UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises
Toxicológicas

Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse
oxidativo do sistema nervoso central de
camundongos jovens

Larissa Helena Lobo Torres

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo
do sistema nervoso central de camundongos jovens

Larissa Helena Lobo Torres

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo
2009

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

Torres, Larissa Helena Lobo
T693e Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo
do sistema nervoso central de camundongos jovens / Larissa
Helena Lobo Torres. -- São Paulo, 2009.
120p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Marcourakis, Tania

1. Toxicologia social 2. Estresse oxidativo : Toxicologia
3. Xenobiótico : Toxicologia I. T. II. Marcourakis, Tania,
orientador.

615.9 CDD

Larissa Helena Lobo Torres

Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo
do sistema nervoso central de camundongos jovens

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Tania Marcourakis
Orientadora/presidente

1º examinador

2º examinador

São Paulo, _____ de _____

Dedico este trabalho ao meu pai, Pedro Roberto Torres.

É praticamente impossível descrever com palavras o imenso amor, admiração e gratidão que sinto pelo senhor, que sempre me ensinou a levantar e seguir.

Quando sua ausência fez com que isso parecesse ser impossível, a lembrança do seu doce olhar e de suas palavras me fizeram acreditar que conseguiria. Te amo muito!

Saudades....

À minha avó, Luzia Carmelinda da Costa Torres,
um anjo que Deus colocou na minha vida. Um raio
de sol que iluminou meus dias.

Agradeço por cada instante que passei ao seu
lado, por cada sorriso, por cada olhar, pelo amor
incondicional, pelo cuidado, pela preocupação, por
ser tão especial e por fazer parte do que sou.
Te amo muito!!!

Saudades....

Ao Maurílio, que faz com que meus dias sejam mais doces. Conviver com alguém tão especial me faz ser melhor a cada dia. Obrigada pela ajuda nessa jornada e, principalmente, pela cumplicidade e por dividir comigo tantos sonhos.

A minha mãe, que sempre acreditou que eu seria capaz de fazer absolutamente qualquer coisa. Sua confiança é meu alicerce!

Ao meu irmão, meus avós e a toda minha família. Sem vocês tudo isso não teria a menor graça. Obrigada por serem tão presentes na minha vida!

A Tania, pela oportunidade, confiança e dedicação. Pela determinação e pelo esforço em proporcionar tudo o que foi necessário para a realização deste trabalho. Por ser um exemplo de conduta profissional e ética, valores tão importantes na minha formação. Com você, aprendo todos os dias!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Wallace, Raphael, Cecília, Livia, Nathalia, Ana Carolina e Gisele, pela colaboração, carinho, amizade e pelos bons momentos entre um café e outro.

A Marli, Stella, Vânia e Bia, pela amizade e carinho.

A Profa Dra Thais Mauad pela colaboração e às minhas amigas Raquel e Ana Laura, por toda ajuda, dedicação e carinho. Sem vocês esse trabalho teria sido muito mais difícil...

Ao Prof Dr Milton de Arruda Martins que cedeu gentilmente seu laboratório para a exposição dos animais e à Fernanda Lopes, pela ajuda sempre necessária.

A Profa Dra Ana Paula de Melo Loureiro, que possibilitou a realização dos ensaios de malonaldeído.

A Prof Dra Rosana Camarini, pela colaboração na realização da análise comportamental. Aos amigos Sabrina, André, Priscila e Daniel, por serem tão atenciosos e pela ajuda em diferentes momentos deste trabalho.

Ao Prof Dr Marcelo Nicolas Muscará e a Dra Simone Aparecida Teixeira, que nos ajudaram prontamente na realização dos ensaios de 3-nitrotirosina.

Ao Prof Dr Roger Chammas, ao Pedro e ao Joel, pela disponibilização do biotério e pelo cuidado com os animais.

Aos funcionários Ângelo, Dalva, Luzia, Helena e Roseli, pela colaboração e amizade.

A UNIFAL/MG e a Profa Dra Lucia Helena S. Ávila Terra, que possibilitaram o início da minha caminhada e de uma grande paixão pela Pesquisa.

A FAPESP, pelo apoio financeiro.

E principalmente, a Deus, por permitir que tudo fosse possível.

Cérebro Eletrônico

(Gilberto Gil)

O cérebro eletrônico faz tudo
Faz quase tudo
Faz quase tudo
Mas ele é mudo
O cérebro eletrônico comanda
Manda e desmanda
Ele é quem manda
Mas ele não anda
Só eu posso pensar
Se Deus existe
Só eu
Só eu posso chorar
Quando estou triste
Só eu
Eu cá com meus botões
De carne e osso
Eu falo e ouço
Eu penso e posso
Eu posso decidir
Se vivo ou morro por que
Porque sou vivo
Vivo pra cachorro e sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
No meu caminho inevitável para a morte
Porque sou vivo
Sou muito vivo e sei
Que a morte é nosso impulso primitivo e sei
Que cérebro eletrônico nenhum me dá socorro
Com seus botões de ferro e seus olhos de vidro

"Nossa maior fraqueza é a
desistência. O caminho mais
certo para o sucesso é sempre
tentar apenas uma vez mais."

Thomas A. Edison

RESUMO

TORRES, LHL. **Efeitos da inalação da fumaça do cigarro no estresse oxidativo do sistema nervoso central de camundongos jovens.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.

A fumaça do cigarro é composta por mais de 4.700 substâncias, muitas das quais tóxicas. O sistema nervoso central (SNC) possui poucas defesas antioxidantes, além de ser rico em lipídeos facilmente oxidáveis e de conter alto teor de metais de transição envolvidos na formação de radicais livres. Existem evidências de que a fumaça do cigarro causa alterações nas enzimas antioxidantes em roedores adultos, mas pouco se sabe sobre os efeitos do tabaco no SNC ainda em desenvolvimento. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar os possíveis efeitos da fumaça do cigarro no SNC de camundongos jovens. Camundongos BALB/c foram expostos a uma mistura de fumaça central e lateral do cigarro (Souza Cruz - Derby Vermelho) dentro de uma câmara de polipropileno acoplada a um sistema Venturi. Além da exposição aguda, realizada no 18º dia de vida, os animais foram expostos a partir do 5º dia de vida por 13 ou 35 dias, durante 2 horas por dia, 7 dias por semana. Os animais foram então eutanasiados por deslocamento cervical imediatamente ou três horas após a última exposição e foram realizadas as determinações das atividades enzimáticas da glutathione peroxidase, glutathione redutase, glutathione S-transferase, além da quantificação de malonaldeído (MDA) e 3-nitrotirosina no cerebelo, córtex frontal, estriado, hipocampo e hipotálamo. Nossos resultados indicam que o SNC em desenvolvimento é susceptível à fumaça do cigarro. Foram detectadas alterações nas enzimas antioxidantes em diferentes estruturas encefálicas imediatamente após

a última exposição sugerindo diferença de sensibilidade das diferentes áreas à fumaça do cigarro. Contudo, essas perturbações não são persistentes, uma vez que a maior parte delas desapareceu três horas após a exposição. O cerebelo parece ser a estrutura mais resistente enquanto o córtex frontal e o estriado, as mais sensíveis. No córtex frontal as alterações enzimáticas são mais persistentes e houve aumento de MDA no grupo agudo e eutanásia 3 horas após a exposição, enquanto no cerebelo, estriado e hipocampo houve aumento de MDA no grupo agudo e eutanásia imediatamente após a exposição. Esses resultados sugerem uma resposta mais tardia do córtex frontal e uma possível adaptação dos tecidos ao xenobiótico. É importante destacar que a eutanásia realizada imediatamente após a exposição crônica à fumaça do cigarro não reflete somente o efeito da última exposição, já que tanto o padrão encontrado na alteração das enzimas quanto na determinação de MDA foi diferente do observado após exposição aguda.

Palavras-chave: Sistema nervoso central, Fumaça do cigarro, Estresse oxidativo, Enzimas antioxidantes, Malonaldeído.

ABSTRACT

TORRES, LHL. **Effects of cigarette smoke in oxidative stress in the central nervous system of young mice.** Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brasil, 2009.

Cigarette's smoke is composed of more than 4.700 substances, many of them are toxic. The central nervous system (CNS) has few antioxidant defenses, is rich in easily oxidable lipids and contains high levels of transition metals which are involved in the formation of free radicals. There are evidences that tobacco smoke causes changes in the antioxidant enzymes in adult rodents, but little is known about its effects during CNS development. Thus, the aim of this work was to evaluate the possible effects of cigarette's smoke in the CNS of young mice. BALB/c mice were exposed to a mixture of mainstream and sidestream smoke of cigarette (Souza Cruz – Red Derby) in a polypropylene chamber attached to a Venturi system. Besides acute exposure, performed at the 18th day of life, the animals were exposed from the 5th day of life for 13 or 35 days, 2 hours a day, 7 days in a week. The animals were then euthanized by cervical dislocation, immediately or three hours after the last exposure. The determinations of enzymatic activities of glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, and the quantification of malonaldehyde (MDA) and 3-nitrotyrosine in cerebellum, frontal cortex, striatum, hippocampus and hypothalamus were performed.

Our results indicate that the CNS in development is susceptible to cigarette's smoke. Alterations in antioxidant enzymes in different brain structures were detected immediately after the last exposure suggesting differences in sensitivity of different

areas to cigarette's smoke. However, these disturbances are not persistent, as most of them disappeared three hours after exposure. Cerebellum seems to be the more resistant structure, while frontal cortex and striatum the most sensitive. Enzyme changes in frontal cortex were more persistent and there was an increase of MDA only in the acute group and euthanasia 3 hours after exposure, whereas in cerebellum, striatum and hippocampus, MDA increased only in acute group and immediately euthanasia after exposure. These results suggest a delayed response of the frontal cortex and a possible adaptation of tissues to xenobiotics. It is important to point out that euthanasia performed immediately after chronic exposure to cigarette smoke not only reflect the effect of the last exposure, since the pattern found in the modification of enzymes and in the determination of MDA was different from that observed after acute exposure.

Keywords: Central nervous system, Cigarette smoke, Oxidative stress, Antioxidant enzymes, Malonaldehyde.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Projeção global de mortes relacionadas ao tabaco.....	3
Figura 2: Esquema do processo de peroxidação lipídica.....	15
Figura 3: Produtos formados em decorrência do processo de peroxidação lipídica.....	16
Figura 4: Mecanismos de produção de proteínas nitradas (P-TyrNO ₂).....	18
Figura 5: Via de produção do ONOO ⁻ e mecanismos antioxidantes.....	20
Figura 6: Representação do ciclo das glutathionas.....	21
Figura 7: Representação da reação de detoxificação catalisada pela GST.....	22
Figura 8: Câmara de exposição à fumaça do cigarro.....	31
Figura 9: Determinação de MDA no SNC	37
Figura 10: Otimização do método de determinação da atividade da GPx.....	40
Figura 11: Atividade da GPx no SNC	47
Figura 12: Otimização do método de determinação da atividade da GR	48
Figura 13: Atividade da GR no SNC	49
Figura 14: Reação de conjugação do CDNB com a GSH catalisada pela GST.....	50
Figura 15: Otimização do método de determinação da atividade da GST	51
Figura 16: Atividade da GST no SNC	51
Figura 17: Géis de <i>Western blots</i> obtidos na determinação de 3-NT	54
Figura 18: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no hipotálamo	55
Figura 19: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no hipotálamo.....	57
Figura 20: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no hipocampo	59
Figura 21: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no hipocampo.....	60
Figura 22: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no córtex frontal.....	62

Figura 23: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no córtex frontal.....	63
Figura 24: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no estriado	65
Figura 25: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no estriado.....	66
Figura 26: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no cerebello.....	68
Figura 27: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no cerebello.....	69
Figura 28: Locomoção central dos animais analisados em campo aberto	70
Figura 29: Peso de camundongos controle e expostos à fumaça do cigarro.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Doenças que potencialmente apresentam risco aumentado de mortalidade devido ao tabagismo passivo.....	7
Tabela 2: Teor dos constituintes do cigarro Derby Vermelho Sol.....	11
Tabela 3: Principais constituintes de cigarros referência da Universidade de Kentucky e cigarros comercializados no Brasil.....	12
Tabela 4: Comparação entre o cigarro referencia 2R4F da Universidade de Kentucky e o cigarro Derby Vermelho Sol.....	13
Tabela 5: Porcentagem de COHb no sangue de camundongos controle e fumante em diferentes horários após a exposição à fumaça do cigarro.....	52
Tabela 6: Monitorização biológica e ambiental da exposição à fumaça do cigarro nos diferentes grupos analisados.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
3-NT	3-Nitrotirosina
AVC	Acidente Vascular Cerebral
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
COHb	Carboxihemoglobina
CAT	Catalase
PIS/Cofins	Contribuição para o Financiamento de Seguridade Social
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FAT	Fumaça Ambiental do Tabaco
GSSG	Glutathione Oxidada
GPx	Glutathione Peroxidase
GR	Glutathione Redutase
GSH	Glutathione reduzida
GST	Glutathione S-transferase
Hb _{red}	Hemoglobina Reduzida
IPI	Imposto sobre Produtos Industrializados
INCA	Instituto Nacional de Câncer
ISO	International Organization for Standardization
LT	Locomoção Total
MDA	Malonaldeído
NPY	Neuropeptídeo Y

NMDA	N-metil-D-aspartato
NOS _e	NOS endotelial
NOS _i	NOS induzível
NOS _n	NOS neuronal
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ODC	Ornitina Descarboxilase
nAChRs	Receptores Nicotínicos da Acetilcolina
RNA _m	RNA mensageiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Epidemiologia	2
1.1.1. Fumo Passivo	3
1.1.2. Controle do tabaco no Brasil	7
1.2. Comparação entre cigarros comercializados	9
1.3. Estresse oxidativo	14
1.5 Estresse oxidativo e tabaco	22
2. OBJETIVO	27
2.1. Objetivos Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1. Animais e exposição à fumaça do cigarro	30
3.2. Determinação da concentração de proteínas	32
3.3. Determinação da concentração de carboxihemoglobina.....	33
3.4. Determinação da atividade de glutathione peroxidase.....	34
3.5. Determinação da atividade de glutathione reductase.....	36
3.6. Determinação da atividade de glutathione S-transferase.....	37
3.7. Determinação da Peroxidação Lipídica	38
3.8. Determinação de resíduos de 3-Nitrotirosina.....	40
3.9. Análise Comportamental.....	43
3.10. Análises Estatísticas	44
4. ÉTICA	45
5. RESULTADOS	46
5.1. Padronização dos métodos enzimáticos	47

5.1.1. Glutathione peroxidase.....	47
5.1.2. Glutathione reductase.....	48
5.1.3. Glutathione S-transferase.....	50
5.2. Carboxihemoglobina e concentração de CO	52
5.3 Análise comportamental	53
5.4 Peso	55
5.5 Análises bioquímicas	56
5.2.1. Hipotálamo.....	58
5.2.2. Hipocampo.....	61
5.2.3. Córtex Frontal.....	64
5.2.4. Estriado.....	67
5.2.5. Cerebelo.....	70
6. DISCUSSÃO.....	72
7. CONCLUSÕES.....	85
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87
Anexo 1 Comissões de Ética em Experimentação Animal.....	101

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA

Pelo relatório divulgado em agosto de 2008 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre a epidemia global do tabagismo, o tabaco é considerado a principal causa de morte evitável no mundo. Ainda segundo a OMS, 100 milhões de pessoas morreram no século XX devido ao cigarro. Atualmente, o tabaco já atingiu a marca de 5,4 milhões de mortes por ano, superando a tuberculose, a malária e a síndrome da imunodeficiência adquirida, juntos. Estima-se que em 2030 esses números sejam de oito milhões de mortes anuais e, caso as atuais tendências de expansão do seu consumo sejam mantidas, o tabaco será responsável por 1 bilhão de mortes no século XXI (OMS, 2008).

