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

Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em um modelo
de inflamação sistêmica

Ana Carolina Cardoso Dos Santos Durão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo

2014

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

Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em um modelo
de inflamação sistêmica

Versão Corrigida

Ana Carolina Cardoso Dos Santos Durão

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador: Profa. Dra. Tania Marcourakis

São Paulo
2014

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

Durão, Ana Carolina Cardoso dos Santos
D951e Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em
um modelo de inflamação sistêmica / Ana Carolina Cardoso
dos Santos Durão. -- São Paulo, 2014.
95p.

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

Orientador: Marcourakis, Tania

1. Toxicologia experimental 2. Tabaco 3. Sistema nervoso
central 4. Inflamação I. T. II. Marcourakis, Tania, orientador.

615.90028 CDD

Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão

Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em um modelo
de inflamação sistêmica

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Tania Marcourakis
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

São Paulo, _____ de 2014.

Dedico este trabalho a todos que acreditaram na sua realização, e que de alguma forma foram responsáveis para que eu possa finalizar mais esta etapa da minha vida!
Muito Obrigada!

*“A vida é uma peça de teatro
que não permite ensaios.
Por isso, cante, chore,
dance, ria e viva
intensamente, antes que a
cortina se feche e a
peça termine sem aplausos.”*

(Charles Chaplin)

À minha mãe por toda força, garra e aprendizado durante todos esses anos, obrigado por me ensinar a ser um pouco como você.

Ao meu irmão, obrigado por me fazer rir nos momentos de maior tensão, mas acima de tudo obrigado por estar ao meu lado durante todo esse tempo, sem a sua ajuda nada disso seria possível!!

Ao meu pai, obrigado pela companhia nos finais de semana de muita luta e fumaça!

Aos meus avós, obrigado pelo carinho e momentos de risada entre uma “cosquinha” e outra!

*Ao meu companheiro de jornada Wesley,
obrigada pela compreensão durante toda esta
etapa, por me mostrar que caminhar junto é
muito mais fácil que separado, e que as coisas
podem não ser tão complicadas quanto parecem
à primeira vista. Sem sua ajuda este trabalho
não chegaria ao fim.*

Te amo!!

Á Tania,

Quando entrei pela primeira vez na sua sala, soube que era ali que queria ficar. Sua compreensão e ensinamentos foram fundamentais para que eu fosse capaz de me sentir segura para caminhar com as minhas próprias pernas.

Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório e acreditado que uma aluna de IC poderia virar uma Mestre!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara, por ter aberto as portas de seu laboratório para que um novo grupo se iniciasse.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, por todo o conhecimento difundido, por todas as ideias trocadas, pelo carinho e pela amizade, mas principalmente pelo exemplo a ser seguido.

Aos doutores Raphael Caio Tamborelli Garcia e Larissa Helena Lobo Torres, por serem meus mentores, meus amigos e muitas vezes meus confidentes! Vocês com certeza fizeram a diferença.

Aos meus amigos Wallace, Sayuri, Mariana e Livia por todo companheirismo, conversas e auxílios nos momentos de desespero.

À Natália Lopez, Michelle e Eduarda, agradeço o carinho e a dedicação com que trataram toda a nossa jornada juntas, foi muito bom ter vocês ao meu lado.

À Natália Trigo, Natália Novo, Stephanie, Anne, Priscila, Fabiana, André, Anax, Tiago, Sara, Luma, Bia, Menk, Lorena, Carine, Zeca, Isabel, Leonard, Erick, Ana, meus companheiro na luta diária da pós-graduação, obrigado por dividirem a loucura comigo.

À Andira, Cristhiano, Verônica e Juliana, por me tornarem a agregada do grupo, me acolhendo com todo carinho.

À Profa. Dra. Carolina Munhoz e ao aluno Nilton pela ajuda na realização das técnicas de Western Blot e Imunofluorescência.

À Profa. Dra. Thais Mauad, pela constante colaboração ao disponibilizar os animais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Yonamine, e a mestre Cíntia Mantovani pela ajuda nos ensaios de cotinina e nicotina.

Ao centro de pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein pela ajuda na realização da técnica de Real Time PCR.

Ao CETEC e seus funcionários, pelo apoio no cuidado com os animais.

Ao Ângelo, pelo cuidado e carinho durante toda esta jornada.

As novas amigas Nancy e Samantha, por todas as conversas, ajuda e apoio nos momentos mais difíceis.

À “Tia Lu”, seus cafezinhos fazem milagre nos dia mais complicados.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com:

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. **Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: Documento eletrônico e impresso. Parte I (ABNT)**. Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Eliana Maria Garcia, Maria Alice de França Rangel Rebello, Maria Aparecida Bezerra Ayello, Maria José de Jesus Carvalho, Maria Marta Nascimento, Rosana Alvarez Paschoalino, Suely Campos Cardoso, Valéria de Vilhena Lombardi. 2. ed. rev. ampl. 102 p. (Cadernos de Estudos; 9). São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2009.

RESUMO

Durão, A.C.C.S., **Efeito da fumaça do cigarro no sistema nervoso central em um modelo de inflamação sistêmica**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O Tabagismo é uma das principais causas de doenças crônicas não transmissíveis, afetando cerca de 1,6 bilhões de pessoas até 2030. Políticas de controle do tabagismo foram criadas para evitar a contaminação de indivíduos não fumantes pela poluição tabagística ambiental. Descritas principalmente no pulmão, pouco se sabe sobre a ação da fumaça do cigarro no sistema nervoso central (SNC). O presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro, por 15 dias consecutivos, em um processo de inflamação sistêmica induzida por LPS. Para tanto, camundongos C57BL/6 foram expostos a uma mistura de fumaça central e lateral do cigarro referência 3R4F (Universidade de Kentucky, EUA). No último dia, os animais foram desafiados com LPS iv. (0,1 µg/animal) ou salina, formando os grupos CO – controle, FU – fumaça do cigarro, LPS – desafio com LPS e FPS – fumaça do cigarro e desafio com LPS. As amostras foram processadas de maneira a realizar as análises de RT-PCR para os primers IL-6, IL-1 β , TNF- α , TLR2, TLR4 e iNOS, além da dosagem por ELISA das citocinas IL-6, IL-10, IL-1 β e TNF- α e *western blot* para a proteína P65. Nossos resultados demonstraram um aumento da transcrição dos genes TLR2, TLR4 e iNOS, em todas as estruturas analisadas no período de 2 horas de eutanásia após o desafio com LPS no grupo FPS em relação a todos os outros grupos estudados. Já no período de 4 horas após o desafio foi possível observar um aumento dos genes IL-1 β e TNF α em ambos grupos que receberam o desafio com o LPS no hipocampo, estriado, córtex e cerebelo, sugerindo que a influência da fumaça do cigarro se de apenas 2 horas após o desafio, uma vez que no período de 4 horas observamos apenas o efeito do LPS. Os resultados da dosagem de citocinas sugerem que, no período de 4 e 6 horas após o desafio, a citocina anti-inflamatória IL-10 está diminuída no hipocampo e no córtex pré-frontal no grupo FPS em relação a todos os outros grupos estudados. Porém é possível observar um aumento estatisticamente significativo da mesma citocina no cerebelo para o grupo exposto apenas à fumaça do cigarro. Nossos dados sugerem que o processo inflamatório no SNC ocorra de maneira diferenciada dependendo da região estudada, e do período analisado.

Palavras Chave: Fumaça do cigarro, Sistema Nervoso Central, Inflamação

ABTRACT

Durão, A.C.C.S., **Effect of cigarette smoke on the central nervous system in a model of systemic inflammation**. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Cigarette smoking is a major cause of chronic non-communicable diseases, affecting approximately 1.6 billion people up to 2030. Tobacco control policies were created in order to prevent contamination of non-smokers by environmental tobacco smoke. Described primarily in the lung, little is known about the action of cigarette smoke in the central nervous system (CNS). The present study aims to evaluate the effects of cigarette smoke exposure for 15 consecutive days in a process of systemic inflammation induced by LPS. To this so, C57BL/6 mice were exposed to a mixture of mainstream and sidestream cigarette smoke reference 3R4F (University of Kentucky, USA). In the last day, animals were challenged with LPS iv. (0.1 µg/animal) or saline and divided into the following groups: CO - control, FU - cigarette smoke, LPS - LPS challenge and FPS - cigarette smoke and LPS challenge. The samples were processed in order to perform the RT-PCR analysis for IL-6, IL-1β, TNF-α, TLR2, TLR4 and iNOS primers, ELISA assay of IL-6, IL-10, IL-1β and TNF-α and western blot for p65. Our results showed an increase in transcription of TLR2, TLR4 and iNOS genes in all structures analyzed within 2 hours of euthanasia after LPS challenge in the FPS group compared to all other groups. Beside this 4 hours after challenge was observed an increase of IL-1β and TNF genes in both groups that received the challenge with LPS in the hippocampus, striatum, cortex and cerebellum, suggesting that the influence of cigarette smoke can be observed only 2 hours after the challenge, justified since in a time period of 4 hours we can only observe the effect of LPS. The results suggest that cytokine assay, between 4 and 6 hours after challenge, the anti-inflammatory cytokine IL-10 is decreased in FPS group in the hippocampus and prefrontal cortex. But it is possible to observe a statistically significant increase in the same cytokine in the cerebellum exposed only to cigarette smoke group. Our data suggest that the inflammatory process in the CNS occurs differently depending on the region studied, and the period analyzed.

Key words: Tobacco smoke, Central Nervous System, Inflammation

LISTA DE ABREVIATURAS

BALF- Lavado Bronco Alveolar

BHE – Barreira Hematoencefálica

CE – Cerebelo

COHb - Carboxihemoglobina

Cx – Córtex Frontal

DAMPs – Padrões Moleculares Associados ao Dano

DCNT – Doença crônica não transmissível

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

ES – Estriado

HP - Hipocampo

I.V. – intravenoso

IARC – *International Agency for research on cancer*

IL- Interleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

iNOS – Oxido nítrico sintase induzível

LBP- LPS Binding Protein

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC II – Complexo de histocompatibilidade

MS – Ministério da Saúde

NF-κB – Fator nuclear κB

NOS – Oxido Nítrico Sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPAS – Organização Pan Americana de Saúde

PAMPs – Padrões moleculares associados a patógenos

PPRs – Receptor de reconhecimento padrão

PTA – Poluição Tabagística Ambiental

RNA – Ácido ribonucleico

SNC – Sistema Nervoso Central

Th – T helper

TLRs – *Toll like receptor*

TNF α – Fator de Necrose Tumoral

UNODOC – *United Nations Office on Drugs and Crime*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Prevalência do consumo de álcool, tabaco e drogas ilícitas no ano de 2010 nos Estados Unidos. Distribuição etária (UNODC, 2012).....	21
Figura 2: Via de ativação do NF- κ B.	27
Figura 3: Ilustração da interação entre neurônios, astrócito e microglia no SNC em condições normais (A) e patológicas (B). Adaptado de: TIAN <i>et al.</i> , 2012.....	32
Figura 4: Câmara de exposição à fumaça do cigarro (TORRES <i>et al.</i> , 2012) ..	38
Figura 5: Dosagem da citocina TNF α em plasma de camundongos C57BL/6 desafiados ou não ao lipopolissacarídeo (LPS) i.v. e eutanasiados 90 minutos após o desafio.....	49
Figura 6: <i>Real Time</i> PCR do hipocampo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio.	52
Figura 7: <i>Real Time</i> PCR do hipocampo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio.	53
Figura 8: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no hipocampo de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio.....	54
Figura 9: Quantificação da proteína P65 pela técnica de <i>Western Blot</i> , no hipocampo de camundongos após desafio com LPS iv..	55
Figura 10: <i>Real Time</i> PCR do estriado após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio.	57
Figura 11: <i>Real Time</i> PCR do estriado após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio.	58
Figura 12: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no estriado de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio.....	59
Figura 13: Quantificação da proteína P65 pela técnica de <i>Western Blot</i> , no estriado de camundongos após desafio com LPS iv..	60
Figura 14: <i>Real Time</i> PCR do córtex pré-frontal após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio.	62
Figura 15: <i>Real Time</i> PCR do córtex pré-frontal após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio.	63

Figura 16: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no córtex pré-frontal de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio.....	64
Figura 17: Quantificação da proteína P65 pela técnica de <i>Western Blot</i> , no córtex pré-frontal de camundongos após desafio com LPS iv.	65
Figura 18: <i>Real Time</i> PCR do cerebelo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio.	68
Figura 19: <i>Real Time</i> PCR do cerebelo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio.	69
Figura 20: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no cerebelo de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio.....	70
Figura 21: Quantificação da proteína P65 pela técnica de <i>Western Blot</i> , no cerebelo de camundongos após desafio com LPS iv.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Constituintes do cigarro padronizado 3R4F da Universidade de Kentucky.....	38
Tabela 2: Determinação da concentração de CO durante a exposição, de COHb em sangue total e de cotinina e nicotina no plasma dos animais expostos	48

