 349, 1498–1504.
- Nowak, D., Kasielski, M., Antczak, A., Pietras, T., Bialasiewicz, P., 1999. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. Respir. Med. 93, 389–396.
- Oury, T.D., Day, B.J., Crapo, J.D., 1996. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. Free Radic. Biol. Med. 20, 957–965.
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4003–4008.
- Rahman, I., 2005. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. Treat. Respir. Med. 4, 175–200.
- Rahman, I., Adcock, I.M., 2006. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. Eur. Respir. J. 28, 219–242.
- Raij, L., DeMaster, E.G., Jaimes, E.A., 2001. Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. J. Hypertens. 19, 891–897.
- Reddy, S., Finkelstein, E.I., Wong, P.S., Phung, A., Cross, C.E., van der Vliet, A., 2002. Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. Free Radic. Biol. Med. 33, 490–498.
- Scheffler, E., Huber, L., Frühbis, J., Schulz, I., Ziegler, R., Dresel, H.A., 1990. Alteration of plasma low density lipoprotein from smokers. Atherosclerosis 82, 261–265.
- Silva Bezerra, F., Valenca, S.S., Lanzetti, M., Pimenta, W.A., Castro, P., Gonçalves Koatz, V.L., Porto, L.C., 2006. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. Nutrition 22, 1192–1201.
- Su, Y., Han, W., Giraldo, C., De Li, Y., Block, E.R., 1998. Effect of cigarette smoke extract on nitric oxide synthase in pulmonary artery endothelial cells. Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 19, 819–825.
- Suntrés, Z.E., Shek, P.N., 1996. Treatment of LPS-induced tissue injury: role of liposomal antioxidants. Shock 6 (Suppl. 1), S57–S64.
- Thimmulappa, R.K., Scollnick, C., Traore, K., Yates, M., Trush, M.A., Liby, K.T., Sporn, M.B., Yamamoto, M., Kensler, T.W., Biswas, S., 2006. Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazolidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 351, 883–889.
- Tkacova, R., Kluchova, Z., Joppa, P., Petrasova, D., Molcanova, A., 2007. Systemic inflammation and systemic oxidative stress in patients with acute exacerbations of COPD. Respir. Med.
- Toth, K.M., Berger, E.M., Beehler, C.J., Repine, J.E., 1986. Erythrocytes from cigarette smokers contain more glutathione and catalase and protect endothelial cells from hydrogen peroxide better than do erythrocytes from nonsmokers. Am. Rev. Respir. Dis. 134, 281–284.
- Tuder, R.M., Yoshida, T., Arag, W., Pasqualini, R., Petrache, I., 2006. State of the art. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in emphysema: an evolutionary perspective. Proc. Am. Thorac. Soc. 3, 503–510.
- Valenca, S.S., Castro, P., Pimenta, W.A., Lanzetti, M., Silva, S.V., Barja-Fidalgo, C., Koatz, V.L., Porto, L.C., 2006. Light cigarette smoke-induced emphysema and NFKappaB activation in mouse lung. Int. J. Exp. Pathol. 87, 373–381.
- van der Vaart, H., Postma, D.S., Timens, W., ten Hacken, N.H., 2004. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. Thorax 59, 713–721.
- Woessner Jr., J.F., 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. Arch. Biochem. Biophys. 93, 440–447.
- Yildiz, L., Kayaoglu, N., Aksoy, H., 2002. The changes of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in erythrocytes of active and passive smokers. Clin. Chem. Lab. Med. 40, 612–615.



## Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke

Manuella Lanzetti, R.D.<sup>a</sup>, Frank Silva Bezerra, M.Sc.<sup>a</sup>, Bruna Romana-Souza, M.Sc.<sup>a</sup>,  
Aline Cristina Brando-Lima, Sc.D.<sup>b</sup>, Vera Lúcia Gonçalves Koatz, Ph.D.<sup>b,\*</sup>,  
Luís Cristóvão Porto, Ph.D.<sup>a,\*</sup>, and Samuel Santos Valenca, Ph.D.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Tissue Repair Laboratory, Histology and Embryology Department, Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup> Medical Institute of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Manuscript received August 1, 2007; accepted January 3, 2008.

### Abstract

**Objective:** Short-term cigarette smoke exposure has been associated with acute lung inflammation (ALI) and oxidative damage. We studied mate tea (*Ilex paraguariensis* infusion) as a possible nutritional resource for ALI.

**Methods:** C57BL/6 mice ( $n = 30$ ) were administered with mate tea orally (150 mg/kg, CSMO), mate tea intraperitoneally (150 mg/kg, CSMIP), or the vehicle (CS) and then exposed to cigarette smoke for 5 d (six cigarettes per day). The control group was sham-smoked ( $n = 30$ ). One day after the final exposure, mice were sacrificed. Bronchoalveolar lavages were performed and lungs removed for biochemical (lung homogenates) and histologic analyses.

**Results:** Mate tea reduced the increase of alveolar macrophages and neutrophils in bronchoalveolar lavages (cells  $\times 10^3/\text{mL}$ ) of the CSMO ( $214.3 \pm 21.4$  and  $12.2 \pm 4.9$ ) and CSMIP ( $248.3 \pm 11.1$  and  $12.1 \pm 2.3$ ) groups compared with the CS group ( $425.9 \pm 28.1$  and  $140.5 \pm 20.1$ ). Mate tea reduced lipid peroxidation (the control group was considered 100%) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (picograms per milliliter) in the CSMO group ( $61.3 \pm 11.3$  and  $185.3 \pm 21.8$ ) compared with the CS group ( $150.0 \pm 18.1$  and  $242.3 \pm 13.2$ ). Matrix metalloprotease-9 activity was higher in the CS group and lower in the CSMO group. Oxidative and inflammatory markers in the CSMO group were not different from those in the control group.

**Conclusion:** These data imply a potential antioxidant role for mate tea on ALI. Further studies are needed to determine such mechanisms and to explore its potential as an anti-inflammatory and nutritional resource in lung damaged by cigarette smoke exposure. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

### Keywords:

Acute lung inflammation; Antioxidant; Cigarette smoke; *Ilex paraguariensis*; Inflammatory cells

### Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a serious and increasing public health problem that affects a large proportion of the world population [1]. COPD is characterized by progressive and irreversible deterioration of pulmonary function and can be caused by several risk

factors such as air pollution, poor diet, occupational exposure, and mainly cigarette smoke (CS) [2].

The presence of CS in the lung tissue is responsible for acute lung inflammation (ALI) [3]. CS causes an inflammatory response in the lower respiratory tract characterized by the accumulation of alveolar macrophages and neutrophils [4]. These activated inflammatory cells release a variety of mediators, including proteases, oxidants, and toxic peptides, which can damage lung structures and are believed to be a major cause of tissue destruction [5].

Cigarette smoke contains a large number of oxidants, and it has been hypothesized that many of the adverse effects of smoking may appear as a result of oxidative damage to

This study was supported by FAPERJ, FUJB, CNPq, and UERJ.

\* In memoriam.

\* Corresponding author. Tel.: +55-21-2587-6509; fax: +55-21-2587-6511.

E-mail address: [leporto@uerj.br](mailto:leporto@uerj.br) (L. C. Porto).

critical biological substances [6]. CS exposure increases the amount of alveolar oxidants, not only because the smoke itself contains an expressive number of free radicals but also because it increases the number of inflammatory cells in alveoli, which spontaneously release oxidants [7]. Reactive oxygen species from CS or from inflammatory cells (particularly macrophages and neutrophils) lead to decreased antiprotease defenses [8] and antioxidants [9]. Nevertheless, antioxidants have been reported as protector factors to the lung in CS-exposure models [7].

*Ilex paraguariensis* (IP) is a potential antioxidant, and IP extract contains a high polyphenol concentration and exhibits high free radical scavenging properties [10]. The mate tea, produced from the IP aqueous extracts, is a beverage whose consumption has increased worldwide [11]. Several works have shown different benefits of mate tea consumption linked to its high polyphenol levels [10,12]. Until now there has been no association relating mate tea effects in mouse lung. This study aimed to verify if IP has protective effects against mobilization of inflammatory cells to alveoli, in lipid peroxidation, matrix metalloprotease-9 (MMP-9), and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) activation after ALI caused by CS.

## Materials and methods

### Chemicals and animals

Acrylamide, *n*-butanol, CaCl<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, Coomassie Blue, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide, Dulbecco's Modified Eagle's Medium, gelatin, thiobarbituric acid, sodium dodecylsulfate, Tris-HCl, Triton X-100, thiobarbituric acid, and ZnCl<sub>2</sub> were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). A specific enzyme-linked immunosorbent assay for TNF- $\alpha$  was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Diff-Quik was purchased from Baxter Dade AG (Dudingen, Switzerland). Bradford was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Ethanol and formalin were purchased from Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brazil). C57BL/6 male mice were purchased from Instituto de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (Niterói, RJ, Brazil).

### Preparation of IP aqueous extract

A sample of commercial "Yerba Mate toasted" was purchased from Leão Junior SA (Curitiba, PR, Brazil). Aqueous extract was prepared under similar conditions as those used traditionally, with some modifications. The plant material was ground to a fine powder and 10 g of each sample was boiled with 200 mL of water for 20 min and cooled at room temperature to 40–45°C [11,12]. After filtration, the extract was lyophilized, yielding 1.30 g of aqueous crude extract. For the nutritional experimental procedure, the

freeze-dried sample was dissolved in an amount of distilled water necessary to obtain the required concentration.

### CS exposure

To study the effects of mate tea in CS-exposed mice, 30 8-wk-old C57Bl/6 mice (male) were exposed to six commercial filtered cigarettes, distributed three times per day, for 5 consecutive days by using a smoking chamber described previously [3]. Mice exposed only to ambient air and supplemented with distilled water by oral gavages were used as controls ( $n = 10$ ). CS mice were divided in three groups of 10 animals: 1) exposed mice supplemented with distilled water by oral gavages (CS), 2) exposed mice supplemented with mate tea by oral gavages (CSMO, 150 mg/kg), and 3) exposed mice supplemented with mate tea by intraperitoneal injection (CSMIP, 150 mg/kg). Mate tea was prepared daily with distilled water and was administered 1 h before the first inhalation. The smoke of one cigarette produced 300 mg/m<sup>3</sup> of total particulate matter in the chamber. Mice were kept at 22 ± 2°C in an illumination-controlled room (photoperiod 14-h light and 10-h darkness), fed Purina Chow, and allowed unrestricted access to water. All procedures were carried out in accordance with conventional guidelines for experimentation with animals and the local committee approved the experimental protocol. All experiments were performed twice.

