

Vitor Cortizo da Fonsêca

**Estudo morfométrico da retina de ratos expostos agudamente à fumaça
de cigarro**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Oftalmologia

Orientador: Prof. Dr. Walter Yukihiko Takahashi

São Paulo

2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

**Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

©reprodução autorizada pelo autor

Fonsêca, Vitor Cortizo da

Estudo morfométrico da retina de ratos expostos agudamente à fumaça de cigarro /
Vitor Cortizo da Fonsêca - - São Paulo, 2006.

Tese (doutorado) - - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia.

Área de concentração: Oftalmologia.

Orientador: Walter Yukihiko Takahashi.

Descritores: 1.Retina/anatomia & histologia 2.Histologia/instrumentação
3.Tabaco 4.Envenenamento 5.Modelos animais

USP/FM/SBD-147/06

Dedicatória

À minha esposa e filho, Larissa e Felipe, os mais importantes acontecimentos da minha vida. Foram seu amor incondicional e constante apoio em todos os momentos, que tornaram esta conquista possível. Obrigado pela paciência que tiveram neste período. Em especial a você, meu par, meu amor, minha vida.

Ao meu pai Alberto e minha mãe Mari, responsáveis por tudo que sou e realizei. Sou grato a vocês por sempre terem sido um exemplo de vida, caráter e fonte inesgotável de apoio. Mais do que pais, os considero como meus maiores amigos. A vocês, o meu amor eterno.

Aos avós Máximo Cortizo (in memoriam) e Otilia Cortizo, cuja dedicação e empenho permitiram que realizasse todos os meus sonhos, por mais impossíveis que parecessem. Vocês foram meu espelho, e sinto isso profundamente arraigado na minha alma. Por tudo que fizeram, sou infinitamente grato e retribuí tentando orgulha-los sempre. Também a vocês, o meu amor eterno.

À minha família Fonsêca, Vó Mariazinha, Gracia, Igor, Tiago e Lucas. Muitas horas de lazer foram deles subtraídas em prol da minha atribulada profissão. Fico feliz e muito orgulhoso por fazer parte desta família, e espero continuamente retribuir o amor que sentem por mim.

À minha família Cortizo, Fernando, Bea, Lucas, Fernanda e Gel, cujo convívio carinhoso sempre marcou minha vida e minha formação pessoal. Todos os momentos que partilharam comigo, carregarei para sempre no meu coração.

À minha Família Barros Nunes, que me aceitou tão genuinamente no seu convívio, tornando fácil minha adaptação ao novo lar. Seu apoio foi fundamental para o término desta tarefa. A vocês o meu sincero agradecimento.

Aos primos Cláudio Nobre, Luiz Gustavo Bastos e Marcos D'Oliveira, pela amizade e apoio em todos os momentos, profissionais ou pessoais, no decorrer destes anos. "Amigo é coisa para se guardar..."

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Walter Takahashi, que prontamente me abriu as portas desta instituição, e com confiança e apoio incondicionais, exerceu grande influência na minha carreira acadêmica e profissional. A um verdadeiro mestre, sempre disposto a esclarecer dúvidas e indicar caminhos, meu sincero agradecimento.

Ao Prof. Dr. Paulo Saldiva, exemplo de cientista. Pela liberdade, confiança e apoio em todas as etapas do projeto. Sempre demonstrou uma enorme disposição para ouvir e discutir dúvidas, sem perder a objetividade e simplicidade. Sem ele nada do que realizamos seria possível.

Aos professores da pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Newton Kara-José, ao Prof. Dr. Carlos Alberto Rodrigues Alves e ao Prof. Dr. Mário L. Monteiro, pelo apoio ao longo do curso.

Ao Prof. Dr. José Roberto Jardim, cujo espírito científico e criatividade superaram obstáculos aparentemente intransponíveis. Seu incentivo foi a grande força propulsora deste projeto.

À Dra. Luciana Bizeto, colaboradora no desenvolvimento desta pesquisa. Seu exemplo e determinação são inigualáveis.

Aos colegas e amigos Alexandre Rosa, Bruno Campelo e Marcelo Netto, companheiros de jornada científica. Muitos momentos de dúvida foram solucionados discutindo com vocês.

Aos colegas e amigos Oliver Nascimento, Anamaria Fleig Mayer, Aquiles Camelier e Fernanada Rosa por todo apoio e companheirismo durante a realização deste projeto.

À Dra Ruth Santo pelo auxílio e colaboração no desenvolvimento dos métodos de fixação. Sua disponibilidade e espírito de colaboração foram fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Milton Ruiz Alves, cujo exemplo acadêmico serve como inspiração aos jovens pesquisadores. Suas idéias e conselhos foram sempre muito bem vindos, e muito contribuíram na minha formação.

Ao Drs. Tadeu Cvintal, Maurício Mattos e Wagner Ghirelli, que contribuíram profundamente na minha formação profissional.

À Regina de Almeida, do departamento de pós-graduação da oftalmologia da FMUSP, meu agradecimento pela colaboração, paciência e amizade. Sem dúvida, uma das responsáveis pelo bom funcionamento do programa de pós-graduação da clínica oftalmológica da FMUSP.

À Cátia Arruda pela boa vontade constante e prestimoso auxílio na preparação do material histológico.

À Sandra Mallagutti, pela orientação na avaliação estatística deste estudo.

“A razão cardeal de toda a superioridade humana é sem dúvida a vontade. O poder nasce do querer. Sempre que o homem aplique a veemência e a perseverante energia de sua alma a um fim, ela vencerá os obstáculos. E se não atingir o alvo, fará pelo menos coisas admiráveis.”

José de Alencar

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas e símbolos

Resumo

Summary

1 – INTRODUÇÃO.....	01
1.1 – Objetivos.....	05
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.1 – Noções anatômicas e histológicas da retina.....	07
2.2 – Morfometria.....	10
2.3 – Tabagismo e a saúde humana.....	11
2.3.1 – Exposição à fumaça de cigarro.....	11
2.3.2 - Estresse oxidativo.....	14
2.3.3 – Morte celular programada: a apoptose.....	16
2.3.4 – Tabagismo e as doenças oculares.....	18
3 – MÉTODOS.....	23
3.1 – Desenho do estudo.....	24
3.2 – Aspectos éticos.....	24
3.3 – Materiais.....	25
3.3.1 – Animais.....	25
3.3.2 – Método de inalação.....	26
3.4 – Preparo e análise histológica.....	31
3.4.1 - Sacrifício dos animais.....	31
3.4.2 – Carboxihemoglobina sérica e cotinina plasmática.....	32
3.4.3 – Preparo dos tecidos.....	32
3.4.4 - Análise morfométrica.....	33
3.5 - Análise estatística.....	38
4 – RESULTADOS.....	39
4.1 – Carboxihemoglobina sérica e cotinina plasmática.....	40
4.2. – Estimativas morfométricas.....	41
4.2.1 - Estimativas do Grupo 0h.....	42

4.2.2 - Estimativas do Grupo 24h.....	45
4.2.3 - Estimativas do Grupo 48h.....	48
4.2.4 - Estimativas dos subgrupos Fumantes comparados entre si	51
4.2.5 - Estimativas dos subgrupos Controles comparados entre si.....	53
5 – DISCUSSÃO.....	54
6 – CONCLUSÕES.....	69
7 – ANEXOS.....	71
8 – REFERÊNCIAS.....	77

Lista de Abreviaturas e símbolos

%	por cento
x	(...) vezes
>	maior que
<	menor que
±	mais ou menos
=	igual
µm	micrômetros
µm ²	micrômetros quadrados
°C	graus Celsius
cm	centímetro
et al.	e outros
Inc.	<i>“incorporation”</i>
L/min	litros por minuto
L	litros
m	metro
N	Tamanho da amostra
n ⁰	número
min	minutos
ng/mL	nanômetros por mililitro
nm	nanômetros
ppm	partículas por milhão

RESUMO

Fonsêca VC: Estudo morfométrico da retina de ratos expostos agudamente à fumaça de cigarro [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 110p.

Objetivo: Estudar as alterações morfométricas da retina de ratos expostos agudamente à fumaça de cigarro. **Métodos:** Em um estudo experimental, controlado, mascarado, foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos (8 semanas de idade), sendo metade deles expostos por duas horas contínuas à fumaça de cigarro em uma câmara de inalação e a outra metade exposta a ar comprimido como grupo controle. A fumaça foi aspirada diretamente do cigarro utilizando um sistema venturi, e conduzida para a câmara. A concentração de monóxido de carbono no interior da câmara de inalação foi mantida em uma faixa constante de 45 a 55 partes por milhão, monitorada eletronicamente no interior do recipiente. Os ratos foram sacrificados imediatamente após a inalação e nos momentos 24 e 48 horas após exposição. Os olhos foram enucleados e analisados por meio da morfometria em microscópio óptico, por examinador mascarado. **Resultados:** Foram identificadas regiões da retina do grupo exposto que sofreram redução das estimativas morfométricas em comparação ao grupo controle, com significância estatística correspondendo às regiões dos fotorreceptores, camada nuclear interna e plexiforme interna 48 horas após a exposição. Comparando os grupos expostos entre si houve uma redução progressiva nas estimativas morfométricas das camadas retinianas com o aumento do intervalo entre o término da exposição e o sacrifício, de forma estatisticamente significativa na camada nuclear interna. **Conclusão:** As retinas dos ratos expostos agudamente à fumaça de cigarro sofreram uma redução nas estimativas morfométricas, com uma tendência a redução progressiva nas estimativas no decorrer das primeiras 48 horas após exposição.

Descritores: Retina/anatomia & histologia, Histologia/instrumentos, tabaco, intoxicação, modelos animais.

SUMMARY

Fonsêca VC: Morphometric study of the retina of rats acutely exposed to cigarette smoke [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 110p.

Objective: To evaluate morphometric alterations of the retina, from rats acutely exposed do cigarette smoking. **Methods:** In an experimental, prospective, masked study with 24 male *Wistar* rats (8 weeks old), half of them were exposed during two hours continually to cigarette smoking inside an intoxicating chamber, while the other half exposed to compressed air. The smoke was aspirated directly from cigarette, using a venturi system, and conducted to the chamber. The carbon monoxide concentration was constantly kept in between 45 to 55 parts per million, electronically monitored inside de chamber. The rats were sacrificed immediately after the inhalation, 24 and 48 hours after exposition. The eyes were enucleated and analyzed trough morphometry, in an optical microscope, by a masked examiner. **Results:** It was identified regions of the retina in the experimental group that suffered a reduction in the morphometric estimates, comparing to control group, with statistical significance, corresponding to the photoreceptor layer, the inner nuclear and inner plexiform layers, 48 hours after exposure. Comparing the exposed groups between themselves, there was a progressive reduction in the morphometric estimates of retinal layers after an increase in time between finishing the exposure and sacrifice, with statistical significance in inner nuclear layer. **Conclusion:** The retina of rats acutely exposed to cigarette smoke suffered a reduction in the morphometric estimates, with a tendency to progressive reduction in the estimates during the initial 48 hours after exposure.

Keywords: Retina/ anatomy & histology, histology/instruments, tobacco, poisoning, animal models.

1 Introdução

O tabagismo é a segunda maior causa de óbito no âmbito global, sendo responsável pela morte de um em cada dez adultos no mundo (WHO, 2006b), e tem papel já muito bem estabelecido no desenvolvimento de neoplasias, doenças cardiovasculares e na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (Mayer, 2004).

A fumaça de cigarro é composta por mais de 4.000 compostos ativos que podem ser tóxicos a órgãos do corpo humano após exposição, seja ela aguda ou crônica, como o monóxido de carbono (CO), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, e a nicotina (Ambrose e Barua, 2004). O tabaco está envolvido com afecções do sistema respiratório, imunológico, sistema nervoso central e até mesmo de órgãos do sentido, como a visão (Solberg et al, 1998).

Sua ação nos fenômenos oxidativos, implica o cigarro na fisiopatologia de processos neurodegenerativos. A apoptose (morte celular programada) pode ser induzida por uma variedade de formas, uma delas pela ação de substâncias que podem atuar na regulação dos mecanismos de oxidação (Thompson, 1995). O tabagismo atua na apoptose celular por meio de sua capacidade de reduzir elementos importantes na proteção do estresse oxidativo (Chow et al 1986; Striker et al, 1988; Uz et al 2003), assim como de induzir aumento de substâncias oxidantes (Pryor et al, 1983; Striker

et al, 1988; Morrow et al, 1995). Também apresenta papel direto no dano ao DNA celular (Izzotti, 2003; De Flora et al, 2003).

Diversas doenças oculares estão relacionadas ao cigarro, muitas delas comuns e graves. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o tabagismo é fator de risco para afecções como oftalmopatia associada à tireóide (oftalmopatia de Graves), degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e catarata. Seu envolvimento ainda é controverso na etiologia de doenças como o glaucoma, neuropatia óptica isquêmica e ambliopia tabaco-álcool (Solberg et al, 1998; Cheng et al, 2000; Hepsen, Evereklioglu, 2001).

Os estudos associando o tabagismo à degeneração de células da retina na DMRI, despertaram nossa atenção para a pesquisa nesta área (Klein et al., 1993; Christen et al., 1996; Tamakoshi et al., 1997; Delcourt et al., 1998; Solberg et al., 1998; Wilson et al., 2001; Mitchell et al., 2002; Khan et al., 2006). Entretanto, nas investigações em humanos é difícil afastar outros fatores que podem influenciar os resultados. Os pacientes geralmente apresentam doenças associadas, ou até mesmo diferentes hábitos de utilização do tabaco, como a quantidade de maços de cigarro consumida ou a frequência de consumo (Hyman et al., 2000; Klein et al., 2003; McGwin et al., 2005; Sato et al., 2006).

Já os modelos “*in vitro*”, apesar de permitirem um maior controle dos fatores externos, estão longe de se assemelhar à maneira da exposição que observamos na prática clínica. Nestes estudos são utilizadas isoladamente apenas algumas das substâncias encontradas no cigarro, o que não reflete a composição real da sua fumaça (Stampfer et al., 1981; Patton et al., 2002;

Liu et al., 2005). Além disso, os métodos de intoxicação e as células-alvo dos estudos não reproduzem com fidedignidade a fisiopatologia do tabagismo (Dilsiz et al., 1999; Evereklioglu et al., 2003).

A melhor maneira de simular a exposição real à fumaça de cigarro sem comprometer a saúde de seres humanos é por meio da aplicação de modelos experimentais de exposição em animais. Isolar os fatores causais, uniformizar a dose e o método de exposição, permitem melhor compreensão da fisiopatologia da doença assim como o estudo de métodos de tratamento. Utilizando modelos de exposição, diversos órgãos-alvo podem ser avaliados, assim como peculiaridades histológicas de diferentes regiões de um mesmo tecido (Akhter et al., 2005; Koul et al., 2005; Shiba et al., 2005).

O impacto do tabagismo na saúde ocular e as evidências de degenerações retinianas associadas ao tabagismo motivaram a execução deste estudo experimental animal das alterações histológicas retinianas relacionadas à exposição aguda à fumaça de cigarro, por meio da morfometria.

1.1 – Objetivos

1. Estudar as alterações histológicas da retina de ratos submetidos à exposição aguda à fumaça de cigarro, por meio da morfometria.
2. Comparar as alterações morfométricas retinianas associadas à exposição aguda de ratos à fumaça de cigarro imediatamente após a exposição, 24 horas, e 48 horas após a exposição.

2 Revisão da Literatura

2.1 - Noções anatômicas e histológicas da retina

A retina é o tecido onde há a captação da imagem e transformação da energia luminosa em estímulos bioquímicos, que são enviados ao sistema nervoso central, onde proporcionam o sentido que denominamos visão. Anatomicamente as porções mais internas da retina são nutridas por capilares derivados da artéria central da retina, enquanto sua parte externa é avascular, e seu suprimento metabólico deriva dos vasos da coróide (Klintworth e Eagle, 1999).

O tecido retiniano do olho humano possui características singulares, onde tipos celulares de diferentes formas e funções estão organizados em camadas. Histologicamente, localizada sobre a camada vascular da coróide denominada coriocapilar, está o epitélio pigmentado da retina (EPR). Em seguida, encontram-se os segmentos externos dos fotorreceptores (SEF), segmentos internos dos fotorreceptores (SIF), a membrana limitante externa, a camada nuclear externa (CNE), a camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), a membrana limitante intermediária, camada plexiforme interna (CPI), camada de células ganglionares (CCG), camada de fibras nervosas (CFN) e a membrana limitante interna (Moreira Júnior e Ávila, 2000) (Figura 1).

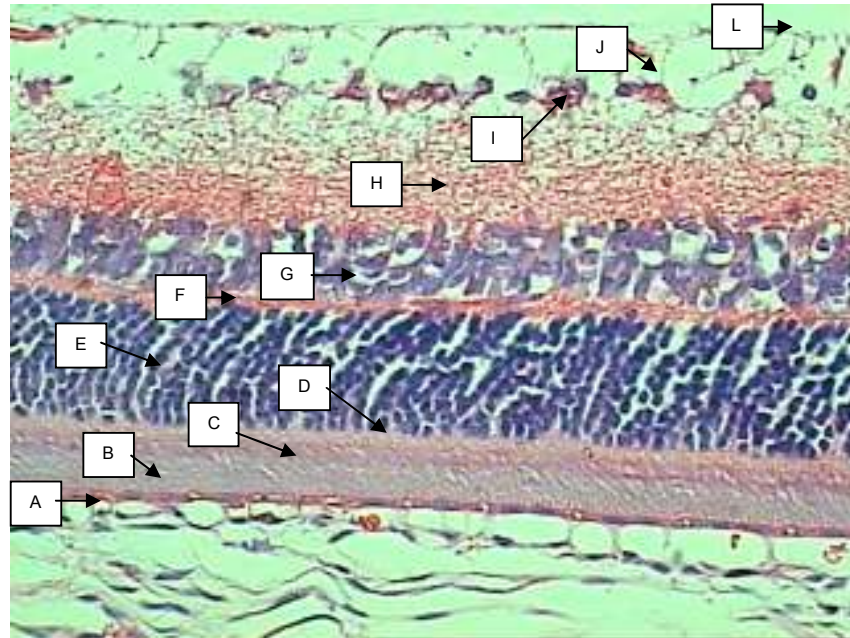


Figura 1. Principais camadas em corte histológico da retina de ratos Wistar, onde se observa: A= epitélio pigmentado da retina; B= segmento externo dos fotorreceptores; C= segmento interno dos fotorreceptores; D= membrana limitante externa; E= camada nuclear externa; F= camada plexiforme externa; G= camada nuclear interna; H= camada plexiforme interna; I= camada de células ganglionares; J= camada de fibras nervosas; L= membrana limitante interna. Coloração HE. Aumento de 40x

Das camadas da retina, quatro são formadas por células, enquanto duas são camadas de conexões entre os neurônios (camadas plexiformes). Os fotorreceptores são as células que transformam o estímulo luminoso em fotoquímico e possuem íntima relação com o epitélio pigmentado da retina (EPR), que lhe dá suporte metabólico (Spalton et al., 1995).