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1.	Tabagismo.....	20
1.1.1.	Epidemiologia	20
1.1.2.	Fumo passivo	21
1.1.3.	Fumaça do Cigarro	22
1.2.	O sistema imune.....	24
1.2.1.	Receptores de reconhecimento padrão.....	25
1.2.2.	O mediador transcricional NF-κB.....	26
1.2.3.	Mediadores inflamatórios	28
1.3.	Fumaça do cigarro e inflamação	32
2.	OBJETIVOS	35
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.	PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO.....	37
3.2.	DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS	39
3.3.	PCR EM TEMPO REAL	42
3.4.	<i>Western Blot</i>	44
3.5.	DOSAGEM DE CITOCINAS	45
3.6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
3.7.	COMITÊ DE ÉTICA	46
4.	RESULTADOS	48
4.1.	MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA E AMBIENTAL	48
4.2.	PADRONIZAÇÃO DO DESAFIO AO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS).....	48
4.3.	<i>REAL TIME</i> PCR, <i>WESTERN BLOT</i> E ELISA	49
4.3.1.	HIPOCAMPO.....	50
4.3.2.	ESTRIADO	56
4.3.3.	CÓRTEX PRÉ- FRONTAL	61
4.3.4.	CEREBELO	66
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÕES	80
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	82

8.	ANEXOS	89
8.1.	Ficha do aluno	89
8.2.	Comitê de Ética FMUSP.....	91
8.3.	Comitê de Ética FCFUSP.....	92

Introdução

1.INTRODUÇÃO

1.1.Tabagismo

1.1.1. Epidemiologia

O último relatório anual de drogas das nações unidas (UNODC, 2012) demonstrou que o uso do tabaco tem crescido em países em desenvolvimento e declinado em países desenvolvidos.

Estudo realizado pela OMS em 2002 relaciona o uso de drogas com aproximadamente 200 mil mortes por ano, levando ao resultado de 11,2 milhões de “anos de vida” perdidos, sendo 5 anos para cada 100 usuários de tabaco.

Ainda segundo a OMS (2008), 61% de todas as mortes ocorridas no mundo em 2005 foram causadas por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). O mesmo padrão pode ser observado no Brasil. O tabagismo é um dos fatores agravantes para DCNT e por isso representa um grande problema de saúde pública, uma vez que aumenta o risco de hipertensão arterial, acidente vascular cerebral, doenças coronarianas, entre outros.

Estima-se que entre 2000 e 2030 o número de fumantes passará de 1,2 bilhões para 1,6 bilhões, sendo que o número de mortes atribuíveis ao tabagismo aumentará de 4,9 para 10 milhões neste período (OMS, 2008).

Conforme relatório da UNODC (2012), estudo realizado nos EUA demonstrou que o uso do tabaco tem seu início por volta dos 18-25 anos juntamente com o álcool, sendo ambos um hábito duradouro como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1: Prevalência do consumo de álcool, tabaco e drogas ilícitas no ano de 2010 nos Estados Unidos. Distribuição etária (UNODC, 2012)

O reconhecimento de que a expansão do tabagismo é um problema mundial fez com que, em maio de 1999, durante a 52^a Assembleia Mundial da Saúde (AMS), os Estados Membros das Nações Unidas propusessem a adoção do primeiro tratado internacional de saúde pública da história da humanidade, negociado sob os domínios da OMS: a Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco.

Esse tratado articula um grupo de ações baseadas em evidências para responder à globalização da epidemia do tabagismo, onde se tem por objetivo “proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco, proporcionando uma referência para as medidas de controle do tabaco a serem implementadas pelas partes nos níveis regional, nacional e internacional, a fim de reduzir de maneira contínua e substancial a prevalência do consumo e a exposição à fumaça do tabaco” (MS – CQCT, 2011).

1.1.2. Fumo passivo

A principal diretriz da Convenção-Quadro para o Controle do Tabaco é a diminuição da exposição ao fumo passivo, que é definido como a inalação da fumaça

de derivados do tabaco, como cigarros e charutos, por indivíduos não fumantes em ambientes fechados. Esta fumaça é denominada poluição tabagística ambiental (PTA) (INCA 2011; IARC 2002).

A criança é o principal fumante passivo em residências de tabagistas, porém, não é a única afetada. O feto é suscetível às consequências imediatas e tardias de uma gestante fumante, uma vez que os elementos presentes na circulação materna podem atravessar a placenta. Os recém-nascidos, além de inalarem a fumaça do cigarro, são expostos aos componentes da mesma por meio do leite materno (SALMÓRIA; OLIVEIRA, 2006).

Segundo o Instituto nacional do câncer (INCA), o fumante passivo sofre os efeitos imediatos da PTA, tais como irritação nos olhos, manifestações nasais, tosse, cefaleia, entre outros, além dos efeitos a médio e longo prazo, sendo os principais: redução da capacidade funcional respiratória, aumento do risco de aterosclerose, doença pulmonar obstrutiva crônica e câncer de pulmão, boca e laringe, além de câncer de mama em mulheres pré-menopáusicas (OPAS, 2008).

1.1.3. Fumaça do Cigarro

A fumaça do cigarro foi identificada com mais de 4.700 substâncias e é composta por uma fase particulada, constituída principalmente de nicotina, alcatrão e água, e por uma fase gasosa, que representa 90% da fumaça e é composta principalmente por monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio e cianetos (MELLO *et al.*, 2005).

A PTA é formada pela fumaça central e a fumaça lateral. A fumaça central, exalada após a tragada, passa primeiramente pelos filtros do cigarro e pelos pulmões do fumante, e sua queima ocorre em temperaturas próximas a 950°C, representando 15% da fumaça ambiental. A fumaça lateral é gerada por meio da queima lenta do cigarro em temperaturas mais baixas que a central (350°C), sendo a grande responsável pela PTA, uma vez que constitui 85% de toda a atmosfera tabagista (MELLO *et al.*, 2001, MELLO *et al.*, 2005, SALMÓRIA, OLIVEIRA, 2006).

A fumaça central é a principal fonte de exposição do fumante ativo, que absorve a maior parte da nicotina, sendo esta concentração variável de acordo com a composição de cada cigarro, a taxa de consumo e os hábitos de cada fumante (frequência de tragada, profundidade da inalação e duração). Vale ressaltar que o fumante ativo é capaz de controlar de maneira eficiente a “nicotinemia”, ou seja, a concentração de nicotina no sangue, de acordo com os efeitos psicofarmacológicos desejados (MELLO *et al.*, 2005).

A fumaça lateral é mais prejudicial que a fumaça central, uma vez que não passa nem pelo filtro do cigarro nem pelo pulmão dos fumantes ativos, além de ser formada por uma combustão incompleta, o que faz com que ela seja composta por maiores quantidades de substâncias tóxicas e carcinogênicas, apresentando concentrações de nicotina, alcatrão e monóxido de carbono de duas a dez vezes mais elevadas que na fumaça central (MELLO *et al.*, 2005; OPAS, 2008).

A composição de cada cigarro varia de acordo com o tipo de folha de tabaco empregada, além de sua manufatura, região de plantio e das técnicas de processamento e fermentação utilizadas, fazendo com que cada cigarro queime de uma maneira particular e produza uma fumaça com diferentes proporções de elementos (MELLO *et al.*, 2001).

Alguns componentes da fumaça do cigarro se destacam quando relacionados em estudos toxicológicos. É o caso, por exemplo, da amônia, componente de maior irritabilidade da fumaça do cigarro e responsável pela alcalinização da fumaça levando ao aumento da absorção da nicotina, o que facilita o processo de dependência (INCA, 2011). Outro exemplo a ser citado são os componentes lipofílicos como a nicotina e o benzeno, que possuem alta taxa de permeabilidade na barreira hematoencefálica (BHE), facilitando, desta forma, sua entrada no sistema nervoso central (SNC) (DUARTE *et al.*, 2006; INCA, 2011).

Estudos demonstram que a exposição à fumaça do cigarro é capaz de levar a alterações inflamatórias no pulmão, como, por exemplo, aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-1 β), além de levar ao aumento de células inflamatórias no lavado bronco alveolar (BALF), compostas principalmente por monócitos e macrófagos (MILLER *et al.*, 2002; THATCHER *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010; SIMONE *et al.*, 2011).

1.2. O sistema imune

1.2.1. Conceitos Básicos

Imunidade é um conceito antigo e pode ser definido como a resistência a substâncias estranhas, sejam elas micro-organismos e macromoléculas como proteínas e polissacarídeos. O sistema imune é o responsável por formular a resposta coordenada de seus componentes a fim de eliminar estes patógenos, bem como proporcionar um estado de resistência à reinfecção pelo mesmo. Outro ponto a ser destacado é a sua importância na manutenção da homeostase, seja atuando no reparo tecidual ou até mesmo nos processos de aprendizagem e plasticidade neuronal (Calich e Vaz, 2009; TIAN *et al.*, 2012).

O sistema imunológico dos mamíferos pode ser didaticamente separado em duas etapas. A primeira é conhecida como *Resposta Imune Inata*, a qual funciona como um sensor do organismo, sendo capaz de reconhecer agentes externos por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), assim como fatores intrínsecos desencadeados por morte celular, em que são reconhecidos os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Tal resposta apresenta baixa especificidade e ação imediata, compreendendo fatores celulares, tais como neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e células dendríticas; fatores físicos e químicos, como epitélio e pH gástrico; e fatores humorais, como o sistema complemento e defensinas (SEHGAL *et al.*, 2000; ABBAS *et al.*, 2011).

A *Resposta Imune Adaptativa* consiste em mecanismos mais específicos, cuja magnitude e capacidade de defesa aumentam após cada exposição ao patógeno pelo processo de memória imunológica. Neste caso, há linfócitos diferenciados circulantes e não circulantes, que são ativados na presença de antígenos específicos, respondendo com uma maior velocidade. Dentre os mecanismos envolvidos neste tipo de resposta, merecem destaque as ações celulares, desencadeadas pelos linfócitos T, e humorais, pelos plasmócitos com a secreção de anticorpos (ABBAS *et al.*, 2011). O reflexo da resposta imune, seja ela inata ou adquirida, se encontra no processo inflamatório.

A inflamação pode ser definida como um processo pelo qual os leucócitos e as proteínas plasmáticas circulantes infiltram o sítio danificado, são ativados e iniciam o processo de ataque ao agente invasor ou reparo tecidual, sendo a grande responsável pela homeostase do organismo. Ela representa a principal manifestação clínica da resposta imune inata e possui como sinais cardinais a dor, o rubor, o calor, o tumor e, em determinados casos, a perda de função (SEHGAL *et al.*, 2000; ZIPP e AKTAS, 2006; ABBAS, 2011).

As células como macrófagos e mastócitos residentes são responsáveis pela produção e liberação de uma variedade de fatores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e aminas vasoativas, mas para que isto ocorra é necessário o reconhecimento das PAMPs por meio dos receptores da imunidade inata, como os TLRs, dando início ao processo inflamatório (LIBBY, 2007; MEDZHITOV, 2008; KUMAGAI *et al.*, 2008; MEDZHITOV E HORNG, 2009; KAWAI, AKIRA 2009).

1.2.1. Receptores de reconhecimento padrão

Descrito primeiramente em drosófilas, os receptores de reconhecimento padrão (PPRs) são capazes de distinguir “self” do “non-self” e assim ativar as células do sistema imune, como os macrófagos e as células dendríticas. Seus produtos de reconhecimento são conhecidos como PAMPs e variam entre lipídeos, proteínas, lipoproteínas, açúcares e ácidos nucleicos (MEDZHITOV *et al.*, 1997, KAWAI, AKIRA 2009, YOKOTA *et al.*, 2010).

Existem 3 tipos básicos desses receptores: os *RIG-I-like* (RLRs), que constituem os receptores gene 1 ácido retinoico induzível (RIG-1) e os genes associados à diferenciação de melanoma (MDA5); os receptores *nucleotide binding-oligomerization domain (NOD)-like* que compõe principalmente os receptores NOD1, NOD2, NALP3 e os *Toll like receptors* (TLRs), os quais até o momento foram descritos 13 na espécie humana (KAWAI, AKIRA 2009; Calich e Vaz, 2009; YOKOTA *et al.*, 2010).