### Tissue processing

Twenty-four hours after the final CS exposure the mice were sacrificed by cervical dislocation and the right ventricle was perfused with saline to remove blood from the lungs. The right lung was ligated and the left lung was inflated by instilling 4% phosphate buffered formalin (pH 7.2) at 25 cmH<sub>2</sub>O pressure for 2 min and then ligated, removed, and weighed. Inflated lungs were fixed for 48 h before embedding in paraffin. Serial 5-μm sagittal sections stained with hematoxylin and eosin were obtained from the left lung for histologic analyses.

### Bronchoalveolar lavage fluid

Airspaces were washed with buffered saline solution (500 μL) three consecutive times in the right lungs (final volume 1.2–1.5 mL). The fluid was withdrawn and stored on ice. Total mononuclear and polymorphonuclear cell numbers were determined in a Zi Coulter counter (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA). Differential cell counts were performed in cytocentrifuge preparations (Shandon, Waltham, MA, USA) stained with Diff-Quik. At least 200 cells per bronchoalveolar lavage (BAL) fluid sample were counted using standard morphologic criteria [13]. After mice were sacrificed, right lungs were immediately homogenized 10% (w/v) in phosphate buffered saline (pH 7.3) and then cen-

trifuged at  $3000 \times g$  for 5 min. Supernatants were stocked in a freezer for posterior biochemical analysis.

#### *Cell metabolic activity*

The method for cell metabolic activity was done according to Putnam et al. [14]. Briefly, MTT (5 mg/mL) in phosphate buffered saline, pH 7.4, was prepared. BAL cells per well ( $2 \times 10^5$ ), from each mouse, were settled into the wells from a plate (1 h at 37°C). Twenty microliters of MTT solution was added to 200  $\mu$ L of Dulbecco's Modified Eagle's Medium in each well and the plate was incubated at 37°C for 3 h. Each well was drained and then 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide was added. The absorbance was measured at 540 nm. MTT levels are presented as percentages of control mice values.

#### *Determination of oxidative damage (thiobarbituric acid-reactive substances)*

The oxidative damage was measured by thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) concentration using a spectrophotometric method. Samples of right lung extracts (250  $\mu$ L) were deproteinized with 500  $\mu$ L of 10% trichloroacetic acid and centrifuged at  $900 \times g$  for 10 min. The supernatant was mixed with 750  $\mu$ L of 0.67% TBA. The mixture was heated for 15 min in boiling water and then cooled. The organic phase containing the pink chromogen was extracted with 750  $\mu$ L of *n*-butanol and absorbance at 535 nm was measured using a Beckman Spectrophotometer (model DU 640; Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). TBARS levels (malondialdehyde equivalents per milligram) are presented as percentages of control mice values [15].

#### *Enzyme-linked immunosorbent assay*

Tumor necrosis factor- $\alpha$  in lung homogenates was quantified with a specific enzyme-linked immunosorbent assay using a rat anti-mouse monoclonal antibody, with a detection limit of 10 pg/mL, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Mouse recombinant TNF- $\alpha$  standard was used in this assay.

#### *Gelatin zymography*

Aliquots of BAL (30  $\mu$ g of protein) were subjected to electrophoresis on a 4% acrylamide stacking gel/8% acrylamide separating gel containing 1 mg/mL of gelatin in the presence of sodium dodecylsulfate under no reducing conditions. After electrophoresis, gels were washed twice with 2.5% Triton X-100, rinsed with water, and incubated at 37°C overnight in 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> · 2(H<sub>2</sub>O), and 2  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 8.4. The gels were stained with 0.25% Coomassie Blue and destained in a solution of 50% ethanol, 10% acetic acid, and 40% distilled water. Gelatinase activities

appeared as clear bands against a blue background. The molecular weight of the gelatinolytic band was estimated using a placental sample (30  $\mu$ g of protein). Enzyme amount was quantified by measuring the intensity of the negative bands using a densitometric analyzer (Scion Image Software, Scion Co., Frederick, MD, USA). Results are expressed as variation of positive control (placenta) [16].

#### *Statistical analysis*

Data are expressed as means  $\pm$  SEMs. Differences among BAL cells and TNF- $\alpha$  were compared among control, CS, CSMO, and CSMIP groups were tested with one-way analysis of variance followed by the Student-Newman-Keuls post test ( $P < 0.05$ ). Differences from cell metabolic activity, TBARS, and gelatin zymography among groups were tested with the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post test ( $P < 0.05$ ). InStat 3.00 for Windows was used to perform the statistical analyses (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

## Results

#### *Histology*

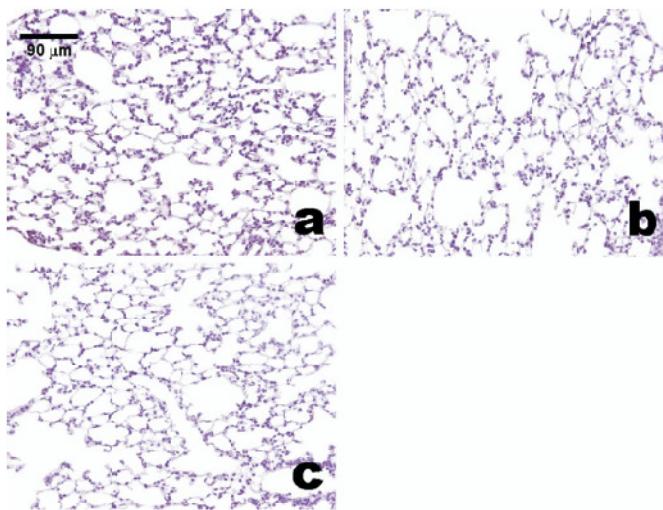
Pulmonary tissue analysis showed that the control group exposed to ambient air presented normal-size air spaces and normal alveolar septa (Fig. 1a). In the CS group the alveolar spaces were similar to those in the control group, but leukocytes were more frequently observed into the alveoli (Fig. 1b). The CSMO group presented the same histology as the control group (Fig. 1c).

#### *Mate tea modulated cell influx*

Mate tea, in an oral supplementation or intraperitoneally administered, reduced the influx of alveolar macrophages and neutrophils in BALs from the CS group compared with the control group (Fig. 2). The alveolar macrophage numbers in BAL fluid (cells  $\times 10^3$ /mL) was elevated ( $P < 0.001$ ) in the CS group ( $425.90 \pm 28.10$ ) compared with the control ( $202.30 \pm 15.30$ ), CSMO ( $214.39 \pm 21.43$ ), and CSMIP ( $248.31 \pm 11.12$ ) groups. The same occurred with the neutrophil number in BAL fluid (cells  $\times 10^3$ /mL), an increase ( $P < 0.001$ ) in the CS group ( $140.50 \pm 20.10$ ) compared with the control ( $9.90 \pm 1.70$ ), CSMO ( $12.20 \pm 4.90$ ), and CSMIP ( $12.10 \pm 2.30$ ) groups. No statistical differences were found between the control group and the CSMO or CSMIP group for alveolar macrophage and neutrophil numbers.

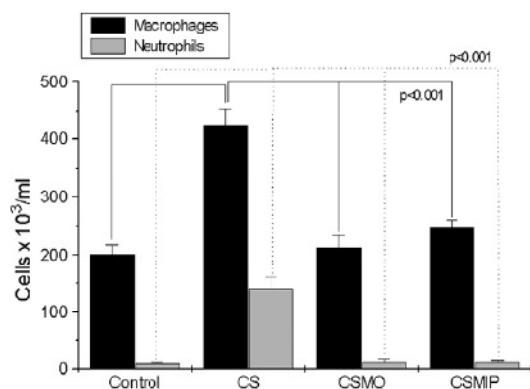
#### *Mate tea reduced cell metabolic activity*

Metabolic activity was measured by the MTT method (Fig. 3). Mate tea reduced ( $P < 0.01$ ) MTT (percentage)



**Fig. 1.** Photomicrographs of lung sections stained with hematoxylin and eosin. (a) In the control group (mice exposed to ambient air), rare leukocytes are observed, with a normal-size airspace and thin alveolar septa. (b) Mice exposed to six cigarettes per day for 5 d show normal-size airspace and thin alveolar septa with an increase of leukocytes. (c) Mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavages show a histologic pattern similar to the control group, with occasional leukocytes.

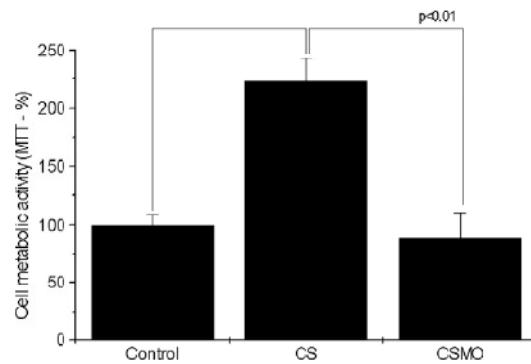
from BAL cells in the CSMO group compared with the CS group. Nevertheless, MTT in the CSMO group was similar to that in the control group. MTT (percentage) levels were  $100 \pm 9$  in the control group,  $223.6 \pm 19$  in the CS group, and  $89.6 \pm 20$  in the CSMO group.



**Fig. 2.** Effects of mate tea supplementation on cellular influx in bronchoalveolar lavage fluid from the control, CS, CSMO, and CSMIP groups. Alveolar macrophages and neutrophils were statistically increased ( $P < 0.001$ ) only in the CS group. At least 200 cells per bronchoalveolar lavage sample were counted using standard morphologic criteria (mean  $\pm$  SEM). Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMIP group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily administration of 150 mg/kg of mate tea by intraperitoneal injection; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage.

#### Mate tea reduced oxidative damage

Oxidative damage was analyzed by the TBARS protocol. Figure 4 shows the effects of supplementation with mate tea by oral gavages on TBARS detection. The reduced ( $P < 0.01$ ) TBARS (percentage) levels in the CSMO group compared with the CS group were not different from the control group ( $P < 0.05$ ). TBARS values were  $100 \pm 3.46\%$  in the



**Fig. 3.** Cellular metabolic activity of the control, CS, and CSMO groups as measured by the MTT assay. A significant increase ( $P < 0.01$ ) in the percentage of MTT from the CS group was observed when compared with the control group. We found no differences between the CSMO and control groups. Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide.

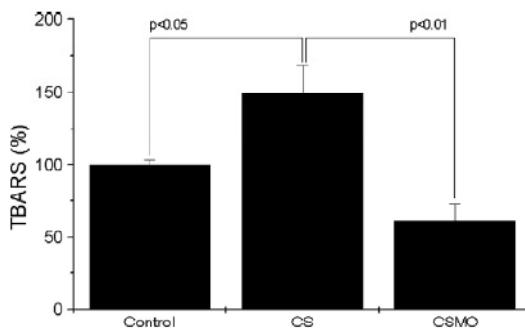


Fig. 4. Effects of mate tea supplementation on TBARS (percentage) in the control, CS, and CSMO groups. A statistical increase from oxidative damage in the CS group was observed in comparison with the control group. We found no differences between the CSMO and control groups. Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances.

control group,  $150 \pm 18.18\%$  in the CS group, and  $61.33 \pm 11.32\%$  in the CSMO group.