Os núcleos dos fotorreceptores encontram-se na camada nuclear externa. Estes se conectam às células da camada nuclear interna, que é composta por células intermediárias, denominadas interneurônios: células bipolares, células horizontais, células amácrinas e células de Müller. Estas últimas formam uma glia especializada da retina, e são responsáveis por seu arcabouço estrutural. Seus processos expandem-se na retina interna em proximidade com a porção vítrea, formando a membrana limitante interna. Os prolongamentos destas células também se projetam na região do segmento interno dos fotorreceptores, formando junções diferenciadas que compõem a membrana limitante externa. As células de Müller contribuem para formação do principal tecido cicatricial em resposta às degenerações retinianas (Spalton et al., 1995).

As células amácrinas, horizontais e bipolares fazem a conexão entre os fotorreceptores e as células ganglionares. As células ganglionares e as fibras nervosas formam as camadas mais internas da retina e tem íntima relação entre si (Spalton et al., 1995).

A barreira hemato-retiniana pode ser dividida em duas partes: a barreira hemato-retiniana interna, constituída pelo endotélio vascular retiniano, com suas células intrinsecamente ligadas pelas junções íntimas (“*zonulae occludens*”), e a barreira hemato-retiniana externa, composta pelo epitélio pigmentado da retina (EPR), que também apresenta tais junções (Penfold, 2001).

A integridade da barreira hemato-retiniana depende do EPR, dos vasos retinianos e da “*glia limitans*” da retina. Esta última é composta pelos

astrócitos, microglia (formada por macrófagos especializados e células dendríticas), porções terminais dos segmentos externos dos fotorreceptores e pelas células amácrinas. A “*glia limitans*” da retina forma uma bainha de processos celulares separando o espaço neuronal dos vasos sanguíneos (Penfold, 1991).

2.2 - Morfometria

Os cortes histológicos são utilizados para definir os detalhes estruturais de tecidos e órgãos. Desta forma, se busca distinguir pelo padrão de achados, um perfil considerado “normal” de um tecido. Descrevem-se aspectos gerais da estrutura analisada, como as características e a presença ou ausência de um achado (Collan, 1997). Obviamente, métodos qualitativos dificultam a comparação das amostras, aumentam a possibilidade de viés e reduzem a fidedignidade do método científico, não sendo suficientes para testes mais objetivos, como uma análise estatística comparativa.

A análise morfométrica é um método quantitativo para avaliar alterações histopatológicas, tornando possível comparar achados, como por exemplo, diferentes padrões que podem resultar de uma doença ou tratamento experimental. Tem por finalidade tornar a coleta dos dados, sua apresentação e análise dos resultados, mais precisos e objetivos.

Quando realizamos a morfometria de uma estrutura plana, estamos estudando sua área (superfície) e o método que aplicamos é a planimetria. Existem diversas maneiras de se realizar uma estimativa planimétrica, mas a mais acurada é por meio da contagem de pontos (Mandarim-de-Lacerda, 1995). Neste método utilizamos um sistema-teste com pontos, onde cada ponto corresponde ao centro geométrico de um polígono de área conhecida. Uma vez calibrado com sistema óptico utilizado, um microscópio por exemplo, basta que contemos os pontos coincidentes com o objeto de estudo que, multiplicando pela área que corresponde a cada ponto, estaremos estimando de maneira precisa a área do objeto (Mandarim-de-Lacerda, 1995). A morfometria é um método muito usado nas pesquisas científicas de diversos tecidos, inclusive oculares (Alves, 1995; Matayoshi, 1999; Kim et al, 2002; Ohguro et al., 2002; Vaughan et al., 2003; Mayer, 2004; Nijhawan, Rajwanshi, 2005; Dioguardi, 2006).

2.3 – Tabagismo e a saúde humana

2.3.1 – Exposição à fumaça de cigarro

Por convenção, a fumaça de cigarro é dividida fisicamente em duas fases: a fase particulada (da qual a nicotina faz parte) e a fase gasosa (Ambrose e Barua, 2004). A fase particulada é composta pelo material que é retido quando se passa o aspirado da fumaça por um filtro de fibra de vidro

de Cambridge, que retém 99,9% do material particulado com tamanho $>0,1$ μm (Pryor e Stone, 1993). Tanto a fase gasosa como a fase particulada, possuem radicais livres, sendo que na última os radicais livres apresentam longa meia-vida (horas a meses) (Smith e Fischer, 2001; Pryor et al, 1998).

A fumaça produzida pelo cigarro tem um fluxo principal (“mainstream”) e um fluxo secundário (“sidestream”) (Ambrose e Barua, 2004). O fluxo principal é aquele aspirado pelo tabagista ativamente pela boca. O fluxo secundário é aquele que resulta da queima do cigarro. O fluxo principal é composto por 8% de fase particulada e 92% de fase gasosa (Pryor e Stone, 1993). A fumaça presente no ambiente, responsável pelo tipo de exposição ao tabagismo denominada de fumante passivo, é composta 85% pelo fluxo secundário e pela pequena fração do fluxo principal exalada, pelo fumante (15% do total). O fluxo secundário possui concentrações mais altas de gases tóxicos (Glantz e Parmley, 1991).

Mesmo a exposição passiva é capaz de produzir danos à saúde. Estima-se que aqueles sob exposição passiva têm risco aumentado de doença cardíaca isquêmica (Law e Wald, 2003). A dosimetria de marcadores bioquímicos em cônjuges de tabagistas revelaram um aumento importante no risco de câncer de pulmão (Hackshaw et al, 1997). Há uma associação entre o tabagismo das gestantes e um aumento de 10% na mortalidade pré-natal (Candy et al, 2001).

Sempre que se faz necessário avaliar a exposição ao tabagismo, seja ela ativa ou passiva, isto é possível por meio da estimativa de marcadores como tiocianato, monóxido de carbono, nicotina, carboxihemoglobina ou a

cotina plasmática (Woodward et al., 1991). A cotina é o principal metabólito primário da nicotina e é linearmente e diretamente relacionada ao consumo de nicotina (Pirkle et al., 1996).

O tabagismo tem amplos efeitos deletérios à saúde. É responsável por um aumento de duas a três vezes no risco de morte prematura (Doll et al., 2004). Pessoas que fumam mais de um maço por dia têm sua expectativa de vida reduzida em cinco a seis anos (Taylor, 1993).

Há também impacto na qualidade de vida. O tabagismo proporciona um aumento no risco de infecção, tanto nos fumantes ativos quanto nos passivos, secundário a alterações no sistema imune humoral e celular, e está bem estabelecida sua associação a um aumento na incidência de infarto do miocárdio e doença coronariana fatal (Arcavi et al, 2004; Ambrose e Barua, 2004).

A fumaça de cigarro contém mais de 50 substâncias cancerígenas e 200 venenosas, como amônia, benzeno, n-nitrosaminas e anilina, que são absorvidas no pulmão e distribuídas pelo corpo (NCI, 2006). Por isso elas podem ter ação carcinogênica em tecidos que não têm exposição direta à fumaça de cigarro como mama, cólon, bexiga e útero (Bartecchi et al., 1994; Perera, 1997; Trimble et al., 2005).

O tabagismo também tem influência no aumento de fatores de risco para outras doenças. Ele aumenta os níveis de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicérides, conhecidos agentes de co-

morbidade (Lee et al., 1998). O cigarro desempenha uma relação dose-dependente com o risco de acidente vascular cerebral (Gorelick, 1995).

2.3.2 – Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um estado biológico que tem sido relacionado a várias doenças como insuficiência cardíaca congestiva, hipertensão arterial sistêmica, doenças cerebrais vasculares e complicações do diabetes (Chen et al., 2002; Kohen e Nyska, 2002; Touyz, 2004). Ele resulta do desequilíbrio entre substâncias pró-oxidativas, denominadas radicais livres, e um sistema de defesa antioxidante, presente nos organismos celulares. O excesso de radicais livres pode advir de inúmeros fatores, como dano tissular, hipóxia e fatores ambientais como exposição à radiação ultravioleta, poluentes e fumaça de cigarro (Scheibmeir et al., 2005). Quando a produção de radicais livres é maior que a capacidade biológica de neutralizar estas substâncias, o estresse oxidativo pode resultar em dano celular (Scheibmeir et al., 2005).

Os radicais livres são átomos que possuem pelo menos um elétron não pareado, na sua órbita mais externa (Gutteridge e Mitchell, 1999). Estas substâncias são resultantes do processo metabólico do consumo de oxigênio e são altamente reativas, podendo causar dano celular com reações em cadeia, interagindo com lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos (ácido desoxirribonucléico - DNA, por exemplo) de células

que estejam adjacentes (Soares, 2002; Blokhina et al., 2003; Kuhn, 2003). Estados de hipóxia podem ser responsáveis por grande estresse oxidativo (Becker, 2004).

Radicais livres envolvendo átomos de oxigênio são denominados espécies de oxigênio reativas (McDermott, 2000). As mais comuns são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet-}$) (Kendler, 1995; Bianchi e Antunes, 1999; Wilson et al., 2001). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula da família das espécies de oxigênio reativas, com capacidade de provocar dano aos tecidos (Kerr et al., 1996). Outras moléculas de espécies de oxigênio reativas são 1O_2 (oxigênio singlete), NO^{\bullet} (óxido nítrico), $ONOO^-$ (peroxinitrito) e Q^{\bullet} (radical semiquinona).

Existem mecanismos de defesa ao estresse oxidativo, que visam proteger os tecidos dos efeitos deletérios da oxidação: a compartimentalização celular, o reparo celular, a remoção enzimática das espécies de oxigênio reativas e a eliminação dos radicais livres por vitaminas e outras substâncias (Sies, 1991).

A compartimentalização é o mecanismo pelo qual se separam as espécies de oxigênio reativas de outros componentes celulares, como no caso das organelas denominadas peroxissomos. O reparo celular atua tanto no DNA celular, como em aminoácidos de proteínas que sofreram oxidação (Floyd, 1990; Polsen, 2005). No DNA, enzimas como a DNA polimerase e a DNA glicosilase, atuam sobre regiões distorcidas da hélice ou nas bases nitrogenadas dos nucleotídeos, retificando-as (Beatty et al., 2005).

Há substâncias capazes de atrasar ou inibir metabolismo oxidativo, evitando a produção e acúmulo de substâncias oxidantes e prevenindo o dano tecidual (Bianchi e Antunes, 1999). Existem os antioxidantes que quebram a reação em cadeia da oxidação, doando elétrons e estabilizando os radicais livres, como a vitamina E (alfa-tocoferol) e o beta-caroteno; e antioxidantes preventivos, que atuam antes do início da reação em cadeia da oxidação, como as enzimas peróxido dismutase e a catalase (Scheibmeir, 2005). Outras enzimas e substâncias antioxidantes são a superóxido dismutase, as peroxidases e a coenzima -Q10.

2.3.3 – Morte celular programada: apoptose

A apoptose é uma forma de morte celular programada geneticamente que tem por objetivo a manutenção do equilíbrio entre o número de células em surgimento e o número de células em falência (Thompson, 1995). Desde que haja uma taxa de proliferação celular constante, é o controle da morte celular que determinará doenças de acúmulo celular, quando há uma redução do número de células com morte programada (inibição da apoptose), como nas neoplasias (Thompson, 1995).

A seleção natural induzida pela apoptose pode acontecer por meio de mecanismos fisiológicos, porém também pode ser induzida por substâncias tóxicas (Corcoran et al., 1994). Vários estímulos regulatórios, tanto intrínsecos como extrínsecos, podem influenciar o aumento ou a redução da

apoptose e estas modificações na sobrevivência celular podem estar relacionadas a diversos processos de doença (Thompson, 1995).

A diferença entre a morte celular por apoptose e a morte por necrose é que esta última é o resultado de uma lesão celular aguda, caracterizada por rápido edema celular e ruptura da célula, com extravasamento de seu conteúdo citoplasmático e indução de resposta inflamatória, enquanto a morte apoptótica caracteriza-se por uma autodigestão por ativação de suas próprias enzimas (caspases, por exemplo), sem que haja um processo inflamatório (Thompson, 1995).

Na apoptose ocorrem alterações estruturais na célula. Quebra do citoesqueleto, com enrugamento da célula, formação de bolhas na membrana celular, assim como alterações nucleares (condensações da cromatina) são alterações morfológicas reconhecidamente associadas à morte celular programada (Krantic et al., 2005). Após este processo, estímulos enviados pela membrana plasmática atraem células fagocíticas, que eliminam a célula sem que haja uma resposta inflamatória associada, formando os corpos apoptóticos (Corcoran et al., 1994).

O papel da apoptose está bem estabelecido na morte celular programada de neurônios assim como o papel das substâncias oxidantes como mecanismos iniciadores (Lok et al., 2002, Krantic et al., 2005). Células neuronais são altamente sensíveis ao estresse oxidativo, já que contam apenas com metabolismo aeróbico para sua produção de energia, com alta formação de espécies de oxigênio reativas resultantes da fosforilação oxidativa (Krantic et al., 2005).

2.3.4 – Tabagismo e as doenças oculares

O cigarro pode afetar a visão por sua ação externa ou por meio de sua atuação sistêmica após absorção, como está evidenciado em diversos estudos epidemiológicos que associam doenças oculares ao tabagismo (Solberg et al., 1998). Mesmo pessoas que não são ativamente tabagistas, estão sujeitas à sua ação por exposição passiva. Como toda mucosa, a conjuntiva ocular é bastante sensível às substâncias químicas e aos gases que constituem a fumaça de cigarro, e a exposição ambiental a estes está associada a um aumento do risco de desconforto ocular (Schwartz e Zeger, 1990; Cometto-Muniz e Cain, 1992).

O tabagismo também está envolvido com redução de fluxo vascular e fenômenos isquêmicos oculares. Doenças ateroscleróticas do sistema arterial retiniano, como oclusões da artéria central da retina ou de seus ramos, estão intimamente associadas ao tabagismo (Tipping et al., 1989; Bruno et al., 1992). Há uma redução na capacidade da hemoglobina de levar oxigênio aos tecidos (Solberg et al., 1998). É observada também uma redução no fluxo vascular por aumento da viscosidade sanguínea, secundária a leucocitose, aumento no hematócrito, na adesividade plaquetária, nos níveis de fibrinogênio sérico e homocisteína (Green e Harari, 1995; Schmid et al., 1996; Bazzano et al., 2003). Além da hiperviscosidade, também ocorre aumento da resistência vascular da coróide e redução do fluxo vascular da retina e nervo óptico, associados ao consumo de cigarro (Langhans et al., 1997).

Evidências associando a neuropatia óptica isquêmica anterior não arterítica ao tabagismo têm sido relatadas na literatura. Talks et al. (1995) conduziram um estudo caso-controle onde encontraram significativa associação, relatando uma taxa de risco (“Odds Ratio”) de 16 (intervalo de confiança de 95% variando entre 3,23 a 79,23). Pesquisas de outros autores corroboram estes achados (Moro et al., 1989; Chung et al., 1994). Outras doenças que apresentam um componente isquêmico como a vasculite retiniana isquêmica idiopática e a paralisia isquêmica do nervo oculomotor, também têm o cigarro implicado na sua etiologia (Teuscher e Meienberg, 1985; Palmer et al., 1995).

O tabagismo é um fator patogênico importante na oftalmopatia associada à tireóide (oftalmopatia de Graves), aumentando o risco de sua ocorrência, agravando sua história clínica e dificultando a resposta ao tratamento (Bartalena et al., 1989; Shine et al., 1990; Tellez et al., 1992; Tallstedt et al., 1993). Pacientes fumantes que sofrem de doença de Graves tem um risco significativamente aumentado de desenvolver oftalmopatia associada tornando-se fumantes, com uma taxa de risco (“Odds Ratio”) de 6,5 , quando comparados com pacientes portadores da doença de Graves não tabagistas (Prummel e Wiersinga, 1993). Fumantes com oftalmopatia associada à tireóide ativa têm uma resposta pior ao tratamento por radioterapia (Hofbauer et al., 1997).

Uma das hipóteses para explicar a influência do cigarro na oftalmopatia associada à tireóide é que o cigarro estaria associado a uma modulação do sistema imunológico. Com isso haveria uma menor atividade

de linfócitos T supressores, e conseqüentemente redução da imunossupressão e da vigilância sobre os clones de linfócitos T auxiliares que estejam direcionados a antígenos da tireóide ou órbita (Volpe, 1986;). O tabagismo também poderia aumentar a liberação de anticorpos anti-tireóide com reação cruzada com os músculos extra-oculares, aumentando a infiltração linfocitária nestes tecidos (Weetman, 1989).

Estudos experimentais evidenciaram que o aumento do estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro também atua na patogênese da oftalmopatia de Graves. A infiltração de fibroblastos na órbita é um dos achados da desta doença e estudos experimentais demonstraram que substâncias oxidativas encontradas na fumaça de cigarro promovem proliferação de tais células (Cohen e Weetman, 1987).

A catarata é uma doença que provoca deficiência visual, e é devida à opacificação do cristalino. Estudos epidemiológicos têm sugerido que o tabagismo é fator de risco para o desenvolvimento de catarata e que a quantidade de cigarros diários assim como o tempo de duração do tabagismo atuariam como fatores agravantes (West et al., 1989; West et al., 1995, Hiller et al., 1997; Christen et al., 2000; Krishnaiah et al., 2005).

Apesar da etiologia da catarata ser complexa e provavelmente multifatorial, acredita-se que o cigarro tenha uma ação deletéria na composição e no metabolismo do cristalino. Substâncias presentes na sua fumaça, como o isocianato, o cobre, chumbo e o cádmio foram encontradas no cristalino após exposição à fumaça de cigarro ou seus componentes (Racz e Erdohelyi, 1988; Harding, 1995; Ramakrishnan et al., 1995).

Entretanto, o principal efeito do cigarro no cristalino provavelmente está associado ao estresse oxidativo (West et al., 1989; Shalini et al., 1994; Taylor et al., 1995).