O primeiro receptor TLR a ser descrito em humanos foi o TLR4 pelo grupo de Medhiztov em 1997, em função de sua similaridade com o receptor “*Toll*” encontrado

nas drosófilas, que era capaz de desencadear uma resposta inflamatória frente a um patógeno desconhecido.

Nos dias de hoje é amplamente conhecida a capacidade do TLR4 em reconhecer o LPS, um lipopolissacarídeo expresso na parede celular de bactérias Gram-negativas. Quando reconhecido, o LPS é capaz de desencadear uma resposta inflamatória local ou sistêmica, dependendo de sua concentração ou local de aplicação, por meio da ativação do fator de transcrição NF- κ B (GLEZER *et al.*, 2003; LIBBY, 2007; MEDZHITOV, 2008; MEDZHITOV E HORNG, 2009).

1.2.2. O mediador trascricional NF- κ B

O NF- κ B foi primeiramente descrito como responsável pela ativação do promotor das células B. É constituído por uma família de 5 membros, sendo formado de homo- ou heterodímeros por meio da combinação das subunidades p65 (também chamada de RelA), p50, p52, c-Rel e RelB, sendo mais frequente a combinação de p65 com p50 (GLEZER *et al.*, 2003, KAWAI, AKIRA 2009).

Presente de maneira constitutiva nas células, o NF- κ B é considerado essencial nos processos de desenvolvimento, plasticidade e neurodegeneração, uma vez que é capaz de induzir a transcrição de genes para citocinas inflamatórias, óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ciclo-oxigenase II, inibidores de apoptose entre outros (GLEZER *et al.*, 2003; Calich e Vaz, 2009; ABBAS, 2012).

Sua ativação se dá principalmente pela ligação de uma PAMP ao seu respectivo PPRs, como é o caso da ligação do LPS com o TLR4, ativando a via dependente de MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) (Figura 2) (KAWAI, AKIRA 2009; YOKOTA *et al.*, 2010; KUMAGAI, AKIRA 2010).

Para ser reconhecido pelo receptor, o LPS deve estar ligado a uma proteína conhecida como *LPS binding protein* (LBP), que está presente tanto em sua forma solúvel quanto ligada à membrana celular. Este primeiro complexo se liga ao CD14, um glicosilfosfatidilinositol responsável pela apresentação do complexo LPS-LBP ao receptor TLR4. Para que este receptor seja ativo é necessária sua homo-dimerização e ligação com uma proteína de membrana (MD-2) responsável pela exposição dos

sítios catalíticos (KUMAGAI *et al.*, 2008; KAWAI, AKIRA 2009; KAWAI, AKIRA 2010; YOKOTA *et al.*, 2010).

A ativação das IRAKs leva à formação de um complexo entre a TARF6 e o conjugado enzimático ubiquitina E2, resultando na ativação da quinase fator de crescimento 1 (TAK1) e sua complexação com a "*binding protein*" TAB1. O conjugado formado é o responsável pela ativação do complexo IKK, formado pelas subunidades IKK α , IKK β (catalíticas) e a IKK γ (NEMO - regulador). Desta forma, a ativação do NF- κ B se dá pela fosforilação e consequente liberação do seu bloqueador I κ B nas serinas 32 e 36. Ao ser fosforilada, a proteína I κ B libera o NF- κ B que será então translocado para o núcleo (GLEZER *et al.*, 2003; KUMAGAI *et al.*, 2008; KAWAI, AKIRA 2009).

Figura 2: Via de ativação do NF- κ B. Após ser blindado pelo LPB o LPS é reconhecido pelo TLR4. Após o reconhecimento, sítios TIR são recrutados e ativam a via que culmina com a fosforilação do I κ B e liberação do NF- κ B, a qual é translocado para o núcleo.

1.2.3. Mediadores inflamatórios

Além de receber estímulo do LPS, o NF- κ B tem sua ativação regulada pela luz ultravioleta, intermediários de espécies reativas do oxigênio, óxido nítrico (NO) e citocinas como IL-1 β e TNF α (GLEZER *et al.*, 2003, KAWAI, AKIRA 2009).

As citocinas representam um papel importante no decurso de um processo inflamatório, pois além de ativarem a via do NF- κ B também são produtos de sua ativação. Formada por pequenos polipeptídeos e secretada por células como linfócitos, macrófagos e células dendríticas, as citocinas têm a capacidade de influenciar o funcionamento celular, bem como sua diferenciação (GRAY, BLOCH 2012).

As citocinas podem ser classificadas de acordo com o a natureza da resposta imune, além do tipo celular na qual irão atuar e da sua localização. Existem 3 grandes classificações para as citocinas: as da imunidade adaptativa que representam a interleucina 21 (IL-21), a interleucina 9 (IL-9) e a interleucina 2 (IL-2); dos sinais pró-inflamatórios, como as interleucinas 1 (IL-1), 6 (IL-6) e o TNF α ; e dos sinais anti-inflamatórios, cujos principais representantes são a interleucina 10 (IL-10) e o fator de crescimento tumoral (TGF- β). Estes polipeptídeos agem de maneira balanceada a fim de manter a homeostase do organismo, sendo algumas de suas funções descritas a seguir (TURNER *et al.*, 2014).

A família da IL-1 é composta por aproximadamente 11 membros, sendo os principais representantes a IL-1 α e a IL-1 β . Descrita primeiramente como agente pirogênico, a IL-1 β é um potente agente pró-inflamatório sendo responsável por mediar a diferenciação dos linfócitos *T helper* (Th), especialmente os Th17 (BORASCHI *et al.*, 2011; SANTARLASCI *et al.*, 2013).

A IL-1 α e a IL-1 β são sintetizadas por diferentes tipos celulares como monócitos, macrófagos, neutrófilos e macrófagos residentes. A ativação destas citocinas pode ser direta, como no caso da IL-1 α que atua como pró-IL-1 α , ou dependente de fatores externos, como a IL-1 β a qual necessita da clivagem da pró-IL-1 β em IL-1 β ativa pela caspase 1 presente nos inflamossomas (AREND *et al.*, 2008; DINARELLO *et al.*, 2009; CASANOVA *et al.*, 2011).

O TNF α foi identificado na década de 70 como um fator responsável pela necrose tecidual em alguns tipos de tumores, tanto “*in vivo*” como “*in vitro*”, sendo sua síntese realizada como um precursor transmembrânico o qual é transportado pelo retículo endoplasmático até a superfície celular (TRACEY *et al.*, 2008; STOW *et al.*, 2009).

O TNF α é secretado principalmente por macrófagos ativos, mas também pode ser secretado por outras células como monócitos, células T, linfócitos NK, fibroblastos e neurônios. Sua ação está centrada no papel pró-inflamatório da imunidade inata, sendo o principal mediador inflamatório, participando da indução de citocinas, aumento da expressão de moléculas de adesão e fatores de crescimento, além de estímulo de proliferação celular (TURNER *et al.*, 2014).

Conhecida por suas funções, a IL-6 pode ser produzida e secretada por uma gama de células como os linfócitos B e T, hepatócitos e células da medula óssea. Desta forma, é capaz de realizar diversas funções dependendo de sua localidade, tais como hematopoese, maturação final dos linfócitos B, além da ativação e diferenciação das células T (KISHIMOTO, 2010).

Como principal representante anti-inflamatório, a IL-10 foi descrita primeiramente como produto exclusivo dos linfócitos Th2. Porém, com o passar do tempo, foi descoberta sua produção e liberação por outras células, como linfócitos Th1 e Th17, monócitos, macrófagos, eosinófilos, células dendríticas, entre outras. Sua principal função é inibir as citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-6 e o TNF α , bem como as quimiocinas. No entanto, a IL-10 também inibe a apresentação de antígenos por meio do bloqueio da expressão do MHC II, receptor responsável pela apresentação dos antígenos às células T CD4⁺ e de moléculas coestimulatórias, como CD80 e CD86 (CHATTERJEE *et al.*, 2014).

Outro fator importante no decurso de um processo inflamatório é o NO. Sua formação decorre da conversão de arginina em citrulina pela ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Existem três tipos de NOS: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). As duas primeiras são constitutivamente expressas em células endoteliais, neurônios, glia, plaquetas, mastócitos, entre outros (LEITÃO *et al.*, 2011). As principais funções do NO são manutenção da pressão arterial, neurotransmissão, mecanismos de defesa antimicrobiana e modulação da resposta imune (HALL *et al.*, 2011).

A iNOS não é detectável em condições basais, aparecendo somente quando estimulada por moléculas como o LPS e citocinas. Sua síntese é induzida de duas a quatro horas após a exposição ao agente, uma vez que requer síntese proteica para sua expressão. Após a indução, a iNOS permanece ativada por vinte horas e sintetiza NO em concentrações nanomolares, mil vezes maiores que a eNOS, sendo a responsável pela grande produção de NO na inflamação (DAVIES *et al.*, 1995; TAYLOR e GELLER, 2000).

Como visto anteriormente, a resposta imune é especializada e ocorre de maneira organizada. Entretanto, quando o assunto é o SNC, o sistema imune se comporta de modo distinto.

1.2.4. Neuroinflamação

Por muitos anos se acreditou que o SNC fosse um sítio “imunoprivilegiado” por possuir características únicas, tais como menor expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) de classes I e II no parênquima cerebral, indução de apoptose de linfócitos T, ausência de vasos linfáticos, limitação da produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-1) e presença da BHE, responsável pela seleção de moléculas permeáveis presentes no sangue (MAN *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2008; ENGELHARDT *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, tal definição começou a ser questionada uma vez que as células T ativadas eram capazes de penetrar a BHE, principalmente em regiões perivasculares dos órgãos circunventriculares (plexo coroide, neuro-hipófise e glândula pineal) e no líquido cefalorraquidiano, e iniciar o processo de vigilância imunológica (CARSON *et al.*, 1999, WILSON *et al.*, 2010).

Em situações não fisiológicas, onde há a presença do patógeno no parênquima cerebral, a resposta imune deve ser muito bem controlada, uma vez que pode levar a perturbações funcionais e morte neuronal. Diversas doenças como Alzheimer e Esclerose Múltipla são decorrentes de uma reação imunológica, seja ela por um processo inflamatório, seja por um processo autoimune (ZIPP e AKTAS, 2006; ABBAS 2012).

O principal componente responsável pelo início da resposta imune no SNC são as células residentes, como astrócitos e microglia, que agem em conjunto respondendo aos sinais de “perigo”, sendo capazes de secretar citocinas, quimiocinas e NO, além de possuírem receptores para citocinas, TLRs e serem capazes de apresentar antígeno para os linfócitos T infiltrantes (FARINA 2005, LI 2007, PRINZ 2011, CARSON *et al.*, 1999, CARSON *et al.*, 1999, KUMAGAI, AKIRA 2010).

É durante o processo de neuroinflamação que estas células são capazes de alterar suas funções fisiológicas e morfológicas, além de aumentar a permeabilidade da BHE. As células da microglia são as primeiras a terem sua morfologia alterada. Quando ativadas, assumem uma forma ameboide fagocítica e migram para as regiões onde há a presença do patógeno, sendo responsável pela remoção dos debris celulares (TAKESHITA *et al.*, 2012).

As células da microglia representam de 5% a 15% das células neuronais e se encontram dispersas por toda a matéria cinza e branca, sendo possível localizar diferentes populações em regiões distintas do SNC. São conhecidas principalmente pela liberação de uma gama de citocinas, complementos e fatores de crescimento, os quais estão relacionados à formação e à plasticidade sináptica. Estudos recentes demonstraram sua capacidade em controlar a densidade dos espinhos dendríticos em situações fisiológicas, uma vez que são sensíveis às perturbações neuronais (TREMBLAY *et al.*, 2010; PAOLICELLI *et al.*, 2011)

De maneira constitutiva, a microglia expressa baixos níveis da proteína tirosina fosfatase CD45 e do MHC II, além de expressar as integrinas CD11b e CD11c. Porém, quando se torna ativa, a microglia é capaz de aumentar os níveis destas proteínas, além de passar a expressar TLRs. Outra mudança significativa é o aumento dos níveis de moléculas coestimulatórias como o CD40, CD80 e CD86, o que torna a célula capaz de apresentar antígenos ao linfócito T e, desta forma, ativar a resposta imune (CARSON *et al.*, 1999, KUMAGAI, AKIRA 2010; TIAN *et al.*, 2012)

Os astrócitos eram tradicionalmente conhecidos como células de suporte neuronal, sendo os responsáveis pela homeostase do SNC (Figura 3a). Por recobrirem cerca de 99% dos microvasos cerebrais, são responsáveis pela alta seletividade na entrada de substâncias através da BHE no parênquima cerebral. Além disso, alguns estudos demonstraram sua importância na regulação da resposta imune inata e adaptativa local (BECHMANN *et al.*, 2007; FARINA *et al.*, 2007)

Em um processo de neuroinflamação, os astrócitos são capazes de expressar receptores TLRs e de manose, além de secretarem citocinas, quimiocinas e fatores neurotróficos capazes de se ligar a outras células da glia e neurônios. As citocinas liberadas são então responsáveis pela abertura da BHE e recrutamento de células imunes periféricas para o parênquima cerebral, ocasionando a amplificação tanto da resposta inata inicial, quanto do início da adaptativa, culminando com a eliminação do agente infeccioso e restauração da integridade tecidual.