#### Mate tea reduced TNF- $\alpha$

Tumor necrosis factor- $\alpha$  was measured in lung samples as an inflammation marker (Fig. 5). Mate tea supplementation reduced TNF- $\alpha$  content in the CSMO group ( $P < 0.05$ ) compared with the CS group. The CSMO group was not different from the control group. TNF  $\alpha$  contents (picograms per milliliter) were  $180.6 \pm 14.4$  in the control group,

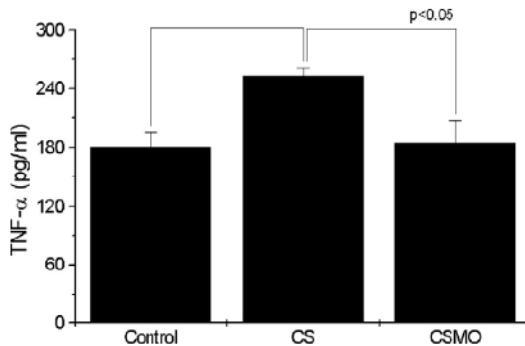


Fig. 5. Effects of mate tea supplementation on TNF- $\alpha$  content in the control, CS, and CSMO groups. There was increase of TNF- $\alpha$  content in the CS group compared with the control group. Mate tea supplementation reduced TNF- $\alpha$  content in the CSMO group compared with the CS group and was similar to the control group. Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .

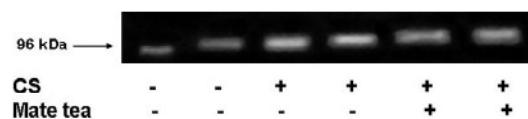


Fig. 6. Effects of mate tea supplementation on gelatin zymography in the control, CS, and CSMO groups. A negative signal indicates ambient air exposure and/or no mate tea supplementation. A positive signal indicates CS exposure and/or mate tea supplementation. Negative bands were reduced in the CSMO compared with the CS group. Negative bands in the CSMO group were more evident than in the control group. The control group presented lower negative bands in comparison with the CS and CSMO groups. Densitometry of negative bands is shown in Fig. 7. Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage.

$253.6 \pm 7.2$  in the CS group, and  $185.3 \pm 21.8$  in the CSMO group.

#### Mate tea reduced MMP-9 activity

The MMP-2 and MMP-9 activities were analyzed by gelatin zymography. MMP-2 activity was not detected in mice samples. However, MMP-9 activity (Fig. 6) and as demonstrated by densitometry in Fig. 7 was decreased by mate tea supplementation ( $P < 0.001$ ) in the CSMO compared with the CS group. Mate tea reduced MMP-9 activity in the CSMO group, but the band was more evident ( $P < 0.01$ ) than in the control group. Densitometry of the bands indicated values of  $107.47 \pm 5.91$  in the control group,  $177.62 \pm 4.07$  in the CS group, and  $130.91 \pm 3.42$  in the CSMO group.

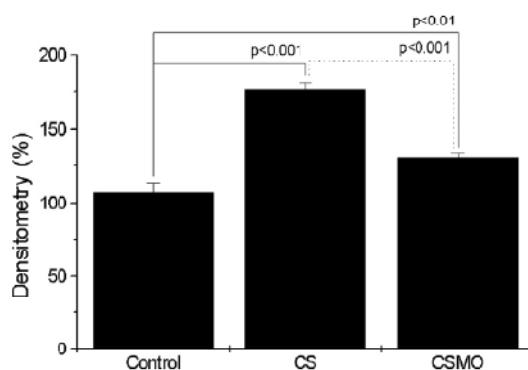


Fig. 7. Densitometry of negative bands from Fig. 6. Cigarette smoke induced an increase in matrix metalloproteinase-9 activity compared with the control and CSMO groups ( $P < 0.001$ ); however, the CSMO group was different from the control group to some degree ( $P < 0.01$ ). Control group, mice exposed to ambient air; CS group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d; CSMO group, mice exposed to six cigarettes per day for 5 d plus daily supplementation of 150 mg/kg of mate tea by oral gavage.

## Discussion

The evidence shows that CS plays a key role for the development of COPD [17]. The presence of more than 4700 chemical compounds, including high concentrations of free radical and other oxidants in CS, increased the importance of the imbalance between oxidants and antioxidants in the pathogenesis of COPD [18].

In our study, the short-term cigarette smoke exposure induced an ALI response in mice, characterized by the influx of inflammatory cells, mainly macrophages and neutrophils in BALs. The effects of mate tea in the lung were observed in the reduction of the influx of inflammatory cells into the alveolar space in both groups treated by an oral or intraperitoneal route. Although there is little knowledge and few reports about the availability of mate by any route of administration, the similar BAL results induced us to focus on IP by an oral route because it is more physiologic and represents the human form of consumption. Therefore, the following assays were realized only with the CSMO group. Cell metabolic activity was analyzed by MTT and we demonstrated a lesser metabolic activity in the CSMO group compared with the CS group.

According to Bixby et al. [11], IP extract is the beverage with the highest polyphenol content [19] when compared with green tea and white and red wines. The aqueous extract was prepared under similar conditions as those used traditionally, with some modifications [11,12], and probably also by other populations in the world, to obtain nutritionally relevant conclusions. Mate tea was used in an attempt to decrease the effects of CS in the lung, especially to diminish the oxidative stress that was indicated by lipid peroxidation, a well-established mechanism of cellular injury [20]. Together with the generation of  $10^{14}$  free radicals per puff in CS, endogenous reactive oxygen species are also produced in the lung in normal cellular processes [21]. Malondialdehyde levels have been used as a convenient index of lipid peroxidation-related oxidative damage from smokers [22].

The TBARS are also markers of lipid peroxidation and were usually associated with other parameters for evaluation of oxidative stress [23]. In this study the CSMO group showed decreased levels of TBARS (similar to the control group) compared with the CS group. Among the reasons stated before, this result could be explained because of an increase in endogenous antioxidant mechanisms such as catalase, glutathione peroxidase, or superoxide dismutase activities [10].

In the exposure models of CS, oxidants and MMPs complement each other in the potential to destroy lung tissue [24]. Nevertheless, MMPs also play a role in regulating inflammation through the generation of cytokines, such as TNF- $\alpha$ , and by blazing trails for cells through tissue barriers [25]. We studied MMP-2 and MMP-9 activities in the CS, CSMO, and control groups. MMP-9, the most elastolytic of the MMPs, is predominantly produced by macrophages but is also found in neutrophil granules,

whereas MMP-2 is produced in smaller quantities by macrophages but is also released by fibroblasts [26]. No MMP-2 activity was detected in any group and the highest MMP-9 activity found in the CS group may be due to the elevated macrophage and neutrophil influxes and in response to inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ . Nevertheless, a recent study connected the role of reactive oxygen species in MMP activation [27]. We observed an increase of MMP-9 activity in the CSMO group compared with the control group ( $P < 0.01$ ), although it was smaller than in the CS group, probably due to less cell inflammatory influx into the airspace, and the oxidative stress provoked by CS, which was attenuated by mate tea antioxidant action.

Alveolar macrophages stimulated by TNF- $\alpha$  may release MMP, suggesting that proinflammatory stimuli might regulate MMP activity in CS-exposure models [25]. Therefore, we expected to find in our exposure model high TNF- $\alpha$  levels and MMP activity. TNF- $\alpha$  expression was increased in the CS group compared with the CSMO and control groups, as was MMP activation. These data suggest that mate tea supplementation in an ALI model can induce an anti-inflammatory profile, because decreases in inflammatory cytokine expression, cell influx, and cellular metabolic activity were observed in the groups treated with mate tea. Corbel et al. [28] proved that TNF- $\alpha$  administration induces airway neutrophilia and increases MMP-9 activity.

## Conclusion

Our data demonstrate that daily administration of mate tea attenuates the initial lung inflammatory response induced by CS in mice. Mate tea reduced oxidative stress, inflammatory cell influx, cellular metabolic activity, and MMP-9 and TNF- $\alpha$  expression. New data are needed to clarify the nutritional antioxidant properties found in this study by analyzing other inflammatory and oxidative markers, and perhaps to investigate a possible nutritional role for mate tea as a potential antioxidant in a long-term CS-exposure model. These results in mice should drive future studies with mate tea extracts as a potential protective resource against CS inflammation in humans.

## References

- [1] Brusselle GG, Bracke KR, Maes T, D'Hulst AI, Moerloose KB, Joos GF, Pauwels RA. Murine models of COPD. *Pulm Pharmacol Ther* 2006;19:155–65.
- [2] Groneberg DA, Chung KF. Models of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2004;5:18.
- [3] Silva Bezerra F, Valenca SS, Lanzetti M, Pimenta WA, Castro P, Goncalves Koatz VL, Porto LC. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. *Nutrition* 2006;22:192–201.
- [4] D'Hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005;26:204–13.

- [5] Lagente V, Manoury B, Nenan S, Le Quement C, Martin-Chouly C, Boichot E. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. *Braz J Med Biol Res* 2005;38:1521–30.
- [6] Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, et al. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:886–90.
- [7] Rahman I, Kilty I. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets* 2006;7:707–20.
- [8] Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* 2003;22:672–88.
- [9] MacNee W. Oxidants and COPD. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005;4:627–41.
- [10] Schinella GR, Troiani G, Davila V, de Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:357–60.
- [11] Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. *Life Sci* 2005;77:345–58.
- [12] Lunceford N, Gugliucci A. *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 2005;76:419–27.
- [13] Castro P, Legora-Machado A, Cardilo-Reis L, Valenca S, Porto LC, Walker C, et al. Inhibition of interleukin-1 $\beta$  reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur J Pharmacol* 2004;498:279–86.
- [14] Putnam KP, Bombici DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro* 2002;16:599–607.
- [15] Valenca SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NF $\kappa$ B activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol* 2006;87:373–81.
- [16] Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000;66:1127–37.
- [17] Siafakas NM, Tzortzaki EG. Few smokers develop COPD. Why? *Respir Med* 2002;96:615–24.
- [18] Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006;28:219–42.
- [19] Chandra S, De Mejia Gonzalez E. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *J Agric Food Chem* 2004;52:3583–9.
- [20] Frei B, Higdon JV. Antioxidant activity of tea polyphenols in vivo: evidence from animal studies. *J Nutr* 2003;133:3275S–84.
- [21] Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109:33–44.
- [22] Altuntas I, Dane S, Gumustekin K. Effects of cigarette smoking on lipid peroxidation. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2002;13:69–72.
- [23] Kim SH, Kim JS, Shin HS, Keen CL. Influence of smoking on markers of oxidative stress and serum mineral concentrations in teenage girls in Korea. *Nutrition* 2003;19:240–3.
- [24] Seagrave J. Oxidative mechanisms in tobacco smoke-induced emphysema. *J Toxicol Environ Health A* 2000;61:69–78.
- [25] Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:492–8.
- [26] Atkinson JJ, Senior RM. Matrix metalloproteinase-9 in lung remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:12–24.
- [27] Manoury B, Nenan S, Leclerc O, Guenon I, Boichot E, Planquois JM, et al. The absence of reactive oxygen species production protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2005;6:11.
- [28] Corbel M, Germain N, Lanchou J, Molet S, Silva PM, Martins MA, et al. The selective phosphodiesterase 4 inhibitor RP 73-401 reduced matrix metalloproteinase 9 activity and transforming growth factor-beta release during acute lung injury in mice: the role of the balance between tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:258–65.