A ambliopia tabaco-álcool é uma doença que causa um déficit visual importante, geralmente bilateral, associada a escotomas e distúrbios na visão de cores, em indivíduos com hábitos de alto consumo de tabaco e álcool (Golnik e Schaible, 1994). Sua fisiopatologia também está associada à deficiência nutricional, e apesar de ainda não estar bem estabelecido o sítio de lesão, evidências sugerem que este pode localizar-se em qualquer ponto da retina, nervo óptico, quiasma ou trato óptico (Smiddy e Green, 1987; Behbehani et al., 2005).

Presume-se que distúrbios no metabolismo de vitaminas do complexo B, em especial a vitamina B₁₂, sejam fundamentais para o desenvolvimento da ambliopia tabaco-álcool. O tabagismo reduz a absorção sistêmica da vitamina B₁₂ e o cianeto (presente na fumaça do cigarro) não é metabolizado e eliminado adequadamente pelo fígado destes pacientes, devido a disfunções associadas ao alto consumo de álcool (Solberg et al., 1998). O excesso de cianeto, associado à deficiência de vitamina B₁₂, é capaz de danificar o nervo óptico (Costagliola et al., 1989).

Algumas outras doenças oftalmológicas têm sido associadas ao cigarro, com maior ou menor consistência. Um estudo histopatológico de pacientes com neoplasia intraepitelial conjuntival identificou o tabagismo como forte fator de risco para seu surgimento (Napura et al., 1990). Pesquisas epidemiológicas demonstraram uma associação entre o consumo

materno de tabaco e o desenvolvimento de estrabismo em sua prole (Hakim e Tielsch, 1992; Chew et al., 1994). A neuropatia hereditária de Leber, uma doença que causa importante déficit visual, tem no cigarro um dos fatores externos para sua expressão em pacientes portadores de predisposição genética (Tsao et al., 1999). Em pacientes com a doença manifesta, o tabagismo tem sido considerado um fator agravante (Tsao et al., 1999).

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma das maiores causas de cegueira no ocidente e principal causa de déficit visual em indivíduos idosos, com uma prevalência mundial de 8,7% (WHO, 2006a). Causa uma degeneração retiniana afetando a visão central (responsável pela visão de alta resolução), dificultando a realização de tarefas como ler, escrever, realizar trabalhos manuais e dirigir, proporcionando um impacto social em uma população de número progressivamente maior com o aumento da expectativa de vida (Seddon e Chen, 2004).

Thorton et al. (2005) realizaram uma revisão sistemática sobre as evidências epidemiológicas entre o tabagismo e a DMRI, relatando que 13 de 17 estudos encontraram uma associação estatisticamente significativa, com um aumento de risco de duas a três vezes quando comparados indivíduos fumantes aos não fumantes.

O cigarro provavelmente tem uma ação deletéria na retina por mais de um mecanismo: efeitos hipóxicos-isquêmicos, efeitos oxidativos, redução dos sistemas anti-oxidantes, toxicidade direta a células do sistema nervoso central e indução de apoptose (Solberg et al., 1998, Beatty et al., 2000; Jang et al., 2002;).

3 Métodos

O estudo foi realizado no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP (Laboratório de Investigações Médicas (LIM) - 05), com o apoio do Laboratório de Investigações Médicas em Terapêutica Experimental da FMUSP (LIM – 20) e do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação da Universidade Federal de São Paulo.

3.1 – Desenho do estudo

Este estudo em modelo animal, foi do tipo analítico, experimental, prospectivo, aleatório e mascarado, utilizando ratos *Wistar*.

3.2 – Aspectos éticos

Todos os procedimentos experimentais foram executados de acordo com as normas para o uso de animais, recomendadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 2006). Este experimento teve aprovação prévia do Conselho de Ética do Hospital das Clínicas da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), por meio de revisão do protocolo de pesquisa nº. 962/03.

3.3 – Materiais

3.3.1 – Animais

Foram utilizados como animais do experimento um total de 24 ratos *Wistar*, do sexo masculino com especificação SPF (*“specific pathogen free”*) com idade de 8 semanas (peso entre 250 e 300g). Durante o período de experimentação os ratos receberam uma dieta balanceada e água *“ad libitum”* e foram armazenados no biotério da FMUSP, equipado com ar condicionado, exaustor e mantidos em um ciclo automático de exposição à luz a cada 12 horas.

Os animais foram divididos em três grupos de oito animais denominados de acordo com o tempo entre o término da exposição e o sacrifício: Grupo 0h, com sacrifício imediatamente após exposição; Grupo 24h e Grupo 48h, sacrificados respectivamente 24 e 48 horas após exposição. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos contendo quatro animais cada: subgrupos 0h Fumantes e 0h Controles; subgrupos 24h Fumantes e 24h Controles; e subgrupos 48h Fumantes e 48h Controles.

O experimento consistiu no acondicionamento dos animais em uma estrutura denominada Câmara de Inalação (CI), utilizada em modelos de intoxicação descritos previamente na literatura (Mayer, 2004). Após completar o tempo total de exposição de duas horas, os animais foram armazenados em gaiolas e mantidos em condições padronizadas de umidade, temperatura e luminosidade (ciclo luminoso de 7 horas da manhã até as 7 horas da noite, mantidos em penumbra a partir de então) até o momento do sacrifício.

3.3.2 – Método de inalação

A câmara de inalação (CI) utilizada neste estudo constituiu-se de material acrílico transparente, de conformação cilíndrica, medindo 40 cm de altura e 30 cm de diâmetro (equivalente a um volume de 28 litros cúbicos).

Possuía oito compartimentos de exposição, de conformação cilíndrica, medindo sete cm de diâmetro e 20 cm de comprimento cada, que se encaixavam em posição perpendicular à câmara principal, com pequeno orifício anterior, por onde o focinho dos animais entrava em contato com interior da câmara. Nestes pequenos compartimentos individuais, os animais eram fixados e então conectados ao sistema principal (Figuras 2 e 3).



Figura 2. Câmara de Inalação onde os animais foram coletivamente expostos à fumaça de cigarro



Figura 3. Câmara de exposição onde os animais eram posicionados individualmente antes de estar conectados à Câmara de Inalação

A válvula Venturi possui três extremidades: a porção aferente da válvula (porção geradora de fluxo), que foi conectada ao ar comprimido, passando por um fluxômetro calibrado; a porção lateral (aspiradora de ar), onde foi colocado o cigarro aceso e sem filtro; e finalmente a porção eferente, conectada a um orifício na porção inferior da Câmara de Inalação. Desta forma, este sistema originou uma aspiração da fumaça de cigarro e a conduziu até a câmara principal (Figuras 4 e 5).



Figura 4. Sistema Venturi com cigarro adaptado a um dos orifícios

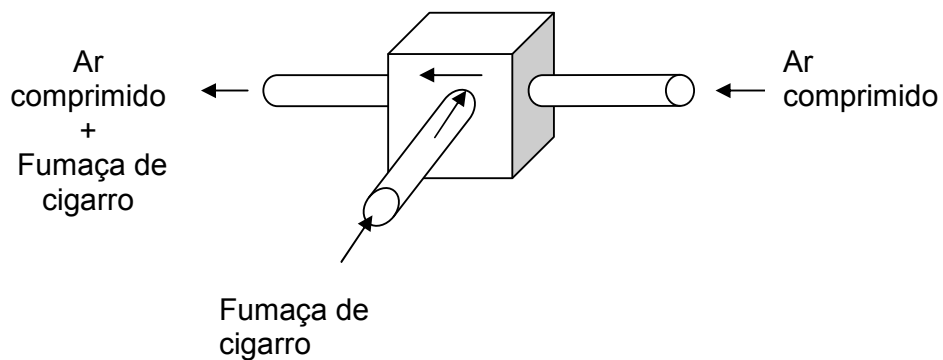


Figura 5. Desenho esquemático do sistema-venturi, demonstrando como foi possível aspirar a fumaça de cigarro para a câmara de inalação

Durante o período de duas horas os subgrupos Fumantes foram submetidos à inalação ininterrupta de fumaça de cigarro comercialmente disponível (com 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 10 mg de monóxido de carbono), recebendo um fluxo constante com a finalidade de manter uma concentração de monóxido de carbono entre 45 e 55 partes por milhão (ppm).

Esta concentração era regulada através de um fluxômetro calibrado, mantido com fluxo entre 50 e 100 mL/min, conectado à porção aferente do sistema. Para aumentar o fluxo de fumaça de cigarro, e conseqüentemente de CO, aumentava-se o fluxo de ar comprimido no sistema Venturi (Vide figura 6 para esquematização geral do sistema de exposição).

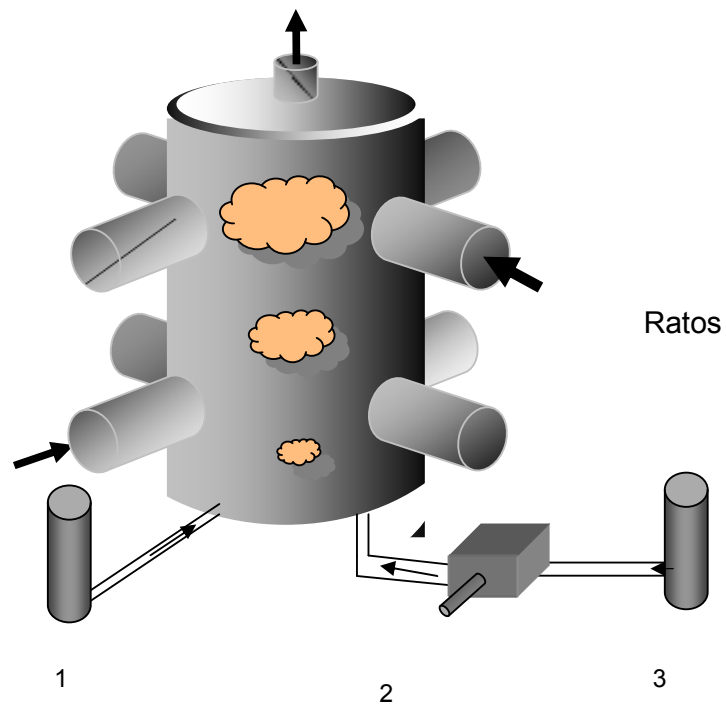


Figura 6. Funcionamento do sistema de exposição. Um aparato elétrico semelhante a um ventilador, localizado no topo da câmara homogeneiza os gases no interior da mesma (1= Fonte de O_2 ; 2= cigarro; 3= Fonte de Ar comprimido)

Dentro da câmara, a concentração de monóxido de carbono (CO) foi monitorada por um dispositivo eletrônico capaz de medir em tempo real sua concentração (TOXICO – Biosystem, Middletown, Reino Unido).

Os subgrupos Controles foram expostos às mesmas condições dos subgrupos Fumantes, numa Câmara de Inalação similar pelo mesmo período de duas horas, entretanto com fluxo constante de ar comprimido (5 L/min) no lugar da fumaça de cigarro.

3. 4 – Preparo e análise histológica

3.4.1 - Sacrifício dos animais

Para a realização do sacrifício, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol® Fontoveter-Cristalia, Itapira, Brasil), por via intraperitoneal (0,5 mg/kg) de modo que ocorresse anestesia profunda, porém sem depressão respiratória, e sacrificados por punção da artéria aorta e exsanguinação.

O preparo do globo ocular foi realizado de forma mascarada, sem conhecimento prévio do grupo de animais preparados. Após o sacrifício, no momento imediatamente anterior à enucleação, foi realizada impressão corneana no meridiano das 12 horas por agulha de insulina (calibre 27 “Gauge”), previamente aquecida. Dessa forma após enucleação e

devidamente identificados os olhos direito e esquerdo, foi possível identificar referências das posições anatômicas do bulbo ocular.

3.4.2 – Carboxihemoglobina sérica (HbCO) e cotinina plasmática

Para confirmar a intoxicação sistêmica das substâncias da fumaça de cigarro, foram coletadas amostras sanguíneas dos animais no momento do sacrifício. A amostra foi centrifugada, separando-se o plasma para armazenamento em tubos de vidro e conservando-o a -70 °C até seu processamento e análise. O percentual de HbCO foi estimado através da espectrofotometria diferencial na região visível, conforme descrito na literatura (Beutler e West, 1984). A cotinina plasmática foi estimada através de anticorpos por radioimunoensaio (Langone et al., 1982).

3.4.3 – Preparo dos tecidos

O preparo para análise histológica do tecido retiniano seguiu método previamente descrito na literatura (Cortizo et al., 2006). Após a enucleação foi realizada a fixação química dos bulbo oculares em uma mistura de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 0,5%, por 24 horas. Após este período, realizou-se a marcação utilizando tinta nanquim, dos meridianos das 3 e 9 horas, e do coto do nervo óptico.

Sob microscópio óptico, realizou-se a abertura da câmara anterior por meio da excisão da córnea, mantendo apenas uma parte no meridiano das 12 horas, para localização como ponto de referência. Retirou-se o cristalino e a maior parte do corpo vítreo, via câmara anterior, e o material foi enviado para processamento automatizado no laboratório de anatomia patológica da FMUSP.

Em seguida foi realizado um corte horizontal da região temporal à região nasal (incluindo o nervo óptico e os meridianos das 3 e 9 horas), dividindo a peça em duas partes. As cavidades vítreas foram preenchidas com parafina e posicionadas para confecção do bloco.

Os blocos foram cortados utilizando micrótomo de 5 μm de espessura, e os cortes foram montados em lâminas de vidro e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Todos os cortes continham a extensão total da retina, da ora serrata da região temporal até a ora serrata da região nasal, passando através da cabeça do nervo óptico.

3.4.4 - Análise morfométrica

A morfometria foi realizada utilizando-se um sistema-teste com pontos fixos e sistematicamente eqüidistantes, descrito previamente na literatura (Figuras 7 e 8) (Gundersen e Jensen, 1987, Mandarim-de-Lacerda, 1995). O número de pontos incidentes (**p**) em um determinado perfil seccional, fornece uma estimativa direta e não viciada de sua área (**a**). Esta estimativa

[a] é expressa em termos de distância entre dois pontos adjacentes ao sistema-teste (denominada **u**), por meio da seguinte fórmula:

$$[a] = p \cdot u^2$$

Uma vez o sistema-teste devidamente calibrado, ele apresenta uma distância de 250 μm em cada borda e sua área total é de 62 500 μm^2 . Existem 100 pontos no sistema, logo cada ponto representa uma área de 625 μm^2 (Figura 7)

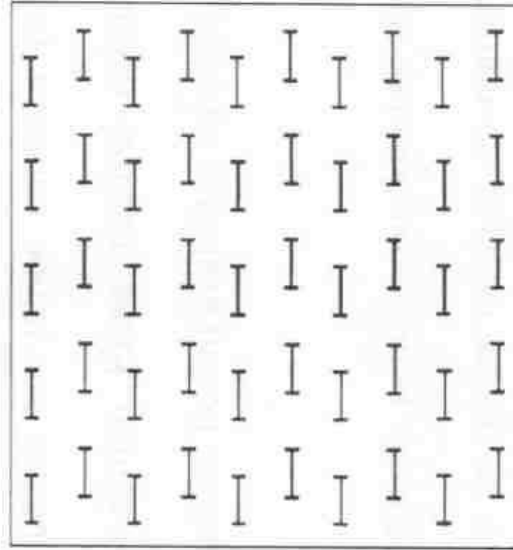


Figura 7. Sistema-teste para análise morfométrica. Cem pontos sistematicamente distribuídos, representando uma área total de $62\,500\ \mu\text{m}^2$

O coeficiente de erro (**CE**) nas estimativas de áreas [**a**] por contagem de pontos foi calculado pela fórmula:

$$\mathbf{CE} = \mathbf{SE} / \mathbf{M}$$

Onde, **SE** = erro padrão e **M** = média.

Os coeficientes de erro foram menores que 10%, como recomendado na literatura (Mandarim-de-Lacerda, 1995).

Os cortes histológicos foram estudados utilizando um microscópio óptico com o sistema-teste adaptado a uma das oculares. Utilizando um aumento de 40 vezes, foram avaliadas seis porções da retina por lâmina (seis campos), numa região localizada de 750 μm do nervo óptico a 1000 μm da ora serrata. Foram estimadas três amostras nasais ao nervo óptico e três amostras temporais, usando o sistema-teste devidamente calibrado em conjunto com o microscópio, onde cada ponto representou uma área estimada de 625 μm^2 .

Os campos foram selecionados aleatoriamente de forma não contígua, posicionando uma das bordas do sistema teste de forma tangencialmente à camada do epitélio pigmentado da retina, e foi realizada a contagem dos pontos coincidentes por camada retiniana, arbitrariamente nomeadas a seguir: Camada 1 (camada dos fotorreceptores, correspondendo à distância entre o epitélio pigmentado e os corpos celulares dos fotorreceptores (camada nuclear externa)); Camada 2 (camada nuclear externa, correspondendo exclusivamente à distância entre o início e o fim dos corpos celulares dos fotorreceptores); Camada 3 (camada nuclear interna, correspondendo exclusivamente à distância entre o início e o fim da área ocupada pelos corpos celulares dos neurônios intermediários); Camada 4 (Camada plexiforme interna, correspondendo exclusivamente à área entre as camadas nucleares interna e de células ganglionares); Camada 5 (conjunto da área ocupada pela camada de células ganglionares e de fibras

nervosas em conjunto) (Figura 8). O examinador estava mascarado quanto ao grupo a que pertencia o animal avaliado.

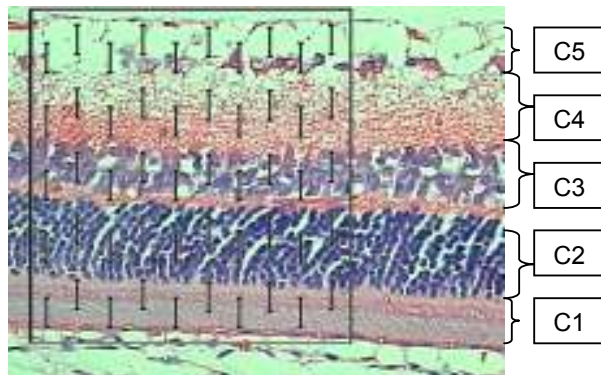


Figura 8. Visualização de corte histológico por meio de sistema-teste acoplado a ocular. C1 = Camada 1; C2 = Camada 2; C3= Camada 3; C4= Camada 4; C5= Camada 5. Coloração HE. Aumento de 40x

Os números obtidos pelas contagens no sistema-teste foram então multiplicados por um fator fixo de correção (625), obtido por meio da sua calibração com o microscópio óptico, e usados na obtenção de uma estimativa média por camada, por animal. Estas variáveis foram então submetidas à análise estatística.