Figura 3: Ilustração da interação entre neurônios, astrócito e microglia no SNC em condições normais (A) e patológicas (B). Adaptado de: TIAN *et al.*, 2012

1.3. Fumaça do cigarro e inflamação

A maior parte dos trabalhos envolvendo fumaça do cigarro foi conduzido tendo como objetivo principal o tecido pulmonar. Tal fato pode ser justificado pela alta prevalência da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), atingindo mais de 14 milhões de pessoas nos EUA (MILLER *et al.*, 2002).

A DPOC é uma inflamação caracterizada por uma obstrução progressiva e quase totalmente irreversível das vias aéreas. Essa obstrução é consequência de mudanças estruturais como remodelamento nas vias aéreas, caracterizada por fibrose adventícia, hiperplasia das células do muco e aumento do músculo liso das vias aéreas em massa, além de enfisema (PERA *et al.*, 2010).

Em fumantes crônicos, o processo de DPOC é constantemente presente, uma vez que a fumaça do cigarro é capaz de ativar a cascata inflamatória das vias aéreas, liberando citocinas e quimiocinas que causam dano ao epitélio pulmonar, além de aumentar a permeabilidade vascular e de levar ao recrutamento de macrófagos e neutrófilos (SIMONE *et al.*, 2011).

Jiang *et al.* (2010) demonstraram que a exposição à fumaça do cigarro durante 2 horas ao dia por 16 dias levou ao aumento de células inflamatórias no BALF, caracterizado principalmente por monócitos e macrófagos. As citocinas também seguiram este aumento, sendo detectadas diferenças nos níveis de TNF- α , TGF- β , IL-6 e IL-1 β em relação ao controle.

Thatcher *et al.* (2008) demonstraram que camundongos expostos à fumaça do cigarro por meio de equipamento específico (máquina de fumar - CH Technologies, Westwood, NJ) por 6 vezes na semana durante 2 semanas apresentaram aumento das células inflamatórias no BALF, sendo principalmente macrófagos e neutrófilos.

No contexto apresentado, é possível comprovar a capacidade da fumaça do cigarro em induzir o processo inflamatório no pulmão, já que há aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e o TNF- α) e do número de células inflamatórias no BALF (MILLER *et al.*, 2002; THATCHER *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010; SIMONE *et al.*, 2011).

O grupo de Khanna *et al.* (2012) deu início ao estudo da influência da exposição à fumaça do cigarro na neuroimunologia. Seus resultados demonstraram que uma exposição passiva à fumaça do cigarro por 45 dias provocou um aumento de genes pró-inflamatórios como IL-6, IL-1 β e TNF α no SNC de ratos *Lewis*. Entretanto, não foi avaliado qual o efeito da fumaça do cigarro na presença de um estímulo inflamatório. Mais ainda, o estudo de Khanna *et al.* (2012) avaliou o SNC como um todo e não as particularidades das respostas das diferentes estruturas encefálicas e nem o decurso temporal da resposta inflamatória que pode ser eliciada pela fumaça do cigarro na presença e na ausência de estímulo inflamatório.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da fumaça do cigarro nas estruturas encefálicas hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e cerebelo, em um modelo de inflamação sistêmica induzida por LPS em camundongos C57BL/6.

Estratégias para se alcançar o objetivo

- ✓ Avaliar a ativação do NF- κ B por meio de *western blot* da proteína P65.
- ✓ Quantificação por ELISA e transcrição gênica das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF α
- ✓ Avaliar a transcrição de iNOS, TLR2 e TLR4 por *Real Time* PCR.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO

Camundongos C57BL/6, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mantidos em ciclo de 12 horas claro/escuro (07h – 19h), com água e comida à vontade, foram expostos à fumaça do cigarro por 15 dias consecutivos. A exposição à fumaça do cigarro ocorreu em dois horários, 9:00 e 16:00h, com duração de uma hora cada, conforme protocolo já estabelecido e utilizado em outros trabalhos de nosso laboratório (Torres *et al.*, 2012). Os animais do grupo controle foram colocados em uma câmara semelhante e inalaram apenas ar sintético.

A exposição à fumaça de cigarro foi realizada dentro de uma câmara de polipropileno (650x445x245mm) acoplada a um sistema Venturi onde um fluxo de ar, dentro de uma tubulação suavemente cônica, produz uma pressão negativa (vácuo) proporcional à velocidade do fluxo e às dimensões da tubulação e, dessa forma, a fumaça do cigarro é direcionada aos animais dentro da câmara (Figura 3). Foram utilizados os cigarros referência 3R4F produzidos pela Universidade de Kentucky (EUA). Estes cigarros, desenvolvidos especialmente para pesquisa, garantem uma uniformidade entre as unidades e permitem a comparação entre os diversos estudos realizados por qualquer laboratório do mundo que os utilizem. A Tabela 1 apresenta os constituintes do cigarro 3R4F.

Figura 4: Câmara de exposição à fumaça do cigarro (TORRES *et al.*, 2012)

Tabela 1: Constituintes do cigarro padronizado 3R4F da Universidade de Kentucky

Constituintes	3R4F (mg/cig)
Nicotina	0,726
Alcatrão	9,4
Monóxido de Carbono	11,9
Benzeno	0,328
Benzopireno	0,0066
Tolueno	0,493
1,3-butadieno	0,236
Acetaldeído	0,4846
Acetona	0,2501
NOx	0,1912
Isopreno	0,1349

Após a última exposição (09h do 15º dia), os animais foram submetidos a uma estimulação intravenosa (i.v.) de LPS provenientes de *Escherichia coli* (Sigma) na concentração de 0,1 µg/animal ou de solução salina. Para a avaliação dos parâmetros pró e anti-inflamatórios, como TLR2, TLR4, IL-1β, IL-6, IL10, TNF e iNOS, os animais foram eutanasiados de acordo com o período apontado pela literatura a qual demonstra a ativação da via do NF-κB a partir de 2 horas após o desafio com LPS (PARRISH *et al.*, 2008, GLEZER *et al.*, 2003), foram seguidos os períodos de 4 e 6 horas para

demostrar um decurso do processo inflamatório. Os períodos de 2 e 4 horas foram utilizadas para a verificação da expressão dos genes TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-6, IL10, TNF e iNOS, além da dosagem de citocinas pela técnica de ELISA, e o de 6 horas para a quantificação das citocinas.

Assim, foram propostos quatro grupos experimentais (n=6), como descrito a seguir:

- ✓ Grupo Controle – (CO) – animais expostos ao ar sintético por 15 dias, submetidos à salina i.v. .
- ✓ Grupo Fumante – (FU) – animais expostos à fumaça do cigarro por 15 dias, submetidos à salina i.v..
- ✓ Grupo LPS– (LPS) – animais expostos ao ar sintético por 15 dias, submetidos ao LPS i.v. .
- ✓ Grupo Fumante + LPS – (FPS) – animais expostos à fumaça do cigarro por 15 dias, submetidos ao LPS i.v. .

Os camundongos foram anestesiados com ketamina e xilazina (1:1) e perfundidos com solução salina fria. O encéfalo foi rapidamente retirado e mergulhado em solução salina fria. As estruturas encefálicas (cerebelo, córtex pré-frontal, estriado 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 os ensaios de quantificação de citocinas e PCR em tempo real.

3.2. DOSAGEM DOS PARÂMETROS BIOLÓGICOS

Foram utilizados como parâmetros biológicos da exposição a determinação de carboxihemoglobina (COHb) em sangue total e de cotinina e nicotina em plasma. A confirmação do processo inflamatório sistêmico foi determinada pela quantificação da citocina TNF α em plasma.

3.2.1. DETERMINAÇÃO DE CARBOXIHEMOGLOBINA (COHb)

Para a dosagem de COHb, utilizou-se o método de Beutler e West (1984) modificado por Malheiro (1991). A modificação foi realizada na etapa de determinação dos fatores de calibração durante a padronização do método, quando foi realizado borbulhamento com N₂ 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 (Hbred), 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.

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

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 µL de sangue total de não-fumante em 12 mL de solução hemolisante (tampão em água na proporção 1:10). No balão A, borbulhou-se CO por 3 min enquanto no balão B borbulhou-se O₂ por 15 min. Ambos os tubos foram fechados imediatamente. As soluções com 100% de COHb e 100% de O₂Hb foram submetidas à corrente de N₂ por 2,5 minutos. Os tubos foram imediatamente fechados após o borbulhamento e 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. A leitura das absorbâncias das soluções A e B foram realizadas em 420 e 432 nm.

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 homogeneização por inversão a solução foi deixada em repouso por 10 minutos. Então, 0,2 mL do hemolisado foram diluídos 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 tampada e deixada à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, a leitura espectrofotométrica foi realizada em 420 e 432 nm, utilizando como branco a solução redutora.

$$\% \text{COHb} = \frac{1 - (\text{AR} \times \text{F1})}{\text{AR} (\text{F2} - \text{F1}) - \text{F3} + 1} \times 100 \quad \text{Sendo: AR} = \text{Abs 420} / \text{Abs 432}$$

3.2.2. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE COTININA E NICOTINA

A determinação de nicotina e da cotinina foi realizada em plasma por meio de cromatografia em fase gasosa (Agilent Technologies 6890N) com detector de nitrogênio/fósforo (MAN *et al.*, 2006). Foram utilizados 150 μL de plasma diluídos em 150 μL de tampão fosfato 0,1M pH 6,0. O padrão interno utilizado foi o prolintano, previamente diluído em metanol, em uma concentração final de 1 $\mu\text{g/mL}$.

As amostras foram submetidas à extração em fase sólida com cartucho de SPE BOND ELUT CERTIFY 130 mg (VARIAN) previamente condicionados com 2,0 mL de metanol e 2,0 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 em seguida, o cartucho foi lavado duas vezes com 3,0 mL de água milli-Q e 3,0 mL HCl 0,1 M. Após sete minutos de secagem a vácuo (20 mbar), foram adicionados 9,0 mL de metanol. A eluição foi realizada com solução de diclorometano/isopropanol/hidróxido de amônio (12:3:0,3) recém preparada. Após secagem com N_2 o analito foi ressuspensionado com 50 μL de metanol para injeção de 2,0 μL no CG.

Parâmetros cromatográficos: Temperatura de injeção: 250°C; Modo de injeção *splitless*; HP-5MS 30x0,25x0,1 (Agilent, Palo Alto, CA, USA); Fluxo de Hélio: 1,2 mL/min; Forno: 100°C, rampa 10°C/min, temperatura final: 250°C; Temperatura do detector: 300°C.

3.3. PCR EM TEMPO REAL

✓ Extração do RNA

Todo o material utilizado era *RNAse free*. A homogeneização dos tecidos foi feita em TRIzol® (Invitrogen). Adicionou-se 1mL do reagente para a homogeneização e aguardou-se 5 minutos em temperatura ambiente. A seguir 200µL de clorofórmio foram adicionados para separação das fases, agitou-se manualmente e aguardou-se de 2 a 3 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 12.000 *g* por 15 minutos à temperatura de 4°C, após este procedimento obteve-se a separação do RNA, DNA e das proteínas. O RNA foi então separado em novo microtubo ao qual foram adicionados 500µL de isopropanol. O conteúdo foi agitado em vórtex e deixado em repouso a temperatura ambiente por um período de 45 minutos a 1 hora. Procedeu-se nova centrifugação por 15 minutos em 12.000 *g* à 4°C e o sobrenadante foi descartado evitando contato com o precipitado de RNA. Adicionou-se 1mL de etanol 75% e centrifugou-se a 7.500 *g* por 5 minutos à 4°C. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi seco em bancada por aproximadamente 5 minutos. Após a secagem, o RNA foi ressuspensionado em 25 µL de água ultra pura (*RNAse/DNAse free*). A quantificação do RNA foi feita em NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

✓ Preparação do cDNA

Utilizou-se uma concentração de 1 µg/µL de RNA, diluído em 13µL de solução aquosa *RNAse/DNAse free*. Adicionou-se então 1µL de Oligo dT e 1µL de dNTPmix

e esta mistura foi levada ao termociclador por 5 minutos à 65°C, sendo a reação seguida por incubação em gelo por 1 minuto. O próximo passo consistiu na adição de 4µL de first-strand Buffer (1:5), 1µL de DTT 0,1M e 1µL de Super Script III RT 200 U/µL. A solução foi novamente homogeneizada com a pipeta e levada ao termociclador por 60 minutos à 50°C no primeiro ciclo, 15 minutos à 70°C no segundo ciclo e posteriormente 5 minutos à 4°C. O cDNA foi armazenado à -20°C até realização das análises.