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Nutritional Biochemistry 19 (2008) 604–611

---

**Journal of  
Nutritional  
Biochemistry**


---

## Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair

Samuel Santos Valenca, Frank Silva Bezerra, Bruna Romana-Souza, Rojane Oliveira Paiva,  
Andréa Monte Alto Costa, Luis Cristóvão Porto\*

*Tissue Repair Laboratory, Histology and Embryology Department, Roberto Alcântara Gomes Institute of Biology, State University of Rio de Janeiro, 20550-170 Rio de Janeiro, Brazil*

Received 9 April 2007; received in revised form 4 July 2007; accepted 8 August 2007

---

### Abstract

Cigarette smoke (CS) induces emphysema by tissue destruction through the production of oxidants and metalloproteinases [matrix metalloproteinases (MMPs)]. The possibility of lung repair after emphysema remains unclear. Our aim was to study the effects of vitamin C and E on mouse lung repair evaluated by catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and MMP-9 activities; by the amount of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in lung homogenates; by cell quantification in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid; and by lung histology. Male C57BL/6 mice ( $n=25$ ) were exposed to nine cigarettes per day, 7 days/week, for 60 days in a whole-body exposure chamber. The control group was sham smoked ( $n=10$ ). After 60 days of CS exposure, a group of animals was sacrificed ( $n=5$ ) and the others were divided into two groups: (a) CS<sub>v</sub> ( $n=10$ ) supplemented with saline and olive oil (vehicles) for 60 days and (b) CS<sub>r</sub> ( $n=10$ ) supplemented with vitamins C and E (50 mg/kg/day) for 60 days. These mice were then sacrificed; BAL was performed and the lungs were removed for biochemical and histological analysis. The results demonstrated that CAT activity was decreased in the CS<sub>v</sub> and CS<sub>r</sub> groups compared to the control group. SOD activity was higher in the CS<sub>v</sub> group than in the control and CS<sub>r</sub> groups. The CS<sub>v</sub> group showed a higher neutrophil count in BAL fluid, associated with more TNF- $\alpha$  in lung homogenates, than the control or CS<sub>r</sub> groups. Finally, emphysema in the CS<sub>v</sub> group was associated with fewer collagen and elastic fibers than in the control and CS<sub>r</sub> groups. These results indicate a possible role of vitamins C and E in lung repair after emphysema induced by long-term CS exposure in mice.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Vitamin C; Vitamin E; Emphysema; Oxidative stress; Stereology; Lung repair

---

### 1. Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major and increasing global health problem, which is predicted to become the third commonest cause of death and the fifth commonest cause of disability in the world by 2020 [1,2]. Cigarette smoke (CS)-induced emphysema is one of the major causes of COPD [3,4], but there are several other risk factors, including air pollution (particularly indoor air pollution from burning fuels) [5], poor diet [6] and occupational exposure [7]. Emphysema is characterized by enlargement of alveolar spaces together with destruction of

alveolar walls in the absence of obvious fibrosis [8]. CS causes an inflammatory response in the lower respiratory tract characterized by accumulation of alveolar macrophages associated with a recruitment of fewer neutrophils [9,10]. These activated inflammatory cells release a variety of mediators, including proteases, oxidants and toxic peptides, which can damage lung structures and are believed to be a major cause of the tissue destruction found in emphysema [11].

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a large family of zinc-dependent proteinases that regulate the destruction of extracellular matrix components in lung [12]. There is increasing evidence for a role for MMPs in COPD [4]. The concentration, expression and activity of lung MMP-9 (gelatinase B) are increased in emphysema patients [13,14]. The interest in MMPs has also been heightened by the demonstration that emphysema induced by chronic CS exposure is prevented in MMP-12<sup>-/-</sup> mice [15].

\* Corresponding author. Dept. Histologia e Embriologia/UERJ, Av. Prof. Manoel de Abreu 444, Maracanã, CEP 20550-170 Rio de Janeiro, Brazil. Tel.: +55 21 2587 6509; fax: +55 21 2587 6511.  
E-mail addresses: lkporto@uerj.br, lkporto@terra.com.br (L.C. Porto).

0955-2863/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jnutbio.2007.08.004

Oxidative stress plays a key role in the pathophysiology of COPD and amplifies the inflammatory and destructive process [16,17]. Reactive oxygen species (ROS) from CS or from inflammatory cells (particularly macrophages and neutrophils) result in several damaging effects in COPD [18], including decreased antiprotease defenses [19] and antioxidants. Many of the adverse effects of smoking may result from oxidative damage to critical biological molecules [9]. Epidemiological evidence indicates that reduced dietary intake of antioxidants may be a determinant of COPD [20]; moreover, population surveys have linked a low dietary intake of the antioxidant vitamins C and E to declining lung function [21]. Supplementary treatment with vitamin E (100 mg/kg/day) reduced bacterial colonization in the lower respiratory tract of smoke-treated rats [22]. Moreover, pretreatment (100 mg/kg/day) of either ascorbic acid or  $\alpha$ -tocopherol acetate before smoke inhalation completely prevented single-strand DNA breaks in the lung, stomach and liver [23]. Also,  $\alpha$ -tocopherol (50 mg/kg/day) and ascorbic acid (100 mg/kg/day) protected sperm by inhibiting the induction of ROS generation by Aroclor 1254 [24]. Bezerra et al. [9] showed that inflammatory alveolar cells and levels of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B and MMP-12 in lungs of mice exposed to CS for a short period (5 days) were reduced to control levels by ascorbic acid,  $\alpha$ -tocopherol or, more efficiently, supplementation with both vitamins. However, it remains unclear whether vitamins C and E may play a role in mouse lung repair after emphysema induced by long-term CS exposure.

Because of the enormous burden of COPD and escalating health care costs, there is now renewed interest in the underlying cellular and molecular mechanisms and a search for new treatment strategies. Vitamins C and E are antioxidants and can therefore be expected to change the oxidant–antioxidant imbalance induced in lungs by CS. Our aim was to study the effects of vitamins C and E on mouse lung repair as evaluated by catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities, by quantification of TNF- $\alpha$  and MMP-9 zymography in lung homogenates, by cell quantification in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid and by morphometric and stereological parameters.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents and animals

Thiobarbituric acid, adrenaline, acrylamide, gelatin, sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100, Tris-HCl, CaCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, Coomassie Blue, hematoxylin–eosin, orcein and Sirius red were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for TNF- $\alpha$  was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Diff-Quik was purchased from Baxter Dade AG (Dudingen, Switzerland). Bradford

reagent was purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Formalin, ethanol, acetic acid and hydrogen peroxide were purchased from Veteo (Duque de Caxias, Brazil). C57BL/6 male mice were purchased from Instituto de Veterinária - Universidade Federal Fluminense (Niterói, Brazil).

### 2.2. CS exposure

To study the effects of vitamins C and E on mouse lung repair after emphysema induced by long-term CS exposure, we exposed 25 eight-week-old C57BL/6 mice (male) to nine commercial filtered cigarettes per day for 60 consecutive days using a smoking chamber as described previously [9,25]. Each cigarette smoked produced 300 mg/m<sup>3</sup> total particulate matter in the chamber. After 60 days of CS exposure, five animals were sacrificed, and histological analysis of the lungs showed evidence of emphysema (first part of protocol). The remaining animals were divided into two groups: (a) CSv ( $n=10$ ) supplemented with saline (0.2 ml) and olive oil (0.2 ml) for 60 days (vehicles) and (b) CSR ( $n=10$ ) supplemented with vitamins C (50 mg/kg diluted in 0.2 ml of saline/day) and E (50 mg/kg diluted in 0.2 ml of olive oil/day) for 60 days (second part of protocol). Vehicles or vitamin C and E supplements were administered by oral gavages. Control mice were exposed to ambient air during the first part of the protocol and received only vehicles during the second part. All procedures were carried out in accordance with conventional guidelines for animal experimentation, and the local committee approved the experimental protocol.

### 2.3. Tissue processing

Sixty-one days after the supplementation with vehicle or vitamins C and E commenced, each mouse was sacrificed by cervical displacement and the right ventricle was perfused with saline to remove blood from the lungs. The left lung was clamped to make BAL fluid from the open right lung (see Section 2.4). Afterward, we clamped the right lung, where BAL was performed, and the left lung was inflated by instilling 4% phosphate-buffered formalin (pH 7.2) at 25 cm H<sub>2</sub>O pressure for 2 min and then ligated [26,27]. Then, another clamp was made in the left extrapulmonary bronchus and the lungs were removed, weighed and fixed en bloc, to avoid formalin loss, for 48 h before embedding in paraffin. Serial sagittal 5- $\mu$ m sections were obtained for morphometric and histological analyses. Sections stained with hematoxylin–eosin, orcein and Sirius red were analyzed.

### 2.4. BAL fluid

The lung air spaces were washed with buffered saline solution (500  $\mu$ l) three consecutive times (final volume, 1.2–1.5 ml). The fluid was withdrawn and stored on ice. Total mononuclear and polymorphonuclear cell numbers were determined using a Zi Coulter counter (Beckman Coulter, Carlsbad, CA, USA). Differential cell counts were

performed on cytopsin preparations (Shandon, Waltham, MA, USA) stained with Diff-Quik. At least 200 cells per BAL fluid sample were counted using standard morphological criteria.

After BAL, the right lungs were immediately homogenized at a concentration of 10% (w/v) in PBS (pH 7.3) and then centrifuged at 3000×g for 5 min. Supernatants were stored in the freezer for later biochemical analysis.