3.5 - Análise estatística

As médias das estimativas morfométricas das camadas da retina de cada animal foram obtidas. Estas variáveis foram apresentadas através de médias aritméticas, desvios-padrão, medianas, e valores mínimos e máximos. Para análise estatística foi utilizado o programa de informática SPSS para Windows 11.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois). Os grupos foram testados para avaliar sua distribuição normal utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Os testes estatísticos utilizadas foram:

- a) Prova de Mann-Whitney (U) – para comparações entre duas amostras de diferentes grupos de animais.
- b) Kruskal-Wallis (H) - para comparações entre amostras de mais de dois grupos de animais.

Foi admitido como estatisticamente significantes os valores da medida descritiva p , e adotado nível crítico de significância de 5% (α (bicaudal)=0,05 e β = 0,20).

4 Resultados

Todos os cortes histológicos analisados apresentavam integridade do tecido retiniano aplicado ao epitélio pigmentar da retina. As lâminas incluíam a ora serrata nasal e temporal, assim como o nervo óptico (Figura 9).



Figura 9. Amostra de tecido retiniano, incluindo ora serrata e nervo óptico. Coloração HE. Aumento de 5x

4.1 – Carboxihemoglobina sérica e cotinina plasmática

O modelo demonstrou o alcance sistêmico da exposição detectando aumento, tanto das estimativas da HbCO quanto da cotinina plasmática, nas

amostras do grupo exposto ao tabagismo sacrificado imediatamente após a exposição, com queda nas amostras dos grupos subsequentes (Tabela 1). O nível de reatividade cruzada da cotinina plasmática com outras substâncias foi menor que 5%, sendo que a variação de medida detectável da curva da cotinina foi de 0,2-20 ng/mL (coeficiente de variação de 6-10%).

Tabela 1. Comparação das estimativas plasmáticas da HbCO e da cotinina nos subgrupos Controles 0h e Fumantes 0h, 24h e 48h

Subgrupo	N	HbCO(%)	Cotinina plasmática (ng/mL)
Controles 0h	4	0	0
Fumantes 0h	4	3,0±0*	17,0±3,8**
Fumantes 24h	4	0	0,5±0,6
Fumantes 48h	4	0,2±0,5	0,8±1,0

N=número de animais; HbCO= carboxihemoglobina

Prova de Mann-Whitney, Fumantes x Controles. *P<0,01 **P<0,05.

4.2. – Estimativas morfométricas

4.2.1 - Estimativas do Grupo 0h

As análises das estimativas morfométricas das camadas da retina comparando os subgrupos Controles e Fumantes no Grupo 0h não revelaram diferenças estatisticamente significantes (tabela 2, figura 10).

Tabela 2. Estimativas morfométricas das camadas retinianas nos subgrupos sacrificados imediatamente após a exposição (Grupo 0h)

Variável	SUBGRUPO CONTROLES N=4		SUBGRUPO FUMANTES N=4		P
	Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo]		Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo]		
	Média ± DP (x10 ² μm ²)		Média ± DP (x10 ² μm ²)		
Camada 1	59,4	58,3			NS
	[52,1 – 61,5]	[50,0 – 62,5]			
	58,1 ± 4,2	57,3 ± 5,5			
Camada 2	105,2	102,6			NS
	[101,0 – 107,3]	[92,7 – 110,4]			
	104,7 ± 2,6	102,1 ± 7,3			
Camada 3	56,8	62,0			NS
	[49,0 – 75,0]	[59,4 – 64,6]			
	59,4 ± 11,4	62,0 ± 2,2			
Camada 4	87,5	86,5			NS
	[86,5 – 91,7]	[82,3-90,6]			
	88,3 ± 2,5	86,5 ± 3,4			
Camada 5	53,1	54,2			NS
	[51,0 – 72,9]	[53,1 – 57,3]			
	57,6 ± 10,4	54,7 ± 2,0			

DP = desvio-padrão; μm²= micrômetros quadrados

Teste de Mann-Whitney; NS = Estatisticamente não significante.

* = Significância estatística (P<0,05).

O teste de Mann-Whitney utilizado para comparação entre os subgrupos Fumante e Controle do grupo 0h, resultou nos seguintes valores:

- Camada 1 U = 7,500; Z = -0,145; P = 0,885.
- Camada 2: U = 6,000; Z = -0,581; P = 0,561.
- Camada 3: U = 5,000; Z = -0,866; P = 0,386.
- Camada 4: U = 5,000; Z = -0,923; P = 0,356.
- Camada 5: U = 6,500; Z = -0,438; P = 0,661.

A prova de Mann-Whitney não identificou diferenças estatisticamente significantes entre os subgrupos Controle e Fumante, no Grupo 0h, em nenhuma das camadas estudadas.

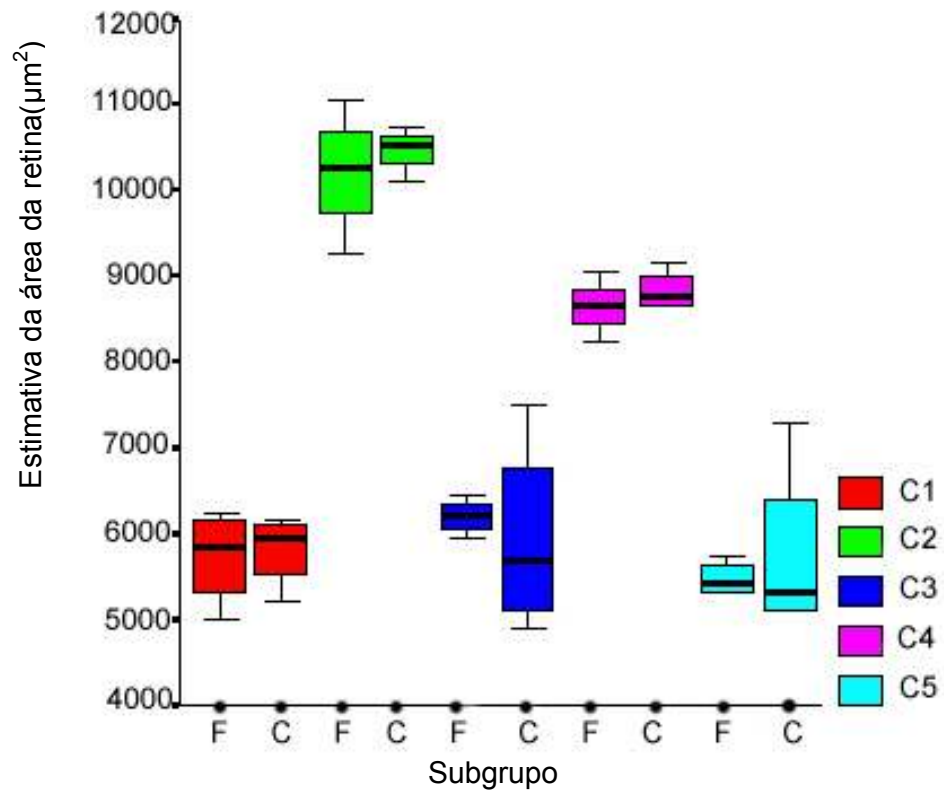


Figura 10. Gráfico de caixas comparando os valores estimados das áreas (μm^2) das camadas 1(C1), 2(C2), 3(C3), 4(C4) e 5(C5) nos subgrupos Fumante(F) e Controle(C) do Grupo 0h. Não houve diferença estatisticamente significativa (prova de Mann-Whitney).

4.2.2 - Estimativas do Grupo 24h

As análises morfométricas das camadas da retina entre os subgrupos Controles e Fumantes no Grupo 24h estão representadas na tabela 3.

Tabela 3. Estimativas morfométricas das áreas de camadas retinianas nos subgrupos sacrificados imediatamente após a exposição (Grupo 24h)

Variável	SUBGRUPO CONTROLES	SUBGRUPO FUMANTES	P
	N=4	N=4	
	Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo] Média ± DP (x10 ² μm ²)	Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo] Média ± DP (x10 ² μm ²)	
Camada 1	57,3 [54,2 – 59,4] 57,0 ± 2,2	53,1 [51,0 - 54,2] 52,9 ± 1,6	*
Camada 2	100,0 [93,8 - 124,0] 104,4 ± 13,4	100,0 [94,8 - 104,2] 99,7 ± 3,9	NS
Camada 3	56,2 [47,9 – 69,8] 57,6 ± 9,1	52,6 [47,9 - 59,4] 53,1 ± 4,9	NS
Camada 4	85,9 [83,3 – 102,1] 89,3 ± 8,7	82,8 [70,8 - 93,8] 82,6 ± 10,9	NS
Camada 5	56,8 [47,9 – 71,9] 58,3 ± 11,4	51,0 [44,8 - 60,4] 51,8 ± 6,5	NS

DP = desvio-padrão; μm²= micrômetros quadrados

Teste de Mann-Whitney; NS = Estatisticamente não significativa.

* = Significância estatística (P<0,05).

O teste de Mann-Whitney aplicado nos resultados da tabela 3 comparando o subgrupo Fumante com o subgrupo Controle, resultaram em:

- Camada 1 U = 1,000; Z = - 2,084; P = **0,037**.
- Camada 2: U = 8,000; Z < 0,001; P = 1,000.
- Camada 3: U = 5,500; Z = -0,730; P = 0,465.
- Camada 4: U = 6,000; Z = -0,577; P = 0,564.
- Camada 5: U = 5,500; Z = -0,726; P = 0,468.

Analisando-se as estimativas da Camada 1, observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos Controles e Fumantes. Esta diferença representou uma redução de 7,2% na estimativa da área das camadas do subgrupo Fumantes (Figura 11). Não houve diferença com significância estatística entre as demais camadas.

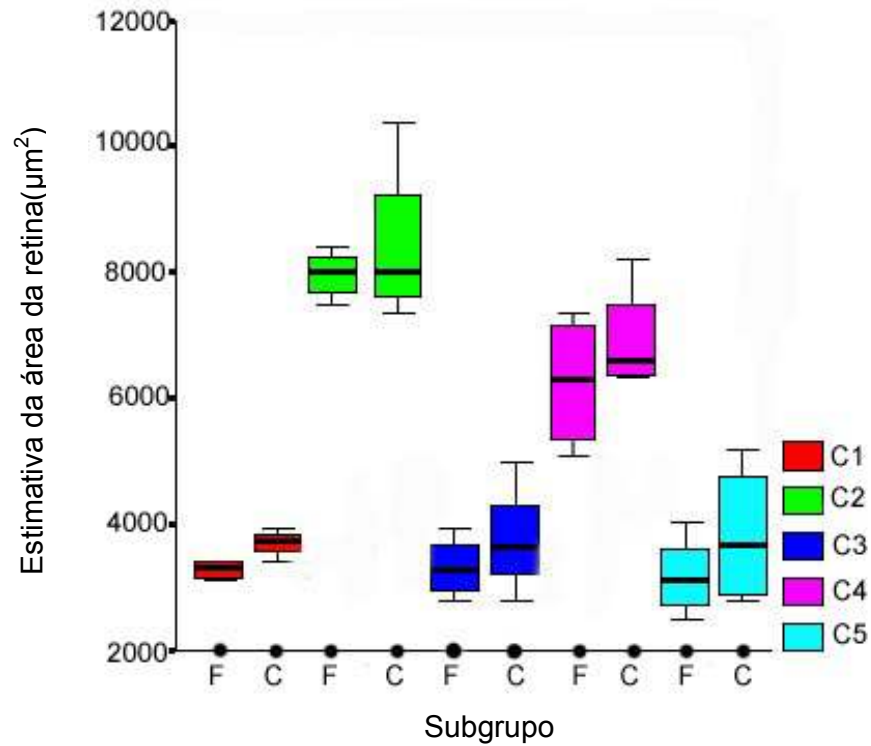


Figura 11. Gráfico de caixas comparando os valores estimados das áreas (μm^2) das camadas 1(C1), 2(C2), 3(C3), 4(C4) e 5(C5) nos subgrupos Fumantes(F) e Controles(C) do Grupo 24h (Diferença estatisticamente significativa em C1, pela prova de Mann-Whitney).

4.2.3 - Estimativas do Grupo 48h

No Grupo 48h foi observada redução da média da área estimada dos subgrupos Fumantes em relação aos Controles, em todas as camadas estudadas (Tabela 4, Figura 12).

Tabela 4 - Estimativas morfométricas das áreas de camadas retinianas nos subgrupos sacrificados imediatamente após a exposição (Grupo 48h)

Variável	SUBGRUPO CONTROLES	SUBGRUPO FUMANTES	P
	N=4	N=4	
	Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo] Média ± DP (x10 ² μm ²)	Mediana [Valor Mínimo – Valor Máximo] Média ± DP (x10 ² μm ²)	
Camada 1	62,0 [56,2 – 64,6]	48,4 [38,5 - 52,1]	*
	61,2 ± 3,5	46,9 ± 5,8	
Camada 2	102,1 [96,9 - 110,4]	101,6 [92,7 - 104,2]	NS
	102,9 ± 5,8	100,0 ± 5,2	
Camada 3	60,9 [57,3 - 64,6]	52,1 [49,0 - 58,3]	*
	60,9 ± 3,2	52,9 ± 4,0	
Camada 4	91,7 [88,5 - 95,8]	72,9 [64,6 - 87,5]	*
	91,9 ± 3,1	74,5 ± 9,6	
Camada 5	62,5 [59,4 - 63,5]	49,5 [42,7 - 64,6]	NS
	62,0 ± 2,0	51,6 ± 10,4	

DP = desvio-padrão; μm² = micrômetros quadrados

Teste de Mann-Whitney; NS = Estatisticamente não significativo.

* = Significância estatística (P<0,05).

Aplicando o teste de Mann-Whitney nos resultados da tabela 4, foram comparados os resultados do subgrupo Fumantes com o subgrupo Controles, apresentados a seguir:

- Camada 1: $U < 0,001$; $Z = -2,309$; $P = \mathbf{0,021}$.
- Camada 2: $U = 6,000$; $Z = -0,584$; $P = 0,559$.
- Camada 3: $U = 1,000$; $Z = -2,021$; $P = \mathbf{0,043}$.
- Camada 4: $U < 0,001$; $Z = -2,309$; $P = \mathbf{0,021}$.
- Camada 5: $U = 4,000$; $Z = -1,162$; $P = 0,245$.

Comparando as estimativas das camadas, foi observado que houve uma redução em todas estimativas do subgrupo Fumantes, em relação ao subgrupo Controles. Entretanto somente em três delas foram observadas diferenças estatisticamente significantes: Camadas 1, 3 e 4. A estimativa da área da Camada 1 no subgrupo Fumantes representou uma redução na média da área estimada de 23,4% em relação ao seu respectivo controle ($P=0,021$). Na Camada 3 foi observada uma redução de 13,1%, no ratos expostos à fumaça de cigarro em relação aos controles ($P=0,043$). Os resultados morfométricos da Camada 4 revelaram redução de 18,9% ($P=0,021$) na estimativa do subgrupo Fumantes, em comparação com o subgrupo Controles.

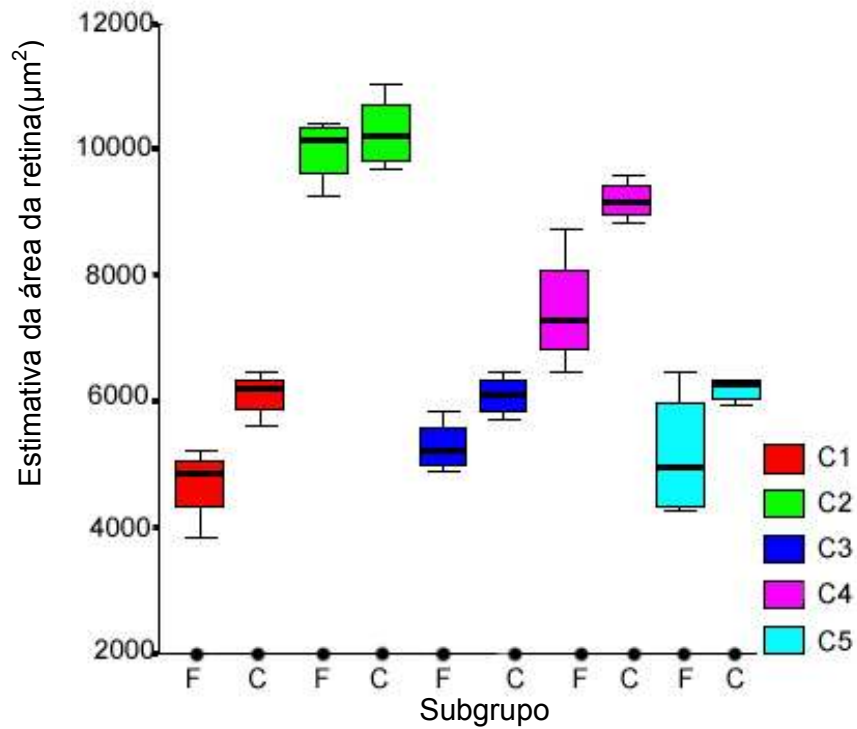


Figura 12. Gráfico de caixas comparando os valores estimados das áreas (μm^2) das camadas 1(C1), 2(C2), 3(C3), 4(C4) e 5(C5) nos subgrupos Fumante(F) e Controle(C) do Grupo 48h. Houve diferenças estatisticamente significantes entre as camadas C1, C3 e C4 (prova de Mann-Whitney).

4.2.4 - Estimativas dos subgrupos Fumantes comparados entre si

Ao compararmos os subgrupos Fumantes dos grupos 0h, 24h e 48h observamos uma tendência a progressiva redução na média das áreas estimadas com o decorrer do tempo, atingindo diferença estatística na Camada 3 (Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,030$) e limiar de significância estatística na Camada 1 (Teste de Kruskal-Wallis, $P=0,050$). A análise dos subgrupos revelou diferenças estatisticamente significantes utilizando o Teste de Mann-Whitney. A diferença verificada na média da área da Camada 1 entre os grupos 0h e 48h foi de 18,2% ($P=0,043$). Já na Camada 3, houve uma redução de 14,4% entre os Fumantes 0h e 24h ($P=0,029$) e de 14,7% entre os grupos 0h e 48h expostos à fumaça de cigarro ($P=0,024$).