O consumo de cigarros durante o período de 1975 a 1996 caiu na maioria dos países desenvolvidos. Entretanto, o consumo global aumentou em torno de 50% devido aos países em desenvolvimento (Figura 1). Observa-se uma correlação entre tabagismo, baixa renda e baixo nível de escolaridade. No Brasil, a probabilidade de um indivíduo com baixa escolaridade se tornar fumante é cinco vezes maior que a de um indivíduo com nível universitário. O menor acesso à informação, à educação e à assistência à saúde são fatores que explicam tal discrepância (OPAS, 2004).

Entre os jovens, o tabaco é a segunda droga mais consumida devido à facilidade de obtenção e ao baixo custo. Soma-se a estes fatores a publicidade, que ao longo dos anos divulgou a imagem do tabaco associada ao sucesso, beleza e poder. A OMS realizou um Estudo Global do Tabagismo entre os jovens de 46 países e foi observado um quadro de dependência prematura. Em países como Polônia, Zimbábue e China, por exemplo, foi relatada a existência de crianças de 10

anos de idade dependentes do tabaco. Esse mesmo estudo foi realizado no Brasil, nos anos de 2002 e 2003, em doze capitais. A prevalência de escolares fumantes variou de 11 a 27% no sexo masculino e de 9 a 24% no feminino (INCA, 2006).

Figura 1. Projeção global de mortes relacionadas ao tabaco (2005-2030) e influência dos países em desenvolvimento (OMS, 2008; Mathers, 2006)

As estatísticas mostram um aumento no número de mulheres fumantes. Pesquisas entre estudantes mostram que as meninas experimentam cigarros em maior proporção do que os meninos. Este é um dado alarmante, já que a mulher fumante tem um risco maior de infertilidade, câncer de colo de útero, menopausa precoce e dismenorréia (INCA, 2006).

1.1.1. FUMO PASSIVO

Além da exposição direta à fumaça de cigarro, também ocorre exposição ambiental a esta fumaça (fumo involuntário ou passivo). De acordo com a OMS, o tabagismo passivo é definido como a inalação da fumaça ambiental do tabaco (FAT)

e de seus derivados por indivíduos não-fumantes em ambientes fechados (INCA, 2008).

A FAT contém centenas de substâncias químicas, tais como formaldeído, benzeno, arsênio, amônia, nitrosaminas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e é composta por uma mistura de fumaça central (10-20%) e de fumaça lateral (80-90%). A fumaça central é a tragada pelo fumante e a fumaça lateral é a produzida pela ponta acesa do cigarro (96% do tempo da queima do cigarro). É importante ressaltar que a fumaça lateral é mais tóxica e apresenta níveis mais elevados de nicotina, monóxido de carbono, amônia, aldeídos e substâncias cancerígenas. (INCA, 2009; MELLO e cols 2005).

Entre os biomarcadores para identificar e medir o grau de exposição à FAT estão a nicotina (meia-vida de 2h) e seu metabólito, a cotinina (meia-vida de 40h). Rosemberg (2004) destaca que após 4 horas de exposição ao tabaco, ainda é possível encontrar nicotina no ar de ambientes fechados. Precioso e cols, (2007) realizaram um estudo para quantificar o nível de poluição do ar provocada pelo cigarro em locais de trabalho e de lazer em Portugal. Segundo os autores, a concentração de nicotina existente no ar de um ambiente fechado é uma medida objetiva do nível de FAT que seria inalado por uma pessoa no ambiente. Eles observaram que foi detectada a presença de nicotina em 85% das amostras. Os locais de trabalho da administração pública e de universidades apresentaram os valores mais baixos de nicotina, enquanto esta poluição mostrou-se elevada em alguns locais de trabalho de empresas, em restaurantes e particularmente em discotecas.

A exposição involuntária à fumaça do tabaco pode acarretar desde reações alérgicas (rinite, tosse, conjuntivite, exacerbação de asma) em curto período, até

infarto agudo do miocárdio, câncer de pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (enfisema pulmonar e bronquite crônica) em adultos expostos por longo período (INCA, 2009). Alguns estudos comprovam que a longo prazo, o tabagismo passivo aumenta entre 20% a 30% o risco de um não fumante desenvolver câncer de pulmão, e entre 25% a 30% de sofrer infarto agudo do miocárdio (INCA, 2009).

Há algumas décadas surgiram estudos epidemiológicos avaliando os efeitos deletérios do fumo passivo em crianças. Geralmente, estes estudos têm como foco crianças menores de cinco anos, uma vez que, nesta faixa etária não há exposição ocupacional e fumo ativo e o risco da exposição passiva pode ser avaliado durante o período do crescimento e desenvolvimento (CARVALHO, 2002). Assim, por viverem a maior parte do tempo em ambiente restrito e pela maior vulnerabilidade de suas vias aéreas, as crianças são susceptíveis aos efeitos do tabagismo passivo. Estima-se que 54% a 70% das crianças são expostas a um ou mais fumantes no domicílio. O número de cigarros fumados foi positivamente associado ao nível de cotinina na urina das crianças expostas. Foi também descrita elevada morbidade respiratória em crianças menores de cinco anos, tendo a exposição passiva sido também associada à elevada mortalidade em crianças de baixa idade. Essas apresentaram mais tosse e infecções virais e se mostraram mais propensas a sofrer infecções do trato respiratório superior e inferior. Os mecanismos mais plausíveis são: edema da mucosa, diminuição do *clearance* mucociliar e prejuízo no desenvolvimento pulmonar (CARVALHO, 2002).

Outra consequência importante da exposição de crianças à FAT é a síndrome de morte súbita infantil. Estudo da OMS com 700 milhões de crianças no mundo demonstrou um risco aumentado em cinco vezes para esta síndrome em filhos de mães fumantes. (INCA, 2009; OMS, 1999).

Em uma pesquisa recente e inédita no país, pesquisadores do Instituto Nacional de Câncer (INCA) e do Instituto de Estudos de Saúde Coletiva da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) constataram que pelo menos 2.655 não-fumantes morrem a cada ano no Brasil por doenças atribuíveis ao tabagismo passivo (INCA, 2008). Neste estudo, que estimou o número e a proporção de óbitos, foram consideradas apenas as três principais doenças relacionadas ao tabagismo passivo: câncer de pulmão, doenças isquêmicas do coração (como infarto) e acidentes vasculares cerebrais (AVC). Foi observado que a cada 1.000 mortes por doenças cérebro-vasculares, 29 são atribuíveis à exposição passiva à fumaça do cigarro. A proporção é de 25 para 1.000 no caso de doenças isquêmicas e de 7 para 1.000 mortes por câncer de pulmão. Os óbitos de mulheres são de 1,3 a 3 vezes mais elevados que os de homens. Das 2.655 mortes, 1.601 foram de mulheres, ou seja, 60,3%. A Tabela 1 apresenta algumas doenças que apresentam risco elevado de mortalidade devido ao tabagismo passivo.

Tabela 1. Doenças que potencialmente apresentam risco aumentado de mortalidade devido ao tabagismo passivo (INCA, 2008)

Doenças	Força da evidência de comentários sobre estudos relação de causa e efeito	
Câncer de pulmão Doença coronariana	+++++ +++++	Numerosos estudos de boa qualidade Peso das evidências sobre relação com mortalidade elevada
Morte súbita infantil Doenças cérebro-vasculares	++++ +++	Menor número de estudos de boa qualidade Peso das evidências sobre relação com mortalidade elevada
Asma Infecções respiratórias baixas Baixo peso ao nascer	++ ++ ++	Muitos estudos mostram aumento da ocorrência da doença, mas há poucas evidências sobre relação com mortalidade
Doença meningocócica Câncer de mama Outros cânceres do trato respiratório Câncer do colo do útero	+ + + +	Literatura limitada, baixa consistência dos achados dos estudos

É importante ressaltar que o estudo realizado pelo INCA e pela UFRJ representa apenas uma parcela da mortalidade atribuível à exposição passiva à fumaça do cigarro. Neste trabalho, definiu-se como fumante passivo, pessoas que nunca fumaram e que moravam com pelo menos um fumante no mesmo domicílio. Somente indivíduos na faixa etária de 35 anos ou mais foram alvo do estudo, assim, não foram levadas em consideração outras causas de óbito possivelmente associadas ao tabagismo passivo, como a síndrome da morte súbita infantil e doenças respiratórias crônicas. Também não foram avaliadas doenças relacionadas à infância e ao período neonatal.

1.1.2. CONTROLE DO TABACO NO BRASIL

O controle do tabaco no Brasil começou na década de 80, mais precisamente em 1986, com a restrição do fumo em repartições públicas. Uma das medidas mais

eficazes foi a proibição da publicidade do tabaco (exceto nos pontos de venda) em 2000. Dois anos mais tarde, passou a ser obrigatória a publicação de imagens de advertência nos maços e em 2005, o país ratificou sua adesão à Convenção-Quadro de Controle do Tabaco, proposta pela OMS (INCA, 2009).

Entre as diretrizes recomendadas pela OMS para que os países diminuam o consumo de tabaco, está o aumento do preço dos maços de cigarros, por meio da elevação de impostos, e a proibição do uso do tabaco em locais públicos (OMS, 2008). Em maio de 2009 o governo brasileiro aumentou o Imposto sobre Produtos Industrializados (IPI) e a Contribuição para o Financiamento de Seguridade Social (PIS/Cofins) sobre o produto, o que elevou o preço ao consumidor em até 25%. Vale destacar que o preço do maço de cigarros no Brasil é um dos mais baratos do mundo. Ainda segundo a OMS, o aumento de 10% no preço do cigarro diminuiu em 4 a 8% o consumo do produto (OMS, 2008; Governo de São Paulo, 2009).

De acordo com estudo realizado por Pinto e cols, (2007) o tabaco causa um prejuízo anual de, pelo menos, R\$ 338,6 milhões ao SUS, sendo que 33,85% desse valor é gasto no tratamento de diversos tipos de câncer. Vale ressaltar que esse valor é subestimado já que contabiliza apenas o que foi gasto com procedimento de quimioterapia e internações relacionadas a 32 doenças. Embora a prevalência do tabagismo esteja reduzindo no país, seus efeitos sobre a morbidade e mortalidade ainda poderão ser observados nas próximas décadas, o que exigirá a continuidade da aplicação de recursos no tratamento das doenças relacionadas ao tabaco e no fortalecimento das ações de controle ao tabagismo.

1.2. COMPARAÇÃO ENTRE CIGARROS COMERCIALIZADOS

A marca Derby (Souza Cruz) é a mais vendida no Brasil desde seu lançamento. Com cerca de 30% de participação no mercado é líder no segmento de consumidores de renda mais baixa (SOUZA-CRUZ, 2008).

De acordo com a empresa Souza Cruz os teores na fumaça dos cigarros são medidos por uma metodologia analítica padronizada internacionalmente pela ISO (*International Organization for Standardization* - Norma ISO 3308/2000), adotada no Brasil pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e indicada como padrão pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução nº 46, de 28 de março de 2001.

O cigarro é “fumado” em máquinas especiais que tragam 35 mililitros de fumaça por minuto, com uma simulação de tragada que dura 2 segundos e um intervalo entre tragadas de 58 segundos, em condições de temperatura, pressão atmosférica e umidade relativa do ar controladas. Os resultados em miligramas por cigarro são impressos nas laterais das embalagens dos cigarros, além de serem informados anualmente à ANVISA. A Tabela 2 demonstra a constituição, segundo o fabricante, do cigarro da marca Derby Vermelho Sol, utilizado neste trabalho.

Diversos estudos sobre os efeitos da fumaça do cigarro utilizam cigarros comercializados regionalmente, como Anbarasi e cols, (2006 - Scissors Standard), Delibas e cols, (2003 - Tekel 2000), Baskaran e cols, (1999 - marca não informada), Biselli, (2008 - Derby Vermelho Sol) e Mello, (2007 - Marlboro). Manna e cols, (2006) utilizam cigarros experimentais desenvolvidos pela Universidade de Kentucky (EUA). Atualmente, os principais cigarros comercializados pela Universidade de Kentucky são o 1R5F, que possui concentração ultra-baixa de nicotina, e o 3R4F, que é o cigarro padrão de pesquisa.

A Tabela 3 demonstra o teor dos principais constituintes de alguns cigarros comercializados no Brasil e dos cigarros referência da Universidade de Kentucky, incluindo o cigarro 2R4F, que se refere ao lote anterior do cigarro 3R4F.

O cigarro Derby Vermelho Sol foi o escolhido para este trabalho porque, além de ser o mais vendido no país, é um dos que a composição mais se assemelha a dos cigarros 2R4F e 3R4F. A Tabela 4 compara diversos constituintes do cigarro Derby Vermelho Sol e do 2R4F (CHEN & MOLDOVEANU, 2003).

Tabela 2: Teor dos constituintes do cigarro Derby Vermelho Sol

Constituintes	Unidade	Concentração média	Intervalo de Confiança
Alcatrão	mg/cig	8,9	± 0,89
Nicotina	mg/cig	0,63	± 0,063
Monóxido de Carbono	mg/cig	9,2	± 1,38
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos			
- Benzopireno	mg/cig	0,000011	± 0,00000222
Compostos Carbonilados			
- Formaldeído	mg/cig	0,040300	± 0,006045
- Acetaldeído	mg/cig	0,580000	± 0,087
- Acetona	mg/cig	0,260000	± 0,039
- Acroleína	mg/cig	0,002000	± 0,01266
- Propionaldeído	mg/cig	0,048600	± 0,00729
- Crotonaldeído	mg/cig	0,002000	± 0,00744
- Metil etil cetona	mg/cig	0,003500	± 0,010545
- Butanaldeído	mg/cig	0,035000	± 0,00525
Fenóis			
- Hidroquinona	mg/cig	0,041300	± 0,006195
- Resorcinol	mg/cig	0,001000	± 0,00015
- Catecol	mg/cig	0,051100	± 0,007665
- Fenol	mg/cig	0,020500	± 0,00328
- m-cresol	mg/cig	0,003500	± 0,000525
- p-cresol	mg/cig	0,008300	± 0,001494
- o-cresol	mg/cig	0,005100	± 0,000969
Amônia	mg/cig	0,009000	± 0,00135
Ácido Cianídrico	mg/cig	0,158000	± 0,0237
Bases Semi-Voláteis			
- Piridina	mg/cig	0,006700	± 0,001072
- Quinolina	mg/cig	0,000320	± 0,0001216
Misturas Orgânicas			
- 1,3-butadieno	mg/cig	0,037600	± 0,00752
- Isopreno	mg/cig	0,287000	± 0,0574
- Acrilnitrila	mg/cig	0,016500	± 0,00264
- Benzeno	mg/cig	0,041100	± 0,006165
- Tolueno	mg/cig	0,067300	± 0,010095
- Estireno	mg/cig	0,006700	± 0,001273
Nitrosaminas			
- N-nitrosoanatabina (NNN)	mg/cig	0,000055	± 0,000011
- N-nitrosoanatabina (NAT)	mg/cig	0,000063	± 0,0000126
- N-nitrosoanabasina (NAB)	mg/cig	0,000015	± 0,0000022
- 4-(metilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK)	mg/cig	0,000009	± 0,0000076
Aminas Aromáticas			
- 3-aminobifenila	mg/cig	0,000003	± 0,00000056
- 4-aminobifenila	mg/cig	0,000002	± 0,00000036
- 1-aminonaftaleno	mg/cig	0,000015	± 0,00000308
- 2-aminonaftaleno	mg/cig	0,000009	± 0,0000018
NOx	mg/cig	0,209000	± 0,04598
Eficiência do Filtro para Nicotina	%	26,7	± 1,335

Tabela 3: Principais constituintes de cigarros referência da Universidade de Kentucky e cigarros comercializados no Brasil.