✓ PCR em tempo Real

O cDNA preparado foi diluído em uma proporção de 1:5, sendo então utilizados 5µL da solução para cada análise. Foi preparado um meio reacional contendo 1µL de 20x Taqman Gene Expression Assay (os genes analisados foram TLR2, TLR4, iNOS, IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α e como gene *housekeeping* foi utilizada a β-actina), 10µL de Taqman Gene Expression Assay Master Mix (1:2) e 4µL de água ultra pura (*RNAse/DNAse free*). Este meio foi pipetado nos tubos Strip® e em seguida foi adicionado à solução de cDNA. A partir deste momento a reação foi levada ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Real-Time PCR System®.

Os primers analisados foram:

Primer	Locus
IL-1β	NM_008361
TNF-α	NM_013693.2
IL-6	NM_031168.1
TLR2	NM_011905.3
TLR4	NM_021297.2
iNOS	NM_010927.3
β-actina	NM_007393.3

3.4. Western Blot

Com o intuito de verificar o início do processo inflamatório, ou seja, a ativação do NF- κ B, foi realizado um decurso temporal através da quantificação da subunidade P65. Os primeiros períodos escolhidos foram 5, 10, 30, 60 e 90 minutos. Foram também realizados testes para responder se há diferença entre as doses de 0,1 μ g/animal e 1 mg/Kg de peso, bem como o processo de perfusão no período de 1 hora após o desafio i.v. de LPS.

As estruturas coletadas foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, Np-40 1%, Deoxicolato de Sódio 0,5%, SDS 0,1%, Tris 50mM para pH8,0) na concentração de 1:5. A partir deste homogenato, o conteúdo proteico do material isolado dos diferentes grupos foi dosado pelo método de Bradford (BioRad) (Bradford, 1979). As amostras foram submetidas à eletroforese por SDS-PAGE. Os materiais foram diluídos em um mesmo volume de tampão Tris/HCl 125 mM, pH 6,8, contendo 2,5% (p/v) de SDS, 2,5% de 2-mercaptoetanol (2-ME), 4mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol, e as amostras foram então fervidas em banho-maria por 5 minutos. O material foi aplicado em um gel de poliacrilamida e submetido a eletroforese com corrente constante de 25 mA (LAEMMLI, 1970). Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Millipore) de acordo com a técnica descrita por Towbin *et al.* (1979). Os antígenos presentes na membrana de PVDF foram submetidos à caracterização imunoenzimática. Após bloqueio com leite desnatado (Molico, Nestlé) 5% em tampão Tris-Salina (Tris 10mM e NaCl 0,15M, pH 7,5), por 2 horas, as membranas foram incubadas *overnight* com o anticorpo específico em concentração baixa (1:1000). Em seguida, as membranas foram lavadas com Tris-Salina e incubadas por 2 horas com um anticorpo secundário marcado com peroxidase (Amersham Biosciences). O excesso de conjugado foi removido com mais um ciclo de lavagens e os antígenos foram revelados com o Kit ECL (Amersham Biosciences) de quimioluminescência e analisadas quanto à densidade das bandas marcadas, utilizando o programa ImageJ.

As proteínas a serem analisadas por *Western Blot* foram:

Proteína	Peso molecular (KDa)	Proteína	Peso molecular (KDa)
P65	65	β -actina	42

3.5. DOSAGEM DE CITOCINAS

Para realizar a quantificação das citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-10) e TNF- α , foi preparado o homogenato dos tecidos coletados em tampão RIPA (NaCl 50mM, Triton X-100 1%, Deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1% e tampão Tris 50mM pH 8,0), e diluídos (1:100) em mesmo tampão. Os ensaios de ELISA foram realizados com kit da BD[®] seguindo instruções do fabricante. Os resultados foram normatizados em relação à quantidade de proteína, dosada pelo método de Bradford (1979)

A dosagem de TNF α em plasma foi realizada para certificar a existência de um processo inflamatório, uma vez que esta citocina é a mais sensível. Para tanto foi realizado a coleta de sangue total com heparina. O plasma foi separado após centrifugação de 10000rpm por 10 minutos, a dosagem da citocina TNF α foi realizada diretamente no material de acordo com as instruções do fabricante (BD).

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de RT-PCR foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste *Newman-Keuls*. Já os resultados de citocinas foram comparados utilizando-se análise ANOVA de duas vias seguido de pós-teste *Newman-Keuls*. Para os parâmetros de dosagem de citocina no plasma, foi realizada o teste *t-Student*. As diferenças foram consideradas significativas para o valor de $p < 0,05$.

3.7. COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina – FMUSP/CEUA, com protocolo de pesquisa nº 124/12, e pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – FCFUSP/CEUA com protocolo de pesquisa nº 97/2012.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA E AMBIENTAL

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na quantificação de COHb em sangue total, cotinina, nicotina em plasma e CO ambiental em animais expostos à fumaça do cigarro por 15 dias consecutivos.

Tabela 2: Determinação da concentração de CO durante a exposição, de COHb em sangue total e de cotinina e nicotina no plasma dos animais expostos à fumaça do cigarro (3R4F) por 15 dias (n=6). Dados expressos em Média $\pm$ EMP

	CO (PPM)	COHb (%)	Cotinina (ng/mL)	Nicotina (ng/mL)
Controle	Não detectado	1,03 $\pm$ 0,79	Não detectado	Não detectado
Tratado	480,10 $\pm$ 191,00	18,10 $\pm$ 6,20	497,92 $\pm$ 130,81	181,88 $\pm$ 5,56

4.2. PADRONIZAÇÃO DO DESAFIO AO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)

A Figura 5 apresenta os valores obtidos no plasma de camundongos desafiados com LPS i.v. na dose de 0,1 μ g/animal e eutanasiados após 90 minutos.

Figura 5: Dosagem da citocina TNF α em plasma de camundongos C57BL/6 desafiados ou não ao lipopolissacarídeo (LPS) i.v. e eutanasiados 90 minutos após o desafio. CO – grupo controle, desafiado com salina i.v.; LPS – grupo tratado, desafiado com LPS i.v. na dosagem de 0,1 μ g/animal (n=6; Análise estatística: Teste t-Student; ** $p<0,01$)

4.3. *REAL TIME PCR, WESTERN BLOT E ELISA*

A partir deste momento serão apresentados os resultados referentes as estruturas encefálicas hipocampo, estriado, córtex pré-frontal e cerebelo, para facilitar a compreensão dos mesmos.

Para relembrar abaixo estão descritos os grupos experimentais:

- ✓ Grupo Controle – (CO) – animais expostos ao ar sintético por 15 dias, submetidos à salina i.v. .
- ✓ Grupo Fumante – (FU) – animais expostos à fumaça do cigarro por 15 dias, submetidos à salina i.v..
- ✓ Grupo LPS– (LPS) – animais expostos ao ar sintético por 15 dias, submetidos ao LPS i.v. .
- ✓ Grupo Fumante + LPS – (FPS) – animais expostos à fumaça do cigarro por 15 dias, submetidos ao LPS i.v. .

4.3.1.

HIPOCAMPO

Os resultados apresentados na Figura 6 (D-F) mostram um aumento estatisticamente significativo da expressão gênica dos mRNAs NOS2 (responsável pela transcrição da proteína iNOS), TLR2 e TLR4 em 2 horas no grupo exposto à fumaça do cigarro e desafiado com LPS, em relação a todos os outros grupos ($p < 0,001$). No mesmo período, é possível observar que para o mRNA TLR2 há um aumento estatisticamente significativo dos grupos fumante (FU) e LPS em relação ao controle ($p < 0,001$), porém não foram observadas diferenças entre estes grupos. Para a citocina pró-inflamatória IL6, os resultados apresentados na Figura 6A mostram uma diminuição estatisticamente significativa no grupo que recebeu ambos tratamentos em relação ao grupo apenas desafiado com LPS ($p < 0,05$), sendo este grupo diferente do controle ($p < 0,05$).

A Figura 7 mostra os resultados encontrados na análise dos mRNAs com eutanásia após 4 horas do desafio. Pode-se observar que para os *primers* de TNF α e IL1 β , os grupos que receberam o desafio com LPS estão estatisticamente aumentados em relação ao controle ($p < 0,01$), sendo que no grupo FPS podemos observar um aumento estatisticamente significativo também em relação ao grupo FU ($p < 0,01$).

Quanto às proteínas resultantes da transcrição dos genes estudados, não foram observadas diferença estatisticamente significativa para as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF α , porém é possível observar um efeito de grupo ($p < 0,001$) para a citocina TNF α sem interação grupo x tempo (Figura 8A, 8C, 8D), não sendo possível desta forma comparar os grupos com os períodos de tempo.

Para a citocina IL-10 (Figura 8B), foi encontrada uma interação grupo x tempo ($p < 0,001$), dessa forma é possível a comparação dos períodos com os grupos. Os resultados demonstram que no grupo FPS há uma redução da liberação da citocina com o passar do tempo, ou seja, há uma menor quantidade de IL-10 em 4 e 6 horas quando comparada com 2 horas ($p < 0,01$). Esta redução é evidenciada uma vez que em 6 horas o grupo FPS está estatisticamente menor em relação ao grupo LPS ($p < 0,01$), que por sua vez se encontra estatisticamente reduzido em relação ao controle e ao grupo FU ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ respectivamente).

A diferença entre os grupos FPS e LPS pode ser observada em 2 horas, quando o grupo que recebeu ambos os estímulos se encontra estatisticamente reduzido em relação ao grupo que recebeu apenas o LPS ($p<0,05$).

Na quantificação da proteína P65, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas no decurso temporal realizado de 5 a 90 minutos (Figura 9).

Figura 6: *Real Time* PCR do hipocampo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keuls * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 7: *Real Time* PCR do hipocampo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 8: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no hipocampo de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS, “a” diferença em relação à 2h, “b” diferença em relação à 4h, “c” diferença em relação à 6h. (n=6; Análise estatística: ANOVA de duas vias *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Figura 9: Quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*, no hipocampo de camundongos após desafio com LPS iv.. A) Decurso temporal com eutanásia em 5, 10, 30, 60 e 90 minutos após o desafio com LPS na dose de 0,1 μ g/animal. CO – controle, LPS – Grupo LPS. “*” em relação ao grupo controle (n=3; Análise estatística: teste *t Student* entre CO e LPS *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

4.3.2.

ESTRIADO

As Figuras 10 e 11 apresentam as análises de *Real Time* PCR.

É possível verificar um aumento estatisticamente significativo em 2 horas para os mRNAs IL1 β , NOS2, TLR2 e TLR4 (Figura 10C – 10F) no grupo FPS em relação a todos os outros grupos estudados ($p < 0,001$). Porém, quando analisado o período de 4 horas, a única diferença encontrada é em relação ao mRNA da citocina IL1 β (Figura 11C), onde podemos observar uma diminuição estatisticamente significativa no grupo FPS em relação aos grupos FU e LPS ($p < 0,05$). Além disso, é possível verificar que o grupo desafiado apenas com o LPS se encontra estatisticamente maior que o grupo controle ($p < 0,01$).

Ao analisar as dosagens realizadas pela técnica de ELISA, não foram encontradas interações grupo x tempo. Apesar de possuir efeitos de grupo ($p < 0,05$) e tempo ($p < 0,05$) para as citocinas IL-10 e IL-6 (Figura 12B e 12C), não houve diferença estatisticamente significativa no estriado.

Na quantificação realizada por *Western Blot* da proteína P65, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes no decurso temporal, nem nos testes realizados com diferentes concentrações de LPS ou em relação a perfusão (Figura 13 A e B).