Apesar de haver uma redução da área estimada do grupo 48h em relação ao grupo 24 h em todas as camadas (exceto Camada 2), estas não atingiram significância estatística, mas demonstraram uma tendência a redução das estimativas das camadas com o passar do tempo após exposição (Figura 13).

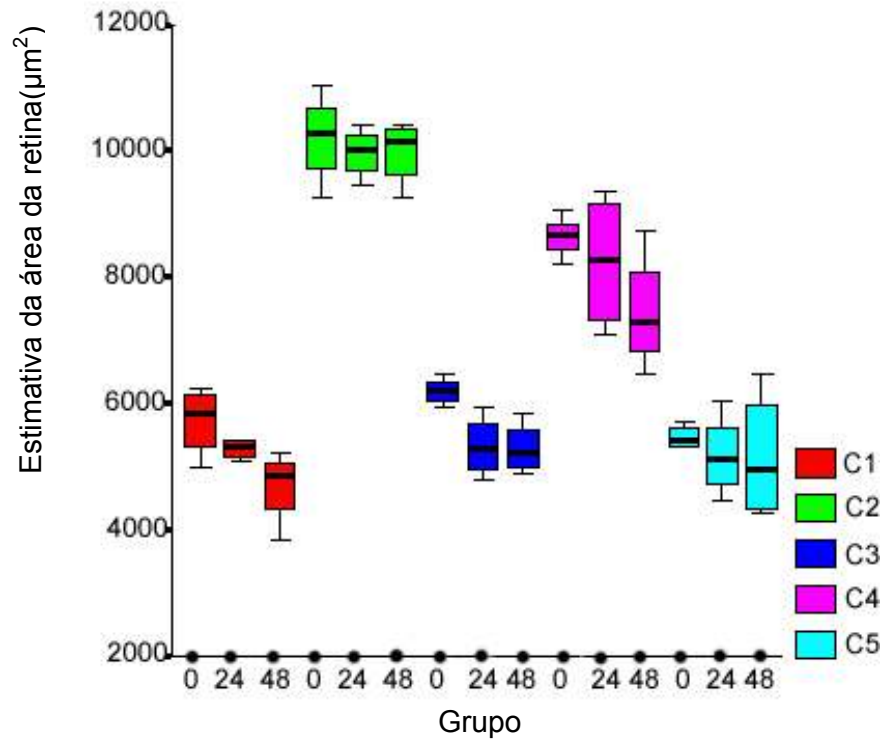


Figura 13. Gráfico de caixas comparando os valores estimados das áreas (μm^2) das camadas 1(C1), 2(C2), 3(C3), 4(C4) e 5(C5) no subgrupo Fumantes entre os Grupos 0h (0), 24h (24) e 48h (48). Houve diferença estatisticamente significativa nas comparações de C3 (prova de Kruskal-Wallis).

4.2.5 - Estimativas dos subgrupos Controles comparados entre si

Entre os Controles dos Grupos 0h, 24h e 48h, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em nenhuma das comparações (Figura 14).

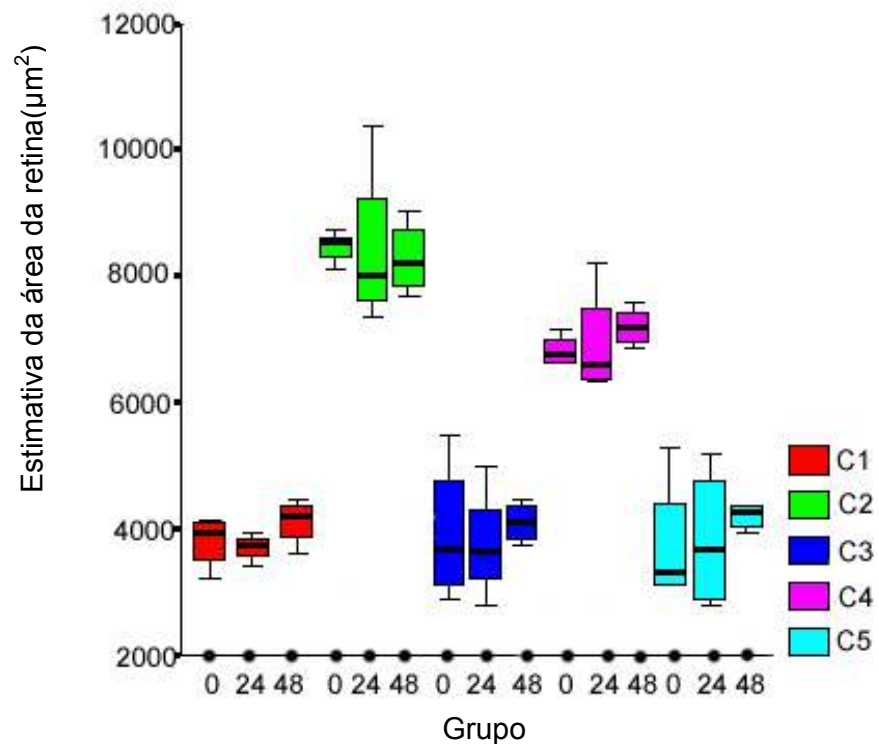


Figura 14. Gráfico de caixas comparando os valores estimados das áreas (μm^2) das camadas 1(C1), 2(C2), 3(C3), 4(C4) e 5(C5) nos subgrupos Controles (C) entre os Grupos 0h (0), 24h (24) e 48h (48). Não houve diferença estatisticamente significativa pela prova de Kruskal-Wallis.

5 Discussão

No presente estudo, demonstramos que houve efetivamente uma exposição dos ratos à fumaça de cigarro, visto que os níveis séricos de substâncias associadas ao tabagismo, como a cotinina plasmática (um metabólito da nicotina) e a HbCO (resultante da ligação da hemoglobina sérica com o monóxido de carbono, componente da fumaça de cigarro), aumentaram imediatamente após a exposição.

Na retina, encontramos achados degenerativos representados por uma redução na estimativa do subgrupo Fumantes, nas estimativas da Camada 1 no período de 24 horas após exposição, e nas estimativas das Camadas 1, 3 e 4 nos grupos expostos à fumaça de cigarro, 48 horas após exposição. A Camada 1 representou os segmentos internos e externos dos fotorreceptores. A Camada 3, foi composta pelos interneurônios (camada nuclear interna, composta por células responsáveis pela conexão entre a retina externa e a interna). A Camada 4 representou a extensão sináptica entre os interneurônios e as células ganglionares (camada plexiforme interna).

Também foi encontrada uma diferença nas estimativas em todas as camadas (exceto a Camada 2), entre os subgrupos Fumantes sacrificados imediatamente, 24 e 48 horas após a exposição, com significância estatística na Camada 3 e limiar de significância estatística na Camada 1, sugerindo

uma relação da redução de espessura retiniana com o tempo decorrido após a exposição. Essa redução de espessura pode ser explicada pela morte celular associada a degenerações da retina, com remodelamento secundário, induzidas pelas substâncias presentes na fumaça de cigarro (Jones e Marc, 2005).

A disposição histológica da retina em camadas permite que degenerações celulares promovam uma redução do volume nas camadas das células mais atingidas. Esta redução pode ser medida objetivamente. A morfometria é o método mais utilizado para medir, avaliar e comparar degenerações estruturais da retina (Stone et al., 1992; Santos et al., 1997; Kim et al, 2002; Ohguro et al., 2002; Vaughan et al., 2003).

Em nosso estudo as camadas avaliadas foram agrupadas de maneira funcional. O que denominamos camada 1, se caracterizou pelos segmentos internos e externos dos fotorreceptores, enquanto a camada 2, por seus núcleos. Desta forma, eventos degenerativos que inicialmente afetassem seus segmentos mais externos (porção de alto metabolismo fotoquímico) poderiam ser medidos antes que as alterações também atingissem seus núcleos. Denominamos camada 3 a camada nuclear interna, onde se encontram os interneurônios e estão localizadas as células de Müller (que apresentam diversas funções na resposta à hipóxia, à inflamação e na degeneração e remodelamento retiniano) (Yoneda et al., 2001; Jones, Marc, 2005). A camada plexiforme externa foi denominada camada 4, enquanto a camada de células ganglionares e a camada de fibras nervosas (que é sua

extensão histológica e funcional) foram avaliadas em conjunto, denominadas camada 5.

Modelos animais são de grande utilidade para o estabelecimento de informações a respeito dos achados histopatológicos e da patogenia das doenças, em especial nos fenômenos de origem multifatorial, onde é difícil definir uma relação de causa e efeito. Ao permitir a compreensão da doença, também fornecem dados úteis para seu tratamento e prevenção.

Dentre os animais que poderiam ser utilizados para investigação de doenças retinianas, os ratos constituem modelos experimentais de muita utilidade. O arranjo histológico e os processos fisiológicos da retina são similares, e muitas das degenerações retinianas encontradas nos ratos tem uma doença retiniana correspondente em humanos. Há uma homologia de genes funcionais de 90% entre o genoma dos ratos e dos seres humanos (Elizabeth Rakoczy et. al., 2006).

Além da viabilidade histológica, existem outras vantagens na utilização de ratos como modelos animais, como facilidade de aquisição e manutenção do animal, assim como de enucleação do bulbo ocular. Também deve ser considerado que seu ciclo de vida tem proporções muito menores que o do ser humano, reduzindo o tempo entre a indução e a resposta a fenômenos patológicos.

Os modelos experimentais de exposição ao cigarro podem ser divididos de acordo com a metodologia empregada: o método de exposição, o intervalo de exposição e o tempo de duração da exposição. O método de exposição pode ser da fumaça do cigarro como um todo, ou seus

componentes bioquímicos (Howard et al., 1994). O intervalo de exposição pode ser intermitente, onde se realiza a aplicação de pequenas porções de fumaça (“puffs”), intercalados por alguns segundos (Kendrick et al., 1976; Orlander et al., 1979; Bilimoria et al., 1980; Clark, 1989; Clark, 1990) ou contínuo, onde a fumaça de cigarro é liberada constantemente dentro da câmara de inalação (Cendon et al., 1997; Balansky et al., 1999; Zhang et al., 2002). Os dois métodos são eficazes na exposição à fumaça de cigarro, que é demonstrada pelo aumento na concentração de carboxihemoglobina (HbCO) ou de cotinina sérica nos animais.

A cotinina sérica é um marcador de alta confiabilidade de exposição ao tabaco, podendo ser medida no sangue, saliva ou urina (Pichini et al., 1992; Rosa et al., 1992). Além de ser utilizada em estudos experimentais com animais, estudos epidemiológicos também a utilizam como marcador do tabagismo (Seccareccia et al., 2003). Níveis de cotinina sérica superiores 15 ng/mL tem sido associados ao fumante ativo (Seccareccia et al., 2003; de Weerd et al., 2002).

Utilizamos a HbCO e a cotinina sérica como marcadores, que confirmaram a exposição à fumaça de cigarro pelo aumento nos níveis séricos imediatamente após o experimento (subgrupo Fumantes 0h). Com isto certificamo-nos que os animais foram realmente submetidos à inalação.

No presente estudo, aplicamos um modelo de câmara de inalação previamente descrito por Mayer (2004), e desenvolvido em conjunto pelo Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Departamento de Patologia da FMUSP (LIM-05), com o apoio do Laboratório de Investigações

Médicas em Terapêutica Experimental da FMUSP (LIM – 20) e do Programa de Pós-Graduação em Reabilitação da Universidade Federal de São Paulo.

Optamos estudar a exposição aguda à fumaça de cigarro, visto que estudos prévios na literatura demonstraram que é possível encontrar lesões degenerativas em cobaias após exposição aguda à fumaça de cigarro. Bilimoria e Ecobichon (1980) encontraram alterações hepáticas e renais em cobaias expostas agudamente à fumaça de doze cigarros, em dose única. Mayer (2004) demonstrou um aumento da permeabilidade do sarcolema nos músculos diafragmáticos e do vasto lateral em ratos expostos agudamente por 2 horas em dose única à fumaça de cigarro. Alterações citogenéticas foram encontradas em células de medula óssea de ratos após curta exposição ao cigarro por Balansky et al. (1988). Realizando exposição à fumaça de cigarro de 1-3 horas de duração, estes autores notaram um aumento de 3,5 vezes no número de eritrócitos policromáticos micronucleados. Estas células têm origem na medula óssea e são marcadores de lesão ao DNA. Em 1992, Balansky et al. realizaram estudos citogenéticos em ratos Sprague-Dawley expostos de 1 a 40 dias à fumaça de cigarro, encontrando defeitos no DNA celular 24 horas após exposição aguda e única. Eles também expuseram ratos à fumaça de cigarro por 1 hora diária por um período de uma semana, detectando aberrações no DNA celular da medula óssea das cobaias expostas (Balansky et al., 1999).

Uma curta exposição à fumaça de cigarro também foi capaz de induzir danos ao DNA de células de coração, fígado e pulmão de camundongos, conforme relatado por Howard et al. (1998). Eles expuseram seus animais a

regimes de 30 e 90 minutos à fumaça de cigarro, realizando sacrifício dos animais imediatamente ao término da inalação.

Já está demonstrado que a retina também pode sofrer alterações degenerativas após exposição aguda a mecanismos indutores. Abler et al. (1996) encontraram apoptose de fotorreceptores da retina de ratos imediatamente após 6 horas de exposição à luz fluorescente verde (480-490 nm), com luminância de 320 pés-velas.

As ações patogênicas das substâncias do cigarro necessitam de absorção sistêmica para que exerçam seus mecanismos, e já foi demonstrado que a administração aguda de substâncias por via sistêmica também é capaz de induzir degenerações retinianas. Taomoto et al. (1998) demonstraram a indução de degeneração retiniana 24 horas após injeção intraperitoneal de N-metil-N-nitrosouréia (MNU) em roedores. Esta degeneração se prolongou, atingindo pico máximo 5 a 7 dias após a injeção, sendo comprovada a lesão celular dos fotorreceptores por apoptose através de testes imunohistoquímicos e microscopia eletrônica. Outros trabalhos também confirmaram apoptose de fotorreceptores após administração sistêmica em dose única da MNU, em ratos e camundongos. (Nakajima et al., 1996a,b; Yuge et al., 1996; Nambu et al., 1997).

Outra substância que provoca degenerações retinianas após exposição aguda é o metanol, uma neurotoxina que atua na retina e nervo óptico. Os efeitos agudos da intoxicação pelo metanol podem gerar distúrbios visuais entre 18 e 48 horas após a ingestão (Eells et al., 1996). Experimentos utilizando injeções intraperitoneais de metanol foram capazes

de degenerar as células da retina, demonstrando alterações funcionais e histológicas 24 horas após a indução. Seme et al. (1999) estudaram alterações funcionais (através do eletrorretinograma) e histológicas da retina de roedores, detectando indícios de degeneração de fotorreceptores 24 horas após início da intoxicação. Plaziac et al. (2003) observaram reduções significativas nas amplitudes de ondas a e b de eletrorretinogramas de ratos, que se iniciaram 24 horas e alcançaram pico 72 horas após exposição única. As ondas b apresentaram alterações mais precoces e acentuadas, presumivelmente por degenerações diretas das células de Müller.

Também o iodato de sódio (NaIO₃) administrado em dose única intraperitoneal, é capaz de induzir degeneração da retina (Mizota et al., 1997; Kiuchi et al., 2002b; Obata et al., 2005; Tanaka et al., 2005). Kiuchi et al. (2002b) injetaram dose única de 100mg/kg de NaIO₃ em camundongos de sete semanas de idade. Examinando a retina destes ratos por estudos histológicos, ultra-estruturais, imunohistoquímicos e pelo método de Marcação *In Situ* das Extremidades Cortadas (“TUNEL”, método histoquímico que avalia apoptose celular), eles notaram necrose de epitélio pigmentado da retina 6 horas após injeção, apoptose de fotorreceptores após 24 horas e proliferação de células de Müller associada à migração de macrófagos no tecido retiniano três dias após o experimento.

Ratos submetidos à ingestão em dose única de 1,4-bis (4-aminofenoxi)-2-fenilbenzeno (2-fenil-APB-144) apresentaram necrose de células do epitélio pigmentado da retina (Lee e Valentine, 1990, 1991). Os autores submeteram ratos pigmentados à administração oral desta

substância e observaram necrose no EPR 4 horas após a ingestão de 100 mg/kg. Em 48 horas, degenerações dos segmentos externos dos fotorreceptores estavam associadas a uma resposta hiperplástica do EPR.

Uma das vantagens na utilização de ratos em modelos experimentais está baseada no fato de que sua longevidade média seja de aproximadamente dois anos (Elizabeth Rakoczy et al., 2006). Logo, o tempo de exposição a uma determinada substância para indução de dano em ratos é extremamente menor do que seria necessário para provocar alterações similares em humanos. Cendon et al. (1999) desenvolveram um modelo de indução de enfisema pulmonar em ratos, intoxicando-os com a fumaça de cigarro por apenas 45 dias. Em humanos, esta doença ocorre após décadas de exposição ao tabagismo.

Na retina, enquanto é necessário um prolongado uso sistêmico de cloroquina para encontrarmos sinais degenerativos em humanos, em modelos animais isto é observado rapidamente. Mahon et al. (2004) induziram degenerações de retina e EPR em ratos submetidos ao uso de cloroquina de forma contínua através de bombas de infusão por um período de apenas sete dias.

Redução de estimativas morfométricas da retina de ratos após a exposição a derivados do cigarro também foi observada por outros autores. Evereklioglu et al. (2003) conduziram um experimento com ratos *Wistar*, utilizando animais gestantes tratadas com injeção intraperitoneal de nicotina, do 9º ao 21º dia de gestação. Suas retinas foram estudadas através de métodos histológicos e morfométricos, observando-se sinais degenerativos e

uma redução na espessura retiniana. A camada plexiforme interna e o número de células ganglionares foram os achados com redução mais acentuada.

Existem algumas hipóteses que podem justificar o papel das substâncias químicas da fumaça de cigarro nas alterações estruturais do tecido retiniano. O tabagismo está envolvido como a redução do suprimento de oxigênio por redução de fluxo, aumento das concentrações de células sanguíneas, da adesividade plaquetária, da hiperviscosidade do sangue e aumento do risco de fenômenos trombóticos (Penfold et al, 2001; Solberg et al, 1998, Bazzano et al., 2003). As substâncias constituintes do cigarro são capazes de promover indução de morte celular por dano direto ao DNA celular, através de um mecanismo de apoptose ou por aumento no estresse oxidativo, proporcionando degenerações nas células retinianas (Lee et al, 1998; Beatty et al., 2000).

A fumaça de cigarro também é capaz de interferir com o metabolismo normal da retina. Brogan et al. (2005) demonstraram que a nor nicotina (um componente da fumaça de cigarro), é capaz de catalisar o processo de isomerização de retinóides (derivados da vitamina A), fundamentais para os mecanismos fotoquímicos fisiológicos responsáveis pela visão. Há um aumento na biossíntese de *N*-retilideno-*N*-retiniletanolamina (A2E), substância que provoca efeito destrutivo nas membranas celulares, disfunção dos lisossomos e libera proteínas apoptóticas presentes nas mitocôndrias. Estes distúrbios metabólicos provocam o acúmulo de lipofuscina nas células do EPR, degenerando os fotorreceptores.

Diversos estudos experimentais associaram o tabagismo ou seus compostos a danos neuronais. A nicotina atua sobre o sistema nervoso central, alterando o potencial evocado luminoso, lesando o DNA neuronal e reduzindo a contagem de células cerebrais (Trauth et al 2000; Hetzler e Theinpeng, 2004). A nicotina também está envolvida com o mecanismo de apoptose celular no hipocampo (Jang et al, 2002).

Em um estudo utilizando o benzo[*a*]pireno (constituente da fumaça de cigarro), Patton et al. (2002) detectaram dano ao DNA de células de epitélio pigmentado da retina. Eles também observaram uma ação sinérgica entre esta substância e radiação ultravioleta. Como o EPR está envolvido com o transporte de substrato da retina externa, com a fagocitose dos resíduos dos segmentos externos dos fotorreceptores e com atividades antioxidantes, estas evidências associam substâncias do cigarro diretamente a degenerações do EPR e retina.

O tabagismo é uma fonte importante de estresse oxidativo, originando radicais livres e espécies de oxigênio reativas de diversas formas. A fumaça de cigarro provoca uma indução de macrófagos e neutrófilos ativados circulantes, que produzem fatores oxidantes. O cigarro também atua em fontes endógenas de oxigênio reativo como as enzimas endoteliais de óxido nítrico sintase (eNOS), xantina oxidase e a cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, aumentando a produção de fatores oxidantes (Ambrose e Barua, 2004; Pryor e Stone 1993; Smith e Fischer, 2001; Pryor et al., 1998; Barua et al., 2003; Guthikonda et al., 2003). As reações entre os radicais livres e óxido nítrico não só contribuem para reduzir os estoques de

substâncias antioxidantes como produz peroxinitrito, aumentando o estresse oxidativo celular (Kodja e Harisson, 1999)

Já que *in vivo*, as espécies de oxigênio reativas normalmente são o resultado do metabolismo celular ou de reações fotoquímicas (Kukreja e Heis, 1992; Dargel, 1992), o aumento do estresse oxidativo associado ao tabagismo pode desencadear danos irreversíveis às células retinianas, que por si só, já são mais suscetível ao dano oxidativo (Beatty et al., 2000).

Além de possuir um alto metabolismo de oxigênio, a retina está exposta a grandes níveis de radiação luminosa, a qual pode induzir lesões oxidativas, muitas vezes por meio da peroxidação lipídica (Wiegand, 1983; Organisciak, 1998).

Nas membranas dos fotorreceptores, há grande proporção de ácidos graxos poliinsaturados, que são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica, com conseqüente perda da função e integridade estrutural (Arstila, et al., 1972). A retina é rica em cromóforos, substâncias que absorvem a luz para produzir reações químicas, como a rodopsina, a melanina, a lipofuscina e enzimas respiratórias mitocondriais (citocromo c oxidase). Estas substâncias podem produzir um dano fotoquímico, através da absorção de luz (Mellerio, 1994). A fagocitose dos segmentos externos dos fotorreceptores pelo EPR aumenta em nove vezes a produção de H₂O₂ extracelular (Tate et al., 1997).

Nos indivíduos fumantes uma série de fatores pode interferir com a oxigenação da retina. Há um aumento nos níveis séricos de monóxido de carbono, que por apresentar uma alta afinidade com a hemoglobina, reduz a

capacidade desta de transportar oxigênio, comprometendo a oxigenação dos tecidos (Solberg et al., 1998).

A nicotina tem um efeito direto no sistema vascular dos fumantes como foi constatado por Morgado et al. (1994). Eles observaram que a exposição aguda ao tabagismo induz redução do fluxo sanguíneo. Mesmo em baixas concentrações, a nicotina é capaz de promover a excitação dos gânglios simpáticos, que por sua vez, induzem a vasoconstrição e aumento da resistência vascular periférica (Langhans et al., 1997).

Ahmed et al. (1993) demonstraram que fotorreceptores de primatas consomem 90 a 100% do suprimento de oxigênio da coriocapilar. Como a retina é um tecido com alto consumo de oxigênio, mesmo pequenas reduções no fluxo podem ter implicações funcionais.

A baixa tensão de oxigênio pode desencadear uma resposta imunológica celular e humoral nas células retinianas, em especial da microglia, alterando a integridade da barreira hemato-retiniana (Penfold, 2001). Os macrófagos da microglia podem influenciar todas as fases do processo angiogênico, através da liberação de fatores de crescimento e citocinas, como fator de crescimento vascular endotelial (“*vascular endothelial growing factor*” – VEGF), interleucina IL-1 beta e fator de necrose tumoral alfa (Sunderkotter, 1994; Oh et al., 1999; Otani et al., 1999). As citocinas pró-inflamatórias são uma resposta da microglia à hipóxia, e quebram a barreira hemato-retiniana alterando sua permeabilidade (Cláudio et al., 1994).

A barreira hemato-retiniana externa representada pelo EPR pode ser quebrada por mecanismos ligados diretamente a componentes da fumaça de cigarro. Estudos experimentais utilizando substâncias policíclicas aromáticas da fumaça de cigarro evidenciaram disfunção e morte celular das células do epitélio pigmentado da retina (Patton et al., 2002).

Também foi demonstrada associação entre o tabagismo e degenerações retinianas em estudos epidemiológicos (Delcourt et al., 2001; Wilson et al., 2001; Mitchell et al., 2002). Com exceção da idade, é o único fator de risco consistentemente identificado em diversos estudos sobre Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) (Hyman, Nebrosky, 2002; Fraser-Bell et al., 2006).

Pesquisas envolvendo análises histopatológicas sobre degeneração macular relacionada à idade (DMRI) sugerem uma sequência de eventos iniciada por atrofia do epitélio pigmentado da retina (EPR), seguida pela morte dos fotorreceptores sobrejacentes (Curcio et al., 1996; Xu et al., 1996; Curcio, 2001). Apesar dos mecanismos envolvidos nestes eventos ainda não estarem bem esclarecidos, existem evidências de que há apoptose dos fotorreceptores na DMRI (Xu et al., 1996; Dunaief et al., 2002).

Substâncias antioxidantes têm importante papel protetor em algumas degenerações retinianas. A utilização sistêmica de antioxidantes foi capaz de reduzir a progressão da degeneração retiniana associada à DMRI (Age-related eye diseases study group, 2001). A suplementação da dieta com N-acetil-L-cisteína foi eficaz na redução da peroxidação lipídica de ratos, através de suas propriedades antioxidantes (Alhamdan, 2005). Kiuchi et al.

(2002a) demonstraram ser possível reduzir a apoptose celular da retina em ratos e camundongos que tiveram danos no DNA após utilização de um agente alquilante (MNU), utilizando a nicotinamida sistemicamente (vitamina B₃). Postula-se que a nicotinamida poderia reparar o DNA lesado, modulando a apoptose e sendo um agente potencial para o tratamento de degenerações retinianas.

Este estudo serviu para aplicar um modelo de exposição aguda e de curto prazo, que demonstrou uma associação entre o tabagismo e a redução de estimativas das camadas retinianas. A partir da utilização de modelos experimentais, é possível aprofundar as investigações sobre a fisiopatologia das degenerações retinianas associadas ao tabagismo, assim como estudar possibilidades farmacológicas de proteção ao dano, como, por exemplo, por meio de substâncias antioxidantes.

No futuro, este modelo poderá ser utilizado em conjunto com testes imunohistoquímicos para elucidar a nível celular os padrões específicos das alterações estruturais retinianas provocadas pelo tabaco. Também poderá ser útil na pesquisa da eficácia de substâncias que possam proteger a retina dos fenômenos neurodegenerativos associados ao uso do cigarro.

6 Conclusões

1. A exposição aguda de ratos à fumaça de cigarro provocou alterações histológicas retinianas, demonstradas por meio da morfometria, com redução da área estimada das camadas de fotorreceptores, nuclear interna e plexiforme interna, dos ratos expostos ao tabagismo, em comparação com os grupos controles.
2. Observou-se diferença estatisticamente significativa nas estimativas morfométricas da camada nuclear interna, entre os ratos sacrificados imediatamente após a exposição ao tabagismo, em relação àqueles sacrificados 24 e 48 horas após, demonstrando uma tendência à redução nas áreas estimadas com o decorrer do tempo após a exposição à fumaça de cigarro.

7 Anexos

Anexo 1 – Estimativas morfométricas das retinas dos animais sacrificados (μm^2)

Identificação	Grupo	Amostra	Subgrupo	C1	C2	C3	C4	C5
C0-11E	0h	1	Controle	5625	7500	5000	9375	8125
C0-11E	0h	2	Controle	7500	8125	4375	8750	7500
C0-11E	0h	3	Controle	6250	10625	4375	9375	5625
C0-11E	0h	4	Controle	5625	12500	5000	8125	7500
C0-11E	0h	5	Controle	6875	11875	5000	7500	8125
C0-11E	0h	6	Controle	5000	10000	5625	8750	6875
C0-12	0h	1	Controle	5625	11875	8125	10000	6250
C0-12	0h	2	Controle	6875	11250	7500	9375	5000
C0-12	0h	3	Controle	5625	10000	7500	8125	5625
C0-12	0h	4	Controle	6250	11250	8125	8125	5000
C0-12	0h	5	Controle	5000	10625	6875	9375	5625
C0-12	0h	6	Controle	5625	9375	6875	8125	5625
C0-13E	0h	1	Controle	7500	10625	5000	8750	5000
C0-13E	0h	2	Controle	6250	11875	5625	9375	5000
C0-13E	0h	3	Controle	6250	11875	6250	10000	5625
C0-13E	0h	4	Controle	5625	9375	5000	8750	4375
C0-13E	0h	5	Controle	5625	10000	5625	8750	5625
C0-13E	0h	6	Controle	5000	9375	4375	9375	5000
C0-14E	0h	1	Controle	5000	11250	6250	9375	4375
C0-14E	0h	2	Controle	5000	11250	5625	8125	5625
C0-14E	0h	3	Controle	5625	9375	5625	8750	4375
C0-14E	0h	4	Controle	6250	10625	6250	8750	5625
C0-14E	0h	5	Controle	4375	11875	6250	7500	5625
C0-14E	0h	6	Controle	5000	8750	6250	9375	5000
C24-11E	24h	1	Controle	6875	10000	5625	8125	5000
C24-11E	24h	2	Controle	5000	10000	4375	7500	5000
C24-11E	24h	3	Controle	5000	8750	3750	8750	3750
C24-11E	24h	4	Controle	5000	9375	5000	7500	4375
C24-11E	24h	5	Controle	5625	9375	5000	10000	6250
C24-11E	24h	6	Controle	6875	8750	5000	8125	4375
C24-12E	24h	1	Controle	6250	11250	6250	9375	3125
C24-12E	24h	2	Controle	6875	10000	5625	8750	5000
C24-12E	24h	3	Controle	5625	10000	4375	10625	3750
C24-12E	24h	4	Controle	6250	10000	6250	6875	7500
C24-12E	24h	5	Controle	4375	9375	6250	8125	6250
C24-12E	24h	6	Controle	6250	8750	5000	8750	4375
C24-13	24h	1	Controle	6250	10625	6250	10000	6250
C24-13	24h	2	Controle	6875	10000	6250	8750	7500
C24-13	24h	3	Controle	5625	10000	5000	8125	6875
C24-13	24h	4	Controle	4375	10000	6250	7500	7500
C24-13	24h	5	Controle	5000	10625	4375	8750	6875
C24-13	24h	6	Controle	4375	9375	5625	7500	8125

continua

**Anexo 1 – Estimativas morfométricas das retinas dos animais sacrificados(μm^2) -
Continuação**

Identificação	Grupo	Amostra	Subgrupo	C1	C2	C3	C4	C5
C24-14E	24h	1	Controle	5000	11875	6875	8750	8750
C24-14E	24h	2	Controle	5000	13750	7500	10625	7500
C24-14E	24h	3	Controle	6250	12500	8750	11250	6250
C24-14E	24h	4	Controle	5625	13125	6875	11250	6875
C24-14E	24h	5	Controle	5625	11250	6250	9375	5000
C24-14E	24h	6	Controle	6875	11875	5625	10000	3750
C48-11E	48h	1	Controle	6250	10000	6250	8750	6250
C48-11E	48h	2	Controle	5625	12500	6250	9375	5625
C48-11E	48h	3	Controle	6250	9375	6250	8125	7500
C48-11E	48h	4	Controle	6250	9375	6250	9375	6250
C48-11E	48h	5	Controle	6250	9375	6250	9375	6250
C48-11E	48h	6	Controle	6250	9375	6250	9375	6250
C48-12E	48h	1	Controle	6250	11875	6875	9375	4375
C48-12E	48h	2	Controle	6250	10625	5000	8125	5625
C48-12E	48h	3	Controle	6250	10000	5625	8750	5625
C48-12E	48h	4	Controle	7500	10625	6250	8750	8750
C48-12E	48h	5	Controle	6250	10000	6250	9375	6875
C48-12E	48h	6	Controle	6250	9375	5625	8750	6875
C48-13E	48h	1	Controle	5625	9375	6250	9375	6250
C48-13E	48h	2	Controle	5625	9375	6250	9375	5625
C48-13E	48h	3	Controle	6250	9375	6250	10000	5625
C48-13E	48h	4	Controle	4375	11250	5625	9375	6250
C48-13E	48h	5	Controle	6250	9375	5625	8750	6250
C48-13E	48h	6	Controle	5625	9375	4375	8750	6875
C48-14E	48h	1	Controle	6250	10625	6875	10625	7500
C48-14E	48h	2	Controle	6250	13125	7500	10000	6250
C48-14E	48h	3	Controle	6250	13750	7500	8750	5000
C48-14E	48h	4	Controle	6250	10000	5000	9375	5000
C48-14E	48h	5	Controle	6250	9375	6250	9375	6875
C48-14E	48h	6	Controle	6250	9375	5625	9375	5000
E0-11D	0h	1	Fumantes	5000	11250	5000	9375	6250
E0-11D	0h	2	Fumantes	6250	9375	4375	8750	5625
E0-11D	0h	3	Fumantes	4375	11250	6250	8750	4375
E0-11D	0h	4	Fumantes	6250	8750	7500	9375	4375
E0-11D	0h	5	Fumantes	6250	9375	6250	8125	5000
E0-11D	0h	6	Fumantes	5625	11250	6250	10000	6250
E0-12E	0h	1	Fumantes	4375	10625	6250	8750	5000
E0-12E	0h	2	Fumantes	5000	10625	6250	8125	5625
E0-12E	0h	3	Fumantes	3750	10625	6250	9375	3750
E0-12E	0h	4	Fumantes	5625	10000	6250	9375	6250
E0-12E	0h	5	Fumantes	5000	10625	6250	8750	6875
E0-12E	0h	6	Fumantes	6250	9375	6250	7500	6875
E0-13E	0h	1	Fumantes	6250	8750	6875	7500	4375
E0-13E	0h	2	Fumantes	5000	10000	6250	9375	5625
E0-13E	0h	3	Fumantes	6250	8750	6250	8125	5000
E0-13E	0h	4	Fumantes	6250	9375	6250	8750	5625

continua

**Anexo 1 – Estimativas morfométricas das retinas dos animais sacrificados(μm^2) -
Continuação**

Identificação	Grupo	Amostra	Subgrupo	C1	C2	C3	C4	C5
E0-13E	0h	5	Fumantes	6250	9375	6875	7500	5625
E0-13E	0h	6	Fumantes	6250	9375	6250	10625	5625
E0-14E	0h	1	Fumantes	6250	10625	5000	8125	6875
E0-14E	0h	2	Fumantes	6250	11250	6250	8750	4375
E0-14E	0h	3	Fumantes	6250	10000	6250	8750	5625
E0-14E	0h	4	Fumantes	6250	11875	6875	8125	6250
E0-14E	0h	5	Fumantes	6250	11875	6250	8125	5000
E0-14E	0h	6	Fumantes	6250	10625	6250	7500	5000
E24-11E	24h	1	Fumantes	5000	9375	6250	9375	3750
E24-11E	24h	2	Fumantes	5000	10625	5625	9375	3125
E24-11E	24h	3	Fumantes	5000	9375	6250	7500	5000
E24-11E	24h	4	Fumantes	6250	10000	5000	9375	5000
E24-11E	24h	5	Fumantes	5625	10000	6250	9375	5625
E24-11E	24h	6	Fumantes	5625	10000	6250	8750	4375
E24-12	24h	1	Fumantes	6250	9375	6875	8125	7500
E24-12	24h	2	Fumantes	6250	9375	6250	10625	5625
E24-12	24h	3	Fumantes	5625	9375	5000	10000	4375
E24-12	24h	4	Fumantes	4375	11250	6250	9375	6875
E24-12	24h	5	Fumantes	3750	12500	4375	8750	6250
E24-12	24h	6	Fumantes	5000	10625	3750	9375	5625
E24-13E	24h	1	Fumantes	5625	9375	6250	6875	6250
E24-13E	24h	2	Fumantes	4375	9375	5000	6875	5000
E24-13E	24h	3	Fumantes	5625	9375	3750	6875	4375
E24-13E	24h	4	Fumantes	5625	10000	4375	8750	5000
E24-13E	24h	5	Fumantes	5000	9375	5000	9375	3750
E24-13E	24h	6	Fumantes	4375	9375	6250	6875	5625
E24-14	24h	1	Fumantes	6875	11250	4375	7500	4375
E24-14	24h	2	Fumantes	5625	11250	5000	8125	5625
E24-14	24h	3	Fumantes	5000	9375	5000	8125	6250
E24-14	24h	4	Fumantes	4375	9375	5625	6875	6250
E24-14	24h	5	Fumantes	5625	10000	5000	6250	5000
E24-14	24h	6	Fumantes	5000	9375	3750	5625	3750
E48-11E	48h	1	Fumantes	6250	9375	6250	8750	6250
E48-11E	48h	2	Fumantes	5000	10625	5625	7500	3750
E48-11E	48h	3	Fumantes	5625	9375	5000	9375	3750
E48-11E	48h	4	Fumantes	3750	8750	5000	6250	5000
E48-11E	48h	5	Fumantes	4375	9375	3750	6250	3125
E48-11E	48h	6	Fumantes	6250	8125	5000	6250	3750
E48-12E	48h	1	Fumantes	5000	10000	4375	6875	5625
E48-12E	48h	2	Fumantes	5000	10000	6250	6250	6250
E48-12E	48h	3	Fumantes	5000	10000	5625	6875	4375
E48-12E	48h	4	Fumantes	5625	10000	5625	8125	5000
E48-12E	48h	5	Fumantes	5000	11250	6250	7500	5000
E48-12E	48h	6	Fumantes	3750	11250	3750	7500	6875

continua

Anexo 1 – Estimativas morfométricas das retinas dos animais sacrificados(μm^2) - Conclusão

Identificação	Grupo	Amostra	Subgrupo	C1	C2	C3	C4	C5
E48-13E	48h	1	Fumantes	3750	11250	4375	7500	4375
E48-13E	48h	2	Fumantes	3750	10625	3750	6250	5000
E48-13E	48h	3	Fumantes	5000	10000	5000	6875	5000
E48-13E	48h	4	Fumantes	3750	9375	5000	6250	4375
E48-13E	48h	5	Fumantes	3125	9375	6250	5625	4375
E48-13E	48h	6	Fumantes	3750	9375	5000	6250	3125
E48-14E	48h	1	Fumantes	5625	10625	6875	9375	6875
E48-14E	48h	2	Fumantes	5625	10000	5625	9375	6250
E48-14E	48h	3	Fumantes	5625	10000	6250	9375	6250
E48-14E	48h	4	Fumantes	4375	11250	5000	8125	7500
E48-14E	48h	5	Fumantes	3750	9375	6250	8750	5000
E48-14E	48h	6	Fumantes	3750	10625	5000	7500	6875

Anexo 2 – Estimativas plasmáticas da carboxihemoglobina (HbCO), e da cotinina dos subgrupos Controles 0h, Fumantes 0h, Fumantes 24h e Fumantes 48h

Identificação	Grupo	Subgrupo	HbCO (%)	Cotina (ng/mL)
C0-11E	0h	Controles	0	0
C0-12	0h	Controles	0	0
C0-13E	0h	Controles	0	0
C0-14E	0h	Controles	0	0
E0-11D	0h	Fumantes	3	20
E0-12E	0h	Fumantes	3	20
E0-13E	0h	Fumantes	3	12
E0-14E	0h	Fumantes	3	16
E24-11E	24h	Fumantes	0	0
E24-12	24h	Fumantes	0	1
E24-13E	24h	Fumantes	0	1
E24-14	24h	Fumantes	0	0
E48-11E	48h	Fumantes	0	0
E48-12E	48h	Fumantes	1	2
E48-13E	48h	Fumantes	0	1
E48-14E	48h	Fumantes	0	0

8 Referências

Abler AS, Chang CJ, Ful J, Tso MO, Lam TT. Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1996 ;92(2):177-89.

Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(10):1417-36.

Ahmed J, Braun RD, Dunn R Jr, Linsenmeier RA. Oxygen distribution in the macaque retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1993 ;34(3):516-21.

Akhter MP, Lund AD, Gairola CG. Bone biomechanical property deterioration due to tobacco smoke exposure. *Calcif Tissue Int*. 2005 ;77(5):319-26.

Alhamdan AA. The effect of dietary supplementation of N-acetyl-L-cysteine on glutathione concentration and lipid peroxidation in cigarette smoke-exposed rats fed a low-protein diet. *Saudi Med J*. 2005 ;26(2):208-14.

Alves MR. *Efeitos do uso tópico da mitomicina C na superfície córneo-conjuntival de coelhas*. [tese livre-docência]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1995.

Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004 19;43(10):1731-7.

Arcavi L, Benowitz NL. Cigarette Smoking and Infection. *Arch Intern Med*. 2004;164:2206-2216.

Arstila AU, Smith MA, Trump BF. Microsomal lipid peroxidation: morphological characterization. *Science*. 1972 ;175(21):530-3.

Balansky RB, D'Agostini F, Znacchi P, De Flora S. Protection by N-acetylcysteine of the histopathological and cytogenetical damage produced by exposure of rats to cigarette smoke. *Cancer Lett*. 1992; 64(2):123-31.

Balansky RM, Blagoeva PM, Mircheva ZI. Investigation of the mutagenic activity of tobacco smoke. *Mutat Res*. 1987;188(1):13-9.

Balansky RM, Blagoeva PM, Mircheva ZI. The mutagenic and clastogenic activity of tobacco smoke. *Mutat Res*. 1988; 208(3-4):237-41.

Balansky RM, D' Agostini F, De Flora S. Induction, persistence and modulation of cytogenetic alterations in cells of smoke-exposed mice. *Carcinogenesis*. 1999; 20(8):1491-7.

Bartalena L, Martino E, Marcocci C, Bogazzi F, Panicucci M, Velluzzi F, Loviselli A, Pinchera A. More on smoking habits and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest*. 1989; 12(10):733-7.

Bartecchi CE, MacKenzie TD, Schrier RW. The human costs of tobacco use (1) *N Engl J Med*. 1994; 330(13):907-12.

Barua RS, Ambrose JA, Srivastava S, DeVoe MC, Eales-Reynolds LJ. Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*. 2003; 107(18):2342-7.

Bazzano LA, He J, Muntner P, Vupputuri S, Whelton PK. Relationship between cigarette smoking and novel risk factors for cardiovascular disease in the United States. *Ann Intern Med*. 2003; 138(11):891-7.

Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 2000; 45(2):115-34.

Becker LB.. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res.* 2004; 61(3):461-70.

Behbehani R, Sergott RC, Savino PJ. Tobacco-alcohol amblyopia: a maculopathy? *Br J Ophthalmol.* 2005; 89(11):1543-4.

Beutler E, West C. Simplified determination of carboxyhemoglobin. *Clin Chem* 1984; 30:871-4.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr* 1999; 12(2): 123-130.

Bilimoria MH, Echobichon DJ. Responses of rodent hepatic, renal and pulmonary aryl hydrocarbon hydrolase following exposure to cigarette smoke. *Toxicol* 1980; 15:83-9.

Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond).* 2003; 91 Spec No:179-94.

Brogan AP, Dickerson TJ, Boldt GE, Janda KD. Altered retinoid homeostasis catalyzed by a nicotine metabolite: implications in macular degeneration and normal development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(30):10433-8.

Bruno A, Russell PW, Jones WL, Austin JK, Weinstein ES, Steel SR. Concomitants of asymptomatic retinal cholesterol emboli. *Stroke*. 1992; 23(6):900-2.

Candy D, Davies EG, Ross E. *Clinical paediatrics and child health*, 1st ed. Philadelphia, WB Saunders, 2001. p.15.

Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnnikoff M, Pereira PM, Conceicao GM, Beppu OS, Saldiva PH. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997; 30(10):1241-7.

Chen J, He J, Hamm L, Batuman V, Whelton PK. Serum antioxidant vitamins and blood pressure in the United States population. *Hypertension*. 2002; 40(6):810-6.

Cheng ACK, Pang CP, Leung ATS, Chua JKH, Fan DSP, Lam DSC. The association between cigarette smoking and ocular diseases. *Hong Kong Med J*. 2000; 6(2):195-202.

Chew E, Remaley NA, Tamboli A, Zhao J, Podgor MJ, Klebanoff M. Risk factors for esotropia and exotropia. *Arch Ophthalmol*. 1994; 112(10):1349-55.

Chiba Y, Murata M, Ushikubo H, Yoshikawa Y, Saitoh A, Sakai H, Kamei J, Misawa M.. Effect of cigarette smoke exposure in vivo on bronchial smooth muscle contractility in vitro in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 33(6): 574-81.

Chow CK, Thacker RR, Changchit C, Bridges RB, Rehm SR, Humble J, Turbek J. Lower levels of vitamin C and carotenes in plasma of cigarette smokers. *J Am Coll Nutr*. 1986;5(3):305-12.

Christen WG, Glynn RJ, Ajani UA, Schaumberg DA, Buring JE, Hennekens CH, Manson JE. Smoking cessation and risk of age-related cataract in men. *JAMA*. 2000; 284(6):713-6.

Christen WG, Glynn RJ, Manson JE, Ajani UA, Buring JE. A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. *JAMA*. 1996; 276(14):1147-51.

Chung SM, Gay CA, McCrary JA 3rd. Nonarteritic ischemic optic neuropathy. The impact of tobacco use. *Ophthalmology*. 1994; 101(4):779-82.

Clark GC. Comparison of the inhalation toxicity of kretek (clove cigarette) smoke with that of American cigarette smoke. I. One day exposure. *Arch Toxicol* 1989; 63:1-6.

Clark GC. Comparison of the inhalation toxicity of kretek (clove cigarette) smoke with that of American cigarette smoke. II. Fourteen days, exposure. Arch Toxicol. 1990;64(7):515-21.

Claudio L, Martiney JA, Brosnan CF. Ultrastructural studies of the blood-retina barrier after exposure to interleukin-1 beta or tumor necrosis factor-alpha. Lab Invest. 1994; 70(6):850-61.

Cohen SB, Weetman AP. Characterization of different types of experimental autoimmune thyroiditis in the Buffalo strain rat. Clin Exp Immunol. 1987; 69(1):25-32.

Colégio Brasileiro de Experimentação Animal [online]. Disponível em: URL: <http://www.cobea.org.br>

Collan Y. Stereology in diagnostic pathology. Pathologica. 1997; 89(4):462-6.

Cometto-Muniz JE, Cain WS. Sensory irritation. Relation to indoor air pollution. Ann N Y Acad Sci. 1992; 641:137-51.

Corcoran GB, Fix L, Jones DP, Moslen MT, Nicotera P, Oberhammer FA, Buttyan R. Apoptosis: molecular control point in toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 1994; 128(2):169-81.

Cortizo V, Santo R, Nunes LM, Bizeto L, Rosa PL, Jardim JR, Takahashi W, Saldiva PH. Métodos de fixação e preparo do tecido retiniano para avaliação histológica: Um estudo comparativo. In: World Ophthalmology Congress 2006; 19-24 Fevereiro 2006; São Paulo, Brasil. Abstracts; São Paulo: International Council of Ophthalmology; Pan American Association of Ophthalmology; Brazilian Council of Ophthalmology; 2006. p. 94, NR708.

Costagliola C, Rinaldi M, Giacoia A, Rosolia S, Cotticelli L, Rinaldi E. Red cell glutathione as a marker of tobacco smoke-induced optic neuropathy. *Exp Eye Res.* 1989; 48(4):583-6.

Curcio CA, Medeiros NE, and Millican CL. Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:1236–1249.

Curcio CA. Photoreceptor topography in ageing and age-related maculopathy. *Eye.* 2001;15:376–383.

Dargel R. Lipid peroxidation--a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxicol Pathol.* 1992 Aug;44(4):169-81.

De Flora S, D'Agostini F, Balansky R, Camoirano A, Bennicelli C, Bagnasco M, Cartiglia C, Tampa E, Longobardi MG, Lubet RA, Izzotti A. Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 2003; 523-524:237-52.

de Weerd S, Thomas CM, Kuster JE, Cikot RJ, Steegers EA. Variation of serum and urine cotinine in passive and active smokers and applicability in preconceptional smoking cessation counseling. *Environ Res.* 2002; 90(2):119-24.

Delcourt C, Diaz JL, Ponton-Sanchez A, Papoz L. Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. *Pathologies Oculaires Liees a l'Age. Arch Ophthalmol.* 1998; 116(8):1031-5.

Delcourt C, Michel F, Colvez A, Lacroux A, Delage M, Vernet MH; The POLA Study Group. Association of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: The POLA study. *Ophthalmic Epidemiol.* 2001; 8(4):237-49.

Dilsiz N, Olcucu A, Cay M, Naziroglu M, Cobanoglu D. Protective effects of selenium, vitamin C and vitamin E against oxidative stress of cigarette smoke in rats. *Cell Biochem Funct.* 1999; 17(1):1-7.

Dioguardi N, Franceschini B, Russo C, Grizzi F. Computer-aided morphometry of liver inflammation in needle biopsies. *World J Gastroenterol.* 2005; 11(44):6995-7000.

Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004; 328(7455):1519.

Dunaief J, Dentchev T, Ying, G, Milam A. The Role of Apoptosis in Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2002; 120(11):1435-1442.

Eells JT, Salzman MM, Lewandowski MF, Murray TG. Formate-induced alterations in retinal function in methanol-intoxicated rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996; 140(1):58-69.

Evereklioglu C, Ozkiris A, Alasehirli B, Sari I, Guldur E, Cengiz B, Kontas O. Effect of gestational nicotine treatment on newborn rat retina: a histopathological and morphometric analysis. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2003; 23(6):527-33.

Fraser-Bell S, Wu J, Klein R, Azen SP, Varma R. Smoking, alcohol intake, estrogen use, and age-related macular degeneration in Latinos: the Los Angeles Latino Eye Study. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141(1):79-87.

Floyd RA. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 1990; 4(9):2587-97.

Glantz SA, Parmley WW. Passive smoking and heart disease. *Epidemiology, physiology, and biochemistry*. *Circulation*. 1991; 83(1):1-12.

Golnik KC, Schaible ER. Folate-responsive optic neuropathy. *J Neuroophthalmol.* 1994; 14(3):163-9.

Gorelick PB. Stroke prevention. *Arch Neurol.* 1995; 52(4):347-55.

Green MS, Harari G. A prospective study of the effects of changes in smoking habits on blood count, serum lipids and lipoproteins, body weight and blood pressure in occupationally active men. The Israeli CORDIS Study. *J Clin Epidemiol.* 1995; 48(9):1159-66.

Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 1987; 147:229-63.

Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG. Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation.* 2003; 107(3):416-21.

Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull.* 1999; 55(1):49-75.

Hackshaw AK, Law MR, Wald NJ. The accumulated evidence on lung cancer and environmental tobacco smoke. *BMJ.* 1997; 315(7114):980-8.

Hakim RB, Tielsch JM. Maternal cigarette smoking during pregnancy. A risk factor for childhood strabismus. *Arch Ophthalmol*. 1992 Oct;110(10):1459-62.

Harding JJ. Cigarettes and cataract: cadmium or a lack of vitamin C? *Br J Ophthalmol*. 1995 Mar;79(3):199-200.

Hepsen IF, Evereklioglu C. Defective visual field tests in chronic heavy smokers. *Acta Ophthalmol Scand*. 2001 Feb;79(1):53-6.

Hetzler BE, Theinpong M. Nicotine alters flash-evoked potentials in Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004 Apr;77(4):717-29.

Hiller R, Sperduto RD, Podgor MJ, Wilson PW, Ferris FL 3rd, Colton T, D'Agostino RB, Roseman MJ, Stockman ME, Milton RC. Cigarette smoking and the risk of development of lens opacities. The Framingham studies. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115(9):1113-8.

Hofbauer LC, Muhlberg T, Konig A, Heufelder G, Schworm HD, Heufelder AE. Soluble interleukin-1 receptor antagonist serum levels in smokers and nonsmokers with Graves' ophthalmopathy undergoing orbital radiotherapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(7):2244-7.

Howard DJ, Briggs LA, Pritsos CA. Oxidative DNA damage in mouse heart, liver, and lung tissue due to acute side-stream tobacco smoke exposure. *Arch Biochem Biophys*. 1998; 352(2):293-7.

Hyman L, Nebrosky R. Risk factors for age-related macular degeneration: an update. *Curr Opin Ophthalmol*. 2002; 13(3):171-75.

Hyman L, Schachat AP, He Q, Leske MC. Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group. *Arch Ophthalmol*. 2000; 118(3):351-8.

Izzotti A. DNA damage and alterations of gene expression in chronic-degenerative diseases. *Acta Biochim Pol*. 2003;50(1):145-54.

Jang MH, Shin MC, Jung SB, Lee TH, Bahn GH, Kwon YK, Kim EH, Kim CJ. Alcohol and nicotine reduce cell proliferation and enhance apoptosis in dentate gyrus. *Neuroreport*. 2002; 13(12):1509-13.

Jones BW, Marc RE. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp Eye Res*. 2005; 81(2):123-37.

Kendler BS. Free radicals in health and disease: implications for primary health care providers. *Nurse Pract*. 1995; 20(7):29-36, 43.

Kendrick J, Nettesheim P, Guerin M, Caton J, Dalbey W, Griesemer R, Rubin I, Maddox W. Tobacco smoke inhalation studies in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1976; 37(3):557-69.

Kerr ME, Bender CM, Monti EJ. An introduction to oxygen free radicals. *Heart Lung.* 1996; 25(3):200-9.

Khan JC, Thurlby DA, Shahid H, Clayton DG, Yates JR, Bradley M, Moore AT, Bird AC; Genetic Factors in AMD Study. Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90(1):75-80.

Kim SY, Sadda S, Humayun MS, de Juan E Jr, Melia BM, Green WR. geographic atrophy due to age-related macular degeneration. *Retina.* 2002; 22(4):464-70.

Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Matsumura M, Tsubura A. Nicotinamide prevents N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor cell apoptosis in Sprague-Dawley rats and C57BL mice. *Exp Eye Res.* 2002; 74(3):383-92.

Kiuchi K, Yoshizawa K, Shikata N, Moriguchi K, Tsubura A. Morphologic characteristics of retinal degeneration induced by sodium iodate in mice. *Curr Eye Res.* 2002; 25(6):373-9.

Klein R, Klein BE, Linton KL, DeMets DL. The Beaver Dam Eye Study: the relation of age-related maculopathy to smoking. *Am J Epidemiol.* 1993; 137(2):190-200.

Klein R, Klein BE, Tomany SC, Cruickshanks KJ. Association of emphysema, gout, and inflammatory markers with long-term incidence of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol.* 2003; 121(5):674-8.

Klintworth, G. K. and Eagle, R. C. Jr (1999) The eye and ocular adnexa. In: *Diagnostic Surgical Pathology*, 3rd edn (ed. S. S. Stephen), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 975–1007.

Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6):620-50.

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res.* 1999; 43(3):562-71.

Koul A, Singh M, Gangar SC. Modulatory effects of different doses of alpha-tocopherol on benzo(a)pyrene-DNA adduct formation in the pulmonary tissue of cigarette smoke inhaling mice. *Indian J Exp Biol.* 2005; 43(12):1139-43.

Krantic S, Mechawar N, Reix S, Quirion R. Molecular basis of programmed cell death involved in neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005; 28(12):670-6.

Krishnaiah S, Vilas K, Shamanna BR, Rao GN, Thomas R, Balasubramanian D. Smoking and its association with cataract: results of the Andhra Pradesh eye disease study from India. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(1):58-65.

Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs.* 2003; 103(4):58-62.

Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovasc Res.* 1992; 26(7):641-55.

Langhans M, Michelson G, Groh MJ. Effect of breathing 100% oxygen on retinal and optic nerve head capillary blood flow in smokers and non-smokers. *Br J Ophthalmol.* 1997; 81(5):365-9.

Langone JJ. *Methods in Enzimology*. 1982. Academic Press, New York, New York. P. 628-640

Law MR, Wald NJ. Environmental tobacco smoke and ischemic heart disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003; 46(1):31-8.

Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, beta-carotene and red ginseng). *Cancer Lett*. 1998; 132(1-2):219-27.

Lee KP, Valentine R. Pathogenesis and reversibility of retinopathy induced by 1,4-bis (4-aminophenoxy)-2-phenylbenzene (2-phenyl-APB-144) in pigmented rats. *Arch Toxicol*. 1991; 65(4):292-303.

Lee KP, Valentine R. Retinotoxicity of 1,4,-bis(4-aminophenoxy)-2-phenylbenzene (2-phenyl-APB-144) in albino and pigmented rats. *Arch Toxicol*. 1990; 64(2):135-42.

Lee KS, Park CY, Meng KH, Bush A, Lee SH, Lee WC, Koo JW, Chung CK. The association of cigarette smoking and alcohol consumption with other cardiovascular risk factors in men from Seoul, Korea. *Ann Epidemiol*. 1998; 8(1):31-8.

Lewis JS, Lee JA, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(6):889-900.

Liu ES, Shin VY, Ye YN, Luo JC, Wu WK, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in cancer cells and macrophages induces colon cancer cell growth by cigarette smoke extract. *Eur J Pharmacol.* 2005; 518(1):47-55.

Lok J, Martin LJ. Rapid subcellular redistribution of Bax precedes caspase-3 and endonuclease activation during excitotoxic neuronal apoptosis in rat brain. *J Neurotrauma.* 2002; 19(7):815-28.

Mahon GJ, Anderson HR, Gardiner TA, McFarlane S, Archer DB, Stitt AW. Chloroquine causes lysosomal dysfunction in neural retina and RPE: implications for retinopathy. *Curr Eye Res.* 2004; 28(4):277-84.

Mandarim-de-Lacerda. Mandarim-de-Lacerda, CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: EdUERJ; 1995. p. 89.

Matayoshi S. *Proposição de um modelo experimental para estudo de vasos e células em esclera de coelhos.* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1999.

Mayer AF. *Lesão de sarcolema em músculo respiratório e periférico de ratos induzida pela exposição à fumaça de cigarro*. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.

McDermott JH. Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. *J Am Pharm Assoc (Wash)*. 2000; 40(6):785-99.

McGwin G, Hall TA, Xie A, Owsley C. The relation between C reactive protein and age related macular degeneration in the Cardiovascular Health Study. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89(9):1166-70.

Mellerio J: Light effects on the retina, in Albert D, Jakobiec F (eds): *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences*. Philadelphia, W B Saunders Co, 1994, pp 1326–45.

Mitchell P, Wang JJ, Smith W, Leeder SR. Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Arch Ophthalmol* 2002; 120(10):1357-63.

Mizota A, Adachi-Usami E. Functional recovery of retina after sodium iodate injection in mice. *Vision Res*. 1997; 37(14):1859-65.

Moreira Júnior CA, Ávila M, editores. *Retina e vítreo*. Rio de Janeiro: Cultura Médica; São Paulo: CBO : CIBA Vision, 2000. p 1-2.

Morgado PB, Chen HC, Patel V, Herbert L, Kohner EM. The acute effect of smoking on retinal blood flow in subjects with and without diabetes. *Ophthalmology*. 1994; 101(7):1220-6.

Moro F, Doro D, Mantovani E. Anterior ischemic optic neuropathy and aging. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol*. 1989;12(1-3):46-57.

Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*. 1995; 332(18):1198-203.

Nakajima M, Nambu H, Shikata N, Senzaki H, Miki H, Tsubura A. Pigmentary degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea and the fate of pigment epithelial cells in the rat retina. *Pathol Int*. 1996; 46(11):874-82.

Nakajima M, Yuge K, Senzaki H, Shikata N, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Photoreceptor apoptosis induced by a single systemic administration of N-methyl-N-nitrosourea in the rat retina. *Am J Pathol*. 1996; 148(2):631-41.

Nambu H, Yuge K, Nakajima M, Shikata N, Takahashi K, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Morphologic characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL mice. *Pathol Int*. 1997; 47(6):377-83.

Napora C, Cohen EJ, Genvert GI, Presson AC, Arentsen JJ, Eagle RC, Laibson PR. Factors associated with conjunctival intraepithelial neoplasia: a case control study. *Ophthalmic Surg.* 1990; 21(1):27-30.

NCI (National Cancer Institute), 2006. "Fact sheet on environmental tobacco smoke". [on line]. Disponível em: URL: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Tobacco/ETS>.

Niedermuller H, Hofecker G, Skalicky M. Changes of DNA repair mechanisms during the aging of the rat. *Mech Ageing Dev.* 1985; 29(3):221-38.

Nijhawan R, Rajwanshi A. Cytomorphologic and morphometric limitations of the assessment of atypia in fibroadenoma of the breast. *Anal Quant Cytol Histol.* 2005; 27(5):273-6.

Obata R, Yanagi Y, Tamaki Y, Hozumi K, Mutoh M, Tanaka Y. Retinal degeneration is delayed by tissue factor pathway inhibitor-2 in RCS rats and a sodium-iodate-induced model in rabbits. *Eye.* 2005; 19(4):464-8.

Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. The potential angiogenic role of macrophages in the

formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(9):1891-8.

Ohguro H, Katsushima H, Maruyama I, Maeda T, Yanagihashi S, Metoki T, Nakazawa M. A high dietary intake of sodium glutamate as flavoring (ajinomoto) causes gross changes in retinal morphology and function. *Exp Eye Res.* 2002; 75(3):307-15.

Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G, Wiggert B. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998; 39(7):1107-16.

Orlander J, Kiessling KH, Larsson L. Skeletal muscle metabolism, morphology and function in sedentary smokers and nonsmokers. *Acta Physiol Scand.* 1979; 107(1):39-46.

Otani A, Takagi H, Oh H, Koyama S, Matsumura M, Honda Y. Expressions of angiopoietins and Tie2 in human choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1999; 40(9):1912-20.

Palmer HE, Jurd KM, Hunt BJ, Zaman AG, Stanford MR, Sanders MD, Graham EM. Thrombophilic factors in ischaemic and non-ischaemic idiopathic retinal vasculitis. *Eye.* 1995; 9:507-12.

Patton WP, Routledge MN, Jones GD, Lewis SE, Archer DB, Davies RJ, Chakravarthy U. Retinal pigment epithelial cell DNA is damaged by exposure to benzo[a]pyrene, a constituent of cigarette smoke. *Exp Eye Res.* 2002; 74(4):513-22.

Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC, Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degenerations. *Prog Retin Eye Res.* 2001; 20(3):385-414.

Penfold PL, Madigan MC, Provis JM. Antibodies to human leucocyte antigens indicate subpopulations of microglia in human retina. *Vis Neurosci.* 1991; 7(4):383-8

Perera FP. Environment and cancer: who are susceptible? *Science.* 1997; 278(5340):1068-73.

Pichini S, Altieri I, Pacifici R, Rosa M, Ottaviani G, Zuccaro P. Simultaneous determination of cotinine and trans-3'-hydroxycotinine in human serum by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1992; 577(2):358-61.

Pirkle JL, Flegal KM, Bernert JT, Brody DJ, Etzel RA, Maurer KR. Exposure of the US population to environmental tobacco smoke: the Third National

Health and Nutrition Examination Survey, 1988 to 1991. *JAMA*. 1996; 275(16):1233-40.

Plaziac C, Lachapelle P, Casanova C. Effects of methanol on the retinal function of juvenile rats. *Neurotoxicology*. 2003; 24(2):255-60.

Poulsen HE. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol*. 2005; 57 Suppl 1:161-9.

Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *JAMA*. 1993; 269(4):479-82.

Pryor WA, Hales BJ, Premovic PI, Church DF. The radicals in cigarette tar: their nature and suggested physiological implications. *Science*. 1983; 220(4595):425-7.

Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol*. 1998; 11(5):441-8.

Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci*. 1993; 686:12-27.

Racz P, Erdohelyi A. Cadmium, lead and copper concentrations in normal and senile cataractous human lenses. *Ophthalmic Res.* 1988; 20(1):10-3.

Elizabeth Rakoczy P, Yu MJ, Nusinowitz S, Chang B, Heckenlively JR. Mouse models of age-related macular degeneration. *Exp Eye Res.* 2006; 82(5):741-52.

Ramakrishnan S, Sulochana KN, Selvaraj T, Abdul Rahim A, Lakshmi M, Arunagiri K. Smoking of beedies and cataract: cadmium and vitamin C in the lens and blood. *Br J Ophthalmol.* 1995; 79(3):202-6.

Rosa M, Pacifici R, Altieri I, Pichini S, Ottaviani G, Zuccaro P. How the steady-state cotinine concentration in cigarette smokers is directly related to nicotine intake. *Clin Pharmacol Ther.* 1992; 52(3):324-9.

Santos A, Humayun MS, de Juan E Jr, Greenburg RJ, Marsh MJ, Klock IB, Milam AH. Preservation of the inner retina in retinitis pigmentosa. A morphometric analysis. *Arch Ophthalmol.* 1997; 115(4):511-5.

Sato E, Fekete GT, Appelbaum EY, Menke MN, Trempe CL, McMeel JW. Association between systemic arterial stiffness and age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2006 Jan 13;:1-9

Scheibmeir HD, Christensen K, Whitaker SH, Jegaethesan J, Clancy R, Pierce JD. A review of free radicals and antioxidants for critical care nurses. *Intensive Crit Care Nurs.* 2005 ; 21(1):24-8.

Schmid P, Karanikas G, Kritz H, Pirich C, Stamatopoulos Y, Peskar BA, Sinzinger H. Passive smoking and platelet thromboxane. *Thromb Res.* 1996; 81(4):451-60.

Schwartz J, Zeger S. Passive smoking, air pollution, and acute respiratory symptoms in a diary study of student nurses. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141(1):62-7.

Seccareccia F, Zuccaro P, Pacifici R, Meli P, PannoZZo F, Freeman KM, Santaquilani A, Giampaoli S; Research Group of the MATISS Project. Serum cotinine as a marker of environmental tobacco smoke exposure in epidemiological studies: the experience of the MATISS project. *Eur J Epidemiol.* 2003;18(6):487-92.

Seddon JM, Chen CA. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin.* 2004; 44(4):17-39.

Seme MT, Summerfelt P, Henry MM, Neitz J, Eells JT. Formate-induced inhibition of photoreceptor function in methanol intoxication. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 289(1):361-70.

Shalini VK, Luthra M, Srinivas L, Rao SH, Basti S, Reddy M, Balasubramanian D. Oxidative damage to the eye lens caused by cigarette smoke and fuel smoke condensates. *Indian J Biochem Biophys.* 1994; 31(4):261-6.

Shine B, Fells P, Edwards OM, Weetman AP. Association between Graves' ophthalmopathy and smoking. *Lancet.* 1990; 335(8700):1261-3.

Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* 1991; 91(3C):31S-38S.

Smiddy WE, Green WR. Nutritional amblyopia. A histopathologic study with retrospective clinical correlation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1987; 225(5):321-4.

Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2001; 158(2):257-67.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15(1):71-81.

Solberg Y, Rosner M, Belkin M. The association between cigarette smoking and ocular diseases. *Surv Ophthalmol*. 1998; 42:535-47.

Spalton DJ, Hitchings RA, Hunter PA. Atlas colorido de clínica oftalmológica. Segunda edição. São Paulo, Editora Manole; 1995. p 13.3-13.9.

Stone JL, Barlow WE, Humayun MS, de Juan E Jr, Milam AH. Morphometric analysis of macular photoreceptors and ganglion cells in retinas with retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 1992; 110(11):1634-9.

Stryker WS, Kaplan LA, Stein EA, Stampfer MJ, Sober A, Willett WC. The relation of diet, cigarette smoking, and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alpha-tocopherol levels. *Am J Epidemiol*. 1988; 127(2):283-96.

Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C. Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 1994; 55(3):410-22.

Talks SJ, Chong NH, Gibson JM, Dodson PM. Fibrinogen, cholesterol and smoking as risk factors for non-arteritic anterior ischaemic optic neuropathy. *Eye*. 1995;9:85-8.

Tallstedt L, Lundell G, Taube A. Graves' ophthalmopathy and tobacco smoking. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1993; 129(2):147-50.

Tamakoshi A, Yuzawa M, Matsui M, Uyama M, Fujiwara NK, Ohno Y. Smoking and neovascular form of age related macular degeneration in late middle aged males: findings from a case-control study in Japan. Research Committee on Chorioretinal Degenerations. Br J Ophthalmol. 1997; 81(10):901-4.

Tanaka M, Machida S, Ohtaka K, Tazawa Y, Nitta J. Third-order neuronal responses contribute to shaping the negative electroretinogram in sodium iodate-treated rats. Curr Eye Res. 2005; 30(6):443-53.

Taomoto M, Nambu H, Senzaki H, Shikata N, Oishi Y, Fujii T, Miki H, Uyama M, Tsubura A. Retinal degeneration induced by N-methyl-N-nitrosourea in Syrian golden hamsters. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 1998; 236(9):688-95.

Tate DJ Jr, Miceli MV, Newsome DA. Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1995 ; 36(7):1271-9.

Taylor A, Jacques PF, Epstein EM. Relations among aging, antioxidant status, and cataract. Am J Clin Nutr. 1995; 62(6 Suppl):1439S-1447S.

Taylor R. Risks of premature death from smoking in 15-year-old Australians. Aust J Public Health. 1993; 17(4):358-64.

Tellez M, Cooper J, Edmonds C. Graves' ophthalmopathy in relation to cigarette smoking and ethnic origin. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1992; 36(3):291-4

Teuscher AU, Meienberg O. Ischaemic oculomotor nerve palsy. Clinical features and vascular risk factors in 23 patients. *J Neurol*. 1985; 232(3):144-9.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-62.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*. 1995; 267(5203):1456-62.

Thornton J, Edwards R, Mitchell P, Harrison RA, Buchan I, Kelly SP. Smoking and age-related macular degeneration: a review of association. *Eye*. 2005; 19(9):935-44.

Tippin J, Corbett JJ, Kerber RE, Schroeder E, Thompson HS. Amaurosis fugax and ocular infarction in adolescents and young adults. *Ann Neurol*. 1989; 26(1):69-77.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*. 2004; 44(3):248-52.

Trauth JA, Seidler FJ, Slotkin TA. An animal model of adolescent nicotine exposure: effects on gene expression and macromolecular constituents in rat brain regions. *Brain Res*. 2000; 867(1-2):29-39.

Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC., Helzlsouer K.J., Diener-West M, Comstock GW, Alberg, A.J. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet. Gynecol* 2005. 105(1), 174–81.

Tsao K, Aitken PA, Johns DR. Smoking as an aetiological factor in a pedigree with Leber's hereditary optic neuropathy. *Br J Ophthalmol*. 1999; 83(5):577-81.

Uz E, Sahin S, Hepsen IF, Var A, Sogut S, Akyol O. The relationship between serum trace element changes and visual function in heavy smokers. *Acta Ophthalmol Scand*. 2003; 81(2):161-4.

Vaughan DK, Coulibaly SF, Darrow RM, Organisciak DT. A morphometric study of light-induced damage in transgenic rat models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003; 44(2):848-55.

Volpe R. The role of immune dysregulation in the pathogenesis of autoimmune thyroid and autoimmunity. In Drexhage HA, Wiersinga WM, editores. The thyroid and autoimmunity. Princeton: Excerpta Medica; 1986. p 283-93

Weetman AP. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: a review. J R Soc Med. 1989; 82(3):153-8.

West S, Munoz B, Emmett EA, Taylor HR. Cigarette smoking and risk of nuclear cataracts. Arch Ophthalmol. 1989; 107(8):1166-9.

West S, Munoz B, Schein OD, Vitale S, Maguire M, Taylor HR, Bressler NM. Cigarette smoking and risk for progression of nuclear opacities. Arch Ophthalmol. 1995; 113(11):1377-80.

Wilson GA, Field AP, Wilson N. Smoke gets in your eyes: smoking and visual impairment in New Zealand. N Z Med J. 2001; 114(1142):471-4.

Wilson JN, Pierce JD, Clancy RL. Reactive oxygen species in acute respiratory distress syndrome. Heart Lung. 2001; 30(5):370-5.

Woodward M, Tunstall-Pedoe H, Smith WC, Tavendale R. Smoking characteristics and inhalation biochemistry in the Scottish population. J Clin Epidemiol. 1991;44(12):1405-10.

World Health Organization (WHO) 2006. "Prevention of Blindness and Visual Impairment" [on line]. Disponível em: URL: <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index8.html>

World Health Organization (WHO) 2006. "Tobacco free initiative" [on line]. Disponível em: URL: http://www.who.int/tobacco/health_priority/en/index.html

Xu GZ, Li WW, Tso MO. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 1996; 94:411–430.

Yoneda S, Tanihara H, Kido N, Honda Y, Goto W, Hara H, Miyawaki N. Interleukin-1beta mediates ischemic injury in the rat retina. *Exp Eye Res.* 2001; 73(5):661-7.

Yuge K, Nambu H, Senzaki H, Nakao I, Miki H, Uyama M, Tsubura A. N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in the mouse retina. *In Vivo.* 1996 ;10(5):483-8.

Zhang J, Liu Y, Shi J, Larson DF, Watson RR. Side-stream cigarette smoke induces dose-response in systemic inflammatory cytokine production and oxidative stress. *Exp Biol Med (Maywood).* 2002; 227(9):823-9.