	Nicotina (mg/cig)	Alcatrão (mg/cig)	CO (mg/cig)	NOx (mg/cig)
3R4F	0,73	9,40	12,00	---
2R4F	0,75	8,91	11,96	0,26898
1R5F	0,16	1,67	2,95	---
Derby Vermelho Sol KS	0,65	9,10	9,60	0,26133
Derby Azul Mar KS	0,58	6,90	6,50	0,21403
Derby Special Azul Mar KS	0,44	5,50	5,20	0,14474
Hollywood Original KS	0,70	9,00	9,70	0,28767
Hollywood America KS	0,59	6,30	6,10	0,16222
Hollywood California KS	0,68	9,20	9,30	0,21280
Free Red KS	0,48	5,10	5,50	0,15562
Free Blue KS	0,36	3,20	3,90	0,09140
Free Silver KS	0,09	0,70	1,00	0,03629
Carlton Blue KS	0,46	4,70	5,80	0,14124
Carlton By Dunhill Blue KS	0,50	5,00	5,60	0,15320
Plaza Gold KS	0,57	6,50	6,00	0,20602
Marlboro King Size	0,90	12,00	12,00	---

Tabela 4: Comparação entre o cigarro referencia 2R4F da Universidade de Kentucky e o cigarro Derby Vermelho Sol.

Constituintes	Derby (mg/cig)	2R4F (mg/cig)
Alcatrão	8,9	8,91
Nicotina	0,63	0,75
Monóxido de Carbono	9,2	11,96
Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos		
- Benzopireno	0,000011	0,000007
Compostos Carbonilados		
- Formaldeído	0,04030	0,02161
- Acetaldeído	0,58000	0,56048
- Acetona	0,26000	0,26474
- Acroleína	0,00200	0,05877
- Propionaldeído	0,04860	0,04392
- Butanaldeído	0,03500	0,02958
Fenóis		
- Hidroquinona	0,04130	0,03240
- Resorcinol	0,00100	0,00091
- Catecol	0,05110	0,03790
- o-cresol	0,00510	0,00189
Amônia	0,00900	0,01102
Ácido Cianídrico	0,15800	0,10920
Bases Semi-Voláteis		
- Piridina	0,00670	0,00702
- Quinolina	0,00032	0,00023
Misturas Orgânicas		
- 1,3-butadieno	0,03760	0,02994
- Isopreno	0,28700	0,29768
- Acrilnitrila	0,01650	0,00828
- Benzeno	0,04110	0,04339
- Tolueno	0,06730	0,06491
- Estireno	0,00670	0,00511
Nitrosaminas		
- N-nitrosoanatabina (NNN)	0,000055	0,000133
- N-nitrosoanatabina (NAT)	0,000063	0,000119
- N-nitrosoanabasina (NAB)	0,000015	0,000016
- 4-(metilnitrosoamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK)	0,000009	0,000115
Aminas Aromáticas		
- 3-aminobifenila	0,000003	0,000003
- 4-aminobifenila	0,000002	0,000002
- 1-aminonaftaleno	0,000015	0,000015
- 2-aminonaftaleno	0,000009	0,000010
NOx	0,209000	0,26898

1.3. ESTRESSE OXIDATIVO

O conceito de estresse oxidativo refere-se ao estado em que a produção de agentes oxidantes ultrapassa as capacidades antioxidantes. Assim, a superprodução de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) pode culminar em processos de morte celular por necrose ou apoptose, por meio da interação com lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA) (MACCIONI e cols, 2001).

Todos os organismos vivos podem sofrer danos oxidativos. De maneira geral, o encéfalo é mais propenso aos danos oxidativos devido a fatores como o alto fluxo de cálcio pelos neurônios, a alta taxa de consumo de oxigênio molecular (O_2) pelos tecidos nervosos e a presença de aminoácidos excitatórios, principalmente o glutamato (MARKESBERRY, 1999). Além disso, possui alto teor de ferro e de metais de transição que podem catalisar a formação do radical $OH^{\bullet}$, por meio da reação de Fenton, além de lipídeos facilmente oxidáveis em comparação a outros tecidos. Contudo, o tecido do SNC apresenta poucas defesas antioxidantes, como baixa atividade da catalase, por exemplo (FLOYD, 1999).

O radical $OH^{\bullet}$ é muito reativo e, por ser uma espécie oxidante muito instável, tem um importante papel na iniciação da peroxidação lipídica retirando um átomo de hidrogênio dos ácidos poliinsaturados, com conseqüente produção de um radical de lipídio ($^{\bullet}L$). O radical $^{\bullet}L$ reage com o oxigênio molecular, formando $LOO^{\bullet}$ (radical peroxila). Ao retirar hidrogênio de outro lipídio, o radical $LOO^{\bullet}$ inicia a fase de propagação, já que há formação de um hidroperóxido de lipídio ($LOOH$) e outro $^{\bullet}L$ que reage com oxigênio e assim por diante. Na fase final, dois radicais reagem entre

si e formam um não radical (Figura 2). O LOOH pode sofrer outras reações, com consequente produção de alcanos e aldeídos de diferentes tamanhos, como por exemplo, o malonaldeído (MDA), utilizado como marcador de peroxidação lipídica (SIMONIAN & COYLE, 1996; AUGUSTO, 2006).

Figura 2: Esquema do processo de peroxidação lipídica. (AUGUSTO, 2006)

A peroxidação lipídica leva à perda de fluidez da membrana (Figura 3) com consequente comprometimento de suas funções, como redução do potencial de membrana e aumento da permeabilidade aos íons como o Ca^{2+} (SIMONIAN & COYLE, 1996).

Figura 3: Produtos formados em decorrência do processo de peroxidação lipídica. (AUGUSTO, 2006)

O $\text{NO}^\bullet$ é formado pela conversão da arginina em citrulina, processo catalisado por uma família de enzimas: as óxido nítrico sintases (NOS). Três isoformas de NOS são expressas em vários tecidos que produzem $\text{NO}^\bullet$ de acordo com propósitos fisiológicos específicos, sendo uma NOS induzível (NOSi) e duas constitutivas – NOS endotelial e neuronal – NOSe e NOSn, respectivamente. (BANERJEE, 2008; AUGUSTO, 2006).

As NOS constitutivas são dependentes de cálcio/calmodulina. A NOSe está presente em células epiteliais e endoteliais, onde produz $\text{NO}^\bullet$ responsável pela vasodilatação. A NOSn, a primeira a ser isolada, está presente em células neuronais, onde a produção de NO está envolvida com a neurotransmissão. A NOSi, independente de cálcio/calmodulina, é induzida por estímulos inflamatórios, como as citocinas. Esta isoforma da NOS pode ser encontrada em células como macrófagos e astrócitos, onde o $\text{NO}^\bullet$ exerce efeito citotóxico por meio de sua combinação com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ produzindo o ONOO^- . (BANERJEE, 2008; AUGUSTO, 2006).

O ONOO^- destaca-se pelo seu poder oxidante. Sua meia-vida do ONOO^- é de menos de 1 segundo e ao se decompor, um dos produtos formados é o $\text{OH}^\bullet$, espécie de alta toxicidade para a célula (LIPTON e cols, 1993; BECKMAN & KOPPENOL, 1996; BOLANOS e cols, 1997). O ONOO^- reage com a tirosina de várias proteínas produzindo a 3-nitrotirosina (3-NT), um composto bastante estável e utilizado como marcador da presença de derivados do óxido nítrico, como o ONOO^- e o dióxido de nitrogênio (NO_2^-). A nitração do carbono 3 da tirosina pelo ONOO^- ocorre espontaneamente, mas é também catalisada por metais de transição como ferro III e cobre II (ISCHIROPOULOS e cols, 1992; ISCHIROPOULOS e cols, 1995).

A atividade da mieloperoxidase, enzima abundante em neutrófilos, também está envolvida na formação da 3-NT (Figura 4). Essa enzima oxida nitrito à dióxido de nitrogênio e resíduos de tirosina ao radical tirosila. A 3-NT é formada pela recombinação desses radicais (AUGUSTO, 2006). Resíduos de 3-nitrotirosina provocam alteração na proteína, podendo interferir na função de receptores, anticorpos, enzimas, entre outros. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Figura 4: Mecanismos de produção de proteínas nitradas (P-TyrNO₂) por oxidantes derivados do óxido nítrico (AUGUSTO, 2006).

Diversas espécies reativas são produzidas durante o metabolismo celular normal, entretanto o organismo possui defesas antioxidantes para controlar e remover essas espécies. Esses mecanismos protetores podem ser enzimáticos, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), ou não enzimáticos, como a glutathione (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C) e a vitamina E. Vale destacar que o termo vitamina E é considerado como um nome genérico e descreve os derivados de tocoferóis e tocotrienóis, vitaminas lipossolúveis que possuem alto poder antioxidante. Os quatro isômeros dos tocotrienóis (α -T3, β -T3, γ -T3 e δ -T3) são estruturalmente relacionados aos seus

correspondentes homólogos dos tocoferóis (α -T, β -T, γ -T e δ -T), mas diferem nas suas cadeias laterais por essas apresentarem três duplas ligações. O isômero α -tocoferol apresenta a maior atividade biológica dentro da classe dos tocoferóis. (THERIAULT e cols, 1999).

O ácido ascórbico é hidrossolúvel e é co-fator de enzimas envolvidas na síntese de colágeno e da noradrenalina. Tanto o ácido ascórbico como o α -tocoferol reduzem a maioria dos radicais livres, formando ascorbila e tocoferila, espécies pouco reativas. O ácido ascórbico e o α -tocoferol apresentam atividades complementares, embora apresentem estruturas com polaridade diferente e atuem em regiões distintas no organismo – o ácido ascórbico tende a permanecer no meio extracelular enquanto o α -tocoferol no meio intracelular. Os tocoferóis (Toc- OH) são eficientes inibidores de peroxidação lipídica por capturar radicais $\text{LOO}^\bullet$ e $\text{OH}^\bullet$ por meio da reação do grupo hidroxila, com consequente produção do radical tocoferoxila (Toc- $\text{O}^\bullet$). Acredita-se que o radical Toc- $\text{O}^\bullet$ é regenerado em Toc- OH utilizando o ácido ascórbico como coadjuvante sinérgico e que o ácido ascórbico, por ele mesmo, não evita o processo de peroxidação lipídica (MELO, 2003; BANERJEE, 2008; AUGUSTO, 2006).

São descritas duas isoformas da enzima SOD em mamíferos, a Cu,Zn-SOD, encontrada no citosol, no espaço intermembranas da mitocôndria e no espaço extracelular e a Mn-SOD, presente na matriz mitocondrial (BANERJEE, 2008; AUGUSTO, 2006). A SOD catalisa a conversão do ânion $\text{O}_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 , por sua vez, é transformado em H_2O por meio da ação das enzimas CAT ou GPx. É importante destacar que, no caso de alta produção de H_2O_2 ou de uma deficiência da CAT ou da GPx, o H_2O_2 na presença de íons ferro ou cobre pode levar à

formação do radical $\text{OH}^\bullet$ por meio da reação de Fenton, conforme descrito na Figura 5 (McCORD & FRIDOVICH, 1969; SIMONIAN & COYLE, 1996).

A CAT é uma hemoproteína que tem especificidade para o peróxido de hidrogênio, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos, e possuir menor afinidade pelo peróxido de hidrogênio em comparação à GPx, a CAT é mais importante em condições nas quais ocorre altas concentrações de peróxido de hidrogênio (VANNUCCHI, 1998). Vale destacar que o SNC é pobre em CAT, sendo que a maior parte do H_2O_2 é eliminado pela GPx (SIMONIAN & COYLE, 1996). Assim, a presença das enzimas SOD e GPx é importante para a manutenção de baixos níveis de radicais livres no SNC.

Figura 5: O NO na presença do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) forma o ânion ONOO^- , levando à formação do $\text{OH}^\bullet$, um dos responsáveis pela morte celular. A SOD é responsável pela dismutação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ levando à formação de H_2O_2 , o qual pode ser eliminado na forma de água (H_2O) após reação com as enzimas CAT e GPx. Na presença de metais de transição como ferro (Fe^{2+}) e cobre (Cu^+), o radical $\text{OH}^\bullet$ também pode ser formado por meio da reação de Fenton.

A GSH é um dos antioxidantes mais importantes. Esta molécula de baixo peso molecular é um tripeptídeo que contém cisteína e é o tiol não protéico mais abundante nas células dos mamíferos, além de estar presente em diversos tecidos, como o sangue, o pulmão e o SNC. Concentrações baixas da GSH estão

associadas à maior risco de estresse oxidativo e ocorrência de infecções oportunistas (BANERJEE, 2008).

A atividade enzimática da GPx é um importante componente na proteção contra radicais livres em espécies que utilizam o metabolismo oxidativo, sendo importante para a sobrevivência da célula por catalisar a redução de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos lipídicos. Estas enzimas incorporam um resíduo de selenocisteína no seu sítio ativo (BANERJEE, 2008; ROVER Jr, 2001).

O núcleo do resíduo cistenilglicina da GSH está envolvido na sua função como antioxidante, mais especificamente como um redutor intracelular, sendo capaz de formar um radical GS[•], que produz por dimerização a GSSG. A GPx catalisa esse processo e a GSSG produzida é então reduzida pela glutathiona redutase (GR), regenerando a GSH, num processo dependente de NADPH (Figura 6). A limitação de disponibilidade de NADPH pode levar ao aumento de GSSG e deixar as células mais sensíveis ao dano oxidativo (VANNUCCHI, 1998).

Figura 6: Representação do ciclo das glutationas. A detoxificação do ROOH é feita pela GPx na presença de GSH, levando à oxidação da glutathiona (GSSG). A GR reduz a GSSG a GSH na presença de NADPH. R = hidrogênio ou radical alquila.

Variações nos níveis de GSH afetam diretamente a síntese de proteínas e de DNA, de tal forma que a oxidação ou a depleção de GSH pode diminuir a síntese

protéica. A GSH pode se perder de modo irreversível em situações de estresse oxidativo muito intenso, permanecendo na forma oxidada e não sendo novamente reduzida (JORDÃO-Jr e cols, 1998).

As enzimas glutathione S-transferase (GST) são descritas como as mais importantes enzimas envolvidas no processo de metabolismo de compostos eletrofílicos (Figura 7). As GST são enzimas envolvidas no processo de detoxificação celular, mecanismo responsável pela metabolização de endobióticos e xenobióticos (DOURADO e cols, 2008; BANERJEE, 2008).

Figura 7: Representação da reação de detoxificação catalisada pela GST.

1.4. ESTRESSE OXIDATIVO E TABACO

A fumaça do cigarro, em suas frações gasosa, particulada e alcatrão, contém milhares de compostos químicos. Entre eles, o complexo quinona-hidroquinona forma o principal grupo da fração alcatrão da fumaça do cigarro e participa da redução do O_2 a $\text{O}_2^{\bullet-}$. Os radicais presentes na fase particulada e no alcatrão da fumaça do cigarro são caracterizados por apresentarem longa meia-vida, enquanto que os radicais da fase gasosa são caracterizados por apresentarem curta meia-vida, não excedendo 5 minutos (SOBCZAK e cols, 2004). Os elementos prevalentes na fase gasosa são radicais simples de oxigênio e de carbono, além de substâncias altamente reativas, como aldeídos e cetonas poliinsaturados que, ao interagir com

grupos tióis, podem provocar aumento da produção intracelular de espécies reativas ao oxigênio/nitrogênio (CHURCH & PRYOR, 1985).