#### 2.5. CAT and SOD activities

To determine CAT and SOD activities, we used lung homogenates. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm [28]. SOD activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation as absorbance at 480 nm [29]. The total protein content in the right lung samples was determined by the method of Bradford [30].

#### 2.6. TNF- $\alpha$ quantification

TNF- $\alpha$  in the lung homogenates was quantified by ELISA using a rat antimouse monoclonal antibody with a detection limit of 10 pg/ml according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, UK). A mouse recombinant TNF- $\alpha$  standard was used in this assay.

#### 2.7. MMP-9 gelatin zymography

Aliquots of lung homogenates (30 µg protein) were subjected to electrophoresis on an 4% acrylamide stacking gel/8% acrylamide separating gel containing 1 mg/ml gelatin in the presence of SDS under nonreducing conditions. After electrophoresis, the gels were washed twice with 2.5% Triton X-100, rinsed with water and incubated at 37°C overnight in 50 mM Tris, 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 2 nM ZnCl<sub>2</sub> (pH 8.4). The gels were stained with Coomassie Blue and destained in a solution of 25% ethanol and 10% acetic acid. Gelatinase activity appeared as clear bands against the blue background. The molecular weights of gelatinolytic bands were estimated using a placental sample (30 µg protein). The enzyme was quantified by measuring the intensity of the negative bands densitometrically using Scion Image Software (Scion Co., Frederick, MD, USA). The results are expressed as deviations from the positive control (placenta) [31].

#### 2.8. Morphometry

To assess the extent of lung damage (emphysema), we performed morphometric analysis on hematoxylin–eosin-stained sections. The pulmonary mean linear intercept (MLI), an indicator of air-space size, was calculated for each sample on the basis of 16 random fields observed at a

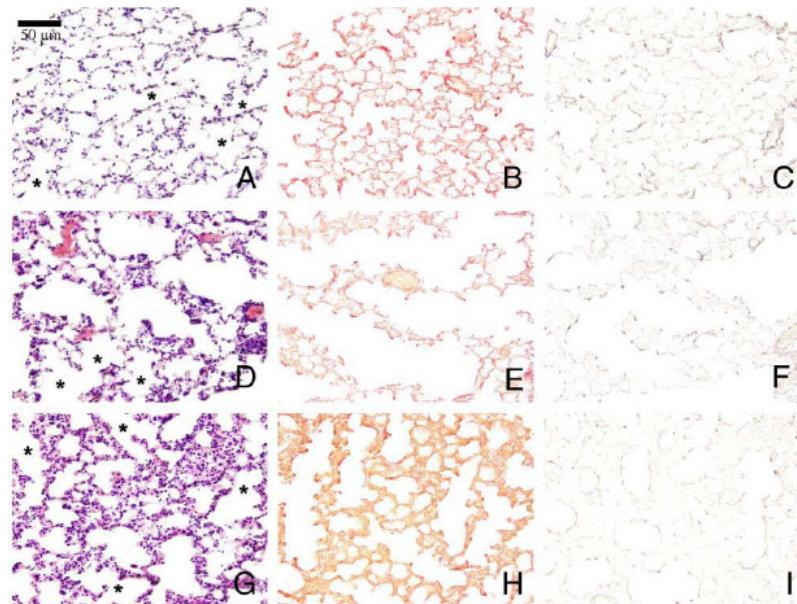


Fig. 1. Lung photomicrographs. (A) The control group lungs were histologically normal, with parenchyma consisting of alveoli connected to alveolar ducts (\*), separated from each other only by thin alveolar septa. (B and C) Collagen and elastic fibers in the alveolar septa were characterized by delicate branching fibers. (D) The lungs of all CSV mice showed emphysematous lesions, areas of alveolar septa disruption and enlarged air spaces among alveolar ducts (\*). (E and F) Collagen and elastic fibers were fragmented and irregular. (G) The lungs of the CS<sup>+</sup> mice were histologically similar to the control group, but it was possible to observe some enlarged alveoli, ducts (\*) and disrupted and thickened alveolar septa. (H and I) No apparent changes in collagen and elastic fibers were observed, despite some difference in arrangement from the control group.

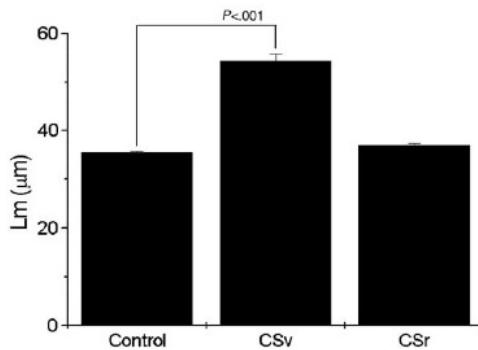


Fig. 2. Air-space sizes in the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There is a 52% increase in Lm for the CSv group compared to the CSr or control groups. Supplementation with vitamins C and E improved lung repair in the CSr group with reduced air-space sizes equivalent to the control group. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.

total magnification of  $\times 200$  using a cross line. The total length of the cross line divided by the number of alveolar walls intersecting the test lines gave the MLI [32].

#### 2.9. Stereology

The volume densities of collagen (Vvcoll) or elastic fibers (Vvel) were determined as previously described [25,33]. Briefly, to obtain uniform and proportionate lung samples, we randomly analyzed 18 fields (6 nonoverlapping fields in each of 3 different sections) using a video microscope (Zeiss-Axioplan — 20 objective lens and JVC color video camera linked to a Sony Trinitron color video monitor; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) and a cycloid test system superimposed on the monitor screen. The reference volume was estimated by point counting using the test point systems (PT). The points hitting the collagen or elastic fibers (PP) were counted to estimate the volume densities (Vv) of these structures (Vv=PP/PT). A total area of  $1.94 \text{ mm}^2$  was analyzed to determine the Vvcoll and Vvel in sections stained with Sirius red and orcein, respectively. Two investigators performed the counting on nonidentified sections.

#### 2.10. Statistical analysis

Data are expressed as means $\pm$ S.E.M. One-way ANOVA was performed followed by the Student–Newman–Keuls posttest ( $P<.05$ ) to test for differences in BAL cells, CAT, SOD, TNF- $\alpha$  and morphometry among the control, CSv and CSr groups of mice. The normality of the data was verified by the Kolmogorov–Smirnov test and Bartlett's test for all groups prior to ANOVA. Kruskal–Wallis was performed followed by Dunn's posttest ( $P<.05$ ) to examine densitometric differences among the three groups in zymography and stereology. We used the GraphPad InStat version 3.00

for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) to perform the statistical analyses.

### 3. Results

#### 3.1. Vitamins C and E improved lung repair after emphysema

Histological changes are illustrated in Fig. 1. The control group lungs were histologically normal, with parenchyma consisting of alveoli connected to alveolar ducts, separated from each other only by thin alveolar septa (Fig. 1A). Collagen and elastic fibers in the alveolar septa were characterized by delicate branching fibers (Fig. 1B and C).

The lungs of all CSv mice showed emphysematous lesions, areas of alveolar septa disruption and enlarged air spaces (Fig. 1D). Collagen and elastic fibers were fragmented and irregular (Fig. 1E and F). The lungs of the CSr mice had a similar histological pattern to the control group, but some alveoli were enlarged and disrupted alveolar septa with many noninflammatory cells were observed (Fig. 1G). No apparent changes in collagen and elastic fibers were observed, despite some degree of disarrangement in comparison to the control group (Fig. 1H and I).

Data from morphometry and stereology confirmed the histological changes. The MLI ( $\mu\text{m}$ ) was  $35.6\pm 0.2$  in the control group,  $54.3\pm 1.4$  in the CSv group and  $36.9\pm 0.6$  in the CSr group (Fig. 2). The volume densities (%) of collagen fibers (Vvcoll) were  $22.8\pm 0.8$  in the control group,  $11.8\pm 0.4$  in the CSv group and  $18.8\pm 1.7$  in the CSr group (Fig. 3). The volume density (%) of elastic fibers (Vvel) was  $15.2\pm 1.3$  in the control group,  $6.7\pm 0.4$  in the CSv group and  $8.5\pm 0.5$  in the CSr group (Fig. 3). The decrease of Vvcoll paralleled the

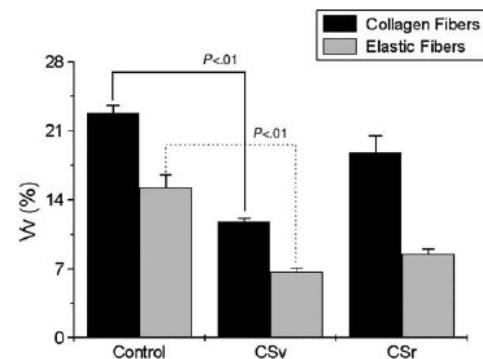


Fig. 3. Volume density of collagen (Vvcoll) and elastic fibers (Vvel) in the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There is a 51% decrease in Vvcoll and a 44% decrease in Vvel in the CSv group compared to the CSr or control groups. Vitamin supplementation stimulated regeneration of collagen and elastic fibers in the CSr group with values equivalent to the control group. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.

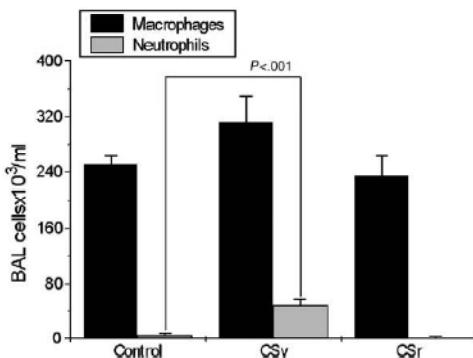


Fig. 4. BAL fluid from the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There were almost 10 $\times$  increases of neutrophils in BAL fluid from the CSv group compared to the CSr group or the control group. No statistically significant differences were observed among the alveolar macrophage numbers in BAL fluid from the three groups. Supplementation with vitamins C and E reduced neutrophil influx into the CSr mouse lungs. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.

decrease in Vvel and corresponded inversely to the increase of MLI in the CSv group.

### 3.2. Vitamins C and E modulated cell influx after emphysema

The alveolar macrophage numbers in BAL fluid ( $\text{cells} \times 10^3/\text{ml}$ ) were  $250.9 \pm 12.8$  in the control group,  $312.5 \pm 38.7$  in the CSv group and  $234.4 \pm 28.8$  in the CSr group. The numbers in the CSv group were higher but not statistically different from those in the CSr and control groups. However, neutrophil numbers were significantly higher in the CSv group ( $P < .001$ ) than in the CSr and control groups (Fig. 4). The neutrophil numbers in BAL fluid ( $\text{cells} \times 10^3/\text{ml}$ ) were  $4.9 \pm 1.9$  in the control group,  $47.8 \pm 9.1$  in the CSv group and  $1.7 \pm 1.1$  in the CSr group.

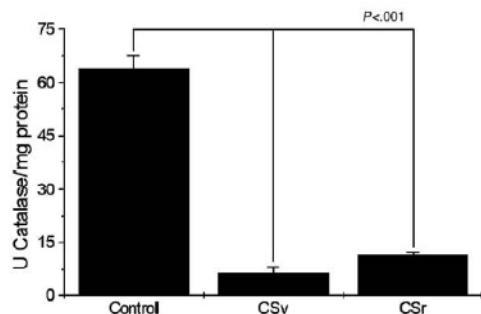


Fig. 5. CAT activity in lung homogenates from the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There is an almost 10 $\times$  reduction of CAT activity in the CSv and CSr groups compared to the control group. Supplementation with vitamins C and E has no effect on CAT activity. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.

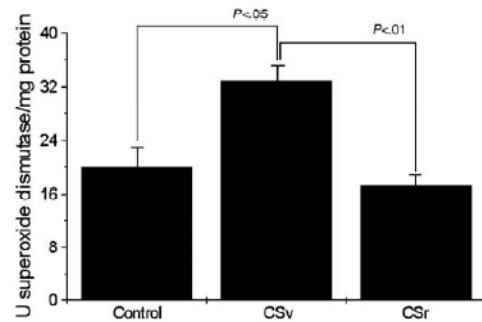


Fig. 6. SOD activity in lung homogenates from the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There is a 64% increase of SOD activity in the CSv group compared to the control group. Supplementation with vitamins C and E reduced SOD activity in the CSr group by 90% compared to the CSv group. No differences were found between the CSr and control groups. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.

### 3.3. Vitamins C and E reduced oxidative stress after emphysema

Oxidative stress was analyzed by CAT and SOD activities (Figs. 5 and 6, respectively). CAT activity was lower in the CSv and CSr groups ( $P < .001$ ) than in the control group:  $64.1 \pm 3.4$  U/mg protein in the control group,  $6.7 \pm 1.3$  U/mg protein in the CSv group and  $11.5 \pm 0.8$  U/mg protein in the CSr group. SOD activity was increased in the CSv group ( $32.9 \pm 2.3$  U/mg protein) compared to both the control group ( $20.0 \pm 2.9$ ,  $P < .05$ ) and the CSr group ( $17.3 \pm 1.5$ ,  $P < .01$ ).

### 3.4. Vitamins C and E reduced TNF- $\alpha$ after emphysema

TNF- $\alpha$  was measured in lung samples as an inflammatory marker. The TNF- $\alpha$  content was higher in the CSv group (Fig. 7) than in the CSr group ( $P < .05$ ) or the control group

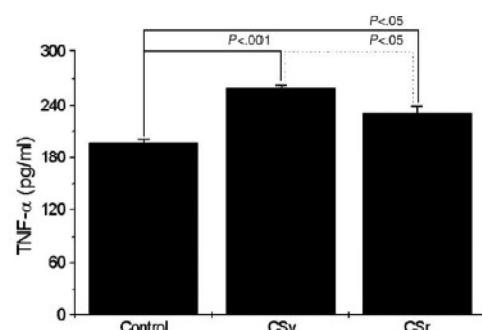
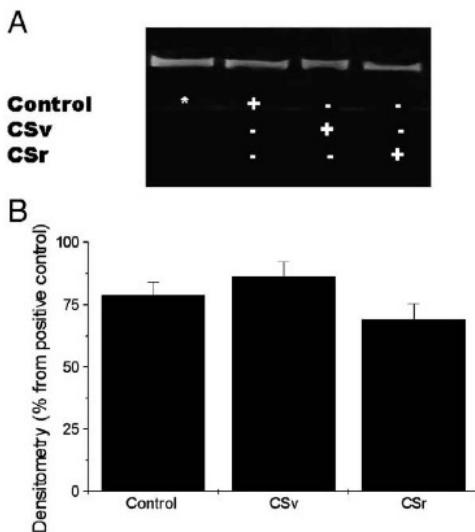


Fig. 7. TNF- $\alpha$  content in lung homogenates from the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. There is a 31% increase of TNF- $\alpha$  content in the CSv group compared to the control group. Supplementation with vitamins C and E reduced the TNF- $\alpha$  content in the CSr group by 12% compared to the CSv group. The TNF- $\alpha$  content was increased by 16% in the CSr group compared to the control group. Data are expressed as means $\pm$ S.E.M.



**Fig. 8.** (A) Gelatin zymography in lung homogenates from the CSv, CSr and control groups after emphysema induced by long-term CS exposure. The first band represented by \* is the positive control (placenta). Representative bands of MMP-9 activity are shown. No differences in MMP-9 activity were found among the three groups. (B) Densitometry of gelatin zymography in lung homogenates (complement to Panel A). No MMP-9 activity was evident after emphysema induced by long-term CS exposure. MMP-9 activity in the CSr group was not affected by supplementation with vitamins C and E.

( $P < .001$ ). The TNF- $\alpha$  content was also higher in the CSr group ( $P < .05$ ) than in the control group. Supplementation with vitamins C and E reduced the TNF- $\alpha$  content of the CSr group but not to control level. The TNF- $\alpha$  content (pg/ml) was  $197.6 \pm 3.1$  in the control group,  $259.7 \pm 3.2$  in the CSv group and  $230.6 \pm 9.3$  in the CSr group.

### 3.5. Gelatin zymography after emphysema

MMP-9 activity was more intense in the CSv group than in the CSr and control groups (nonsignificant difference — Fig. 8A). Densitometry was performed on the negative bands (Fig. 8B).

## 4. Discussion

The present study reports lung repair after emphysema induced by long-term CS exposure in mice supplemented with vitamins C and E. A marked neutrophilia associated with high TNF- $\alpha$  content and emphysema was observed in mice previously exposed to smoke for 60 days (CSv group), but the inflammatory status was reduced by vitamins C and E with improved lung histology.

In COPD, MMPs play an important role in the destruction of lung tissue [3,11]. MMPs attack and degrade extracellular matrix components such as collagens and elastic fibers

[4,25]. MMP-9 is elevated in BAL fluid from subjects with emphysema, suggesting that it may be important in the pathogenesis of the disease [14]. These observations have been supported and extended by Russell et al. [13], who showed that more MMP-9 was secreted by macrophages from COPD patients than from healthy volunteers when stimulated with IL-1 $\beta$ , endotoxin or CS-conditioned medium. We expected to find high MMP-9 activity in the CSv group, but surprisingly, it was not different from the CSr or control groups and it was not associated with the lung inflammatory status indicated by neutrophilia and high TNF- $\alpha$  levels in the CSv group. Alveolar macrophages secrete proteolytic enzymes, including MMP-2 and MMP-9, which contribute to the destruction of lung parenchyma [34]. Macrophages are the likely source of the progressively increased levels of MMP-9 in mouse emphysema [35,36], and MMP-9 is more abundant than MMP-2 in COPD subjects [37]. Thus, the accumulation of macrophages in mouse lung may explain, in part, the very marked increase in MMP-9. Our result, therefore, may be explained by the restoration of mouse alveolar macrophages to control levels when smoking was stopped after 60 days. Further confirmatory studies should be performed using extended observation times and different intervals after cessation of smoking to determine when the lung MMP-9 activity returns to control level.

The data presented here indicate that neutrophils may be related to inflammatory status in ex-smokers. The increased neutrophil number in the CSv group was combined with high TNF- $\alpha$  content. However, supplementation with vitamins C and E reduced alveolar neutrophil numbers, although the TNF- $\alpha$  level remained elevated compared to the control group. These findings raise the possibility that TNF- $\alpha$  is associated with emphysema, as shown by Shapiro et al. [38] and Churg et al. [32]. In addition, TNF- $\alpha$  transgenic mice have increased lung volumes, loss of elastic recoil, destruction of alveolar walls and pulmonary hypertension [39]. Since these changes progress with CS exposure, chronic inflammation induced by TNF- $\alpha$  plays an important role in developing emphysema [32,39]. Our results indicate that a self-perpetuating inflammatory status is present in ex-smoker mice and that vitamin supplementation is more efficient in reducing cell influx to alveoli, probably by reducing the generation of ROS, although the TNF- $\alpha$  level in mouse lung homogenates remains high. Emphysema was confirmed by morphometry and stereology. The MLI, an indicator of air-space destruction, was increased in the CSv group in association with decreased collagen and elastin volume densities. Treatment with vitamins C and E improved the de novo formation of collagen and elastic fibers to some degree. Although elastin fiber destruction and repair are well described in elastase-induced emphysema, collagen and elastin fiber remodeling in chronic CS exposure is poorly characterized. Cells in the alveolar septa of the CSr group may be fibroblasts, myofibroblasts or leukocytes. Our BAL data indicate that the leukocytes in the alveolar septa

did not enter the alveoli. We can speculate that tissue remodeling activity was more intense, as reflected by Vvcoll and Vvel. The mechanisms of alveolar septa repair and de novo formation of collagen and elastic fibers were not studied here, but we believe that antioxidant supplementation by vitamins C and E may stimulate fibroblast activation and proliferation [40]. Vitamin C plays an essential role in collagen formation because it acts as a cofactor for prolyl hydroxylase, which catalyzes hydroxyproline synthesis. Hydroxyproline is required for effective production of type I and type III collagens by fibroblasts and endothelial cells; these collagens represent approximately 90% of all the collagen in the lung [41]. Vitamin E may participate in collagen production by regulating genes responsible for tumor growth factor- $\beta$  and some extracellular matrix proteins [42].

Oxidative stress has been implicated in the pathogenesis of emphysema [16]. Free radicals from inhaled CS and oxidants endogenously formed by inflammatory cells expose the lung to an increased oxidant burden [17]. Despite these observations, studies assessing the benefits of antioxidants for COPD have yielded mixed results. Antioxidants such as vitamins C and E have been shown to decrease smoke-induced oxidative damage in animal [9] and human studies [20]. In addition, numerous epidemiological studies have shown a positive correlation between dietary intake of vitamins C and E and lung function [20]. However, clinical trials evaluating the efficacy of these antioxidants have been less impressive. The formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide is the first event in the development of lung oxidative injury [18]. The major enzymatic antioxidants in the airways are CAT and SOD [17]. SOD is the primary enzyme in defending the lung against the damaging effects of superoxide. It does this by converting superoxide into hydrogen peroxide, which can then be broken down into water by antioxidants such as CAT and glutathione [16]. SOD is a key mediator in the pathophysiological responses that lead to the development of emphysema. We found CAT activity in both ex-smoker groups when compared to the control group. In this context, improvement was independent of vitamin supplementation, in contrast to the SOD activity, which was restored only in the CS<sub>r</sub> group. The number of neutrophils into the alveoli was only comparable to the control levels in the treated mice. This result confirms that the reduction of oxidative stress in the lung should be considered to decrease the influx of inflammatory cells into the alveoli [22].

Despite the importance and rising prevalence of COPD, little progress has been made toward developing effective drug therapies. One treatment strategy is to suppress the inflammatory and destructive processes that underlie this disease. In this context, we observed that supplementation with vitamins C and E can ameliorate the lung structure in ex-smoker mice. These data suggest that interactions among these individual antioxidants, with beneficial mutual protection and regeneration, may represent a complementary treatment for human emphysema.

## Acknowledgments

Funding for this study was provided by FAPERJ, CNPq and UERJ.

## References

- [1] Viegi G, Maio S, Pistelli F, Baldacci S, Carrozza L. Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease: health effects of air pollution. *Respiratory* 2006;11:523–32.
- [2] Hurd S. Global impact of COPD. *Exp Lung Res* 2005;31(Suppl 1): 57–62.
- [3] Spurzem JR, Rennard SI. Pathogenesis of COPD. *Semin Respir Crit Care Med* 2005;26:142–53.
- [4] Belvisi MG, Bottomley KM. The role of matrix metalloproteinases (MMPs) in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): a therapeutic role for inhibitors of MMPs? *Inflamm Res* 2003;52:95–100.
- [5] Martin P, Glasgow H, Patterson J. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): smoking remains the most important cause. *N Z Med J* 2005;118:U1409.
- [6] Jones RC, Hyland ME, Hanney K, Erwin J. A qualitative study of compliance with medication and lifestyle modification in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Prim Care Respir J* 2004;13: 149–54.
- [7] Boschetto P, Quintavalle S, Miotti D, Lo Cascio N, Zeni E, Mapp CE. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and occupational exposures. *J Occup Med Toxicol* 2006;1:1.
- [8] Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1256–76.
- [9] Bezerra FS, Valenca SS, Lanzetti M, Pimenta WA, Castro P, Goncalves Koatz VL, et al. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. *Nutrition* 2006;22:1192–201.
- [10] D'Hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005;26:204–13.
- [11] Buhl R, Meyer A, Vogelmeier C. Oxidant–protease interaction in the lung. Prospects for antioxidant therapy. *Chest* 1996;110:267S–72S.
- [12] Gueders MM, Foidart JM, Noel A, Cataldo DD. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in the respiratory tract: potential implications in asthma and other lung diseases. *Eur J Pharmacol* 2006;533:133–44.
- [13] Russell RE, Culpepper SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, et al. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;26:602–9.
- [14] Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Kontinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest* 1998;78:1077–87.
- [15] Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science* 1997;277:2002–4.
- [16] Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006;28:219–42.
- [17] Rahman I. The role of oxidative stress in the pathogenesis of COPD: implications for therapy. *Treat Respir Med* 2005;4:175–200.
- [18] Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax* 2005;60:693–700.
- [19] Sanguinetti CM. Oxidant/antioxidant imbalance: role in the pathogenesis of COPD. *Respiration* 1992;59(Suppl 1):20–3.

- [20] Smit HA, Grieink L, Tabak C. Dietary influences on chronic obstructive lung disease and asthma: a review of the epidemiological evidence. *Proc Nutr Soc* 1999;58:309–19.
- [21] Islam SS, Schottenfeld D. Declining FEV1 and chronic productive cough in cigarette smokers: a 25-year prospective study of lung cancer incidence in Tecumseh, Michigan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994;3:289–98.
- [22] Ozlu T, Cay M, Akbulut A, Yekeler H, Naziroglu M, Aksakal M. The facilitating effect of cigarette smoke on the colonization of instilled bacteria into the tracheal lumen in rats and the improving influence of supplementary vitamin E on this process. *Respirology* 1999;4:245–8.
- [23] Tsuda S, Matsusaka N, Ueno S, Susa N, Sasaki YF. The influence of antioxidants on cigarette smoke-induced DNA single-strand breaks in mouse organs: a preliminary study with the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Toxicol Sci* 2000;54:104–9.
- [24] Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (alpha-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol* 2007;23:239–45.
- [25] Valenca SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol* 2004;32:351–6.
- [26] Weibel ER. A note on lung fixation. *Am Rev Respir Dis* 1968;97:463–5.
- [27] Yan X, Polo J, Carbayo J, Weibel ER, Hsia CC. Variation of lung volume after fixation when measured by immersion or Cavalieri method. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;284:L242–5.
- [28] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121–6.
- [29] Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;32:279–312.
- [30] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [31] Niu R, Okamoto T, Iwase K, Nomura S, Mizutani S. Quantitative analysis of matrix metalloproteinases-2 and -9, and their tissue inhibitors-1 and -2 in human placenta throughout gestation. *Life Sci* 2000;66:1127–37.
- [32] Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor-alpha drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:492–8.
- [33] Valenca SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetta M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and NF kappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol* 2006;87:373–81.
- [34] Vlahos R, Bozinovski S, Jones JE, Powell J, Gras J, Lilja A, et al. Differential protease, innate immunity, and NF-kappaB induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L931–45.
- [35] Churg A, Wang R, Wang X, Onnervik PO, Thim K, Wright JL. An MMP-9/-12 inhibitor prevents smoke-induced emphysema and small airway remodeling in guinea pigs. *Thorax* 2007;62:706–13.
- [36] Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1beta causes pulmonary inflammation, emphysema, and airway remodeling in the adult murine lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:311–8.
- [37] Vazquez de Lara LG, Umstead TM, Davis SE, Phelps DS. Surfactant protein A increases matrix metalloproteinase-9 production by THP-1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L899–L906.
- [38] Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol* 2003;163:2329–35.
- [39] Fujita M, Shannon JM, Irvin CG, Fagan KA, Cool C, Augustin A, et al. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;280:L39–L49.
- [40] Dubaybo BA, Rubeiz GJ, Fligiel SE. Dynamic changes in the functional characteristics of the interstitial fibroblast during lung repair. *Exp Lung Res* 1992;18:461–77.
- [41] Myllyla R, Kuutti-Savolainen ER, Kivirikko KI. The role of ascorbate in the prolyl hydroxylase reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;83:441–8.
- [42] Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Negis Y, Villacorta L, et al. Vitamin E mediates cell signaling and regulation of gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1031:86–95.

## 8.8 – APÊNDICE H: ARTIGOS EM COLABORAÇÃO

# Original Article

## Effects of hyperoxia on Wistar rat lungs\*

Samuel dos Santos Valença<sup>1</sup>, Milena Leonarde Kloss<sup>2</sup>, Frank Silva Bezerra<sup>3</sup>,  
Manuella Lanzetti<sup>4</sup>, Fabiano Leichsenring Silva<sup>5</sup>, Luís Cristóvão Porto<sup>6</sup>

### Abstract

**Objective:** To study the effects of short-term exposure to high oxygen concentrations (hyperoxia) on Wistar rat lungs. **Methods:** Animals were divided into three groups exposed to hyperoxia for 10', 30' and 90' (O10', O30', O90', respectively), together with a control group (exposed to room air). The animals were sacrificed 24 h after exposure. Bronchoalveolar lavage was performed, and the lungs were removed for histological and stereological analysis. **Results:** In the O10', O30', and O90' groups, respectively and in comparison with the controls, we observed an increase in the numbers of macrophages ( $2169.9 \pm 118.0$ ,  $1560.5 \pm 107.0$ , and  $1467.6 \pm 39.0$  vs.  $781.3 \pm 78.3$ ) and neutrophils ( $396.3 \pm 35.4$ ,  $338.4 \pm 17.3$ , and  $388.7 \pm 11.7$  vs.  $61.6 \pm 4.2$ ), concomitant with an increase in oxidative damage ( $143.0 \pm 7.8\%$ ,  $180.4 \pm 5.6\%$ , and  $235.0 \pm 13.7$  vs.  $100.6 \pm 1.7\%$ ). The histological and stereological analyses revealed normal alveoli and alveolar septa in the controls ( $83.51 \pm 1.20\%$  and  $15 \pm 1.21\%$ ), in the O10' group ( $81.32 \pm 0.51\%$  and  $16.64 \pm 0.70\%$ ), and in the O30' group ( $78.75 \pm 0.54\%$  and  $17.73 \pm 0.26\%$ ). However, in the O90' group, inflammatory cell infiltration was observed in the alveoli and alveolar septa. Red blood cells extravasated from capillaries to the alveoli ( $59.06 \pm 1.22\%$ ), with evidence of congestion, hemorrhage, and septal edema ( $36.15 \pm 0.69\%$ ). **Conclusion:** Hyperoxia for 90' caused injury of the lung parenchyma, resulting in oxidative damage and inflammatory cell infiltration.

**Keywords:** Hyperoxia; Lung/injuries; Oxidative stress.

\* Study conducted in the Laboratory of Tissue Repair of the Department of Histology and Embriology at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil and at the Research Center of the *Faculdade Adventista da Bahia* – FAB, Adventist School of Bahia – Cachoeira, Brazil.

1. Visiting Professor in the Department of Histology and Embriology at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

2. Undergraduate Student in Physical Therapy at the *Faculdade Adventista da Bahia* – FAB, Adventist School of Bahia – Cachoeira, Brazil.

3. Doctoral Student in the Department of Histology and Embriology at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

4. Undergraduate Student in Nutrition in the Department of Histology and Embriology at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

5. Assistant Professor at the Research Center of the *Faculdade Adventista da Bahia* – FAB, Adventist School of Bahia – Cachoeira, Brazil.

6. Full Professor in the Department of Histology and Embriology at the *Universidade do Estado do Rio de Janeiro* – UERJ, Rio de Janeiro State University – Rio de Janeiro, Brazil.

Correspondence to: Samuel dos Santos Valença. Departamento de Histologia e Embriologia, IBRAG-UERJ, Av. Professor Manoel de Abreu, 444, 3º andar, Maracanã, CEP 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Tel 55 21 2587 6509. Fax 55 21 2587 8164. E-mail: sarruelv@hotmail.com

Submitted: 25 October 2006. Accepted, after review: 9 March 2007.

*Experimental Lung Research*, 35:1–16, 2009  
 Copyright © Informa Healthcare USA, Inc.  
 ISSN: 0190-2148 print / 1521-0499 online  
 DOI: 10.1080/01902140902853184

**informa**  
 healthcare

## HYPEROXIA-INDUCED LUNG INJURY IS DOSE DEPENDENT IN WISTAR RATS

**Q1 Akinori Nagato**  Department of Histology and Embryology, UERJ, Rio De Janeiro, Brazil

**Fabiano L. Silva**  Department of Physiology, Rio Grande Do Sul Federal University, Porto Alegre, Brazil; and Bahia Adventist Faculty, Cachoeira, Brazil 5

**Ariane R. Silva**  Bahia Adventist Faculty, Cachoeira, Brazil

**Frank S. Bezerra**  Department of Histology and Embryology, UERJ, Rio De Janeiro, Brazil

**Mayara L. Oliveira**  Bahia Adventist Faculty, Cachoeira, Brazil 10

**Adriane Belló-Klein**  Department of Physiology, Rio Grande Do Sul Federal University, Porto Alegre, Brazil

**Luis Cristovao Porto**  Department of Histology and Embryology, Rio De Janeiro State University, Rio De Janeiro, Brazil

**Professor Samuel Santos Valenca**  Department of Histology and Embryology, UERJ, Rio De Janeiro, Brazil 15

Oxygen is indispensable for aerobic respiration. However, the effects of hyperoxia on the lungs are poorly defined. The aim of the present study was to determine the effects of different oxygen concentrations on rat lungs. Rats ( $n = 6$  per group) were exposed to hyperoxia for 90 minutes at 3 different concentrations: 50% (H50%), 75% (H75%), or 100% (H100%). Bronchoalveolar lavage (BAL) was performed and the right lungs were removed for histological analyses. The BAL samples were assayed for lipid peroxidation and antioxidant status using biochemical methods. Hyperoxia induced influxes of macrophages (1.8- to 2.3-fold) and neutrophils (7.0- to 10.2-fold) into the lungs compared to the control group (exposed to normoxia;  $n = 6$ ). Histological analyses of the hyperoxic groups showed hemorrhagic areas and septal edema. A significant increase (2.2-fold) in lipid peroxidation was observed in the H100% group compared to the control group ( $P < .05$ ). Glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities were reduced to approximately 20% 20

25

Received 12 December 2008; accepted 26 February 2009.

This work was conducted with grants from National Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and Rio de Janeiro State Research Agency (FAPERJ).

Address correspondence to Professor Samuel Santos Valenca, PhD, Department of Histology and Embryology, UERJ, Av. Prof Manuel De Abreu, 444, Rio De Janeiro, Brazil. E-mail: samuelv@hotmail.com

## 8.9 – APÊNDICE I: ARTIGOS EM MORFOLOGIA

### Quantitative and descriptive analysis of the meniscotibial ligament in human corpses

Bezerra, FS.<sup>1,2,3</sup>, Alves, JN.<sup>1</sup>, Silva, MAS.<sup>1</sup>, Trajano, ETL.<sup>1</sup>, Ferreira, TA.<sup>1</sup>, Vasconcellos, HA.<sup>3</sup> and Valençá, SS.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Anatomia, Universidade Severino Sombra – USS,  
Av. Expedicionário Oswaldo de Almeida Ramos, 280, Centro,  
CEP 27000-000, Vassouras, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Reparo Tecidual, Departamento de Histologia e Embriologia,  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – IBRAG,  
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ,  
Av. Prof. Manoel de Abreu, 444, 3º andar, Maracanã,  
CEP 20550-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Anatomia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ  
\*E-mail: samachv@hotmail.com

#### Abstract

The meniscotibial ligaments (LMT) of humans are capsular fibers with proximal origin in the lateral border of the menisci and distal insertion in the lateral border of the tibial condyle, also called coronary ligament of the knee. However, few studies describe the presence, course and anatomical variations of this ligament. Our objective was to evaluate the LMT through quantitative and descriptive methods. Eighty-five knees were examined (42 right knees [RK] and 43 left knees [LK]), dissected, evaluated, catalogued and photographed by four examiners. Twenty knees (23.53%) presented LMT, 6 (30%) in RK and 14 (70%) in LK. In two RKS, the LMT presented proximal insertion in the medial menisci and distal insertion in medial tibial condyle; in the other ones, the LMT presented proximal insertion in the lateral menisci and distal insertion in the lateral tibial condyle. In the LK, four LMT presented proximal insertion in the medial menisci and distal insertion in the medial tibial condyle, while the other ones presented proximal insertion in the lateral menisci and distal insertion in the lateral tibial condyle. One LMT in the LK presented proximal and distal insertion in both menisci and tibial condyle. The analysis of human corpses in our study suggests that the presence of the LMT is much more common in the LK than in the RK, with more frequent insertion in the proximal region of the lateral menisci and distal insertion in the lateral tibial condyle.

**Keywords:** meniscotibial ligament, knee, anatomy.

#### 1 Introduction

The menisci are fibrocartilaginous structures attached to the tibia and accommodate the femur (BRODY, LIN, HULSTYN et al., 2006; KOHN and MORENO, 1995; LaPRADE, ENGBRETSEN, LY et al., 2007). They serve to transmit axial and tensional forces across the joint, cushion mechanical loading, limit comprehensive displacement, distribute synovial fluid, increase the surface area for femoral condylar motion and prevent synovial impingement (AMIS, BULL, GUPTA et al., 2003; GUPTA, BULL, THOMAS et al., 2003; GUPTA, BULL, THOMAS et al., 2003). Meniscocapsular ligaments, including meniscofemoral and meniscotibial components, attach the menisci to the posterior femur and tibial plateau, respectively (LaPRADE, MORGAN, WENTORF et al., 2007; NAGASAKI, OHKOSHI, YAMAMOTO et al., 2006). The meniscotibial ligaments are short, confluent ligamentous bands that attach peripherally to the body of the meniscus and serve to stabilize and maintain the meniscus in the appropriate position on the tibial plateau (LaPRADE, ENGBRETSEN, LY et al., 2007; GOODFELLOW and O'CONNOR, 1986; GUPTA, BULL, MURRAY et al., 2007). The meniscotibial or coronary ligaments further form a portion of the third or deepest layer of the lateral joint capsule. Together, the meniscotibial

and meniscofemoral ligaments also comprise the medial capsular ligament, which represents a portion of the medial joint capsule (LaPRADE, MORGAN, WENTORF et al., 2007; MERIDA-VELASCO, SANCHEZ-MONTESINOS, ESPIN-FERRA et al. 1997; SCHMEISER, HEMPFLING, BUHREN et al., 2001). The meniscotibial ligament fibers are, however, difficult to separate from the adjacent capsule and collateral ligament fibers. The meniscotibial or coronary ligaments are attached several millimeters below the articular cartilage to the tibia and occasionally result in a small synovial recess. Although this recess may be seen on an MRI, the meniscotibial ligaments themselves are rarely separately identified (BASSETT, GROVER and SEEGER 1990; ERBAGCI, YILDIRIM, KIZILKAN et al., 2002; LEE, JEE, KIM et al., 2000). Our aim here was to study meniscotibial ligaments in human corpses by descriptive methods.

#### 2 Material and methods

This study was performed between November 2005 and May 2006 with 109 knees of human corpses from the Instituto de Anatomia da Universidade Severino Sombra (IAUSS). The knees with muscle insertion (which corre-

## Study of Sinoatrial Nodal Artery Dominance in Brazilian Human Hearts

Estudio de Dominancia de la Arteria Sinoatrial Nodal en Corazones Humanos Brasileños

\*,\*\*,\*\*\*Frank Silva Bezerra; \*Akinori Cardoso Nagato; \*Carolina Lourdes Julião Vieira;  
\*Liana Antonicci Reis; \*Luciene Novaes & \*\*Samuel Santos Valença.

BEZERRA, S. F.; NAGATO, C. A.; VIEIRA, J. C. L.; REIS, A. L. NOVAIS, L. & VALENÇA, S. S. Study of sinoatrial nodal artery dominance in Brazilian human hearts. *Int. J. Morphol.*, 26(1):47-50, 2008.

**SUMMARY:** Thirty hearts from adult individuals, 15 from male individuals and 15 female individuals, from the Anatomy Institute of Severino Sombra University were used. After a paramedian incision in the sternocostal joint, a careful dissection was performed in order to expose and identify the sinoatrial nodal artery (SAN), a right or left coronary artery branch. The domain was registered as right, if the right coronary branch irrigated the SAN. The same was listed for the left coronary artery. In addition, cases were both arteries irrigated SAN also were listed. All data, including hearts mass according to gender definition, were compared with previous reports through the variance analysis test (One-way ANOVA) and the post-hoc test of Newman-Keuls with  $p \leq 0.05$ . Groups were defined as MHL: Hearts from male individuals, data from literature; FHL: Hearts from female individuals, data from literature; MHS: Hearts from male individuals, data obtained from the present study; FHS: Hearts from female individuals, data obtained from the present study. Data from MHL was 22% heavier than FHL group. MHS group was 41% heavier than FHS group. Only FHS was 11% lighter than FHL ( $p < 0.05$ ). Right coronary domain was present in 80% and 100% of the studied cases, male and female, respectively. Only 20% of the hearts from MHS group showed left coronary domain. No cases of irrigation form: both arteries were observed in the present study. The present results indicated higher right sinoatrial nodal artery dominance in all cases studied regardless gender and differences on heart weight were similar to those found in literature descriptions.

**KEY WORDS:** Heart; Sinoatrial nodal artery; Arterial dominance.

### INTRODUCTION

The advances in the diagnosis of coronary heart diseases have brought to discussion the long forgotten studies in the morphology and anatomy of coronary arteries (Fox *et al.*, 1973; Flaci Jr., 1994). Coronary arteries, as the first branches of aorta artery, supply blood to the myocardium. Coronary found arteries, normally found in pairs, may vary in origin, distribution, number and size. These arteries emit several branches responsible for irrigating the whole surface and interior heart tissue (Mandarim-de-Lacerda, 1990).

Among those branches, the sinoatrial nodal (SAN) artery, which is responsible for irrigating the structure, which is in charge of initiating each heart beat, is one of the most important branches (Sañudo *et al.*, 1998). Anatomical variations of coronary dominance are common, and they are

characterized by the presence of a coronary branch irrigating SAN, which could be originated from either right or left coronary artery (Gray & Mayo, 1988). Therefore, the aim of this study was to investigate the anatomical variance of SNA artery in human hearts compared with previous anatomical reports and/or records.

### MATERIAL AND METHOD

Thirty hearts from adult individuals, 15 men and 15 women, from Anatomy Institute of Severino Sombra University were used for this experiment. The hearts were weighted on a precision balance and data were recorded.

\* Instituto de Anatomia Humana da Universidade Severino Sombra, Vassouras, Brasil.

\*\* Laboratório de Reparo Tecidual – Departamento de Histologia e Embriologia – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

\*\*\* Departamento de Anatomia – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.