Figura 10: *Real Time* PCR do estriado após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 11: *Real Time* PCR do estriado após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “**” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 12: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no estriado de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS, “a” diferença em relação à 2h, “b” diferença em relação à 4h, “c” diferença em relação à 6h. (n=6; Análise estatística ANOVA de duas vias *post-hoc* Newman Keuls *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Figura 13: Quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*, no estriado de camundongos após desafio com LPS iv.. A) Decurso temporal com eutanásia em 5, 10, 30, 60 e 90 minutos após o desafio com LPS na dose de 0,1 µg/animal. B) Comparação entre tratamentos com e sem perfusão e dose de LPS baixa (0,1 µg/animal) e alta (1 mg/Kg de peso), eutanásia realizada após 60 minutos do desafio. CO – controle, LPS – Grupo LPS. “*” em relação ao grupo controle com perfusão, “#” em relação ao grupo LPS de baixa dose, “@” em relação ao grupo LPS de alta dose (n=3; Análise estatística: A) teste *t Student* entre CO e LPS; B) ANOVA de uma via *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

4.3.3.

CÓRTEX PRÉ- FRONTAL

Os resultados apresentados na Figura 14F mostram aumento estatisticamente significativo da expressão gênica do receptor TLR4 no grupo FPS em relação a todos os outros grupos testados ($p<0,01$) no período de 2 horas, além de mostrar aumento no mesmo grupo em relação ao controle para o mRNA da iNOS ($p<0,05$).

Quando observados os mesmos mRNAs no período de 4 horas (Figura 15), nossos resultados mostram aumento estatisticamente significativo para as citocinas TNF α e IL1 β (Figuras 15B e 15D) nos grupos LPS e FPS, em relação ao controle ($p<0,001$ – TNF α e $p<0,05$ – IL1 β) e do grupo FPS em relação ao FU nas mesmas citocinas ($p<0,001$). Outra diferença encontrada é em relação aos mRNAs NOS2 e TLR2, em que podemos observar diminuição ($p<0,05$) e aumento ($p<0,05$), respectivamente, em relação ao FPS (Figura 15D) e ao controle (Figura 15E).

As análises realizadas pela técnica de ELISA mostram não haver interação grupo x tempo para as citocinas IL-1 β , TNF α e IL-6, porém é possível observar um efeito de tempo para a citocina IL-1 β ($p<0,01$) e para a citocina TNF α ($p<0,05$), não sendo encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa para a citocina IL-6 (Figura 16A, C, e D).

Para a citocina IL-10 (Figura 16B), foi encontrado interação grupo x tempo ($p<0,05$), com efeito de tempo ($p<0,001$). Os resultados demonstram que no grupo FPS há aumento estatisticamente significativo em relação ao controle ($p<0,001$), sendo seguido de redução da liberação da citocina com o passar do tempo, ou seja, há uma menor quantidade de IL-10 em 4 e 6 horas quando comparada com 2 horas.

Em relação à quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*, foi observada diferença estatisticamente significativa do grupo desafiado com LPS e eutanasiados após 90 minutos em relação ao seu controle ($p<0,01$), como apresentado na Figura 17A. Não foram observadas outras diferenças estatisticamente significativas.

Figura 14: *Real Time* PCR do córtex pré-frontal após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keuls * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 15: *Real Time* PCR do córtex pré-frontal após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “***” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 16: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no córtex pré-frontal de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS, “a” diferença em relação à 2h, “b” diferença em relação à 4h, “c” diferença em relação à 6h. (n=6; Análise estatística: ANOVA de duas vias *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Figura 17: Quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*, no córtex pré-frontal de camundongos após desafio com LPS iv.. A) Decurso temporal com eutanásia em 5, 10, 30, 60 e 90 minutos após o desafio com LPS na dose de 0,1 µg/animal. B) Comparação entre tratamentos com e sem perfusão e dose de LPS baixa (0,1 µg/animal) e alta (1 mg/Kg de peso), eutanásia realizada após 60 minutos do desafio. CO – controle, LPS – Grupo LPS. “*” em relação ao grupo controle com perfusão, “#” em relação ao grupo LPS de baixa dose, “@” em relação ao grupo LPS de alta dose (n=3; Análise estatística: A) teste *t Student* entre CO e LPS; B) ANOVA de uma vias *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001).

4.3.4.

CEREBELO

Na Figura 18 e 19 são apresentados os resultados para a técnica de *Real Time* PCR no cerebelo para 2 e 4 horas, respectivamente.

Em duas horas (Figura 18) é possível observar que o grupo FPS está estatisticamente maior que todos os grupos analisados para os mRNAs NOS2, TLR2 e TLR4 ($p < 0,001$), estatisticamente maior que os grupos FU e LPS na análise da citocina IL-6 ($p < 0,05$) e estatisticamente maior que o controle e o grupo FU para a citocina IL-1 β ($p < 0,01$). Outra diferença encontrada no período de 2 horas foi na análise do receptor TLR2, o qual se encontra estatisticamente maior no grupo LPS quando comparado ao controle e ao grupo FU ($p < 0,01$).

Em 4 horas, as únicas alterações encontradas são para os genes TNF α , NOS2 e TLR4. A Figura 19B, que apresenta a citocina TNF α , mostra que tanto o grupo LPS quanto o grupo FPS estão estatisticamente maiores que o controle ($p < 0,01$), sendo que o grupo FPS também se encontra estatisticamente maior o grupo FU ($p < 0,05$).

Para a análise do gene NOS2 (Figura 19D), é possível observar que o grupo FPS esta estatisticamente maior que todos os grupos analisados ($p < 0,001$) e para o gene TLR4 (Figura 17F) o grupo FPS está estatisticamente maior apenas que o grupo FU ($p < 0,01$).

Na quantificação das citocinas pela técnica de ELISA, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para a citocina IL-1 β conforme apresentado na Figura 20D. Para as citocinas IL-6, TNF α e IL-10 foi encontrada interação de grupo e tempo conforme descrito a seguir.

Para a citocina TNF α (Figura 20A), foi encontrado uma interação de grupo e tempo ($p < 0,05$), com efeito de tempo ($p < 0,001$) e grupo ($p < 0,001$). Pode-se observar que no período de 4 horas após o desafio, todos os grupos tratados se encontram diminuídos em relação a 2 e 6 horas, com exceção do grupo FPS que, em 6 horas, não consegue reestabelecer seus níveis normais e, de alguma forma, se encontra estatisticamente diminuído em relação ao grupo controle e fumante.

Em relação à citocina IL-10, foi observada interação de grupo e tempo ($p < 0,001$), além de um efeito de tempo ($p < 0,001$) e um efeito de grupo ($p < 0,01$). Conforme apresentado na Figura 20B, pode-se observar um pico em 6 horas no grupo

FU, sendo estatisticamente maior que todos os outros grupos testados neste mesmo período ($p<0,001$), bem como de seu mesmo grupo em outros tempos (2h $p<0,001$ e 4h $p<0,001$).

Para a citocina IL-6 apresentada na Figura 20C, foi observada interação grupo tempo ($p<0,001$), bem como efeito de tempo ($p<0,05$) e de grupo ($p<0,001$). Foi verificado aumento estatisticamente significativo no grupo FU para o período de 6 horas quando comparado ao seu respectivo controle e grupo LPS. Este aumento pode ser evidenciado, uma vez que os períodos de 2 e 4 horas se encontram diminuídos. Ao se adicionar um agente pró-inflamatório como o LPS, o grupo que recebeu a fumaça do cigarro e o desafio tem a quantificação da citocina estatisticamente menor que todos os grupos de seu horário, bem como dos grupos FPS em 2 e 4 horas.

A Figura 21A mostra os resultados obtidos na quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*. É possível observar que o grupo desafiado com LPS e eutanasiado 30 minutos após o desafio se encontra estatisticamente menor que o seu controle ($p<0,05$). Já na Figura 21B foi observado que o grupo de teste sem perfusão se encontra estatisticamente maior que todos os outros grupos testados ($p<0,01$).

Figura 18: *Real Time* PCR do cerebelo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 19: *Real Time* PCR do cerebelo após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 4 horas do desafio. Figuras A-F representam os mRNAs analisados. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS (n=6; Análise estatística: ANOVA de uma via, *post-hoc* Newman Keus * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Figura 20: Dosagem das citocinas IL-6, IL-10, TNF α e IL-1 β , por ELISA, no cerebelo de camundongos após 15 dias de exposição à fumaça do cigarro, desafio com LPS iv. e eutanásia após 2, 4 e 6 horas do desafio. CO – controle, FU – fumante, LPS – Grupo LPS, FPS – Fumaça do cigarro e desafio com LPS. “*” em relação ao grupo controle, “#” em relação ao grupo fumante, “@” em relação ao grupo LPS, “\$” em relação ao grupo FPS, “a” diferença em relação à 2h, “b” diferença em relação à 4h, “c” diferença em relação à 6h. (n=6; Análise estatística: ANOVA de duas vias *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Figura 21: Quantificação da proteína P65 pela técnica de *Western Blot*, no cerebelo de camundongos após desafio com LPS iv.. A) Decurso temporal com eutanásia em 5, 10, 30, 60 e 90 minutos após o desafio com LPS na dose de 0,1 μ g/animal. B) Comparação entre tratamentos com e sem perfusão e dose de LPS baixa (0,1 μ g/animal) e alta (1 mg/Kg de peso), eutanásia realizada após 60 minutos do desafio. CO – controle, LPS – Grupo LPS. “*” em relação ao grupo controle com perfusão, “#” em relação ao grupo LPS de baixa dose, “@” em relação ao grupo LPS de alta dose (n=3; Análise estatística: A) teste *t student* entre CO e LPS; B) ANOVA de uma via *post-hoc Newman Keuls* *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001)

Discussão

5. DISCUSSÃO

O fumo passivo é um problema de saúde pública que vem sendo muito estudado nas últimas décadas com o enfoque principal em seu órgão alvo, o pulmão (THATCHER *et al.*, 2008; SIMONE *et al.*, 2011). Os grupos de MILLER *et al.* (2002) e Jiang *et al.* (2010) demonstram que a fumaça do cigarro é capaz de levar a alterações imunológicas no pulmão de camundongos expostos, aumentando o número de células no BALF e a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF α , IL-6 entre outras. Poucos são aqueles que avaliam o efeito da PTA no sistema nervoso central (TORRES *et al.*, 2012; OBERG *et al.*, 2011).

O grupo de Khanna *et al.* (2013), demonstrou que a exposição de ratos Lewis por 65 dias à fumaça do cigarro 3R4F, levou ao aumento da transcrição de genes pró-inflamatórios em homogenato de encéfalo. Em nosso trabalho é possível observar que a exposição por 15 dias consecutivos aliada a uma pequena inflamação sistêmica é capaz de elevar a transcrição dos genes para os receptores TLR2 e TLR4, iNOS e citocinas pró-inflamatórias em todas as estruturas estudadas. Desta forma, estes estudos iniciam uma nova linha de pesquisa capaz de demonstrar as consequências da exposição ao fumo passivo em processos neuroinflamatórios.

Apesar do protocolo de exposição à fumaça do cigarro já ser bem estabelecido em nosso laboratório (TORRES *et al.*, 2012) foi necessária uma adaptação na câmara de polipropileno para a exposição de camundongos adultos, já que o trabalho anterior foi realizado em neonatos, entretanto a monitorização ambiental realizada por meio da mensuração de CO na câmara de exposição demonstrou que nossos resultados são coerentes com os encontrados na literatura e com trabalhos anteriores de nosso grupo (TORRES *et al.*, 2012; BISELLI *et al.*, 2011)

Para a monitorização biológica foram utilizados como parâmetros COHb, cotinina e nicotina. O sangue foi colhido imediatamente após a última exposição e a COHb foi dosada em seguida, uma vez que a ligação entre o monóxido de carbono e a hemoglobina em camundongos não passa de 30 minutos (MELLO *et al.*, 2005)

Nossos resultados apresentados na Tabela 2 são coerentes com o estudo de Biselli *et al.* (2011) que observaram uma concentração de 23% de COHb em animais C57Bl/6 expostos à fumaça do cigarro por 2 meses, porém são maiores que os

apresentados por nosso grupo, de aproximadamente 12% (Torres *et al.*, 2012). Uma diferença entre o estudo de Torres *et al.* (2012) e o nosso é que, no primeiro os animais recém-nascidos eram expostos em gaiolas com maravalha junto com as mães, e no nosso os animais são adultos e ficam soltos na câmara, justificando assim os valores maiores.