Existem evidências de que a fumaça do cigarro causa prejuízo das funções endoteliais mediadas pelo $\text{NO}^{\bullet}$ por meio do aumento da formação do $\text{O}_2^{\bullet-}$ (MORROW e cols, 1995; RAIJ e cols, 2001). Um provável mecanismo para este evento é que os compostos tióis presentes na fumaça do cigarro podem ativar a NADPH oxidase e aumentar a produção do $\text{O}_2^{\bullet-}$, reduzindo assim a bioatividade do $\text{NO}^{\bullet}$ com consequente disfunção endotelial (JAIMES e cols, 2004).

Reddy e cols (2002) demonstraram que a exposição de uma solução de GSH à fumaça produzida pelo cigarro resultou em uma rápida depleção da GSH e que, 50% desta depleção pode ser responsabilizada pelas reações com acroleína e crotonaldeído, os dois principais aldeídos β -insaturados presentes neste agente. Os mesmos resultados foram encontrados previamente por Maranzana & Mehlhorn (1998). Mais ainda, de acordo com Banzet e cols (1999), a mitocôndria seria o alvo preferido para os efeitos mediados pela fumaça do cigarro.

Kocyigit e cols (2001) mostraram que a exposição à fumaça do cigarro pode alterar as atividades das enzimas antioxidantes. A atividade da Cu/Zn-SOD e os níveis plasmáticos de cobre e de tiocianato, utilizado como marcador do tabagismo, apresentavam-se significativamente aumentados em fumantes quando comparados com não-fumantes. Entretanto, os níveis plasmáticos de selênio e a atividade da GPx estavam significativamente menores em fumantes do que em não-fumantes e não houve alteração da enzima CAT e nem dos níveis de ferro e de zinco nos dois grupos. Mais ainda, houve correlação positiva significativa entre a atividade eritrocitária da GPx e as concentrações de selênio; entre a atividade da Cu/Zn-SOD eritrocitária e concentração de cobre plasmático e entre a atividade da CAT

eritrocitária e a concentração de ferro plasmática. Foi também evidenciada uma correlação negativa significativa entre os níveis plasmáticos de selênio e de tiocianato.

A interferência do cigarro na atividade das enzimas antioxidantes e de seus elementos traços dependentes também foi relatada por outros autores. Abou-Sheif e cols (1996) observaram aumento da atividade da CAT e da SOD, bem como diminuição da atividade da GPx em eritrócitos de indivíduos fumantes comparados a não fumantes. Dubick & Keen (1991) mostraram que fumantes possuem concentrações séricas de cobre e zinco significativamente maiores enquanto Ellis e cols (1984) demonstraram diminuição nas concentrações séricas de selênio e aumento da concentração de cádmio no sangue total de fumantes.

Lesgards e cols (2002) avaliaram os efeitos de diversos fatores relacionados ao estilo de vida na capacidade total antioxidante e demonstraram que o cigarro, o consumo de álcool, o estresse psicológico, entre outros, diminuem de modo significativo a capacidade antioxidante geral. Mais ainda, Lykkesfeldt e cols (2003), demonstraram que ocorre uma indução do ciclo do ácido ascórbico em fumantes em relação a não-fumantes.

Um dado interessante é apresentado por Sobczak e cols (2004). Os autores estudaram o efeito da fumaça do cigarro nos níveis de α e γ -tocoferol em não-fumantes, fumantes passivos e fumantes ativos, classificados por meio dos níveis de cotinina urinária. Os resultados mostram que fumantes passivos e ativos apresentaram diminuição significativa dos níveis plasmáticos de α -tocoferol em comparação a não fumantes. Não houve alteração nos níveis de γ -tocoferol entre os grupos.

Poucos estudos descrevem os efeitos da fumaça do cigarro no SNC. Anbarasi e cols (2006) demonstraram o aumento do estresse oxidativo no encéfalo de ratos adultos por meio da redução dos níveis de GSH e de vitamina A, C e E, além da diminuição da atividade da SOD, da CAT, da GPx e da GR após exposição à fumaça do cigarro. Os animais foram expostos à fumaça lateral do cigarro duas vezes por dias durante doze semanas. Cada exposição tinha duração de 3 horas, com intervalo de 10 minutos entre cada cigarro. Este trabalho não fez a distinção de áreas específicas do SNC, sua avaliação foi feita em homogenato total do encéfalo de ratos adultos. Manna e cols (2006) realizaram um estudo com exposição prolongada ao tabaco. Neste caso, camundongos foram expostos diariamente por sete horas a uma mistura de fumaça central (11%) e fumaça lateral (89%) do cigarro durante seis meses. Os autores relataram aumento de ROS em diferentes estruturas encefálicas de camundongos adultos (cerebelo, córtex frontal, hipocampo e estriado), levando a níveis significativamente altos de peroxidação lipídica em todas as regiões encefálicas expostas ao tabaco. (MANNA e cols, 2006).

Entretanto, nem todos os autores concordam com o efeito do cigarro nas enzimas antioxidantes. Delibas e cols (2003) avaliaram os efeitos da fumaça do cigarro na peroxidação lipídica, nas enzimas antioxidantes – CAT, SOD e GPx – e na concentração das subunidades 2A e 2B de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) no hipocampo de ratos Sprague-Dawley adultos expostos à fumaça do cigarro por duas horas diárias durante 4 semanas. Os animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram aumento da concentração das subunidades 2A e 2B de receptores NMDA, entretanto, não houve alteração na peroxidação lipídica e nas enzimas antioxidantes no hipocampo desses animais. Baskaran e cols (1999) também avaliaram os efeitos da fumaça do cigarro na peroxidação lipídica e em

enzimas antioxidantes – CAT, SOD, GPx e GST – em ratos expostos à fumaça do cigarro duas vezes ao dia durante 30 dias. Eles observaram aumento na peroxidação lipídica no fígado, pulmão e rins dos animais expostos à fumaça do cigarro, enquanto não houve alteração no encéfalo e no coração. O mesmo ocorreu com as enzimas antioxidantes analisadas, com exceção da GST, que apresentou atividade elevada no encéfalo desses animais.

É importante salientar que todos os trabalhos apresentados referem-se a animais adultos e nenhum estudo avaliou o efeito da fumaça do cigarro em animais que se encontram num período crítico de desenvolvimento do SNC, que, em roedores, compreende as primeiras semanas de vida pós-natal. As duas primeiras semanas do período pós-natal de roedores equivalem ao terceiro trimestre de gestação em humanos. Esse período caracteriza-se por um rápido crescimento encefálico incluindo arborização dendrítica, crescimento axonal, mielinização e pico dos processos de sinaptogênese, gliogênese e maturação da neurotransmissão (BAYER e cols, 1993; QUINN e cols, 2005; DWYER e cols, 2008; DWYER e cols, 2009). Durante esse período o SNC é mais vulnerável a agentes ambientais e quaisquer perturbações na seqüência de eventos normais causam efeitos irreversíveis na estrutura e na função do tecido (MOURA-RIBEIRO e cols, 2006; RICE e cols, 2000; JACOBSON e cols, 1991).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da fumaça do cigarro relacionados ao estresse oxidativo durante o período de desenvolvimento do Sistema Nervoso Central de camundongos jovens.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar métodos para determinação da atividade das enzimas GST, GR e GPx nas diversas estruturas do SNC;
- ✓ Avaliar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro na atividade de enzimas antioxidantes, na produção de MDA e 3-NT em diferentes estruturas do SNC – cerebelo, córtex frontal, estriado, hipotálamo e hipocampo – nos seguintes tempos e condições: agudo, após exposição por 13 e 35 dias com eutanásia imediatamente ou três horas após a última exposição.
- ✓ Avaliar atividade locomotora e imobilidade, por meio de campo aberto, de animais expostos por 13 e 35 dias à fumaça do cigarro.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO

Camundongos BALB/c, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos em ciclo normal de 12 horas claro/escuro, foram expostos à fumaça de cigarro a partir do 5º dia de vida até o 18º dia ou até o 40º dia (respectivamente, 13 e 35 dias de exposição). Os animais foram expostos acompanhados pelas mães até o 21º dia de vida. A exposição à fumaça de cigarro ocorreu em dois horários, 8:00 e 16:00h, com duração de uma hora cada exposição, sete dias por semana. Para a avaliação do efeito agudo à fumaça do cigarro foi feita por meio de uma única exposição de animais aos 18 dias de vida às 8:00 horas durante uma hora. Os animais do grupo controle foram colocados em uma câmara semelhante e inalaram apenas ar comprimido.

Os animais foram expostos a uma mistura de fumaça central e fumaça lateral numa câmara de polipropileno (564x385x371mm) dentro de uma capela. Na câmara havia quatro aberturas para entrada de um fluxo de ar comprimido, da fumaça lateral, da fumaça central e para troca com o ambiente. Foram utilizados cigarros da marca Souza Cruz (Derby Vermelho Sol).

Enquanto a fumaça lateral foi produzida pela ponta de um cigarro aceso colocado em uma das aberturas da câmara, a fumaça central foi produzida pelo sistema Venturi. Nesse sistema, constituído por uma tubulação suavemente cônica, o fluxo laminar de ar comprimido passa de uma região de maior para uma de menor diâmetro. Com isso, há aceleração do fluxo de ar e consequente redução da pressão nesse ponto (efeito Venturi), o que permite que a fumaça do cigarro seja aspirada.

Assim, a entrada para fumaça central recebia uma mistura de ar comprimido e fumaça do cigarro (Figura 8).

Em cada hora de exposição eram utilizados entre 9 e 12 cigarros para fumaça central e 6 cigarros para fumaça lateral. Vale destacar que o cigarro utilizado no sistema Venturi também produzia fumaça lateral, mas esta era eliminada pelo sistema de exaustão da capela. Este consumo explica o alto número de cigarros utilizados nesse sistema.

A quantidade de monóxido de carbono (CO) presente na fumaça inalada pelos animais foi monitorada a cada 10 minutos por meio de um detector de gases específico da marca Biosystems (Toxi-Oxy Pro®).

Figura 8: Câmara de exposição à fumaça do cigarro

Após pesagem, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e o encéfalo rapidamente retirado e mergulhado em solução fria de tampão salina-fosfato. As estruturas encefálicas (cerebelo, córtex frontal, estriado, hipotálamo e hipocampo) foram dissecadas sobre uma placa de petri gelada coberta

por papel de filtro embebido em solução salina gelada e congeladas em gelo seco. As estruturas foram armazenadas em freezer a -80°C até a preparação do homogenato.

As análises foram realizadas em quatro grupos experimentais, como descrito a seguir:

- ✓ Grupo Agudo (0h) – única exposição de 1 hora com eutanásia imediatamente após a exposição;
- ✓ Grupo Agudo (3h) – única exposição de 1 hora com eutanásia 3 horas após a última exposição;
- ✓ Grupo 13 dias (0h) – exposição por 13 dias consecutivos e eutanásia imediatamente após a última exposição;
- ✓ Grupo 13 dias (3h) – exposição por 13 dias consecutivos e eutanásia 3 horas após a última exposição;
- ✓ Grupo 35 dias (0h) – exposição por 35 dias consecutivos e eutanásia imediatamente após a última exposição;

3.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A dosagem foi realizada utilizando-se o método de Bradford (1976), cujo princípio consiste na adição de um corante ácido a uma solução de proteínas, e subsequente medição da absorbância no comprimento de onda de 595 nm. A comparação com uma curva padrão de soro albumina bovina fornece a concentração de proteínas presente nas amostras. Todos os ensaios espectrofotométricos foram realizados em espectrofotômetro da Bio-Tek Instruments INC modelo Power Wave x 340 e software KC4 v3.0.

3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOXIHEMOGLOBINA (COHb)

A COHb é utilizada como marcador biológico para a exposição à fumaça do cigarro. Para sua dosagem, utilizou-se o método de Beutler e West (1984) modificado por Malheiro (1991). A modificação introduzida foi realizada na etapa de determinação dos fatores de calibração durante a padronização do método, onde foi feito o borbulhamento com N_2 para evitar que o CO dissolvido na amostra interferisse nos resultados. O princípio do método consiste na redução da hemoglobina com ditionito de sódio formando hemoglobina reduzida (Hb_{red}), a desoxihemoglobina. Este agente reduz todas as formas de hemoglobina (metemoglobina e a oxihemoglobina), exceto a COHb. Os fatores de calibração devem ser calculados para cada espectrofotômetro e no caso, os fatores obtidos foram: F1: 1,2814; F2: 0,7672 e F3: 1,9170.

A técnica utilizada no estudo está descrita a seguir.

a) Determinação dos fatores de calibração:

Em dois tubos de ensaio (A e B), adicionou-se 3,0 mL do hemolisado, preparado pela diluição de 100 μ L de sangue total de não-fumante em 12 mL de solução hemolisante (tampão em água na proporção 1:10). No balão A, foi borbulhado CO por 3 min, enquanto no balão B, O_2 por 15 min. Ambos balões foram fechados imediatamente. As soluções com 100% de COHb e 100% de O_2 Hb foram submetidas à corrente de N_2 por 2,5 minutos. Após tampar os tubos, 2,0 mL de cada solução foram diluídos com solução redutora (25 mg de ditionito de sódio em 20 mL de solução tampão) em balões volumétricos de 25 mL, preparada imediatamente

antes do uso. As absorbâncias das soluções A e B foram determinadas em 420 e 432 nm. Para o cálculo dos fatores F1, F2 e F3:

$$F1 = \frac{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F2 = \frac{\text{Abs COHb} 432}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420} \quad F3 = \frac{\text{Abs COHb} 420}{\text{Abs Hb}_{\text{red}} 420}$$

b) Determinação da porcentagem de COHb:

Em um tubo de ensaio com tampa, adicionou-se 0,1 mL de sangue total e 12 mL de solução hemolisante (tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH=6,85/água 1:10). Após homogeneizar e deixar em repouso por 10 minutos, 0,2 mL do hemolisado foi diluído com 2,3 mL de solução redutora (25mg de ditionito de sódio em 20 mL de tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,1M pH=6,85). A solução foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. As absorbâncias foram determinadas em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora.

$$\% \text{COHb} = \frac{1 - (\text{AR} \times F1)}{\text{AR} (F2 - F1) - F3 + 1} \times 100$$

Sendo: $\text{AR} = \text{Abs } 420 / \text{Abs } 432$

3.4. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GPx

Este método baseia-se na medida indireta da atividade da GPx, por meio de uma reação casada com a GR. A glutathiona oxidada (GSSG), produzida pela redução por hidroperóxidos pela GPx, é reciclada para gerar seu estado reduzido pela GR e NADPH (FLOHÉ, 1984). A padronização do método para determinação da atividade da GPx em tecido do sistema nervoso central será apresentada no capítulo de resultados, item 5.1.

O substrato utilizado neste ensaio é o terc-butil hidroperóxido. A oxidação de NADPH a NADP^+ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm.

Em cada cavidade de uma microplaca adicionou-se 120 μL de tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0mM; 30 μL de amostra (60 μg de proteína); 5 μL de solução de GSH 80mM; 0,048U de GR (5 μL da solução 0,0096U/ μL). Essa mistura foi incubada por 5 minutos a 37°C, e em seguida foram adicionados 10 μL de solução de terc-butil hidroperóxido 0,46% e 30 μL de solução de NADPH 1,20mM. O decréscimo na absorbância foi monitorado a 340nm a 37 °C por 5 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi então determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{30\mu\text{L}} \right] / 60\mu\text{g}$$

Sendo:

Atividade: atividade específica da GPx (U/ μg de proteína)

k: inclinação da curva de decaimento (min^{-1})

b: caminho óptico (0,524 cm)

ξ_{NADPH} : $6,22 \times 10^{-3} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$

60 μg : quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$\frac{200\mu\text{L}}{30\mu\text{L}}$: diluição da amostra na cubeta

3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GR

O método baseia-se na medida direta da atividade da GR, que utiliza o NADPH como co-fator na redução da GSSG em GSH. A oxidação de NADPH a NADP^+ foi acompanhada pelo decaimento da absorbância a 340 nm e a 37°C (CALBERG e cols, 1975). A padronização do método para determinação da atividade da GR em tecido do sistema nervoso central será apresentada no capítulo de resultados, item 5.1.

Para o preparo de 10mL de meio reagente, utilizou-se 4mL de tampão fosfato 0,10M pH 7,0 e EDTA 1,0mM; 3mL de EDTA 0,005M; 3mL de água deionizada, 0,02g de GSSG e 4mg de NADPH. Adicionou-se em cada cavidade de uma microplaca 20 μL de amostra (80 μg de proteína) e 180 μL meio reacional preparado no momento do uso. O decréscimo dos valores de absorbância foi monitorado a 340nm, à 37° C por 5 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi então determinada a partir da fórmula:

$$\text{Atividade} = \left[\frac{k}{\xi_{\text{NADPH}} \cdot b} \times \frac{200\mu\text{L}}{20\mu\text{L}} \right] / 80\mu\text{g}$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GR (U/ μg de proteína)

k = inclinação da curva de decaimento (min^{-1})

b = caminho óptico (0,524 cm)

$$\xi_{\text{NADPH}} = 6,22 \times 10^{-3} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

80 μg = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$$\frac{200\mu L}{20\mu L} = \text{diluição da amostra na cubeta}$$

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE GST

O método baseia-se na formação de um complexo entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST. O aumento de absorbância é diretamente proporcional à atividade da GST na amostra (HABIG, 1974). A padronização do método para determinação da atividade da GST em tecido do sistema nervoso central será apresentada no capítulo de resultados, item 5.1.

Figura 9. Reação de conjugação do CDNB com a GSH catalisada pela GST.

Em cada cavidade de uma microplaca adicionou-se 20 μ L de amostra (25 μ g de proteína), 160 μ L tampão fosfato 0,1M pH=6,5 e 5 μ L de solução de CDNB 0,1M. Essa mistura foi pré-incubada por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 15 μ L de GSH 0,1M. O aumento na absorbância foi monitorado em 340nm a 25°C por 5 minutos. As amostras foram analisadas em triplicata.

A atividade foi então determinada a partir da fórmula:

$$Atividade = \left[\frac{k}{\xi_{CDNB} \cdot b} \times \frac{200 \mu L}{20 \mu L} \right] / 25 \mu g$$

Sendo:

Atividade = atividade específica da GST (U/ μ g de proteína)

k= inclinação da curva (min^{-1})

b= caminho óptico (0,524 cm)

$$\xi_{CDNB} = 9,60 \times 10^{-3} (\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$$

25 μ g = quantidade de proteínas totais utilizada no ensaio

$$\frac{200 \mu L}{20 \mu L} = \text{diluição da amostra na cubeta}$$

3.7. DETERMINAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O malonaldeído (MDA) foi utilizado como marcador de peroxidação lipídica. As estruturas encefálicas foram homogeneizadas (1:10g/mL) em tampão fosfato pH 7,3. Em 200 μ L desse homogenato foram adicionados 50 μ L de BHT 0,2% e 200 μ L de solução ácida formada por ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,4%; ácido tricloroacético 20% e HCl 0,25 M. Essa solução deve ser preparada imediatamente antes do uso. Em seguida, essa mistura foi incubada por 45 minutos a 90°C em banho-maria. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente centrifugado e filtrado com Spin-X e finalmente, 50 μ L foi injetado no sistema de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência). As análises foram realizadas em um equipamento da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com duas bombas LC-20AT, um detector de arranjo de fotodiodos PDA-20AV, um auto-injetor (Proeminence SIL-20AC) e um forno para colunas (CTO-

10AS/VP) controlado por um módulo de comunicação CBM-20A e o software LC-Solution.

Condições cromatográficas para análise: coluna C-18 (150 mm x 4,6 mm, 10 μ m); fluxo de 1 mL/min; fase móvel: 65% de tampão fosfato 50 mM pH 7,0 e 35% de metanol; detecção espectrofotométrica (λ = 532 nm). A quantificação de MDA foi realizada por meio de uma curva de calibração utilizando-se solução estoque de MDA bis-acetilado.

Figura 10. Exemplo de cromatograma obtido na determinação da concentração de MDA no hipocampo de camundongos expostos à fumaça do cigarro.

3.8. DETERMINAÇÃO DE RESÍDUOS DE 3-NITROTIROSINA (3-NT)

O conteúdo das proteínas nitradas com resíduos de 3-NT foi avaliado pela técnica de *Western blot*. As estruturas encefálicas foram homogeneizadas com tampão Tris-HCl 50 mM (Tris-HCl 50mM, pH 7,4 contendo 1,0 mM de PMSF, leupeptina 10 μ g/ml e 1,0 mM de L-cit) na diluição 1:10 e centrifugados durante 5 minutos a 1000g a 4 °C.

Todas as amostras foram ajustadas para a mesma concentração protéica (2,5 μ g/ μ L) pelo método de Bradford, por meio de diluição com TRis-HCl 50 mM. Em seguida, 130 μ L da amostra foram diluídos com 30 μ L de tampão de Laemmli (0,0625M de Tris-HCl, pH 6,8 contendo 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,001% de azul de bromofenol e 5% de 2-mercaptoetanol). Após centrifugação a 10.000g por 1 min, 25 μ g de proteína das amostras foram separadas por eletroforese em gel de policrilamida 10% contendo lauril sulfato de sódio a 0,1% (SDS – PAGE) conforme originalmente descrito por Laemmli (1970).

Para a separação eletroforética das proteínas, foi utilizado tampão composto por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 0,1% de SDS pH 8,3 e intensidade de corrente constante (35 mA), resultando em valores de voltagem que variaram entre 100 a 180 V. Posteriormente, as bandas protéicas foram transferidas eletroforéticamente por meio de sistema submerso para membrana de nitrocelulose (150 mA, ~ 40 V) durante 2 horas. A composição do tampão empregado para a transferência eletroforética de proteínas para a membrana de nitrocelulose foi composto por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 0,1% de SDS e 18% (V/V) de etanol absoluto. Para comprovar a eficiência da transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de Ponceau (0,1% em ácido acético a 5%). Após lavagem rápida das membranas para retirada do excesso de corante com tampão TBS-t (20 mM de Tris-HCl, 137 mM de NaCl pH 7,4, contendo 0,1% de Tween-20), os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação da mesma com solução a 0,2% de caseína em tampão TBS-t, sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas durante 15-18 horas, a 18 °C com anticorpos primários específicos

– Anti-NT (monoclonal de camundongo, Upstade, EUA) 1:2000, 500 ng/mL – diluídos em tampão TBS-t.

Após o término da incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 minutos) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas – anticorpo policlonal de cabra anti-camundongo+AP (1:3000) – durante 2 horas. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram reveladas por incubação com substratos específicos para as enzimas conjugados aos anticorpos secundários, cujas reações envolvem emissão de quimioluminescência.

As imagens foram detectadas e digitalizadas em sistema Chemilmager 5500 (Alpha Innotech, EUA) e as intensidades das bandas imunorreativas foram comparadas por análise densitométrica pelo software do mesmo sistema e expressas em unidades arbitrárias. Como a maioria das proteínas podem ser nitradas, a densitometria foi realizada em todo o gel, ou seja, foram consideradas proteínas de diversos pesos moleculares. A razão entre a densitometria de todas as bandas de diferentes pesos moleculares do gel e a densitometria das bandas de α -tubulina, utilizada como controle interno, foi utilizada como fator normalizador.

Para determinação da α -tubulina, realizamos um *stripping* de membrana, que consiste na retirada do anticorpo para nitrotirosina. As membranas foram lavadas com TBS-t 0,1% de Tween 20 e em seguida lavadas com solução de *stripping* (7,51g de glicina 0,2M, 5,84g de NaCl 0,2M, qsp 500mL H₂O destilada; HCl para pH 2,8) por 30 min sob agitação constante. Em seguida, adicionou-se 625 μ L de NaOH 1M para neutralizar a solução ácida de *stripping* e as membranas foram deixadas por mais 30 min sob agitação. Após 3 lavagens de 10 min com TBS-t, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário foram bloqueados por incubação com

solução a 0,2% de caseína em tampão TBS-t, sob agitação constante durante uma hora. A seguir, as membranas foram incubadas por 18 horas, a 18 °C com anticorpos primários específicos – Anti-tubulina (monoclonal de camundongo, Santa Cruz) 1:2000, 200 µg/mL – diluídos em tampão TBS-t.

Após incubação, as membranas foram lavadas (6 vezes durante 10 minutos) com tampão TBS-t e incubadas com anticorpos secundários conjugados a enzimas – anticorpo anti-camundongo com horse radish peroxidase Bio Rad (1:3000) – durante 2 horas. As membranas foram submetidas novamente a uma nova série de lavagens com TBS-t, e as bandas imunorreativas foram reveladas por quimioluminescência.

O peso molecular das bandas foi calculado a partir das mobilidades relativas de proteínas marcadoras de peso molecular (faixa de 7 a 195 kDa; Bio Rad, EUA).

Este estudo foi realizado com o auxílio da equipe do laboratório da Prof. Dr. Marcelo Nicolás Muscará do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

3.9. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

No dia anterior à eutanásia, os animais expostos por 13 e 35 dias foram submetidos à análise comportamental. A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta dos mesmos em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura). O fundo da arena é dividido por meio de três círculos em três partes que, por sua vez, são subdivididas por segmentos de retas em 19 partes aproximadamente iguais. Esse aparelho foi construído baseado naquele sugerido por Broadhurst (1960).

Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto, e observado por um período de 5 minutos. Do repertório comportamental de um camundongo em campo aberto, os parâmetros indicativos de sua atividade geral registrados foram a frequência de locomoção central e periférica e a imobilidade. Cada unidade de locomoção corresponde ao ato do animal penetrar com as quatro patas em um dos quadrantes centrais (não contíguos às paredes) ou periféricos (contíguos às paredes) do campo aberto. A imobilidade refere-se ao tempo em que o animal permanece completamente imóvel.

Após cada observação, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre às 10h.

Este estudo foi realizado com o auxílio da equipe do laboratório da Profa. Dra. Rosana Camarini do Departamento de Farmacologia do ICB-USP.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os grupos controle e fumante foram comparados, nos diversos estudos, pelo teste “t” de Student para amostras não pareadas. Os dados são apresentados como média±EPM e foram considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

4. ÉTICA

O projeto foi aprovado pelas Comissões de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO 1).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. PADRONIZAÇÃO DOS MÉTODOS ENZIMÁTICOS

5.1.1. GLUTATIONA PEROXIDASE

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteínas totais (50 a 110 μ g) e as soluções reagentes (preparadas em tampão fosfato 0,1M pH=7,0 e EDTA 1,0mM): NADPH 1,2 mM (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ L); t-butil hidroperóxido 0,46% V/V (5, 10, 15, 20, 25 e 30 μ L); GSH 80mM (2, 5, 8, 10, 15, 20 e 25 μ L) e GR 0,0096U/ μ L (2, 5, 8, 10 e 15 μ L).

Os melhores resultados foram usados numa análise de múltiplas variáveis. A Figura 11 mostra um resumo dos estudos descritos.

Figura 11. Resultados da análise de múltiplas variáveis obtidos na otimização do método de determinação da atividade da GPx em tecido do sistema nervoso central.

A combinação “B” foi escolhida, já que apresentou maior reprodutibilidade, maior atividade, desvio-padrão discreto e alta linearidade. Com base na análise dos estudos realizados, obteve-se as condições ótimas para realização do método,

apresentadas no item 3.4. A Figura 12 demonstra a atividade da GPx em tecido do SNC nas condições padronizadas.

Figura 12: Exemplo de curva de consumo de NADPH representando a atividade da GPx no SNC de animais expostos à fumaça do cigarro.

5.1.2. GLUTATIONA REDUTASE

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais (50 a 150µg) e reagentes: NADPH (0,2; 0,4 e 0,8mg/mL de meio reacional); GSSG (1, 2 e 4 mg/mL de meio reacional) e EDTA 0,005mM (10; 20; e 30% V/V em meio reacional). Os melhores resultados foram usados numa análise de múltiplas variáveis, apresentados na Figura 13.

Figura 13. Resultados obtidos na análise de múltiplas variáveis para otimização do método de determinação da atividade da GR em tecido do SNC. Valores expressos para 10mL de meio reacional.

Os resultados escolhidos foram aqueles que apresentaram maior linearidade, atividade enzimática e menor desvio padrão. Destacam-se as três primeiras combinações apresentadas na Figura 13. Como não há diferença significativa entre elas, a combinação B foi escolhida, já que apresenta menor desvio padrão. As condições ótimas para determinação da atividade enzimática da GR foram apresentadas no item 3.5.

A Figura 14 demonstra o consumo de NADPH promovido pela enzima GR em tecido do SNC nas condições padronizadas.

Figura 14: Exemplo de curva de consumo de NADPH representando a atividade da GR no SNC de animais expostos à fumaça do cigarro.

5.1.3. GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Para otimização do método avaliou-se a quantidade ideal de proteína totais (50 a 110µg) e as soluções reagentes de CDNB 0,1M, preparada em etanol absoluto (2, 5 e 10µL) e de GSH, preparada em tampão fosfato 0,1M pH=6,5 (2, 5, 10, 15 e 20µL). Os melhores resultados foram usados numa análise de múltiplas variáveis, representada na Figura 15.

Figura 15. Resultados obtidos na análise de múltiplas variáveis para otimização do método de determinação da atividade da GST em tecido do SNC.

Pode-se observar na Figura 15 que a combinação “C” corresponde àquela com maior atividade e menor desvio-padrão. As condições ótimas para determinação da atividade enzimática foram apresentadas no item 3.6. A Figura 16 apresenta a curva obtida na determinação da atividade da GST.

Figura 16: Exemplo de curva obtida na determinação da atividade da GST no SNC de camundongos expostos à fumaça do cigarro.

5.2. CARBOXIHEMOGLOBINA E CONCENTRAÇÃO DE CO

Para determinar a estabilidade da COHb após a exposição à fumaça do cigarro foram utilizados camundongos BALB/c adultos que foram eutanasiados em diferentes horários: imediatamente (0h), 3 (3h) e 6 horas (6h) após a exposição. O grupo controle foi analisado imediatamente após a exposição de ar comprimido. Além disso, foi realizado estudo da estabilidade da amostra após a coleta. Assim, amostras colhidas imediatamente após a exposição (fumante 0h) foram analisadas imediatamente e 6,5h após a coleta. As análises foram realizadas tanto pelo método espectrofotométrico quanto por gasometria para comparação dos resultados. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 5. Porcentagem de COHb no sangue de camundongos controle e fumante em diferentes horários após a exposição à fumaça do cigarro

	% COHb (gasometria)	%COHb (espectrofotometria)
Fumante A 0h – análise imediata	23,8	—
Fumante A 0h – análise após 6,5h	24,0	23,9
Fumante B 0h – análise imediata	22,2	—
Fumante C 3h – análise imediata	2,50	—
Fumante D 6h – análise imediata	0,90	—
Controle A 0h – análise imediata	0,55	0,80
Controle B 0h – análise imediata	1,20	1,05

Não foi possível realizar a análise espectrofotométrica em todas as amostras devido à escassez de material. A partir destes resultados, o sangue para as análises de COHb foi colhido imediatamente após a exposição e as amostras foram analisadas dentro de um período de 6 horas.

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos na monitorização biológica e ambiental da exposição à fumaça do cigarro nos diferentes grupos por meio da dosagem de COHb nos animais controle e fumante e da concentração de CO na câmara de exposição. Foram utilizados cerca de 18 cigarros por hora de exposição.

Tabela 6: Monitorização biológica e ambiental da exposição à fumaça do cigarro nos diferentes grupos analisados.

Grupo	% COHb Controle	% COHb Fumante	[CO] ppm
Agudo (0h)	1,19	15,20	466,5 ± 170,13
Agudo (3h)	1,37	16,10	487,5 ± 181,74
13 dias (0h)	1,52	18,23	559,7 ± 167,19
13 dias (3h)	1,63	16,65	479,1 ± 142,05
35 dias (0h)	1,06	16,94	511,6 ± 131,9

5.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL

Os animais expostos por 13 dias (3h) apresentaram alto erro padrão na locomoção total (LT), sugerindo diferenças entre essa população. Assim, os animais foram divididos em dois subgrupos, de acordo com a locomoção total: I – animais que se locomoveram menos de 50 quadrantes; II – animais que se locomoveram mais de 50 quadrantes. Os resultados indicam que os animais com menor locomoção total (57% dos animais) apresentam aumento significativo da locomoção central. Abaixo, os resultados obtidos na análise da locomoção central (Figura 17a).

Não houve diferença na locomoção central dos animais expostos por 35 dias (Figura 17b) e, como este grupo apresentou baixo erro padrão entre os animais, não foi necessário subdividir o grupo.

Figura 17: Porcentagem de locomoção central em relação à locomoção total (LT) dos animais analisados em campo aberto. (a) animais expostos por 13 dias; (b) animais expostos por 35 dias; $**p < 0,001$
 LT < 50, LT > 50: animais com locomoção total menor ou maior que 50 quadrantes.

Em nenhum dos grupos avaliados, 13 dias (3h) e 35 dias de exposição, houve alteração na locomoção periférica e na imobilidade dos animais expostos à fumaça do cigarro em comparação aos controles.

5.4. PESO

Os animais de todos os grupos expostos à fumaça do cigarro tiveram significativa perda de ganho de peso em comparação aos animais controle. A Figura 18 representa os grupos expostos por 13 e por 35 dias.

Figura 18: Peso de camundongos controle e expostos à fumaça do cigarro. (a) grupo 13 dias (0h); (b) grupo 13 dias (3h); (c) grupo 35 dias – animais com 18 dias de vida; (d) grupo 35 dias – animais com 40 dias de vida; *** $p < 0,0001$.

5.5. ANÁLISES BIOQUÍMICAS

A atividade das enzimas GST, GPx e GR, bem como a quantificação do MDA foram realizadas para cada estrutura encefálica (n=5) em todos os grupos estudados.

A análise dos resíduos de 3-NT foi realizada nos grupos agudo (0h), 13 dias (3h) e 35 dias de exposição. Vale ressaltar que a densitometria foi realizada em todas as bandas de diferentes pesos moleculares e a α -tubulina foi utilizada como controle interno. Para que seja possível avaliar o efeito da fumaça do cigarro em cada estrutura, os resultados da densitometria da 3-NT serão apresentados junto com as determinações das atividades enzimáticas e a quantificação do MDA. Assim, a Figura 19 representa os *Western blots* obtidos nas diferentes estruturas encefálicas.

Figura 19: Representação dos géis de *Western blots* obtidos na determinação de resíduos de 3-NT no grupo 13 dias (3h). (a) cerebello; (b) córtex frontal; (c) estriado; (d) hipocampo; (e) hipotálamo. M= marcador de peso molecular; C= controle; F= fumante.

5.2.1. HIPOTÁLAMO

A Figura 20 apresenta os resultados da atividade das enzimas GST, GPx e GR. O grupo fumante apresentou aumento da atividade da GST estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) ($p < 0,0001$) e diminuição estatisticamente significativa nos grupos 13 dias (0h) ($p < 0,05$) e 35 dias ($p < 0,0001$). Em relação à GPx, o grupo fumante apresentou aumento da atividade da GPx estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) ($p < 0,05$) e 13 dias (0h) ($p < 0,05$). Quanto à GR, o grupo fumante apresentou diminuição da atividade estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após 13 dias (0h) ($p < 0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 20: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no hipotálamo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

A Figura 21 representa o resultado obtido na quantificação do MDA e da 3-NT no hipotálamo. O grupo fumante apresentou diminuição significativa da quantidade de MDA em relação ao grupo controle no grupo agudo (0h) ($p<0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 21: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no hipotálamo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p<0,05$.

5.2.2. HIPOCAMPO

A Figura 22 apresenta os resultados da atividade das enzimas GST, GPx e GR. O grupo fumante apresentou aumento da atividade da GST estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) ($p<0,01$), 13 dias (0h) ($p<0,05$) e 35 dias ($p<0,01$). Em relação à atividade da GPx, o grupo fumante apresentou diminuição estatisticamente significativa da atividade em relação ao grupo controle após 13 dias (0h) ($p<0,05$) e 35 dias de exposição ($p<0,05$). Quanto à GR, o grupo fumante apresentou aumento da atividade estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) ($p<0,05$), 13 dias (0h) ($p<0,001$) e 35 dias ($p<0,001$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 22: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no hipocampo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A Figura 23 representa o resultado obtido na quantificação do MDA e da 3-NT no hipocampo. O grupo fumante apresentou aumento significativo da quantidade de MDA em relação ao grupo controle no grupo agudo (*0h*) ($p<0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 23: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no hipocampo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (*0h*); (II) grupo agudo (*3h*); (III) grupo 13 dias (*0h*); (IV) grupo 13 dias (*3h*); (V) grupo 35 dias (*0h*). * $p<0,05$.

5.2.3. CÓRTEX FRONTAL

A Figura 24 apresenta os resultados da atividade das enzimas GST, GPx e GR no córtex frontal. O grupo fumante apresentou diminuição da atividade da GST estatisticamente significativa em relação ao grupo controle no grupo agudo (3h) ($p < 0,001$) e aumento da atividade da GST após exposição por 13 dias (0h) e (3h) ($p < 0,05$). Além disso, o grupo fumante apresentou aumento da atividade da GPx em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) e 13 dias (0h) ($p < 0,05$) e diminuição da atividade da GPx no grupo agudo (3h) e após 35 dias de exposição ($p < 0,05$). A atividade da GR apresentou diminuição significativa no grupo fumante em relação ao grupo controle no grupo agudo (3h) e aumento após exposição por 13 dias (3h) ($p < 0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 24: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no córtex frontal de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

A Figura 25 representa o resultado obtido na quantificação do MDA e da 3-NT no córtex frontal. O grupo fumante apresentou aumento significativo da quantidade de MDA em relação ao grupo controle no grupo agudo (3h) ($p<0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 25: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no córtex frontal de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p<0,05$.

5.2.4. ESTRIADO

A Figura 26 apresenta os resultados da atividade das enzimas GST, GPx e GR. O grupo fumante apresentou aumento da atividade da GST estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h), 13 dias (0h) e (3h) ($p < 0,05$) e 35 dias de exposição ($p < 0,0001$). Em relação às atividades da GPx e da GR, as únicas diferenças estatisticamente significativas foram observadas no grupo de 35 dias, que apresentou atividade da GPx menor nos fumantes do que no grupo controle ($p < 0,05$) e atividade da GR maior no grupo fumante ($p < 0,0001$).

Figura 26: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no estriado de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$.

A Figura 27 representa o resultado obtido na quantificação do MDA e da 3-NT no estriado. O grupo fumante apresentou aumento significativo da quantidade de MDA em relação ao grupo controle no grupo agudo (0h) ($p<0,05$) e aumento nos resíduos de 3-NT no grupo agudo (0h) ($p<0,05$) e no exposto por 35 dias ($p<0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 27: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no estriado de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p<0,05$.

5.2.5. CEREBELO

A Figura 28 apresenta o resultado obtido na determinação da atividade das enzimas GST, GPx e GR no cerebelo. O grupo fumante apresentou aumento da atividade da GST estatisticamente significativa em relação ao grupo controle após exposição aguda (0h) ($p<0,05$) e aumento da atividade da GPx ($p<0,001$) no grupo exposto por 13 dias (0h). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 28: Atividade das enzimas GST, GPx e GR no cerebelo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p<0,05$; ** $p<0,001$

A Figura 29 representa o resultado obtido na quantificação do MDA e da 3-NT no cerebelo. O grupo fumante apresentou aumento significativo da quantidade de MDA em relação ao grupo controle no grupo agudo (0h) ($p<0,05$). Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 29: Determinação de MDA e de resíduos de 3-NT no cerebelo de animais controle e expostos à fumaça do cigarro. Dados representados em porcentagem em relação ao controle. (I) grupo agudo (0h); (II) grupo agudo (3h); (III) grupo 13 dias (0h); (IV) grupo 13 dias (3h); (V) grupo 35 dias (0h). * $p<0,05$.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A fumaça do cigarro é uma complexa mistura de componentes, muitos dos quais são tóxicos e estão relacionados à etiologia de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como doença pulmonar obstrutiva crônica, asma, câncer e doenças cardiovasculares (MANNA e cols, 2006). A liberação de radicais livres a partir do alcatrão e da fase gasosa do fumo promove estresse oxidativo, peroxidação lipídica e, conseqüentemente, altera o sistema de defesa antioxidante no sangue e demais tecidos de fumantes. O encéfalo é particularmente vulnerável ao estresse oxidativo porque contém lipídeos facilmente oxidáveis e é rico em ferro e metais de transição que podem catalisar a formação do radical hidroxila, além de possuir poucas defesas antioxidantes. (PRYOR & STONE, 1993; BASKARAN e cols, 1999; ANBARASI e cols, 2006).

É importante salientar que o SNC é ainda mais vulnerável durante seu desenvolvimento. Estudos recentes têm avaliado os efeitos da exposição à nicotina durante esse período crítico. Enquanto diversos trabalhos demonstram os efeitos neuroprotetores da nicotina no envelhecimento (PIAO e cols, 2009; TAKEUCHI e cols, 2009; PICCIOTTO e cols, 2008), o efeito oposto ocorre no desenvolvimento de fetos e crianças. A nicotina induz a formação de radicais livres e depleta os mecanismos de defesas antioxidantes das células neurais (QIAO e cols, 2005).

A análise do desenvolvimento encefálico pós-natal de animais expostos à nicotina durante a gestação mostrou a ocorrência de anormalidades persistentes durante o período de maturação do encéfalo, como por exemplo, altos níveis da enzima ornitina descarboxilase (ODC), enzima que tem papel crítico na coordenação

da proliferação e diferenciação celular. Atividade elevada da ODC é indicativo de processo de maturação celular anormal (SLOTKIN e cols, 1986).

Slotkin e cols, (2007) demonstraram que a exposição pré-natal à nicotina provoca mudanças permanentes nas funções sinápticas colinérgicas e serotoninérgicas de ratos e que a exposição à nicotina em adolescentes produz efeitos tardios similares à exposição pré-natal. (SLOTKIN e cols, 2007). Esses resultados levaram a recente precaução em relação aos potenciais danos no desenvolvimento do sistema neurológico de fetos provocados pela terapia de substituição de nicotina em grávidas.

Apesar de diversos estudos correlacionarem a exposição à nicotina e o desenvolvimento do SNC, pouco se sabe sobre os efeitos da fumaça do cigarro no encéfalo em desenvolvimento.

Neste estudo procuramos avaliar os possíveis efeitos da fumaça do cigarro no SNC de camundongos em desenvolvimento por meio da análise de enzimas antioxidantes e de marcadores de dano oxidativo, como o MDA e a 3-NT, além da análise comportamental em campo aberto.

Durante a exposição, a monitorização da concentração de CO apresentou alto desvio entre as medidas, provavelmente devido à composição do cigarro comercial. É difícil manter uma concentração constante de CO dentro da câmara, já que cada cigarro queima de maneira particular. Vale ressaltar que boa parte da fumaça lateral produzida é eliminada pelo sistema de exaustão da capela, o que ajuda a explicar o número de cigarros utilizados por hora. A COHb, marcador da fase gasosa do cigarro, possui meia-vida de meia hora em camundongos, devido a ligação lábil entre o monóxido de carbono e a hemoglobina dos roedores (MELLO e cols, 2005). Ao avaliar a concentração de COHb em diferentes horários confirmamos essa

afirmação, uma vez que 3 horas após a exposição não foi mais possível detectar a alteração na COHb no sangue dos animais fumantes em relação aos controles. Além disso, foi possível comparar a gasometria com o método espectrofotométrico de Beutler e West (1984) e verificar a semelhança entre essas duas técnicas. Pode-se também observar que a COHb é estável no sangue colhido por pelo menos 6,5 horas.

Nos animais expostos à fumaça do cigarro, a COHb foi de aproximadamente 16%, o que demonstra que o sistema de exposição é eficiente e permite que os animais inalem a fumaça do cigarro. Em humanos, a COHb em fumantes depende de vários fatores como a tragada e o número de cigarros fumados e varia de 3 a 9%, valor que permanece praticamente constante ao longo do dia, já que sua meia-vida é de 3 horas e os fumantes tem o hábito de fumar periodicamente (MELLO e cols, 2005).

Nossos resultados indicam que os animais expostos à fumaça do cigarro tiveram significativa perda de ganho de peso, fato importante na análise do desenvolvimento desses animais. Diversos estudos demonstram relação inversa entre o uso de produtos derivados do tabaco e o peso corporal em humanos e roedores (FRANKISH e cols, 1995; LI e cols, 2000; CHEN e cols, 2005). É consenso que os filhos de mães que fumam durante a gravidez têm cerca de 200g a menos do que as que não fumam. A redução do peso ao nascer pode trazer sérias consequências, uma vez que está relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade infantil (SWAN e cols, 2007).

A nicotina parece ser o principal constituinte do tabaco responsável pelos efeitos no peso corporal. A administração de nicotina em roedores reduz o consumo de alimento, aumenta o gasto energético e diminui o peso de animais (FRANKISH e

cols, 1995). Os mecanismos pelos quais a nicotina exerce este efeito ainda não estão bem esclarecidos, mas provavelmente são mediados pelo hipotálamo, estrutura envolvida na regulação da alimentação, no balanço energético e no peso corporal. Assim, como são encontrados receptores nicotínicos em áreas do hipotálamo que regulam o apetite (JO e cols, 2002), a fumaça do cigarro pode afetar o apetite de roedores por alterar os circuitos da homeostasia energética, incluindo tanto a liberação de peptídeos orexigênicos (neuropeptídeo Y - NPY) quanto de peptídeos anorexigênicos (CHEN e cols, 2005).

O NPY, um neuropeptídeo abundante no encéfalo de mamíferos e com altas concentrações no hipotálamo, é conhecido por seu papel no aumento do consumo de alimentos. Frankish (1995) demonstrou que tanto o efeito agudo (24h) quanto a longo prazo (2 semanas) de altas doses de nicotina (12mg/kg/dia) diminuem o conteúdo de NPY e expressão de RNAm NPY no hipotálamo (núcleos arqueado e paraventricular) de ratos, além de redução de 30% do consumo de alimentos.

Gaworski e cols (2004) avaliaram o efeito da fumaça central do cigarro na prole (geração F1) de ratos Sprague-Dawley expostos duas horas/dia, sete dias/semana a partir de duas semanas antes do acasalamento até 21 dias após o nascimento dos filhotes. Os autores relataram que a exposição à fumaça do cigarro durante a gestação e aleitamento reduz o peso do animal ao nascer e retarda o crescimento do rato neonato. No entanto, nenhuma alteração na resposta acústica, aprendizagem e memória, atividade locomotora e marcos de desenvolvimento (idade de patência vaginal ou separação prepucial) foram observadas na geração F1.

Em nosso trabalho, a avaliação da atividade locomotora indicou que 57% dos animais expostos por 13 dias apresentaram aumento significativo da locomoção central, sugerindo efeito ansiolítico nesses animais. O estriado, formado pelo núcleo

caudado e pelo putâmen, é uma estrutura que está envolvida com o comportamento motor, mais especificamente, com a modulação do movimento (BEAR e cols, 2008). No início do período pós-natal o sistema motor de roedores passa por um período crítico que depende da atividade e da plasticidade do estriado (SOIZA-REILLYE e cols, 2009). Como o grupo exposto por 35 dias não apresentou diferença significativa em nenhuma das avaliações, estes dados sugerem uma possível adaptação ou influência de maturação do sistema neste comportamento.

Nossos resultados corroboram os de Cao e cols (2007), que observaram os efeitos da nicotina e do acetaldeído, principais constituintes do cigarro, em campo aberto por 30 minutos. Ratos Sprague-Dawley adolescentes e adultos foram divididos em quatro grupos: salina, nicotina (30µg/Kg/100µL), acetaldeído (16µg/Kg/100µL), e nicotina + acetaldeído. Os animais foram colocados em campo aberto imediatamente após injeção intravenosa dos agentes tóxicos. Os autores observaram que a nicotina aumenta a locomoção nos ratos adolescentes e diminui a locomoção nos adultos. O acetaldeído sozinho não causou alteração na locomoção dos animais, entretanto, potencializou os efeitos da nicotina tanto nos adultos quanto nos adolescentes. Além disso, esse estudo demonstrou que a nicotina aumenta o tempo de permanência dos animais na área central do campo aberto, tanto nos jovens quanto nos adultos, indicando efeito ansiolítico. Neste caso, ao contrário dos efeitos na locomoção, o acetaldeído não altera os efeitos da nicotina, o que sugere distintos circuitos neuronais entre o aumento da locomoção e o tempo de permanência na área central.

Outros trabalhos também relatam aumento da atividade locomotora após exposição à fumaça do cigarro. Paulson e cols (1993) demonstram que ratos Sprague-Dawley que receberam extrato de tabaco por gavagem oral durante o

período gestacional (1,33; 4,0 ou 6,0 mg/kg de nicotina) tiveram filhotes com aumento da atividade locomotora com cerca de 25 dias de idade e Suemaru e cols (1992) observaram aumento da atividade locomotora em ratos adultos expostos à fumaça do cigarro durante 20 minutos, duas vezes por dia durante 14 dias.

A análise das enzimas antioxidantes mostrou uma diferença de sensibilidade à fumaça do cigarro nas diferentes estruturas encefálicas.

O hipotálamo, estrutura envolvida na homeostase corporal e no controle do sistema vegetativo, foi a única estrutura que apresentou diminuição do MDA e aumento tanto da atividade da GST quanto da atividade da GPx no grupo agudo (0h). Estes dados sugerem que o aumento da atividade das enzimas GST e GPx potencializa a eliminação do MDA do tecido, fazendo com que haja diminuição de MDA no fumante em relação ao controle. Como há aumento da atividade da GPx e diminuição da atividade da GR e da GST imediatamente após a eutanásia e nenhuma alteração no grupo com intervalo de 3 horas para a eutanásia, é possível que haja uma adaptação do tecido à fumaça do cigarro 3 horas após a exposição. Interessante notar que imediatamente após a exposição de 35 dias, a única alteração que permaneceu foi a diminuição da atividade da GST, o que pode refletir uma diminuição dos níveis de glutathione, já que esta enzima é dependente deste agente antioxidante. Nossos resultados sugerem que os mecanismos de defesa antioxidantes são eficientes, já que não houve alteração nos resíduos de 3-NT em nenhum dos grupos analisados e na produção do MDA nos grupos expostos por 13 e 35 dias.

Outra estrutura que merece destaque é o hipocampo, responsável pelos processos de aprendizado e de memória. Esta estrutura parece ser sensível à fumaça do cigarro, uma vez que tanto no grupo agudo (0h) quanto no de exposição

por 13 dias (0h) e no de exposição de 35 dias, houve aumento significativo da atividade da GST e da GR. Nos dois últimos grupos também foi possível observar diminuição da atividade da GPx. Contudo, nossos resultados também sugerem que o hipocampo possui mecanismos antioxidantes rápidos e eficientes, já que 3 horas após a exposição não há alteração na atividade de nenhuma das enzimas avaliadas. Não houve alteração nos resíduos de 3-NT em nenhum dos grupos analisados e apenas no grupo agudo (0h) é possível observar aumento de MDA, o que sugere uma adaptação do tecido.

No córtex frontal, que está envolvido com o planejamento do movimento, além de funções cognitivas e pensamento abstrato, houve uma alteração do padrão de resposta aguda à fumaça do cigarro, já que não houve ativação da GST após exposição aguda (0h) e foi a única estrutura a apresentar alteração no grupo agudo (3h), com diminuição na atividade das enzimas antioxidantes GST, GPx e GR, além de aumento na produção de MDA.

Enquanto nas outras estruturas a GST é a primeira enzima a ter sua atividade aumentada, no córtex frontal esta função passou a ser da GPx, que também apresentou-se aumentada no grupo de 13 dias (0h) e diminuída no grupo de 13 dias (3h) e no grupo de 35 dias. Vale destacar que nos animais expostos por 13 dias, a atividade da GST aumentou tanto na eutanásia imediatamente quanto 3 horas após a exposição e a atividade da GR só aumentou 3 horas após da exposição. Estes resultados sugerem que a defesa antioxidante do córtex frontal se inicia mais tardiamente e que as alterações enzimáticas são mais persistentes, fazendo com que o tecido seja sensível ao xenobiótico. Contudo, não houve alteração na produção de 3-NT no córtex frontal.

Os resultados da atividade da GPx no córtex frontal também sugerem que a diminuição da atividade enzimática pode ocorrer devido ao consumo do substrato (GSH). Aparentemente, a GPx aumenta sua atividade em resposta ao xenobiótico – grupo agudo (0h). Contudo, em um segundo momento – grupo agudo (3h) – a atividade enzimática diminui devido, provavelmente, ao alto consumo de GSH.

Além de modular o sistema motor, o estriado tem importante papel na memória de procedimentos. Esta estrutura responde à fumaça do cigarro de forma diferente, uma vez que a atividade da GST, além de aumentar no grupo agudo (0h) e 13 dias (0h), permanece aumentada 3 horas após a exposição por 13 dias e se mantém após 35 dias de exposição. Mais ainda, as enzimas do ciclo das glutatonas levaram mais tempo para serem ativadas: houve diminuição da atividade da GPx e aumento da GR apenas no grupo exposto por 35 dias, sugerindo que essas enzimas são ativadas como um reforço para GST. Como nas demais estruturas, houve aumento da peroxidação lipídica no grupo agudo (0h). Contudo, o aumento de resíduos de 3-NT no grupo agudo (0h) e exposto por 35 dias sugere que o estriado é a estrutura mais sensível ao xenobiótico e que não possui mecanismos tão eficientes de defesa antioxidante quando comparado às demais estruturas.

O cerebelo, responsável por mecanismos de equilíbrio e postura, além de coordenação e modulação do movimento (BEAR e cols, 2008), é a estrutura que se mostra mais resistente à fumaça do cigarro. Neste caso, as únicas alterações encontradas foram no grupo agudo onde houve aumento da peroxidação lipídica e aumento da atividade da GST e no grupo exposto por 13 dias (0h), o qual apresentou aumento da atividade da GPx.

De acordo com os resultados obtidos por McFarland e cols (1991) o cerebelo é mais resistente aos efeitos da nicotina, provavelmente devido à baixa distribuição

de receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) nessa região. Os nAChRs são amplamente distribuídos no encéfalo com a seqüência decrescente de densidade: tálamo, gânglio basal, córtex cerebral e cerebelo (MCFARLAND e cols, 1991; SWAN e cols, 2007). Este também pode ser um possível mecanismo para explicar a resistência à fumaça do cigarro observada em nosso estudo. McFarland e cols (1991) avaliaram os efeitos da exposição aguda à nicotina na síntese de DNA em diferentes regiões do encéfalo – tronco encefálico, prosencéfalo e cerebelo – de ratos. Os animais receberam nicotina durante a gestação (18º dia) e no período pós-natal (3 e 10 dias após o nascimento). Os resultados demonstraram que a nicotina causa significativa diminuição da síntese de DNA e que essa alteração varia de acordo com a região analisada. O tronco encefálico e o prosencéfalo são sensíveis à nicotina nos diferentes períodos, enquanto o cerebelo apresenta redução da síntese de DNA apenas no período pós-natal e mesmo assim, essa alteração é menor quando comparado às demais estruturas.

Em todas as estruturas houve alteração do MDA apenas no grupo agudo, sugerindo que o desenvolvimento de mecanismos compensatórios, como a atividade das enzimas antioxidantes em resposta ao aumento da formação das espécies reativas de oxigênio, possa ser o responsável pela prevenção da produção do MDA nos animais expostos por 13 e 35 dias.

Produtos secundários da peroxidação lipídica podem atingir pontos distantes do local em que se formaram, já que são mais estáveis do que os radicais que iniciam o processo e os radicais lipídicos formados durante a fase de propagação (LOUREIRO e cols, 2002). O MDA é um agente alquilante com capacidade de se ligar covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, podendo levar a alterações nas funções dessas moléculas. Algumas

subclasses de GST podem metabolizar produtos secundários da peroxidação lipídica que são substâncias eletrofílicas, como isoprostanos, 4-hidroxinonenal e MDA (LOUREIRO e cols, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Nossos resultados indicam que a enzima GST é a primeira a apresentar alteração em resposta à exposição à fumaça do cigarro, fato confirmado pelo trabalho de Baskaran e cols (1999) e que condiz com a função de detoxificação da GST. As enzimas do ciclo das glutationas surgem mais tardiamente e, aparentemente, no caso da GST não ser capaz de estabilizar o tecido encefálico após este evento agressor. Possivelmente a ativação da GST impede a alteração na produção de MDA algumas horas após a exposição aguda à fumaça do cigarro, efeito que permanece durante a exposição crônica. Contudo, vale destacar que o MDA é rapidamente metabolizado nos tecidos de mamíferos. A enzima aldeído desidrogenase oxida o MDA à semialdeído ácido malônico, que é descarboxilado a acetaldeído, que, por sua vez, é oxidado também pela aldeído desidrogenase, à acetato (LOUREIRO e cols, 2002; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Tsuru-Aoyagi e cols (2009) observaram que camundongos de 21 dias submetidos a traumatismo crânio-encefálico apresentaram nitração protéica no hipocampo 24 horas após a lesão. Este resultado contrasta com o encontrado no córtex frontal de animais adultos, onde não há alteração na nitração protéica após 24 horas, mas somente 48 horas após a lesão. De acordo com os autores, essa diferença pode estar relacionada à idade dos animais ou às variações específicas de cada região no encéfalo. Os jovens são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo no encéfalo, devido ao alto teor de ácidos graxos e ao elevado consumo de oxigênio, que é proporcionalmente maior do que no adulto. Durante o desenvolvimento, as defesas antioxidantes são imaturas e não respondem ao

estresse oxidativo de mesma maneira que no encéfalo adulto (TSURU-AOYAGI e cols, 2009). Nossos resultados indicam que diferenças no padrão de alteração na nitração protéica devem-se principalmente, a variações de cada região do encéfalo, uma vez que não foi observada alteração em diferentes idades, mas sim, em diferentes estruturas. É possível que existam outros fatores que determinam *in vivo* o padrão da instabilidade da nitração protéica. Tsuru-Aoyagi e cols (2009) observaram que a superexpressão da GPx (animais transgênicos para GPx - GPxTg) resultou em uma redução na nitração protéica 24 horas após a lesão.

Existem poucos estudos avaliando as alterações na atividade enzimática provocadas pela exposição à fumaça do cigarro e não há consenso a respeito. Anbarasi e cols (2006a) demonstraram diminuição dos níveis de glutathione e diminuição significativa da atividade das enzimas SOD, GPx, GR e CAT além de intensa apoptose, medida pelo ensaio de TUNEL (detecção de fragmentos de DNA), no encéfalo total de ratos Wistar adultos expostos à fumaça lateral do cigarro por 12 semanas, duas vezes ao dia. Nesse estudo, cada exposição teve duração de 3 horas (ANBARASI e cols 2006b). Manna e cols (2006) observaram aumento das espécies reativas ao oxigênio e significativo aumento na peroxidação lipídica no córtex frontal, cerebelo, hipocampo e estriado em camundongos A/J adultos expostos à mistura de fumaça lateral e central por seis meses, 7 horas por dia, 7 dias por semana.

Por outro lado, Delibas e cols (2003) avaliaram os efeitos da fumaça do cigarro na peroxidação lipídica, nas enzimas antioxidantes – CAT, SOD e GPx – e na concentração das subunidades 2A e 2B de receptores NMDA no hipocampo de ratos Sprague-Dawley adultos. Os animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram aumento da concentração das subunidades 2A e 2B de receptores

NMDA, contudo, não houve alteração na peroxidação lipídica e nas enzimas antioxidantes no hipocampo desses animais.

Baskaran e cols (1999) também avaliaram os efeitos da fumaça do cigarro na peroxidação lipídica e em enzimas antioxidantes – CAT, SOD, GPx e GST – em ratos. Foi observado aumento na peroxidação lipídica no fígado, pulmão e rins dos animais expostos à fumaça do cigarro, enquanto não houve alteração no encéfalo e no coração. O mesmo ocorreu com as enzimas antioxidantes analisadas, com exceção da GST, que apresentou atividade elevada no encéfalo desses animais.

É importante destacar que todos os trabalhos apresentados referem-se a animais adultos e as variações nas respostas podem ser decorrentes dos diferentes protocolos, como o tempo e a intensidade da exposição à fumaça do cigarro. Uma importante informação para analisar estes resultados seria o intervalo de tempo entre a última exposição e a eutanásia, porém, nenhum trabalho menciona este dado. Assim, nosso estudo torna-se importante na medida em que avalia tanto o efeito da fumaça do cigarro imediatamente após a última exposição e em um intervalo de 3 horas. A avaliação do efeito agudo teve como objetivo verificar se, mesmo após exposições repetidas, os efeitos encontrados na eutanásia logo após a exposição não seriam decorrentes da última exposição. Verificamos que o padrão encontrado na ativação das enzimas após um período de exposição de 13 ou 35 dias foi diferente do observado após a exposição aguda, portanto, nossos resultados não refletem a última exposição. Vale ressaltar que, embora o SNC tenha se mostrado competente em relação às suas defesas antioxidantes, isso não significa que não haja danos ao seu desenvolvimento.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados indicam que:

- 1- Os animais expostos à fumaça do cigarro tiveram retardo no crescimento, já que apresentaram diminuição no ganho de peso. Além disso, pode-se observar efeito ansiolítico em 57% dos animais expostos por 13 dias ou uma possível adaptação ou influência de maturação do sistema neste comportamento, já que não houve alteração no grupo exposto por 35 dias.
- 2- O SNC em desenvolvimento é sensível à fumaça do cigarro. Entretanto, as alterações enzimáticas não são persistentes, grande parte desaparecendo três horas após a exposição aguda e por 13 dias.
- 3- Houve diferença no padrão de resposta à fumaça do cigarro entre as estruturas encefálicas estudadas.
- 4- A GST é a primeira enzima a ser ativada após exposição aguda, sendo que a exposição prolongada à fumaça do cigarro ativa as enzimas do ciclo das glutathionas, como a GPx e a GR, podendo comprometer os estoques de glutathiona.
- 5- A eutanásia realizada imediatamente após a exposição à fumaça do cigarro não reflete somente o efeito da última exposição, uma vez que o padrão encontrado na ativação das enzimas após um período de exposição de 13 ou 35 dias foi diferente do observado após exposição aguda.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abou-Seif MA. Blood antioxidant status and urine sulphate and thiocyanate levels in smokers. *J Biochem Toxicol*, 11:133-138, 1996.

Anbarasi K, Vani G, Balakrishna K, Shymala Devi CS. Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sci*, 2006a, 78:1378-1384.

Anbarasi K, Kathirvel G, Vani G, Jayaraman, G, Shymala Devi CS. Cigarette smoking induced heat shock protein 70 kDa expression and apoptosis in rat brain: modulation by bacoside A. *Neuroscience*, 2006b, 138:1127–1135.

Augusto O. Radicais livres: bons, maus e naturais. São Paulo: Oficina de Textos; 2006. 120p.

Banerjee R. Redox Biochemistry. Wiley; 2008. 318p.

Banzet N, François D, Polla BS. Tobacco smoke induces mitochondrial depolarization along with cell death: effects of antioxidants. *Redox Rep*. 1999, 4(5):229-36.

Baskaran, S., Lakshmi, S., Prasad, P.R. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. *Indian Journal of Experimental Biology*. 1999, 37:1196-1200.

- Bayer S A, Altman J, Russo R J, Zhang X.. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993, 14:83–144.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. Artmed. 2008. 896p.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol*, 1996, 271:1424-1437.
- Beutler, E.; West, C. Simplified determination of Carboxihemoglobin. *Clin. Chem.*, 1984, 30:871-874.
- Biselli PJC. *Efeito da exposição à fumaça de cigarro e ao resíduo de óleo diesel (ROFA) em pulmões de camundongos C57/Bl6*. 2008. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchen S, Land JM, Clark JB, et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem*, 1997, 68:2227-2240.
- 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.

- Broadhurst PL. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. *Fortschr Psychosom Med.* 1960, 1:63-9.
- Calberg, I.; Mannervik, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 1975, v. 250 (14):5475-5480.
- Cao, J. et al. Acetaldehyde, a Major Constituent of Tobacco Smoke, Enhances Behavioral, Endocrine, and Neuronal Responses to Nicotine in Adolescent and Adult Rats. *Neuropsychopharmacology.* 2007, 32:2025-2035.
- Carvalho LMT; Pereira EDB. Morbidade respiratória em crianças fumantes passivas. *J. Pneumologia*, 2002, 28(1): 8-14.
- Chen PX, Moldoveanu SC. Mainstream smoke chemical analyses for 2R4F Kentucky reference cigarette. *Contributions to tobacco research.* 2003, 20(7)448-458.
- Chen, H. et al. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology.* 2005, 30:713-719.
- Church DF, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985, 34:111-126.

- Delibas, N., Ozcankaya, R., Altuntas, I., Sutcu, R. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation, antioxidant enzymes and NMDA receptor subunits 2A and 2B concentration in rat hippocampus. *Cell Biochemistry and Function*. 2003, 21: 69-73.
- Dourado DFAR, Fernandes PA, Mannervik B, Ramos MJ. Glutathione Transferases: New Model for Glutathione Activation. *Chem. Euro. J*. 2008, 31:9591-9598.
- Dubick MA, Keen CL. Influence of nicotine on tissue trace element concentration and tissue antioxidant defense. *Biol Trace Elem Res*, 1991, 31:97-109.
- Dwyer J B, Broide R S, Leslie F M Nicotine and Brain Development. *Birth Defects Research (Part C)* 2008, 84:30-44.
- Dwyer, JB, McQuown, SC, Leslie, FM. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. *Pharmacology and Therapeutics*. 2009, in press.
- Ellis NI, Lloyd B, Lloyd RS, Clayton BE. Selenium and vitamine E in relation t risk factors for coronary heart disease. *J Clin Pathol*, 1984, 37:200-206.
- Flohé L, Günzler WA. Assays of glutathione preoxidase. *Methods Enzymol*. 1984, 105:114-21.
- Floyd RA. Antioxidants, oxidative stress, and degenerative neurological disorders. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 222:236-245.

Frankish, H. M. et al. Nicotine administration reduces neuropeptide Y and neuropeptide Y mRNA concentrations in the rat hypothalamus: NPY may mediate nicotine's effects on energy balance. *Brain Research*. 1995, 694:139-146.

Gaworski CL, Carmines EL, Faqi AS, Rajendran N. In Utero and Lactation Exposure of Rats to 1R4F Reference Cigarette Mainstream Smoke: Effect on Prenatal and Postnatal Development. *Toxicological Sciences*. 2004, 79:157-169.

Governo de São Paulo – Lei anti fumo, 2009 www.leiantifumo.sp.gov.br

Habig, W. H.; Pabst, M. J.; Jakoby, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 1974, v. 249 (22):7130-7139.

Halliwell B; Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. University Press, Oxford, NY. 2007

INCA – Instituto Nacional de Câncer; FALANDO SOBRE TABAGISMO, 2006 – www.inca.gov.br

INCA – Instituto Nacional de Câncer; Mortalidade atribuível ao tabagismo passivo na população urbana do Brasil, 2008 www.inca.gov.br

INCA – Instituto Nacional de Câncer; Advertências Sanitárias nas Embalagens dos Produtos de Tabaco, 2009 – www.inca.gov.br

Ischiropoulos H, Al-Mehdi AB. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. *FEBS Lett*, 1995, 364:279-282.

Ischiropoulos H. Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298:431-437.

Jacobson M. Formation of dendrites and development of synaptic connections. In: *Developmental Neurobiology*. New York: Plenum Press, 1991; 223-284.

Jaimes EA, DeMaster EG, Tian R-X, Raj L. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24:1031-1036.

Jo, Y. H.; Talmage, D. A.; Role, L. W. Nicotinic Receptor-Mediated Effects on Appetite and Food Intake. *J Neurobiol*. 2002, 53(4): 618–632.

Jordão-Jr AA, Chiarello PG, Bernardes MSM, Vannucchi H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina, Ribeirão Preto*, 1998, 31:434-449.

- Kocyigit A, Erel O, Gur S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clin Biochem*, 2001, 34:629-633.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-5.
- Lesgards JF, Durand P, Lassarre M, Stocker P, Lesgards G, Lanteaume A, Prost M, Lehucher-Michel MP. Assessment of lifestyle effects on the overall antioxidant capacity of healthy subjects. *Environ Health Perspect*, 2002, 110:479-86.
- Li, M. D. et al. Nicotine administration enhances NPY expression in the rat hypothalamus. *Brain Research*. 2000, 867:157–16.
- Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 1993, 364:626-632.
- Lykkesfeldt J, Viscovich M, Poulsen HE. Ascorbic acid recycling in human erythrocytes is induced by smoking in vivo. *Free Rad Biol Med*, 2003, 35:1439-1447.
- Loureiro APM, Di Mascio P, Medeiros MHG. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Quim. Nova*, 2002, 25(5):777-793.

Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*, 2001, 32:367-381.

Malheiro, ACCGC. *Determinação espectrofotométrica da carboxihemoglobina em indivíduos expostos ocupacionalmente ao monóxido de carbono*. 1991. 125p. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

Manna SK, Rangasamy T, Wise K, Sarkar S, Shishodia S, Biswal S, Ramesh GT. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor-kappa B, activator protein-1, and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochem Pharmacol*, 2006.

Maranzana A, Mehlhorn RJ. Loss of glutathione, ascorbate recycling and free radical scavenging in human erythrocytes exposed to filtered cigarette smoke. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 350:169-182.

Markesberry WR. The role of oxidative stress in Alzheimer Disease. *Arch Neurol*, 1999, 56:1449-1452.

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 2006, 3(11):442.

- McCord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. I. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem*, 1969, 244:6056-63.
- McFarland, B.J., Seidler, F.J., Slotkin, T.A., Inhibition of DNA synthesis in neonatal rat brain regions caused by acute nicotine administration. *Dev. Brain Res.* 1991 58, 223-229.
- Mello, P. R. B. et al. Avaliação de um sistema de exposição tabágica passiva em modelo experimental utilizando cotinina e carboxiemoglobina como marcadores de exposição. *Pulmão*, Rio de Janeiro, 2005, 14(3):228-236.
- MELO RPA. Estudos visando a síntese de híbridos de tocoferol com ácido ascórbico. 2003. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ. 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*, 1995, 332:1198-1203.
- Moura-Ribeiro, M. V. L. e Gonçalves, V. M. G. Neurologia do Desenvolvimento da Criança. 1^oEd. Rio de Janeiro: *Revinter*, 2006, 109-130.

OMS – Organização mundial da saúde; International Consultation on Environmental Tobacco Smoke and Child Health, 1999.

OMS – Organização Mundial da Saúde; Relatório sobre a Epidemia Global de Tabagismo: Pacote MPOWER, 2008.

OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde, 2004 – www.opas.org.br

Paulson RB, Shanfeld J, Vorhees CV, Cole J, Sweazy A, Paulson JO. Behavioral effects of smokeless tobacco on the neonate and young Sprague Dawley rat. *Teratology*. 1994, 49(4):293-305.

Piao WH, Campagnolo D, Dayao C, Lukas RJ, Wu J, Shi FD. Nicotine and inflammatory neurological disorders. *Acta Pharmacol Sin*. 2009, 30(6): 715-22.

Picciotto MR, Zoli M. Neuroprotection via nAChRs: the role of nAChRs in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's disease. *Front Biosci*. 2008 (1)13:492-504.

Pinto MFT. *Custos de Doenças Tabaco - Relacionadas: uma análise sob a perspectiva da economia e da epidemiologia*. 2007. 223p. Tese de Doutorado. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

- Precioso J, Lopez MJ, Calheiros JM, Macedo M, Ariza C, Sanchez F, Schiaffino A, Fernández E, Nebot M. Poluição do ar interior provocada pelo fumo do cigarro em locais públicos de Portugal. *Rev Saúde Pública* 2007, 41(5):808-13.
- Pryor, W.A., Stone, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993, 686:12-27.
- Qiao, D., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. Oxidative mechanisms contributing to the developmental neurotoxicity of nicotine and chlorpyrifos. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005, 206:17-26.
- Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition* 2005, 21:775–777.
- Raj L, DeMaster EG, Jaimes EA. Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *J Hypertens*, 2001, 19:891-897.
- Reddy S, Finkelstein EI, Wong PS-Y, Phung A, Cross CE, van der Vliet A. Identification of glutathione modifications by cigarette smoke. *Free Rad Biol Med*, 2002, 33:1490-1498.
- Rice, D.; Barone Jr, S. Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. *Environmental Health Perspectives*, 2000, 108:511-533.

Rosemberg J. *Nicotina: Droga Universal*. 2004. 239p.

Rover Jr L, Höehr NF, Vellasco AP, Kubota LT. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Quim. Nova*, 2001, 24:112-119.

Simonian NA, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1996, 36:83-106.

Slotkin TA, Ryde IT, Seidler FJ. Separate or sequential exposure to nicotine prenatally and in adulthood: persistent effects on acetylcholine systems in rat brain regions. *Brain Res Bull.* 2007, 74(1-3):91-103.

Slotkin TA. Cholinergic systems in brain development and disruption by neurotoxicants: nicotine, environmental tobacco smoke, organophosphates. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004, 198:132-151.

Slotkin, T.A., Greer, N., Faust, J., Cho, H., Seidler, F.J. Effects of maternal nicotine injections on brain development in the rat: ornithine decarboxylase activity, nucleic acids and proteins in discrete brain regions. *Brain Res.* 1986, 17:41-50.

Sobczak A, Golka D, Szoltysek-Boldys I. The effects of tobacco smoke on plasma alpha- and gamma-tocopherol levels in passive and active cigarette smokers. *Toxicol Lett*, 2004, 151:429-437.

Soiza-Reilly M, Azcurra JM. Developmental striatal critical period of activity-dependent plasticity is also a window of susceptibility for haloperidol induced adult motor alterations. *Neurotoxicol Teratol*. 2009, 31(4):191-7.

Souza Cruz – Marcas Líderes; 2008 www.souzacruz.com.br

Souza Cruz – Teores do Cigarro; 2009 www.souzacruz.com.br

Suemaru K, Oishi R, Gomita Y, Saeki K, Araki Y. Effect of long-term cigarette smoke exposure on locomotor activity and brain monoamine levels in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1992, 41(3):655-8.

Swan GE, Lessov-Schlaggar CN. The effects of tobacco smoke and nicotine on cognition and the brain. *Neuropsychol Rev*. 2007, 17(3):259-73.

Takeuchi H, et al. Nicotinic receptor stimulation protects nigral dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease models. *J Neurosci Res*. 2009, 87(2):576-85.

Theriault A, Chao JT, Wang Q, Gapor A, Adeli K. Tocotrienol: a review of its therapeutic potential. *Clin Biochem*. 1999 32(5):309-19.

Tsuru-Aoyagi K, Potts MB, Trivedi A, Pfankuch T, Raber J, Wendland M, Claus C, Koh SE, Ferriero D, Noble-Haeusslein LJ. Glutathione peroxidase activity

modulates recovery in the injured immature brain. *Ann Neurol.* 2009, 65(5):540-549.

Vannuchi H, Moreira EAM, Cunha DF, Junqueira-Franco MM, Bernardes MM, Jordão-Jr AA. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. *Medicina, Ribeirão Preto*, 1998, 31:31-44.

ANEXO 1

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 18.04.07, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0216/07**, intitulado: **"EFEITOS DA INALAÇÃO DA FUMAÇA DO CIGARRO SOBRE O ESTRESSE OXIDATIVO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS JOVENS"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Profª. Drª. Thais Mauad**

Pesquisador (a) Executante: **Larissa Helena Lobo Torres**

CAPPesq, 18 de abril de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Comissão de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA nº 34/2007

São Paulo, 11 de junho de 2007.

Ilmo(a) Sr(a).
Larissa Helena Lobo Torres
Orientador: Prof. Tania Marcourakis
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 11 de junho, **APROVOU** o projeto "Efeitos da inalação da fumaça do cigarro sobre o estresse oxidativo no sistema nervoso central de camundongos jovens" (Protocolo CEEA nº 152), apresentado por Vossa Senhoria, e solicita apenas a correção do item 7f do formulário.

Sendo o que nos cumpre, reiteramos protestos de estima e consideração.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da CEEA