Os valores de nicotina encontrados estão de acordo com outros trabalhos de nosso grupo (TORRES *et al.*, 2012) e outros trabalhos encontrados na literatura (MELLO *et al.*, 2005; BISELLI *et al.*, 2011). Em relação à cotinina, os valores encontrados em nosso trabalho são 3,4 vezes superior aos observados por Torres *et al.* (2012). Tal fato pode ser justificado pelo tipo de exposição, uma vez que em nosso trabalho esta foi realizada de forma direta e não em caixas com maravalha, e ao comportamento do animal, que permanece em movimento e próximo as saídas de cigarro. Vale a pena destacar que os animais utilizados em nosso estudo são os C57BL/6 e no de Torres *et al.* (2012) a linhagem utilizada foi Balb/c. Desta forma, um dos fatores que podem interferir na biotransformação da nicotina é a diferença de linhagem, uma vez que camundongos C57BL/6 podem apresentar maior quantidade de enzimas do citocromo P450, justificando a rápida formação de cotinina.

A nicotina possui uma meia vida de 2 – 3 horas, sendo aproximadamente 80% de sua dose metabolizada pelo fígado em cotinina que por possuir meia vida de aproximadamente 20 horas, é encontrada de maneira estável no plasma (BENOWITZ, 1996; TONSTAD *et al.*, 2014). Desta forma exposições repetidas são capazes de aumentar os níveis de nicotina e cotinina no plasma de animais expostos. Por ser considerada ansiolítica, uma vez que a nicotina estimula o reflexo do vago, os camundongos passam a expressar um comportamento exploratório, o que os leva a buscar novos objetos pela caixa de exposição, desta forma o cigarro, mesmo com as barreiras colocadas, se torna um grande atrativo levando o animal a suas proximidades (POMERLEA, 1992).

A dose de LPS utilizada nos desafios (0,1 µg/animal) mimetiza um leve processo inflamatório, uma vez que é 10 vezes menor que as doses utilizadas por Glezer *et al.* (2003) e outros trabalhos. Apesar da dose menor de LPS, há a vigência de um processo inflamatório sistêmico, uma vez que os níveis da citocina TNF α estão aumentados em relação aos animais que receberam injeção i.v. de salina.

Uma vez na corrente sanguínea o LPS passa a circular por todo o organismo, atingindo os microvasos do SNC, sendo desta forma percebido pelos receptores TLR4 presentes nos pseudópodes dos astrócitos responsáveis pela seletividade da BHE (FARINA *et al.*, 2007). Ao reconhecer o agente invasor, os astrócitos liberam citocinas e quimiocinas que levam ao recrutamento de células da microglia e macrófagos circulantes (TIAN *et al.*, 2012).

Em seu estado “resting”, as células da microglia circulam pelo parênquima cerebral em busca de sinais de injúria, como por exemplo liberação de cálcio e adenosina tri-fosfato. Desta forma, ao receber os sinais de perigo emanados pelos astrócitos, as células da microglia migram para o local lesionado e se ativam (PRINZ e PRILLER, 2014).

Durante o processo de ativação, as células da microglia passam a expressar em suas membranas receptores que tornam possível o reconhecimento de fatores estranhos, como por exemplo os PPRs TLR4 e TLR2 (TIAN *et al.*, 2012). Poucos estudos mencionam quanto tempo é necessário para que haja a ativação de uma célula da microglia, em nosso estudo é possível observar que duas horas após o desafio com LPS em todas as estruturas analisadas há um aumento na transcrição dos genes para os receptores TLR2 e TLR4, além de apresentar aumento na transcrição da enzima iNOS nos grupos que foram desafiados com LPS e expostos à fumaça do cigarro, sugerindo que algumas das substâncias presentes na PTA sejam responsáveis por facilitar a ativação dos astrócitos e consequentemente a ativação das microglias.

Após ativadas, estas células se tornam responsáveis pela maciça produção e liberação de citocinas, a qual serão responsáveis pela progressão e possível resolução do processo inflamatório (TURNER *et al.*, 2014). Nosso estudo, assim como outros presentes na literatura (BESSIS *et al.*, 2007; LEE e KIM, 2014), foi capaz de demonstrar o aumento da transcrição das citocinas pró-inflamatórias TNF α e IL-1 β após 4 horas do desafio com o LPS.

Benowitz (1996) demonstrou que após a exposição à fumaça do cigarro os níveis de nicotina atingem o SNC em até 20 segundos e perduram por no máximo 2 horas, uma vez que se inicia o processo de biotransformação e a concentração de nicotina decai. Nossos dados podem ser explicados a partir dos achados de Benowitz (1996), uma vez que é possível observar a influência da fumaça do cigarro na resposta

imune apenas 2 horas após o desafio com LPS, sendo que após 4 horas não é possível observar diferenças estatísticas entre os grupos LPS e FPS.

Outro ponto a ser levado em consideração é que os diversos estudos que verificam a influência da PTA no sistema imune possuem um protocolo experimental de mais de 15 dias, de forma a consolidar as alterações causadas pela exposição (MILLER *et al.*, 2002; THATCHER *et al.*, 2008; JIANG *et al.*, 2010; SIMONE *et al.*, 2011; KHANNA *et al.*, 2012). Entretanto nosso estudo foi capaz de demonstrar que com pequenos períodos, a PTA é capaz de facilitar a indução do processo inflamatório no sistema nervoso central, mesmo que de maneira lábil.

A dosagem das citocinas pela técnica de ELISA é uma abordagem utilizada para verificar o produto final da transcrição gênica, ou seja, quais RNAs foram transcritos, traduzidos e se tornaram ativos.

Em nosso estudo não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos para a citocina IL-1 β em nenhuma das estruturas analisadas. Este fato pode ser explicado pela via de ativação desta citocina. Para que se torne funcional após o processo transcrricional a pró-IL-1 β deve ser clivada pela caspase 1, a qual só é ativa na presença do inflamossoma (DINARELLO, 2009).

Segundo Medzhitov (2008), os inflamossomas são recrutados apenas a partir de sinais de perigo como ATP ou quando há ruptura da parede do fagossomo. Desta maneira, como o estímulo inflamatório utilizado em nosso estudo é o LPS, um antígeno pequeno não endossomado, e a dose utilizada é relativamente pequena, não foram encontrados indícios da ativação do inflamossoma e consequentemente não houve a clivagem da pró-IL-1 β em IL-1 β ativa. Diferente do estudo de Eltom *et al.* (2014), a qual demonstraram que a ação conjunta no pulmão da fumaça do cigarro e do LPS foram capazes de ativar o inflamossoma e a via da IL1- β .

Para as outras citocinas estudadas é preciso observar cada estrutura de maneira individualizada. O estriado não apresentou diferença em nenhuma das citocinas dosadas, já o hipocampo e o córtex demonstraram haver um decaimento da IL-10 em relação ao período de 2 horas, esta reação pode ser devida a alterações no balanço de polarização das células da microglia.

Como demonstrado por Sopori e Kozak (1998), a fumaça do cigarro leva a um aumento da liberação de IL-4 pelos macrófagos. Por ser responsável pela polarização

das células Th0 em Th2, este aumento é capaz de alterar o balanço Th1/Th2 no pulmão de camundongos expostos, aumento a resposta Th2.

Ao se analisar o cerebelo, não é possível explicar de acordo com a literatura os dados encontrados para a dosagem das citocinas IL-10 e IL-6, necessitando desta forma de mais estudos para auxiliar no entendimento desta resposta.

Inicialmente este projeto foi baseado no trabalho do grupo de Glezer *et al.*, (2003), na qual ratos Wistar foram desafiados com 1 mg/kg de LPS intravenoso e foi realizado uma análise de decurso temporal para o NF- κ B. Os autores descreveram que o pico de ativação era 2 horas após o desafio com o LPS. Estes experimentos foram realizados através de gel de retardo, o que demonstra a translocação da subunidade p65 para o núcleo.

Com o intuito de verificar o início do processo inflamatório, tentamos repetir os achados do grupo de Glezer *et al.* (2003) por meio da quantificação da subunidade P65 pela técnica de *Western Blot*. Nossos resultados não formam capazes de mostrar o aumento desta subunidade em nenhum dos períodos utilizados. Desta forma procedeu-se com os testes para verificar se a diferença de resposta entre nossos resultados e o de Glezer *et al.* (2003), poderia ser em função da dose de LPS utilizada ou do processo de perfusão que remove as células ativas provenientes da periferia.

A partir desses resultados podemos inferir que há a presença de células ativadas provenientes da periferia, e recrutadas a partir da ativação dos astrócitos no cerebelo, uma vez que é possível observar um aumento da subunidade P65 após 1 hora do desafio com LPS. Não foi possível observar a mesma ativação vista por Glezer *et al.* (2003), pois o período analisado foi anterior ao de seu trabalho, sugerindo que as células recrutadas da periferia demorem mais para alcançar estruturas mais preservadas como o hipocampo e o estriado por exemplo.

Vale destacar que o estudo realizado por Glezer *et al.* (2003) tinha o intuito de verificar a resposta imune como um todo, utilizando-se de artefatos tanto periféricos quanto centrais e o nosso procura explorar a resposta tecidual de maneira individualizada, de forma a elucidar os efeitos da fumaça do cigarro nas células imunes do sistema nervoso central.

De uma forma geral, nossos resultados sugerem a implantação de um processo inflamatório, uma vez que foi observado aumento estatisticamente significativo para os genes inflamatórios em todas as estruturas. Nossos dados estão de acordo com

os apresentados por Khanna *et al.* (2012), que mostraram o aumento da transcrição de mRNAs no SNC de ratos expostos à fumaça do cigarro durante 6 semanas.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Podemos concluir que a exposição à fumaça do cigarro:

- 1- Foi capaz de aumentar a transcrição gênica dos receptores TLR4 e TLR2 após 2 horas do desafio com LPS;
- 2- Influencia apenas o início do processo inflamatório, uma vez que 4 horas após o desafio com LPS não há diferença entre o grupo exposto ao ar sintético e o grupo exposto à fumaça do cigarro e desafiados com LPS;
- 3- Não foi capaz de elevar as concentrações de citocinas no hipocampo, estriado e córtex pré-frontal.

De uma maneira geral, nossos resultados indicam que a exposição à fumaça do cigarro foi capaz de levar a alterações transcricionais após 2 horas da indução do processo inflamatório sistêmico, o qual não pode ser observado após 4 horas. Desta forma, mais estudos são necessários para esclarecer as alterações imunes causadas pela exposição à PTA no sistema nervoso central.

Bibliografía

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S.. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 6ª edição, 2008.
- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S.. *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 7ª edição, 2012.
- Arend, W.P.; Palmer, G.; Gabay, C.. IL-1, IL-18 and IL-33 families of cytokines. *Rev. Immunology*, v.223, p.503-507, 2010.
- Bechmann, I.; Galea, I.; Perry, V.H.. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends of immunology*, v.28, p.5-11, 2007
- Benowitz, N.L.. Pharmacology of nicotine: Addiction and Therapeutics. *Annu Rev, Pharmacol. Toxicol*, v.36, p.597-613, 1996.
- Bessis, A.; Bechade, C.; Bernard, D.; Roumier, A.. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, v.55, p.233-238, 2007
- Biselli P.J.C.; Lopes, F.D.T.Q.S.; Moriya, H.T.; Rivero, D.H.R.F., et al.. Short-term exposure of mice to cigarette smoke and/or residual oil fly ash produces proximal airspace enlargements and airway epithelium remodeling. *Braz J Med Biol Res*, v.44, p.460-468, 2011.
- Boraschi, D.; Lucchesi, D.; Hainzl, S.; Leitner, M., et al.. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur. Cytokine Netw.* v.22, p.127-147, 2011.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem.* 1979.; 72:248.
- Chatterjee, P.; Chiasson, V.L.; Bounds, K.R.; Mitchell, B.M.. Regulation of anti-inflammatory cytokines interleukin-4 and interleukin-10 during pregnancy. *Frontiers in Immunology*, v.5, p.1-6, 2014.
- Calichi, V. e Vaz, C.. *Imunologia*. Revinter, 2ª edição, 2009.
- Carson, M.J.; Sutcliffe, G. Balancing Function vs. Self Defense: The CNS as an Active Regulator of Immune Responses. *Journal of Neuroscience Research*, v.55, p.1-8, 1999.

- Casanova, J.L.; Abel, L.; Quintana-Murci, L.. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological and clinical genetics. *Annual Review of Immunology*, v.29, p.447-491, 2011.
- Dinarello, C.A.. Immunological and inflammatory functions of the interleukine-1 family. *Annual Rev. Immunology*, v.27, p.519-550, 2009.
- Duarte, J.L.; Faria, F.A.C.; Ceolin, D.S.; *et al.,*. Efeitos da inalação passiva da fumaça do cigarro sobre as pregas vocais de ratos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. Bauru, v.72, n.2, p.210-216, 2006.
- Eltom S.; Dale N.; Raemdonck K.R.G.; Stevenson C. S.; *et al.*. Respiratory Infections Cause the Release of Extracellular Vesicles: Implications in Exacerbation of Asthma/COPD. *Plos One*, v.9, n.6, 2014.
- Engelhardt, B.; Coisne, C.. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS*, v.18, 2011.
- Farina C, K. M., Giese T, Aloisi F, Meinel E.. Preferential expression and function of TLR3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol*, v.159, p.12-19, 2005.
- Farina C.; Aloisi, F.; Meinel, E.. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunology*, v.28, p.138-145, 2007
- Glezer I., Mnhos C.D., Kawamoto E.M., Marcourakis T., *et al.*, MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kB induced by LPS. *Neuropharmacology*, n.45, v.8, p.1120-1129, 2003.
- Gray, S.M.; Bloch, M.H.. Systematic review of proinflammatory cytokines in obsessive compulsive disorder, *Cure Psychiatry Rep.*, 2012
- Hall, D.T.; Ma, J.F.; Marco, S.D.; Gallouzi, I.. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in muscle wasting syndrome, sarcopenia, and cachexia. *AGING*, v.3, n.8, p.1-14, 2011.
- IARC – International Agency for research on cancer; Monographs on the evaluation of cancer risks to humans – Tobacco smoke and involuntary smoking. V.83, 2002.
- INCA – Instituto Nacional de Câncer; FALANDO SOBRE TABAGISMO, 2011 – www.inca.gov.br
- Jiang, H.; Zhu, Y.; Xu, H.. Activation of hypoxia-inducible factor-1a via nuclear factor-kB in rats with chronic obstructive pulmonary disease. *ABBS – Acta Biochim Biophysin*. v.42, p.483-488, 2010

- Kawai, T.; Akira, S..The role of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology* v.21, n.4, p.317-337, 2009.
- Khanna, A.; Mehra, M.; Royal III, W.. Inflammation and oxidative stress induced by cigarette smoke in Lewis rats brain. *Journal of Neuroimmunology*, 2012
- Kishimoto, T.. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunology*, v.22, p.347-352, 2010.
- Kraft, A.D.; Harry, G.J.. Features of microglia and neuroinflammation relevant to environmental exposure and neurotoxicity. *International Journal of environmental research and public health*, n.8, p.2980-3018, 2011
- Kumagai, Y.; Takeuchi, O.; Akira, S.. Pathogen recognition by innate receptors. *Journal of Infectious diseases and chemotherapy*, v.14, p.86-92, 2008.
- Kumagai, Y.; Akira, S.. Identification and functions of pattern-recognition receptor. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*, v.125, n.5, p.985-993, 2010.
- Lee, E.J.; Kim, H.S.. The anti-inflammatory role of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lipopolysaccharide stimulated microglia. *Journal of Neuroinflammation*, v.11, 2014.
- Leitão, R.F.C.; Brito, G.A.C., Oriá, R.B. *et al.*. Role of inducible nitric oxide synthase pathway on methotrexate induced intestinal mucositis in rodents. *BMC Gastroenterology*, v.11, n.90, 2011.
- Li Y, C. N., Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang G. Increased IL-23 p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain*, v.130, p.490-451, 2007.
- Libby, P.. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*, v.65, n.12, p.S140-S146, 2007.
- Medzhitov, R.; Janeway, C.A.Jr.. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, v.91, p.295-298, 1997
- Medzhitov, R.. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v.454, p.428-435, 2008
- Medzhitov, R.; Horng, T.. Transcriptional control of the inflammatory response. *Nature Immunology*, v.9, p.692-703, 2009
- Mendes, C.C.C.. *Efeito da nicotina na ativação do fator de transcrição NF-κB no sistema nervoso central na vigência de estímulo inflamatório induzido por*

- lipopolissacarídeo (LPS)*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2009.
- Mello, P.R.B.; Pinto, G.R.; Botelho, C.. Influencia do tabagismo na fertilidade, gestação e lactação. *Jornal de Pediatria*, v.77, n.4, p.257-265, 2001.
- Mello, P.R.B.; Okay, T.S.; Dores, E.F.G.C.; Botelho, C.. Avaliação do sistema de exposição tabagística passiva em modelo experimental utilizando cotinina, carboxihemoglobina como marcadores de exposição. *Pulmão*, v.14, n.3, p.228-236, 2005
- Miller, L.M.; Foster, W.M.; Dambach, D.M. *et al.*,. A murine model of cigarette smoke induces pulmonary inflammation using intranasally administered smoke-conditioned medium. *Experimental Lung Research*, v.28, p.435-455, 2002.
- MS – Ministério da Saúde – Instituto Nacional do Câncer – Convenção-quadro para o controle do tabaco. Brasil, 2011
- Oberg, M.; Jaakola, M.S.; Woodward, A.; Peruga, A.; *et al.*. Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *Lancet*, v.377, n.9760, p.139–146, 2011.
- OMS – Organização Mundial da Saúde; Relatório sobre a Epidemia Global de Tabagismo: Pacote MPOWER, 2008.
- OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde – Ambiente 100% livre de tabaco – Guia para elaboração e implantação de políticas públicas. Brasil, 2008.
- Paolicelli, R.C.; Bolasco, G.; Pagani, F.; Maggi, L. *et al.*. Synaptic pruning by microglial is necessary for normal brain development. *Science*, v.333, p.1456- 1458, 2011
- Parrishi, W.R.; Rosas-Ballina, M.; Gallowitsch-Puerta, M. *et al.*,. Modulation of TNF released by choline requires $\alpha 7$ subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. *Mol Med*, v.14, n,9-10; p.567-574, 2008.
- Pera, T.; Gosens, R.; Lesterhuis, A.H.; Sami, R.; Toorn, M.; Zaagsma, J.; Meurs, H.. Cigarette smoke and lipopolysaccharide induce a proliferative airway smooth muscle phenotype. *Respiratory Research*, v.11,n.48, 2010.
- Pomerleau, O.F.. Nicotine and the Central Nervous System: Biobehavioral Effects of Cigarette Smoking. *The American Journal of Medicine*, v.93, 1992.
- Prinz M, M. A.. Microglia in the CNS: immigrants from another world. *Glia*, v.59, p.177-187, 2011.

- Prinz, M.; Priller, J.. Microglial and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature*, v.15, p.300-312, 2014.
- Salmária, J.G.; Oliveira, B.R.G.. Crianças de centro de educação infantil: exposição ao fumo passivo. *Ciência, Cuidado e Saúde*, v.5, n.1, p.16-23, 2006.
- Santarlaschi, V.; Cosmi, L.; Maggi, L.; Liotta, F., *et al.* IL-1 and Thelper immune response. *Frontiers of Immunology*, v.4, p.182, 2013.
- Sehgal, A.; Berger, M.S.. Basic concepts of immunology and neuroimmunology. *Neurosurg Focus*, v.9, 2000
- Simone, R.E.; Russo, M.; Catalano, A. *et al.,.* Lycopene inhibits NF-kB-mediated IL-8 expression and changes redox and PPAR γ signaling in cigarette smoke-stimulated macrophages. *PLOS ONE*, v.6, n.5, p.1-13, 2011.
- Sopori, M.L.; Kozak, W.. Immunomodulatory effects of cigarette smoke. *Journal of Neuroimmunology*, v.83, p.148-156, 1998.
- Stow, J.L.; Low, P.C.; Offenhäuser, C.; Sangermani, D.. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology*, v. 214, p.601-612, 2009.
- Takeshita, Y.; Ransohoff, R.M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models.. *Immunology Review*, v.248, p.228-239, 2012.
- Taylor, B.S.; Geller, D.A.. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock*, v.13, n.6, p.413-424, 2000.
- Thatcher, T.H.; Benson, R.P.; Phipps, R.P.; Sime, P.J.. High-dose but not low-dose mainstream cigarette smoke suppresses allergic airway inflammation by inhibiting T cell function. *American Physiological Society*, n.295, p.412-421, 2008
- Tian, L.; Ma, L.; Kaarela, T.; Li, Z.. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases. *Journal of Neuroinflammation*, v.9, 2012
- Tonstad, S.; Gustavsson, G.; Kruse, E.; Walmsley, J.M., *et al.* Symptoms of Nicotine Toxicity in Subjects Achieving High Cotinine Levels During Nicotine Replacement Therapy. *Nicotine & Tobacco Research*, p.1-6, 2014.
- Torres LHL, Moreira WL, Quaglio NB, et al. Avaliação do estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) de camundongos expostos à fumaça do cigarro.

Dissertação de Mestrado – Faculdades de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2009

- Torres LH; Moreira WL; Garcia RCT; *et al.,*. Environmental Tobacco Smoke Induces Oxidative Stress in Distinct Brain Regions of Infant Mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v.75, n.16-17, p. 971-980, 2012
- Tracey, D.; Klareskog, L.; Sasso, E.H.; Salfeld, J.G., *et al.*. Tumor necrosis factor antagonist mechanism of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.*, v.117, p.244-279, 2008.
- Tremblay, M.E.; Lowery, L.R.; Majewska, A.K.. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, v.8, 2010
- Turner, M.D.; Nedjai, B.; Hurst, T.; Pennington, D.J.. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signaling and inflammatory diseases. *Biochim. Biophys. Act.*, 2014
- UNODOC – *United Nations Office on Drugs and Crime* – World Durg Report, 2012
- Wilson, E.H.; Weninger, W.; Hunter, C.A.. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *The Journal of clinical investigation*, v.120, n.5, p.1368-1379, 2010
- Yokota, S; Tamaki O; Fujii N. The battle between virus and host: modulation of toll-like receptor signaling pathway by virus infection. *HHindawi Publishingn Corporation*, v. 2010, p.1-12, 2010.
- Zipp, F.; Aktas, O.. The brain as a target of inflammation: common pathway links inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in Neuroscience*, v.29, n.9, p.518-527, 2006.

Anexos

8. ANEXOS

8.1. Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação
Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas FICHA DO ALUNO
<hr/>	
9141 - 7913856/1 - Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão	
Email:	ana.carolina.cardoso@usp.br
Data de Nascimento:	18/08/1989
Cédula de Identidade:	RG - 47.679.316-6 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Faculdades Oswaldo Cruz - São Paulo - Brasil - 2012
<hr/>	
Curso:	Mestrado
Programa:	Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula:	10/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	10/02/2012
Data Limite para o Depósito:	11/08/2014
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Tania Marcourakis - 10/02/2012 até o presente. E.Mail: tmarcour@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 10/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 24/04/2013
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
<hr/>	
Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)	
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014	
Impresso em: 01/07/14 15:06:13	
<div style="text-align: right;"> Irineu Ruel de Oliveira Chefe Adm. de Serviço SPG/FQF/USP Nº USP 2115033</div>

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9141 - 7913856/1 - Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803-2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5802-2/7	Tópicos Avançados em Toxicologia I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	75	A	N	Concluída
BMB5795-4/1	Neurociência Básica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	15/03/2012	14/06/2012	120	8	100	A	N	Concluída
BMI5897-1/1	Resposta Imune Inata e Adaptativa no Sistema Nervoso Central (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	21/05/2012	17/06/2012	60	4	100	B	N	Concluída
FBC5818-1/1	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	24/10/2012	28/11/2012	45	3	90	A	N	Concluída
EDM5791-5/10	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	28/06/2013	120	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
MAE5755-6/5	Métodos Estatísticos Aplicados às Ciências Biológicas (Instituto de Matemática e Estatística - Universidade de São Paulo)	12/08/2013	29/11/2013	120	8	100	B	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	10	25	27
Estágios:			
Total:	10	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 10/02/2014

Impresso em: 01/07/14 15:06:13

Irineu Ruel de Oliveira
 Chefe Adm. de Serviço
 SPG/FCF/USP
 Nº USP 2115033

8.2. Comitê de Ética FMUSP

A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **20/06/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **124/12** intitulado: **“EFEITO DA FUMAÇA DO CIGARRO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL”** que utilizará **365** animais da espécie **Camundongo C57Bl/6**, apresentado pelo **Departamento de PATOLOGIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Thais Mauad

Pesquisador (a) Executante: Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão

CEP-FMUSP, 22 de Junho de 2012.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

8.3. Comitê de Ética FCFUSP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/97/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Efeito da fumaça do cigarro na resposta inflamatória do Sistema Nervoso Central"** (Protocolo CEUA/FCF/379), de responsabilidade da pesquisadora **Ana Carolina Cardoso dos Santos Durão**, sob a orientação da Profa. Dra. Tânia Marcourakis, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 01 de outubro de 2012.

São Paulo, 02 de outubro de 2012.

Prof. Dr. Jorilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP