



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Carlos Romualdo Rueff Barroso

**Participação do L-NAME, da L-arginina e da N-acetilcisteína no
enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em
camundongos**

Rio de Janeiro

2010

Carlos Romualdo Rueff Barroso

Participação do L-NAME, da L-arginina e da N-acetilcisteína no enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências ao programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Pôrto.

Coorientador: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença.

Rio de Janeiro

2010

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R919 Rueff-Barroso, Carlos Romualdo.
Participação do L-NAME, da L-arginina e da N-acetilcisteína no enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos / Carlos Romualdo Rueff Barroso.- 2010.
95f.:38 il.

Orientador: Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto.

Coorientador: Samuel dos Santos Valença.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental

1. Óxido nítrico - Teses. 2. Fumaça - Teses. 3. Cigarros - Teses. 4. Inflamação - Teses. 5. Estresse oxidativo - Teses. 6. Camundongo como animal de laboratório - Teses. 7. Enfisema pulmonar - Teses. I. Porto, Luís Cristóvão de Moraes Sobrino. II. Valença, Samuel dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.12-008.46-036

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Carlos Romualdo Rueff Barroso

Participação do L-NAME, da L-arginina e da N-acetilcisteína no enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências ao programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de abril de 2010.

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Luis Cristóvão M. S. Pôrto (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Josiane Sabbadini Neves
Instituto de Ciências Biomédicas – UFRJ

Prof.^a Dra. Raquel Moraes Soares
Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Roberto Soares de Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Rio de Janeiro
2010

DEDICATÓRIA

À minha adorável esposa Danielle.

À minha mamãe Helida, à minha vovó Wanda e ao meu vovô Hélio (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, que me guia, me protege e me dá toda força que preciso para continuar minha caminhada em busca dos meus sonhos... e esse foi um dos maiores... obrigado Pai amado... obrigado...

À minha amada esposa Danielle, pela presença tão forte em minha vida. Agradeço seu amor, sua doçura e sua compreensão em tudo que eu faço. Passar por tudo isso junto com você tornou todas as dificuldades menores... Obrigado pelos seus olhares de carinho e seu sorriso de cada dia... essa é mais uma conquista NOSSA!

Agradeço de forma muito especial ao professor Samuel dos Santos Valença, por ter insistido tanto em mim, por toda a ajuda e compreensão com tudo que aconteceu durante o meu doutorado. Valeu “Câra”!

Ao professor Luís Cristóvão de Moraes Sobrino Porto, por mais uma vez ter me dado a oportunidade e a segurança de continuar caminhando sob sua orientação. Obrigado por toda a paciência, confiança, aconselhamentos e ensinamentos.

À professora Andréa Monte Alto Costa que desde o meu primeiro dia no laboratório esteve sempre presente e disponível para esclarecer minhas dúvidas e me ensinar com seu exemplo.

A todos os colegas do Laboratório de Reparo Tecidual (reparados e inflamados). Mas, em especial, aos colegas inflamados que foram os verdadeiros responsáveis pela realização desse trabalho e que fazem parte de cada uma das páginas dessa Tese: Adriana Corrêa Melo, Alan de Aguiar Lopes, Eduardo Lima Trajano, Frank Bezerra, Jackson Nogueira Alves, Karla Maria Pires, Manuella Lanzetti, Marco Aurélio Santos Silva, Renata Tiscoski Nesi, Rômulo Fonseca, Thiago dos Santos Ferreira e Wagner Alves Pimenta.

À querida amiga e companheira de trabalhos Débora Milagres.

Agradeço a todos os colegas do Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular que foram carinhosos comigo, em especial a Caroline Fernandes Santos, Júlio Cesar Fraulob Aquino, Geraldo Oliveira Júnior, Leonardo Mendonça, Sandra Barbosa Silva, Thiago Silva Torres e Victor Faria Motta.

Aos amigos que, mesmo estando fora do ambiente da pós-graduação sempre demonstraram verdadeiramente seu carinho e preocupação, em especial ao Rodrigo Alva, Tatiana Robaina e Vagner Bernardo.

Ao amigo Ciro Reis, por toda ajuda nos assuntos da pós-graduação, mas principalmente pelos incontáveis momentos de conversas e reflexões sobre as coisas realmente importantes dessa vida...

À minha família, especialmente à minha mamãe Helida, minha vovó Wanda e meu querido vovô Hélio (*in memoriam*), os grandes responsáveis pela minha formação pessoal e profissional. Aos tios Hélio, Denise, Helena e Helaine, por todo amor que sempre recebi de vocês. Aos meus queridos primos Bernardo, Bruno, Andressa, Bárbara, Iago e Christian.

Aos meus queridos sogros Sr. Ítalo e D. Rose, por todo apoio, incentivo, carinho e confiança. Ao núcleo “familiar” do Rio, Lis, Ney, Sofia, Roger e Léié, pelas agradáveis conversas e o apoio de sempre! Aos adoráveis cunhados Fafá, Fabinho e Luís, e ao meu concunhado Roberto, pelo apoio e carinho.

Para conhecermos os amigos é necessário passar pelo sucesso e pela desgraça. No sucesso, verificamos a quantidade e, na desgraça, a qualidade.

Confúcio (551 a.C. – 479 a.C.)

RESUMO

RUEFF-BARROSO, Carlos Romualdo. *Participação do L-NAME, da L-arginina e da N-acetilcisteína no enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos*. 2010. 95f. Tese de Doutorado em Biologia Humana e Experimental Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2010.

O óxido nítrico (NO^{*}) constitui um dos mais importantes mediadores intra e extracelulares e tem sido descrita sua participação tanto em processos biológicos como patológicos. Nosso objetivo foi verificar se o aumento ou a diminuição do óxido nítrico apresenta um efeito benéfico na proteção do tecido pulmonar no enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos. Para tanto, utilizamos o L-NAME (inibidor do NO^{*}), a L-arginina (substrato para a formação do NO^{*}) e os comparamos com a N-acetilcisteína (utilizada no tratamento da DPOC). Foram utilizados 65 camundongos C57BL/6 machos. Cinquenta animais foram divididos em grupos controle, fumaça de cigarro (FC), fumaça de cigarro + L-NAME (FC+LN), fumaça de cigarro + L-arginina (FC+LA), fumaça de cigarro + N-acetilcisteína (FC+NAC) (n=10, por grupo). Durante sessenta dias 40 animais foram expostos a 12 cigarros comerciais por dia, 3 vezes ao dia. Os grupos controle e FC foram submetidos à gavagens orogástricas com o veículo. Os grupos FC+LN, FC+LA, FC+NAC receberam gavagens diárias de L-NAME (60 mg/kg), L-arginina (120 mg/kg) ou NAC (200 mg/kg) respectivamente. Quinze animais (n = 5, por grupo) foram expostos ao ar ambiente e tratados apenas com L-NAME, L-arginina e NAC. Realizamos a análise do perfil das células do lavado broncoalveolar após o sacrifício. O pulmão direito foi removido para as análises histológicas do alargamento dos espaços aéreos determinado pela medida do diâmetro alveolar médio (Lm) e da densidade de superfície (Sv) dos septos alveolares. Os pulmões esquerdos foram removidos e homogeneizados para as análises da atividade enzimática (SOD, CAT e MPO) e do sistema glutationa (GSH/GSSG), para a análise dos valores de nitrito e da expressão de 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1, TIMP-2. Nossos resultados apontam que o L-NAME tem uma ação voltada para a matriz extracelular (via protease-antiprotease), enquanto que a L-arginina possui uma ação voltada para os oxidantes, assim como a NAC. Porém a NAC atua aumentando os níveis de glutationa, o que interfere diretamente nos oxidantes (via oxidante-antioxidante), enquanto a L-arginina interfere aumentando o burden oxidativo concomitante a um aumento da velocidade de ação dos oxidantes o que aumenta as células inflamatórias, mas diminui seu tempo de ação permitindo uma maior proteção. Concluímos que tanto o favorecimento para a produção e liberação do NO^{*} através da administração da L-arginina quanto a inibição do NO^{*} pela utilização do L-NAME foi eficiente na proteção do pulmão, apesar de não terem alcançado um resultado tão bom quanto a NAC.

Palavras-chave: Óxido Nítrico. Fumaça de cigarro. Inflamação. Estresse oxidativo. Camundongos.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO^{*}) represents one of the most important intra and extracellular mediators/messengers. It takes part in both biologic and pathologic processes. This study aimed to verify NO role in pulmonary emphysema induced by cigarette smoke (CS) in mice. So L-NAME (LN) (a NO^{*} inhibitor) and L-arginine (LA) (a substrate for NO formation) were analyzed and compared to N-acetylcysteine (NAC) (which is used in COPD treatment). A total of 65 C57BL/6 male mice were used. Fifty of them were divided in control, cigarette smoke (CS), cigarette smoke + L-NAME (CS+LN), cigarette smoke + L-arginin (CS+LA) and cigarette smoke + N-acetylcysteine (CS+NAC) groups (n = 10, each group). Forty animals were exposed to 12 commercial cigarettes 3 times a day for sixty days. Control and CS groups were submitted to orogastric gavages with saline. FC+LN, FC+LA, FC+NAC groups received daily gavages with L-NAME (60 mg/kg), L-arginine (120 mg/kg) and NAC (200 mg/kg) respectively. Fifteen animals (n=5, each group) were exposed to ambient air and treated with L-NAME, L-arginine and NAC alone. Cell profile of bronchoalveolar lavage was analyzed and the right lung was removed in order to perform histological analysis of air space enlargement. This was done measuring median alveolar diameter (Lm) and total alveolar septal volume (Sv) of alveolar septa. Left lungs were removed and homogenized to perform enzymatic activity (SOD, CAT and MPO) and glutathione ratio analysis (GSH/GSSG). Besides it, nitrite values and the expression of 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1 and TIMP2 were also performed. L-arginine administration favored NO^{*} production and release, while L-NAME use inhibited. Briefly, we suggest L-NAME action to be directed to extracellular matrix (via proteinase-antiproteinase), while L-arginine action is directed to oxidants, similar to NAC. Our results showed that NAC acts raising glutathione levels which interfere directly with oxidants (via oxidant-antioxidant) while L-arginine acts raising oxidative burden at the same time it raises oxidants time of action. This also increases inflammatory cell numbers, but decreases their time of action, allowing a longer remodeling period. In conclusion, NO^{*} and both effects were efficient in lung protection/remodeling, although this remodeling was not as effective as when NAC was administrated.

Keywords: Nitric oxide. Cigarette smoke. Inflammation. Oxidative stress. Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Nicotiana tabacum</i>	19
Figura 2 –	O tabaco e a civilização Asteca	20
Figura 3 –	Desembarque de Cristóvão Colombo e os primeiros europeus em São Salvador	21
Figura 4 –	Exploradores espanhóis e portugueses e a descoberta dos povos do novo mundo e do tabaco	22
Figura 5 –	Vias aéreas intrapulmonares	27
Figura 6 –	Células do alvéolo pulmonar	28
Figura 7 –	Patogenia do enfisema	30
Figura 8 –	Geração de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de defesa contra os danos devido ao oxigênio reativo	35
Figura 9 –	Estresse oxidativo e suas consequências na DPOC	37
Figura 10 –	Molécula do óxido nítrico	39
Figura 11 –	Etapas da síntese do NO	40
Figura 12 –	Produção de óxido nítrico e sinalização	44
Figura 13 –	Protocolo experimental de exposição à fumaça de cigarro – Parte 1	50
Figura 14 –	Protocolo experimental de exposição à fumaça de cigarro – Parte 2	51
Figura 15 –	Gavagem orogástrica	52
Figura 16 –	Análises do pulmão direito	54
Figura 17 –	Lavado broncoalveolar	55

Figura 18 – Análises do pulmão esquerdo	56
Figura 19 – Histologia do pulmão	62
Figura 20 – Medida densidade de superfície dos septos alveolares (Sv)	63
Figura 21 – Medida do diâmetro alveolar médio (Lm)	64
Figura 22 – Número de leucócitos totais do lavado broncoalveolar (BAL)	65
Figura 23 – Número de macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar (BAL)	66
Figura 24 – Número de neutrófilos do lavado broncoalveolar (BAL)	67
Figura 25 – Atividade da superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado do pulmão	68
Figura 26 – Atividade da catalase (CAT) no homogeneizado do pulmão	69
Figura 27 – Atividade da mieloperoxidase (MPO) no homogeneizado do pulmão	70
Figura 28 – Razão da glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) no homogeneizado do pulmão	71
Figura 29 – Conteúdo do nitrito no homogeneizado do pulmão	72
Figura 30 – Razão da glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) no homogeneizado do pulmão (veículo)	73
Figura 31 – Conteúdo do nitrito no homogeneizado do pulmão (veículo)	74
Figura 32 – Expressão da 4-hidroxinonenal (4-HNE) no homogeneizado do pulmão	75
Figura 33 – Expressão da metaloprotease 12 (MMP-12) no homogeneizado do pulmão	76
Figura 34 – Expressão da elastase de neutrófilo (NE) no homogeneizado do pulmão	76

Figura 35 –	Expressão do inibidor tecidual de metaloprotease-1 (TIMP-1) no homogeneizado do pulmão	77
Figura 36 –	Expressão do inibidor tecidual de metaloprotease-2 (TIMP-2) no homogeneizado do pulmão	77
Figura 37 –	Relação da intensidade vs tempo entre os processos de estresse oxidativo e proteção tecidual 1	83
Figura 38 –	Relação da intensidade vs tempo entre os processos de estresse oxidativo e proteção tecidual 2	83

LISTA DE ABREVIATURAS

α 1-AT	Alfa-1-antitripsina
4-HNE	4-hidroxinonenal
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica
BH ₄	Tetraidrobiopterina
Ca ⁺⁺	Íon cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
CAT	Catalase
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
e-NOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
ERN	Espécie(s) reativa(s) de nitrogênio
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FC	Fumaça de cigarro
FMN	Flavina mononucleotídeo
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona reduzida
GSSG	Glutaciona oxidada
H ⁺	Íon hidrogênio

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDAC2	Histona desacetilase 2
HO [•]	Radical hidroxila
HO ⁻	Radical hidroperoxila
i-NOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IL-1	Interleucina 1
IL-8	Interleucina 8
INF- γ	Interferon gama
L-NA	N ^G -nitro-L-arginina
L-NAA	N ^G -amino-L-arginina
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
L-NIO	N-imino-etil-Lornitina
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
LBA	Lavado broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
MDA	Malondialdeído
MMP-12	Metaloprotease tipo 12 ou metaloprotease de macrófago
n-NOS	Enzima óxido nítrico sintase neuronal
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Fosfato dinucleótido adenina nicotinamida
NF κ B	Fator nuclear kappa B
NHA	N ^G -hidroxi-L-arginina

NO^\bullet	Óxido nítrico
NO_2^-	Nitrito
NOS	Enzima óxido nítrico sintase
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Radical ânion superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO^-	Radical peroxinitrito
PDE4	Fosfodiesterase-4
SOD	Superóxido dismutase
$\text{TNF-}\alpha$	Fator alfa de necrose tumoral
TIMP-1	Inibidor tecidual de metaloprotease-1
TIMP-2	Inibidor tecidual de metaloprotease-2

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1	História do tabaco	19
1.2	O cigarro	24
1.3	Histofisiologia do pulmão	26
1.4	Patogênese do enfisema – hipóteses	29
1.5	Radicais livres e espécies reativas	32
1.6	Antioxidantes	33
1.7	Estresse oxidativo	35
1.8	Óxido nítrico	38
1.9	Terapêutica da DPOC	43
2	OBJETIVOS	46
3	METODOLOGIA	47
4	RESULTADOS	59
5	DISCUSSÃO	76
6	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXOS	96
	Produção científica durante o período do doutorado	96

INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo tem sido sugerido como forte contribuinte na patogênese e progressão da doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (1). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio da fumaça de cigarro e das células inflamatórias reagem com a matriz extracelular induzindo dano tecidual (2). Alterações estruturais aos componentes do pulmão são causadas por estresse oxidativo contribuindo para um dano irreversível do parênquima e das vias aéreas (3). O estresse oxidativo é diretamente associado à inflamação pulmonar por ativação de fatores específicos como o fator nuclear kappa B ($\text{NF}\kappa\text{B}$) e fator de transcrição AP-1 (AP-1) nas células inflamatórias (4). Macrófagos, neutrófilos, linfócitos e mastócitos desempenham funções críticas na liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que por sua vez, exarcebam e aceleram o quadro inflamatório resultando em dano tecidual (5). Os mediadores inflamatórios, também aumentam a produção de oxidantes nas células inflamatórias (6).

Até o presente momento não há uma droga para curar a DPOC, apesar de inúmeras tentativas. Entretanto, tem sido consenso administrar aos pacientes com DPOC a N-acetilcisteína (NAC) (7). A NAC é um composto tiólico que reduz eficientemente as espécies reativas de oxigênio. Além de sua capacidade de interagir diretamente com agentes oxidantes, exerce seu efeito antioxidante indiretamente, servindo como precursor para a síntese de glutatona e inibindo o $\text{NF}\kappa\text{B}$ (8).

O óxido nítrico (NO^\bullet) é um gás livremente difusível, formado a partir do aminoácido semiessencial L-arginina que é transformado em L-citrulina, reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (9). A NOS catalisa uma oxidação de cinco elétrons de um nitrogênio amidina da L-arginina. A N-hidroxi-L-arginina é um intermediário que permanece firmemente ligado à enzima. Os produtos finais desta reação enzimática são, em quantidades equimolares, o NO^\bullet e a L-citrulina, formados através de monoxidação com N $^\omega$ -hidroxiarginina que é um intermediário que permanece ligado firmemente à enzima. Este processo requer oxigênio como um co-substrato e NADPH como fonte de elétrons (10).

O NO[•] medeia vários fenômenos, como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibe a ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal, depressão sináptica em longo prazo, potencialização da transmissão sináptica em longo prazo, microcirculação medular e glomerular e prevenção de piloroespasmo em estenose pilórica hipertrófica infantil (11). A atividade do NO[•] foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC), macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrointestinal e miocárdio (12-16). O NO[•] também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica, como no caso de tumores (11).

Não está claro na literatura se o aumento da produção de NO[•] na inflamação pulmonar é primariamente benéfico (agente protetor) por sua ação broncodilatadora ou se ele perpetua e amplifica a inflamação. Em um estudo prévio (17), nosso grupo obteve resultados que apontam os doadores diretos e indiretos de NO[•] como benéficos na inflamação pulmonar aguda gerada pela fumaça de cigarro. A partir de um modelo de inflamação pulmonar crônica induzida por fumaça de cigarro, será possível a confirmação dos potenciais efeitos benéficos do óxido nítrico e a comparação com a NAC, uma droga já estabelecida como protetora do pulmão.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A História do Tabaco

O tabaco é oriundo das plantas do gênero *Nicotiana*, em particular da *Nicotiana tabacum* (Figura 1), que são plantas nativas das Américas (principalmente da América do Sul) tendo se desenvolvido nos Andes, ao redor do Peru e do Equador. Os homens do Velho Mundo tiveram conhecimento destas plantas juntamente com plantas de onde se extraíam produtos mais úteis como tomates, batatas, milho, cacau e borracha. Acredita-se que o tabaco tenha sido cultivado desde 5.000-3.000 a.C. (18).



Figura 1. *Nicotiana tabacum*.
Adaptado de http://en.wikipedia.org/wiki/Nicotiana_tabacum

Os Maias são conhecidos por terem cultivado tabaco, como retratado em uma escultura de um homem fumando um longo cachimbo (400 a.C). Populações nativas utilizavam o tabaco para outros fins além de fumar. Alguns também acreditavam na origem divina do tabaco. Entre os deuses astecas, existiam a Cihuacoatl, a Deusa da Terra, que possuía o corpo preenchido por tabaco, e o Mixcoatl, o Deus da Caça, que foi retratado com uma cabaça cheia de tabaco como uma parte integral de seu traje de costume (Figura 2a,b). Os sacerdotes astecas, quando realizavam sacrifícios humanos para o Deus Sol, utilizavam a queima do tabaco (Figura 2c). O uso do tabaco na civilização Asteca também se propagou aos índios do Caribe, que habitavam muitas ilhas caribenhas (19).

A prática de fumar parece ter surgido a partir da inalação, já que os instrumentos de inalação estão entre os mais antigos artefatos encontrados relacionados ao tabaco. Contudo, o tabaco não era somente inalado e fumado, mas mascado, comido, bebido (como chá), passado sobre os corpos (para matar piolhos e outros parasitas) e usado como colírio para os olhos e em enemas. Era soprado

nas faces dos guerreiros antes das batalhas, sobre os campos antes das plantações e sobre o corpo das mulheres antes do sexo. Era usado medicinalmente por suas propriedades analgésicas e antissépticas e como cura para uma variedade de doenças. Era oferecido aos deuses e utilizado em cerimônias religiosas. Apresentava qualidades tanto reais quanto místicas. Muitos instrumentos foram inventados e empregados para a utilização do tabaco, mas o método mais duradouro sempre foi, desde os tempos antigos, através do fumo. O tabaco era fumado enrolado como, uma espécie de cigarro, mas o método mais popular nos tempos antigos era o cachimbo, que apresentava vários tipos e servia tanto para rituais como para fins sociais (20).

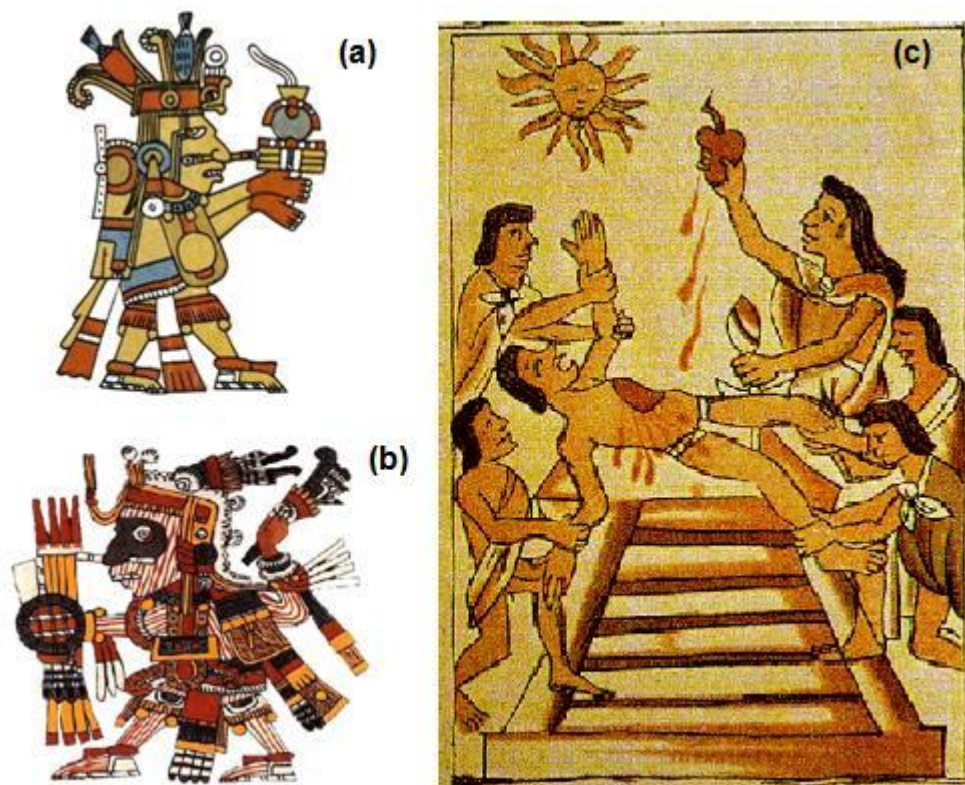


Figura 2. O tabaco e a civilização Asteca. Cihuacoatl, a Deusa da Terra (a) e Mixcoatl, o Deus da Caça (b). Sacrifício humano para o Deus Sol (c). Adaptado de http://www.espiritualismo.hostmach.com.br/imagens/misterios/astecas_sacrificio.gif, <http://lgpolar.com/image/fname/373/8-mixcoatl.gif> e <http://sharazad.iespana.es/centeotl.jpg>.

No início, o fumo se limitava aos feiticeiros, sacerdotes e curandeiros entre as tribos da América do Norte. Eles acreditavam que o tabaco podia combater o mal com o poder do incenso. Além disso, atribuindo poderes divinos ao tabaco, muitas tribos acreditavam que o tabaco possuía poderes medicinais. Interessantemente, foi admitido que o tabaco ajudava a melhorar a asma e outras doenças respiratórias. Os índios *Cherokee*, usavam a fumaça do tabaco para aliviar a dor de dente. Até mesmo mordidas de cobras foram tratadas esfregando o suco do tabaco sobre as feridas. Foi a crença nas propriedades medicinais do tabaco a principal responsável por sua disseminação na sociedade europeia (19).

Os primeiros europeus que fumaram foram os membros da tripulação de Cristóvão Colombo em 1492, quando eles chegaram a Cuba (Figuras 3,4). Os europeus ganharam mais experiência com o tabaco em 1500, quando Pedro Alvarez Cabral, um explorador Português, desembarcou no que hoje é o Brasil (Figura 4). A população nativa deste país considerava o tabaco uma erva sagrada. Eles recomendavam o seu uso para úlceras, abscessos, feridas inespecíficas e até pólipos crônicos (21). Marinheiros portugueses começaram a trazer a planta sagrada ou “erva santa” para a Europa. Contudo, já no século XVI pode se encontrar a descrição do vício ligado ao uso do tabaco. Bartolomeu Las Casas, um explorador do início dos anos 1500 escreveu: “Eu conheço espanhóis na Ilha *Hispaniola* (Santo Domingo) que estão acostumados a usar o tabaco e ao adverti-los de que isso era um vício e eles replicaram dizendo que eram incapazes de parar de usar”(19).



Figura 3. Desembarque de Cristóvão Colombo e os primeiros europeus em São Salvador. Adaptado de [http:// upload.wikimedia.org/wikipedia/ commons/6/6e/ Christopher_Columbus4.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6e/Christopher_Columbus4.jpg).



Figura 4. Exploradores espanhóis e portugueses e a descoberta dos povos do novo mundo e do tabaco. Trajeto das embarcações de Cristóvão Colombo (linha vermelha) e de Pedro Álvares Cabral (linha preta).

Em meados do século XVI, Demaio de Goes, arquivista do rei de Portugal, estava cultivando plantas nos jardins reais de Lisboa. Isso também aconteceu nos jardins reais da Espanha. O tabaco passou a ser conhecido na como “a erva sagrada” com poderes miraculosos (20, 22). Em 1561 de Goes presenteou Jean Nicot (de onde deriva o nome da nicotina), o embaixador da França em Portugal, com a planta do tabaco. Nicot percebeu que o tabaco aliviava suas enxaquecas e, rapidamente, mandou o tabaco para a sua rainha Catherine de Medici, mencionando suas propriedades medicinais. Por volta da mesma época em 1561, na península Italiana, o Cardeal Prospero introduziu o tabaco como a “erva panacéia”. O tabaco chegou à Inglaterra em 1564 através de *Sir. John Dawkins*, capitão da Frota Real. Em 1579, *Sir. Francis Drake*, um protegido da rainha Elizabeth I, popularizou o uso do tabaco entre a pequena nobreza de Londres. Por volta do final do século XVI, o tabaco já havia sido introduzido na sociedade europeia (19). Como o tabaco era muito caro, os ingleses começaram a plantar o seu próprio tabaco.

O cultivo comercial do tabaco teve início em Jamestown, na Virginia, em 1612 por John Rolfe para suprir tanto a alta demanda tabaco quanto a competição contra a Espanha para fornecer tabaco à Inglaterra (22). Em poucos anos, a produção de

tabaco da Virginia se igualou ao suprimento de tabaco espanhol. Como consequência, o rei James I conseguiu impor um imposto para o tabaco que, em 1624, chegou a 4000%.

O tabaco foi utilizado como a penicilina do século XVII. Era recomendado para o tratamento de queimaduras, feridas, verrugas, calos, câncer, vermes, cólica e doenças do fígado, baço e útero. Johann Neander, em seu livro *Tabacologia*, descreveu extensivamente preparações e várias aplicações terapêuticas do tabaco (23, 24). No final do século XVII, a maioria das propriedades medicinais atribuídas ao tabaco não puderam ser comprovadas, no entanto, o tabaco ainda apresentava seu valor para recreação, prazer e relaxamento. Ele havia se tornado um símbolo *fashion* do estilo de vida da aristocracia.

O rei James I, da Inglaterra, ficou famoso por ter sido o primeiro grande opositor ao uso do tabaco. Em 1604, ele fez um pronunciamento com uma descrição acurada e profética, sobre o fumo do tabaco como “um hábito repugnante aos olhos, odioso ao nariz, nocivo ao cérebro, perigoso aos pulmões e cuja fumaça negra e fedida assemelha-se à escuridão sombria das covas sem fundo”. Em resumo, ele declarou que o tabaco era imoral e insalubre (18, 24).

No ano seguinte, um debate público sobre o uso do tabaco foi realizado em Oxford. Os participantes aprenderam que o prazer de fumar poderia resultar em cegueira, surdez, fraqueza do corpo e até uma redução no tempo de vida. O medo de que sua fama e lucro fossem prejudicados, levou alguns defensores do tabaco a se oporem a tais declarações (19).

Penas de morte foram impostas aos fumantes na Rússia, Turquia, Pérsia e até em algumas partes da Índia, onde em 1617 o imperador Mogul Jahangir ordenou que os fumantes fossem punidos tendo seus lábios cortados (23). Outros, incluindo líderes religiosos, se voltaram contra o fumo. O clero católico de Roma qualificou o ato de fumar como um ato maligno. No início dos anos de 1800, o fumo era considerado um risco à saúde e proibido em muitos países. Os fumantes poderiam ser presos e punidos por multas ou até mesmo por abusos físicos. A suspensão dessa proibição ocorreu durante a epidemia global de cólera que eclodiu em 1830 (25).

1.2 O Cigarro

O surgimento dos cigarros foi em 1840 e os cigarros enrolados à mão foram vendidos nas maiores cidades inglesas até 1850. Quando John A. Bonsack inventou a primeira máquina para enrolar cigarros com sucesso em 1881, a produção em massa se iniciou de forma rápida e a taxa de consumo do tabaco aumentou exponencialmente, pelo menos nos Estados Unidos (19).

A facilidade e o conforto na sua utilização, especialmente nas trincheiras durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918), tornou essa forma de consumo da nicotina a mais popular desde então, especialmente a partir da elaboração de pontas de cortiça, seguido pelo desenvolvimento de filtros e pela velocidade com que o fabricante podia manipular seus conteúdos (26). Infelizmente a fumaça do cigarro é mais ácida do que a de cachimbos e charutos e requer uma inalação para dentro dos pulmões para que haja uma efetiva absorção da nicotina, enquanto a nicotina dos cachimbos e charutos pode ser absorvida mais eficientemente pela mucosa oral. A absorção pelos pulmões provê não somente uma sensação mais imediata de satisfação aos fumantes já que a nicotina chega ao cérebro em um curto espaço de tempo, mas também expõe uma área de superfície muito maior do epitélio respiratório à fumaça, que aumenta sua absorção e potencializa a natureza viciante do produto. O fumo do cigarro tem se disseminado pelo mundo inteiro desde então e tem sido descrito como “um trágico acidente da história” (27).

Uma crescente incidência de câncer de pulmão foi observada pela primeira vez nos anos 1920 e 1930, por patologistas e outros profissionais clínicos (27, 28). A primeira e principal evidência, quase conclusiva na história moderna dos efeitos da fumaça sobre a saúde, ocorreu em 1950 com a publicação de quatro estudos retrospectivos sobre os hábitos de fumar de pacientes com câncer de pulmão (29, 30).

A partir de 1950, o cigarro foi considerado um problema de saúde pública (31). A grande quantidade de fumantes e os inúmeros problemas de saúde causados pelo seu consumo levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a considerar o tabagismo como uma epidemia. Levantamentos estatísticos da OMS

em 1999 revelaram que já havia cerca de 1,1 bilhão de pessoas fumantes em todo o mundo (32). As estimativas das fatalidades associadas ao consumo do cigarro mostram que em 2000 houve cerca de 4,83 milhões de mortes prematuras em escala mundial, associadas a distúrbios cardiovasculares, ao câncer de pulmão e à doença pulmonar obstrutiva crônica. Desse total, 2,41 milhões ocorreram nos países em desenvolvimento e 2,43 milhões nos países industrializados (33).

Um em cada dez adultos no mundo inteiro morre devido ao tabagismo, o que representa quase cinco milhões de óbitos por ano. Se o atual padrão de consumo continuar, a proporção será de um a cada seis óbitos até 2020-2030, cerca de 10 milhões de óbitos por ano (34, 35).

Dados do Ministério da Saúde do Brasil mostraram que o consumo de tabaco responde pela morte anual de 200 mil brasileiros, dado que excede o montante de mortes resultantes do alcoolismo, AIDS, acidentes de trânsito, homicídios e suicídios, juntos (36).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2008), 80 milhões de pessoas sofrem de DPOC moderada ou grave (37). No Brasil (2005), a prevalência em grandes centros urbanos, como a cidade de São Paulo, varia de 6% a mais de 15%, dependendo do critério diagnóstico adotado (38). A DPOC representa a quinta principal causa de morte no mundo e, de acordo com estimativas recentes, alcançará a terceira posição até o ano de 2030 (37).

1.3 Histofisiologia do Pulmão

Os mamíferos possuem pulmões que se apresentam como órgãos altamente especializados cuja função primordial é a de permitir as trocas gasosas entre o ar ambiente e a circulação pulmonar. Essa troca acontece no nível alveolar num processo chamado de hematose, e consiste na captação do oxigênio (O_2), que é levado ao sangue venoso dos capilares pulmonares, e na eliminação do dióxido de carbono (CO_2) resultante dos processos do metabolismo celular.

O sistema respiratório pode ser dividido, em termos funcionais, em uma porção de condução e uma porção de respiração. A porção de condução é a responsável por conduzir o ar inspirado até os alvéolos pulmonares e, a partir destes, conduzir o ar expirado eliminando o CO_2 . A porção de condução é formada pelo nariz (cavidade nasal), faringe (parte nasal e parte oral), laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos (até os bronquíolos terminais). A porção respiratória é constituída pelos pulmões, mais especificamente no nível dos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e alvéolos pulmonares (39, 40).

A traqueia bifurca-se, no plano transversal do tórax (ângulo do esterno), em brônquios principais direito e esquerdo que entram em cada pulmão através do hilo do pulmão. Nos pulmões, cada brônquio principal se divide em brônquios lobares, dois no pulmão esquerdo (superior e inferior) e três no pulmão direito (superior, médio e inferior), cada um suprimindo um lobo do pulmão. Cada brônquio lobar se divide em brônquios segmentares que suprem os segmentos broncopulmonares. Os 19 brônquios segmentares ainda se dividem em cerca de 20 a 25 gerações de bronquíolos terminais. Nos bronquíolos terminais encontramos um epitélio pseudo-estratificado ciliado com células muco-secretoras e células de Clara, que secretam proteínas que protegem o revestimento bronquiolar contra certos poluentes do ar inspirado e contra inflamações. Cada brônquio terminal dá origem a diversas gerações de bronquíolos respiratórios (41) (Figura 5).

A estrutura dos bronquíolos respiratórios é semelhante à dos bronquíolos terminais, mas suas paredes já apresentam alvéolos, onde já pode haver troca gasosa (42). Os bronquíolos respiratórios constituem a transição entre a porção de

condução e a porção de respiração. Ao longo da parede deste bronquíolo, o número de alvéolos aumenta até que a parede passa a ser constituída apenas por alvéolos pulmonares e o tubo passa a ser chamado de ducto alveolar (40). Cada bronquíolo respiratório dá origem a 2-11 ductos alveolares cada um dos quais dá origem a 5-6 sacos alveolares revestidos por alvéolos (41) (Figura 5).

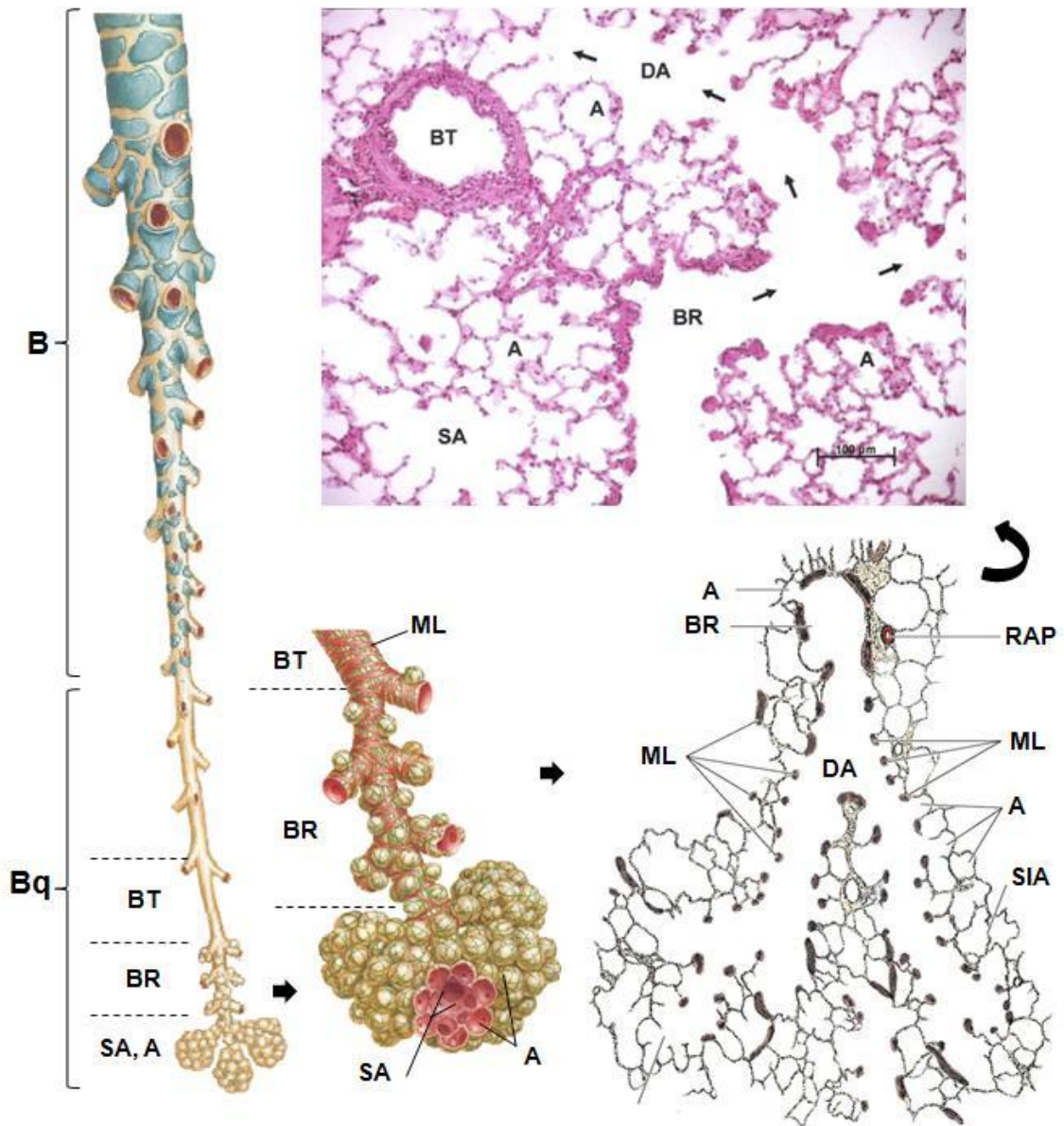


Figura 5. Vias aéreas intrapulmonares. Brônquio (B), bronquíolo (Bq), bronquíolo terminal (BT), bronquíolo respiratório, sacos alveolares (SA), alvéolo (A), músculo liso (ML), ducto alveolar (DA), ramo da artéria pulmonar (RAP) e septo intralveolar (SIA). As setas indicam a passagem do ar (→). (Adaptado de Netter, 2008; Junqueira, 2008; Machado-Santelli, 2003).

Os alvéolos pulmonares constituem pequenas evaginações em forma de saco, com aproximadamente 200 μm de diâmetro, localizados nos bronquíolos respiratórios, ductos alveolares e sacos alveolares. Cada um deles representa a unidade funcional e estrutural primária do sistema respiratório, porque suas delgadas paredes permitem a troca de O_2 por CO_2 entre o ar contido em seus espaços e o sangue nos capilares adjacentes. Embora cada alvéolo seja uma estrutura pequena com aproximadamente 0,002 mm^3 , seu número total se aproxima de 300 milhões, conferindo ao pulmão seu aspecto esponjoso. Estima-se que a área de superfície total de todos os alvéolos disponíveis para as trocas gasosas exceda 140 m^2 . Os espaços aéreos de dois alvéolos podem se comunicar entre si através dos poros alveolares (de Kohn), que executam a função de equilibrar a pressão do ar dentro dos segmentos pulmonares. A região entre os alvéolos adjacentes é conhecida como septo alveolar (ou interalveolar), que é composto por capilares contínuos, supridos pela artéria pulmonar e drenados pelas veias pulmonares. O tecido conjuntivo do septo alveolar é rico em fibras do sistema elástico e fibras de colágeno tipo III (fibras reticulares). Os alvéolos repousam sobre uma proeminente lâmina basal e suas aberturas, associadas a sacos alveolares, são desprovidas de células musculares lisas. Ao invés disso, seus orifícios são circundados por fibras elásticas e reticulares (principalmente). Suas paredes são compostas por dois tipos de células: os pneumócitos tipo I e pneumócitos tipo II (42) (Figura 6).

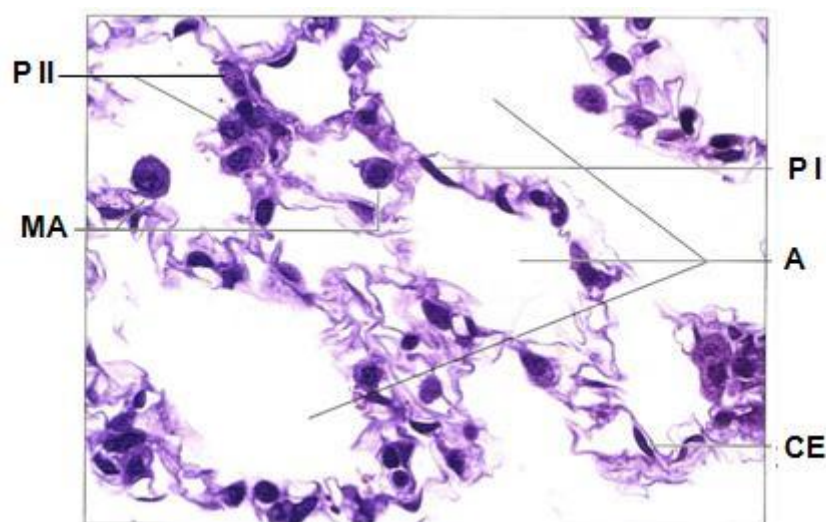


Figura 6. Células do alvéolo pulmonar. Pneumócitos tipo I (PI), pneumócitos tipo II (P II), macrófagos alveolares (MA), alvéolo (A) e célula endotelial (CE). (Adaptado de Telser, 2007).

Aproximadamente 95% da superfície alveolar é revestida por epitélio pavimentoso simples, cujas células são conhecidas como pneumócitos do tipo I. Eles formam junções oclusivas prevenindo o escape do líquido extracelular (líquido tecidual) para dentro do lúmen do alvéolo. Os pneumócitos do tipo II ocupam somente 5% da superfície alveolar, são responsáveis pela produção do surfactante, que reduz a tensão superficial dos alvéolos e, conseqüentemente, reduz a força necessária para a inspiração, facilitando a respiração. Além disso, impedem o colapso dos alvéolos durante a expiração (40, 42).

Nos espaços livres da superfície interna dos alvéolos (lúmen) encontram-se células chamadas de macrófagos alveolares. Eles se movem lentamente por toda parte dentro da camada de surfactante, mantendo-a limpa e estéril. As partículas de poeira que alcançam os alvéolos pulmonares são fagocitadas pelos macrófagos alveolares. Quando estimulados por agentes infecciosos, os macrófagos alveolares iniciam uma resposta imunológica secretando fatores quimiotáticos para leucócitos, particularmente neutrófilos. Estes invadem o alvéolo e se unem ao ataque contra os organismos estranhos. Os macrófagos alveolares também fagocitam o surfactante e, deste modo, são importantes na sua renovação. Os macrófagos alveolares contendo fragmentos migram para os brônquios e são levados para fora dos pulmões pela ação ciliar (43) (Figura 6).

1.4 Patogênese do Enfisema - Hipóteses

O enfisema, um importante tipo de DPOC, é uma condição do pulmão caracterizada por uma dilatação anormal e permanente dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, acompanhada pela destruição de suas paredes (septos alveolares) e áreas com depósitos excessivos de fibras colágenas, sem fibrose aparente (44, 45).

A DPOC se caracteriza por uma leve inflamação crônica por todas as vias aéreas, parênquima e vasculatura pulmonar. Macrófagos, linfócitos T CD8+ e neutrófilos estão aumentados em várias partes do pulmão. As células inflamatórias ativadas liberam uma variedade de mediadores incluindo o leucotrieno B₄, IL-8, TNF-

α e outros, que são capazes de danificar as estruturas pulmonares ou induzir uma inflamação neutrofílica (46).

Atualmente, sugere-se que o enfisema é uma consequência de dois desequilíbrios críticos: o desequilíbrio protease-antiprotease e oxidante-antioxidante (Figura 7).

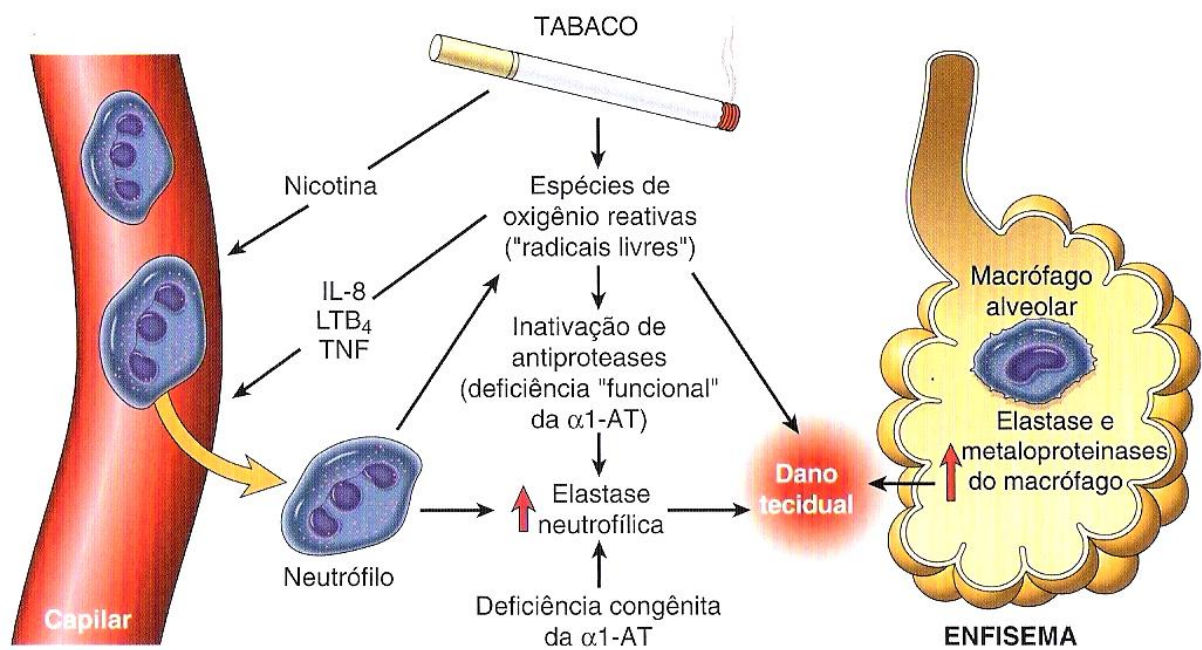


Figura 7. Patogenia do enfisema. Os desequilíbrios protease-antiprotease e oxidante-antioxidante apresentam efeitos aditivos e contribuem para a lesão tecidual. A deficiência de α 1-antitripsina (α 1-AT) pode ser tanto congênita quanto “funcional”, como resultado de uma inativação oxidativa. (De Kumar et al., 2008).

De acordo com a teoria protease-antiprotease, a destruição da parede alveolar resulta de um desequilíbrio entre as proteases (principalmente a elastase) e antiproteases do pulmão. Esta hipótese se baseia na observação de que pacientes com uma deficiência genética de α 1-antitripsina apresentam uma tendência maior de desenvolver enfisema, que está combinado com o tabagismo (47). A α 1-antitripsina, normalmente presente no soro, fluidos teciduais e macrófagos, é a principal inibidora

das proteases (particularmente da elastase) secretadas pelos neutrófilos durante a inflamação. Mais de 80% dos indivíduos que apresentam a deficiência da α 1-antitripsina desenvolvem enfisema assintomático, que ocorre em indivíduos mais jovens e com maior gravidade em casos onde o indivíduo seja fumante. Desta forma, a sequência postulada é a de que 1) os neutrófilos (principal fonte de proteases) são sequestrados dos capilares periféricos; 2) qualquer estímulo capaz de aumentar tanto o número de leucócitos (neutrófilos e macrófagos) quanto a liberação de seus grânulos contendo proteases aumenta a atividade proteolítica; 3) com baixos níveis de α 1-antitripsina sérica, há destruição do tecido elástico que resulta em enfisema. Assim, o enfisema é visto como resultado de um efeito destrutivo de alta atividade de proteases em uma situação de baixa atividade de antiproteases (48).

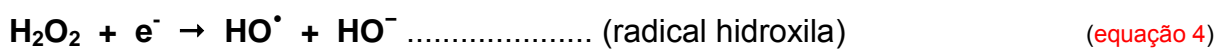
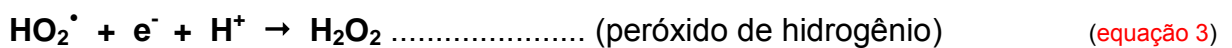
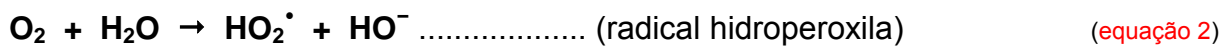
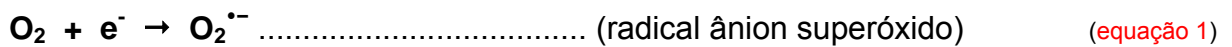
A hipótese de um desequilíbrio protease-antiprotease também ajuda a explicar o efeito do cigarro no desenvolvimento do enfisema, mesmo em presença de quantidades normais de α 1-antitripsina. O mecanismo da inflamação não está completamente elucidado, mas possivelmente é devido aos efeitos quimioatrativos da nicotina, assim como os efeitos dos radicais oxidativos presentes na fumaça do cigarro. Estas ativam o fator NF- κ B, que ativam os genes que codificam o TNF- α e quimiocinas, incluindo a IL-8, que atraem e ativam os neutrófilos. Os neutrófilos ativados liberam seus grânulos ricos em proteases (elastase de neutrófilo, protease 3 e catepsina G) causando o dano tecidual. A fumaça do cigarro também aumenta a atividade da elastase de macrófagos. A elastase de macrófago não é inibida pela α 1-antitripsina e, na verdade, ela pode digerir proteoliticamente esta antiprotease (49). Há grandes evidências que, além da elastase, as metaloproteases produzidas por macrófagos e neutrófilos também participam no dano tecidual (49).

1.5 Radicais Livres e Espécies Reativas

Radicalis livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não-pareados em sua camada orbital externa, o que explica sua instabilidade e elevada reatividade (50). Entretanto, radical livre não é a designação

ideal para o conjunto dos agentes reativos patogênicos, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, embora participem das reações de oxirredução. Assim, os termos espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são considerados mais apropriados por descreverem melhor esses agentes químicos.

As ERO são encontradas em todos os sistemas biológicos e têm origem no metabolismo do oxigênio molecular (O_2). Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (51). Durante esse processo, são formados intermediários reativos, tais como os radicais ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (HO^{\bullet}) (equações 1, 3 e 4). As ERN, em sua maioria, são formadas a partir da produção do óxido nítrico (NO^{\bullet}) através da conversão da L-arginina a L-citrulina pelas óxido nítrico sintases (52).



A produção de espécies reativas é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, notadamente nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas (53). Para contrabalançar essa produção e seus potenciais efeitos negativos (danos à estrutura dos lipídeos, carboidratos, proteínas e DNA), o organismo dispõe de um sistema antioxidante. Nas situações em que surge um desequilíbrio entre os sistemas oxidante e antioxidante, com predomínio dos oxidantes, ocorre o estresse oxidativo (53)

O trato respiratório é um alvo importante de danos causados por oxidantes, tanto de origem endógena quanto exógena, pelo fato de estar em contato direto com o meio externo e exposto a elevadas concentrações de oxigênio (53, 54). As espécies reativas de origem endógena são, geralmente, produzidas através de reações enzimáticas e não-enzimáticas de transferência de elétrons. Os principais locais e processos celulares geradores de oxidantes são a mitocôndria, os microsossomos e os sistemas enzimáticos xantina/xantina oxidase e, em maior escala, NADPH oxidase (54, 55). No trato respiratório, as principais fontes endógenas de oxidantes são os macrófagos alveolares, as células epiteliais, as células endoteliais e os neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos recrutados durante a inflamação (53). A ativação dessas células resulta na formação de $O_2^{\bullet-}$, que é rapidamente convertido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD). Através de uma reação secundária não-enzimática, o H_2O_2 , na presença de ferro, forma HO^{\bullet} (reação de Fenton) (54) (equação 5). As espécies reativas produzidas pelos fagócitos são a principal causa de dano tissular associado a doenças pulmonares inflamatórias crônicas (53). Já os oxidantes exógenos são originários de poluentes atmosféricos, tais como ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e, em especial, a fumaça do cigarro.

A fumaça do cigarro apresenta uma fase gasosa e uma fase particulada, e contém cerca de cinco mil compostos tóxicos, incluindo oxidantes potentes (aproximadamente 10^{14} radicais livres por cada inalação), tais como, acroleína, H_2O_2 , HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , NO_2^{\bullet} , R^{\bullet} , ROO^{\bullet} , $ROONO$, $ROONO_2$ e radicais orgânicos (56). A fase gasosa é composta, entre outras substâncias, por monóxido de carbono, amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada contém nicotina e alcatrão, além de outras 43 substâncias cancerígenas como o arsênio, o níquel, o benzopireno, o cádmio e o chumbo, além dos resíduos de agrotóxicos dos produtos agrícolas como, por exemplo, o DDT, e substâncias radioativas como o Polônio 210, o Carbono 14, o Rádio e o Tório (57).



1.6 Antioxidantes

Conforme sua estrutura, os antioxidantes podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Os principais componentes do sistema antioxidante enzimático são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), que agem no início da cadeia de formação das espécies reativas, evitando o acúmulo dos radicais $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 . (Figura 8). Em eucariontes a SOD se apresenta sobre a forma Cu,Zn-SOD (citosol) e Mn-SOD (mitocôndria). A SOD extracelular é abundante no tecido pulmonar e protege o pulmão contra o estresse oxidativo (58). Os antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos produzidos *in vivo*, tais como a glutathione reduzida (GSH), a ubiquinona, o ácido úrico e as proteínas de transporte de metais de transição (transferrina e ceruloplasmina), e compostos obtidos diretamente da dieta, tais como o betacaroteno e as vitaminas C e E (59, 60).

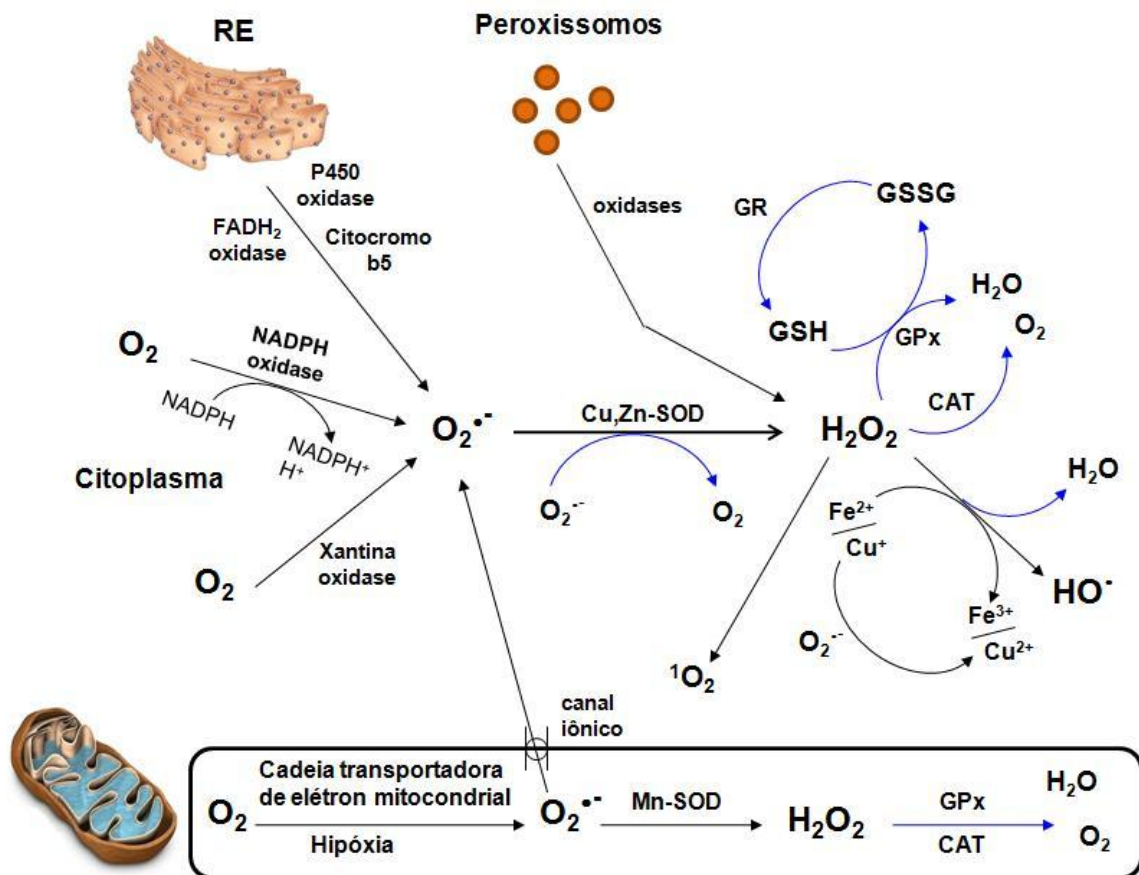


Figura 8. Geração de espécies reativas de oxigênio e mecanismos de defesa contra os danos devido ao oxigênio reativo. Durante a hipóxia, o ânion superóxido gerado pode ser degradado na mitocôndria pela Mn-SOD ou, se atingir o citoplasma, pela Cu,Zn-SOD. No retículo endoplasmático, a NADPH-citocromo P450 redutase pode perder elétrons para o O₂ gerando O₂^{•-}. A FADH₂ e o citocromo b5 também podem contribuir para esse sistema. Dentro dos peroxissomos há enzimas localizadas que produzem H₂O₂ sem intermediação do O₂^{•-}. Ao contrário do O₂^{•-}, o H₂O₂ é capaz de atravessar as membranas celulares e dentro das células pode reagir com o Fe²⁺ ou Cu⁺ para formar radicais hidroxila através da reação de Fenton. GR = glutatona redutase; MPO = mieloperoxidase; RE = retículo endoplasmático; ¹O₂ - oxigênio singlete. (Adaptado de Matés JM et al., Clin Biochem. 1999 Nov;32(8):595-603.)

Os principais antioxidantes do lavado broncoalveolar incluem a mucina, a GSH, o ácido úrico, proteínas (especialmente albumina) e o ácido ascórbico (59). Em fumantes e portadores de DPOC, ainda são escassas as informações sobre o

sistema de defesa antioxidante no epitélio respiratório. Fumantes crônicos apresentam níveis elevados de GSH no lavado broncoalveolar. Entretanto, esse aumento de GSH pode não ser suficiente para neutralizar a excessiva carga de oxidantes durante a fase aguda do tabagismo, já que uma redução dos seus níveis é observada durante a exposição à fumaça do cigarro, de uma forma tempo e dose dependente (61).

1.7 Estresse Oxidativo

De maneira geral, existem quatro mecanismos responsáveis pelas alterações observadas na DPOC: o desequilíbrio entre oxidantes-antioxidantes (estresse oxidativo), a inflamação, o desequilíbrio entre proteases-antiproteases e a apoptose (62). Cada um deles com contribuições variáveis ao processo. Atribui-se ao estresse oxidativo um papel central na gênese da DPOC, pois além da lesão direta sobre as estruturas do sistema respiratório, funciona como um desencadeador e amplificador dos outros três mecanismos citados (61, 63-65).

A fumaça do cigarro é o principal fator ambiental para o desenvolvimento da DPOC. Entretanto, a taxa de declínio da função pulmonar em fumantes é variável (66, 67) e somente cerca de 25% irão desenvolver uma expressão clínica da doença (67), sugerindo que a gênese da DPOC depende da interação entre fatores ambientais e genéticos.

O tabagismo desempenha também um papel central na perpetuação do desequilíbrio oxidante-antioxidante na patogênese do enfisema. Normalmente, o pulmão contém uma quantidade de antioxidantes que mantém o dano oxidativo em níveis baixos. A fumaça do cigarro contém muitas espécies reativas que causam a depleção dos mecanismos antioxidantes, incitando o dano tecidual. Os neutrófilos ativados contribuem aumentando o número de espécies reativas no alvéolo. Uma consequência secundária da lesão oxidativa é a inativação das antiproteases nativas, resultando em uma deficiência “funcional” de α 1-antitripsina, mesmo em indivíduos sem deficiência enzimática (68-70).

O enfisema por deficiência de α 1-antitripsina é a única forma de expressão da DPOC associada a alterações em um único gene e que não requer interação com fatores ambientais. Todos os outros casos da doença parecem resultar de alterações moleculares decorrentes de uma complexa interação de múltiplos genes e fatores ambientais. Dentre os genes associados às alterações observadas na DPOC, estão incluídos aqueles relacionados ao sistema protease-antiprotease, antioxidantes, inflamação e apoptose.

O estresse oxidativo exerce um importante papel na gênese da DPOC através de danos diretos aos componentes do trato respiratório (também a oxidação de lipídios, proteínas e DNA), bem como amplificando os outros mecanismos co-participantes (Figura 9).

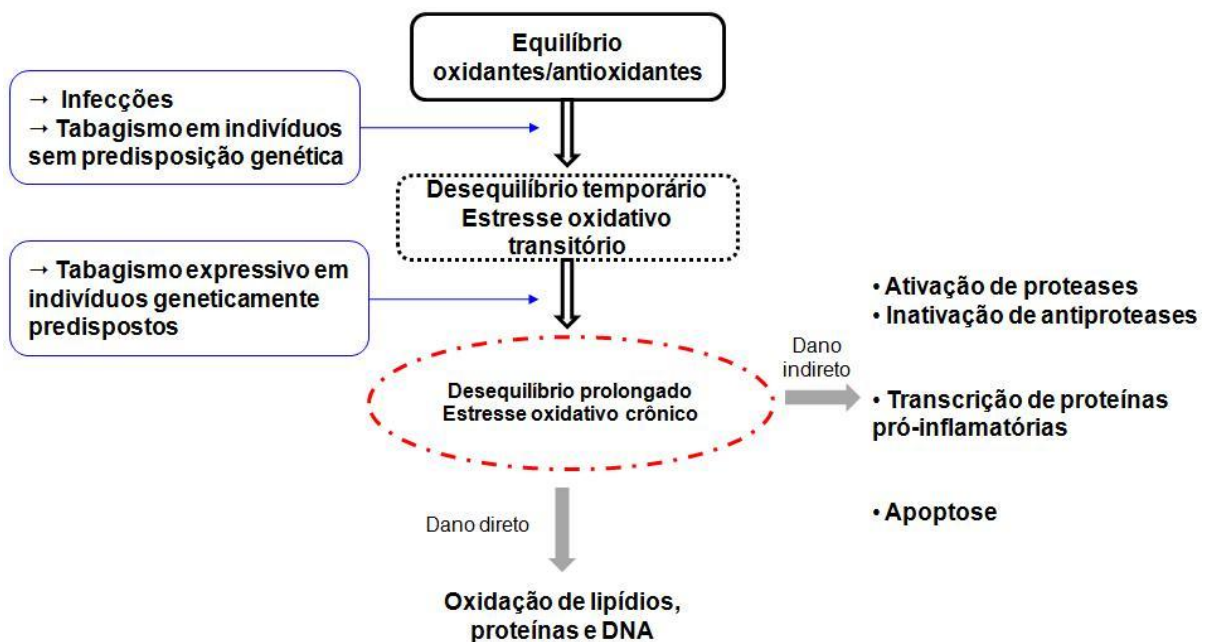


Figura 9. Estresse oxidativo e suas consequências na DPOC. O estresse oxidativo na DPOC gera danos diretos aos componentes pulmonares e participa como desencadeador e amplificador dos outros mecanismos etiopatogênicos. (Adaptado de Cavalcante AGM e Bruin, PF. J Bras Pneumol. 2009;35(12):1227-1237).

Basicamente, a peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado, resultando em sua degradação oxidativa. Os fosfolipídios da membrana celular são particularmente suscetíveis ao processo de peroxidação. Isso acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, resultando em perda da seletividade da troca iônica, liberação do conteúdo de organelas, tais como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, dentre eles, o malondialdeído (MDA) (71).

Nos sistemas biológicos, os fosfolipídios da membrana celular podem ser hidrolisados pela enzima fosfolipase, produzindo o ácido araquidônico não-esterificado, que pode sofrer peroxidação por duas vias: a enzimática, envolvendo as ciclo-oxigenases e as lipoxigenases, e a não-enzimática, através da participação de ERO, ERN, metais de transição e outros radicais livres. Os produtos finais da peroxidação lipídica mediada por espécies reativas incluem o 4-hidroxinonenal (4-HNE), o MDA e os isoprostanos (72, 73).

Fumantes sem DPOC apresentam uma resposta inflamatória discreta que representa, provavelmente, uma reação de defesa da mucosa à inalação crônica de irritantes. Nos indivíduos que desenvolvem DPOC, ocorre uma marcada amplificação da resposta inflamatória, que se acentua com a progressão da doença (74, 75). O mecanismo molecular dessa amplificação ainda é desconhecido; porém, fatores genéticos, infecções virais latentes e o estresse oxidativo prolongado têm sido apontados como potenciais responsáveis. Dentre os elementos celulares mais importantes da inflamação na DPOC, estão, as células epiteliais, os neutrófilos, os macrófagos alveolares e os linfócitos T CD8⁺, assim como, durante os períodos de exacerbação, os eosinófilos (62, 76).

Três classes de proteases são consideradas relevantes na etiopatogenia da DPOC: as proteases de serina, capazes de degradar a elastina e algumas formas de colágeno; as proteases de cisteína, que degradam componentes de matriz (77); e as metaloproteases da matriz extracelular (MMP), que têm ação sobre os colágenos, elastina, proteoglicanos e glicoproteínas pericelulares da MEC (78). Cada uma dessas classes de enzimas pode ser inibida por uma ou mais antiproteases. Os oxidantes podem potencializar os efeitos das proteases na DPOC através da

ativação dessas enzimas. Espécies reativas aumentam a atividade das MMPs por ativação das precursoras pró-metaloproteases.

1.8 Óxido Nítrico

Em 1980, Furchgott e Zawadzki descreveram um fenômeno de relaxamento vascular endotélio dependente, na aorta isolada de coelho, que era induzido pela acetilcolina (79). Estes pesquisadores propuseram que o relaxamento vascular encontrado era secundário à liberação de uma substância vasodilatadora pelo endotélio, que recebeu, inicialmente, o nome de fator relaxante derivado do endotélio (*endothelium derived relaxing factor*, EDRF) (79). Posteriormente, em 1987, foi caracterizado que o EDRF era na verdade o NO[•] (80, 81).

O NO[•] constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (82) (Figura 10). O NO[•] é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (83). O NO[•] possui uma meia-vida muito curta e vem sendo associado a funções fisiológicas e a condições patológicas (84, 85).

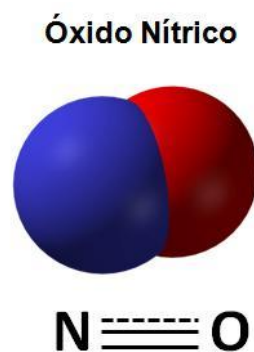


Figura 10. Molécula do óxido nítrico. Adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ficheiro:Nitric-oxide-3D-vdW.png>.

O NO[•] é formado a partir do aminoácido L-arginina, por meio de uma reação catalisada por uma família de enzimas, as óxido nítrico sintases (NOS), que

convertem a L- arginina em L-citrulina e NO^\bullet (Figura 11), necessitando da presença de dois co-substratos, o oxigênio e o fosfato de dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH) (85-87).

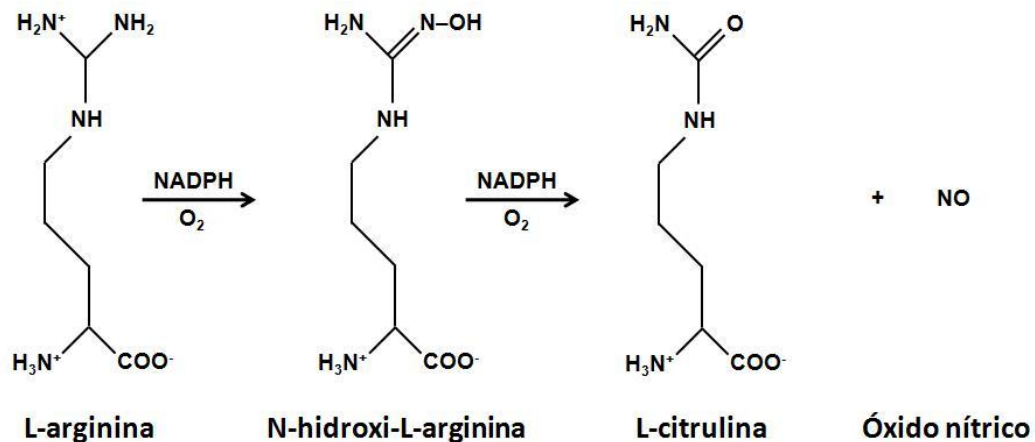


Figura 11. Etapas da síntese do NO^\bullet . A síntese de NO^\bullet , envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G -hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O_2) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO^\bullet e L-citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH_4) são utilizados como co-fatores na reação.

Existem três diferentes isoformas de NOS: tipo I ou neuronal (n-NOS), tipo II ou induzível (i-NOS) e tipo III ou endotelial (e-NOS) (85-87). As isoformas n-NOS e e-NOS são constitutivas e suas atividades reguladas pelo cálcio (Ca^{++}) intracelular e pela proteína associada ao Ca^{++} , a calmodulina (85-87). Em contraste, a i-NOS é Ca^{++} e calmodulina-independente, podendo ser induzida por diferentes citocinas e/ou endotoxinas, produzindo grande quantidade de NO^\bullet por um longo período de tempo (Tabela 1) (86, 87).

O NO^\bullet é um importante sinalizador celular envolvido em vários processos fisiológicos essenciais, incluindo neurotransmissão central e periférica, vasodilatação, broncodilatação, atividade citotóxica do sistema imune, inibição da adesão e agregação plaquetárias (85, 88, 89). Seu principal mecanismo de ação é através do aumento da produção do GMPc intracelular. O seu tempo de ação é

muito curto, pois é rapidamente degradado por enzimas chamadas fosfodiesterases (10, 90).

Tabela 1. Classificação dos Diferentes Tipos de Óxido Nítrico Sintases (NOS)

Tipos:	n-NOS ou tipo I	i-NOS ou tipo II	e-NOS ou tipo III
Expressão:	Constitutiva neuronal	Induzível (por citocinas e endotoxinas)	Constitutiva endotelial
Cálcio / calmodulina dependente:	Sim	Não	Sim
Substrato:	L-arginina	L-arginina	L-arginina
Quantidade de NO produzido:	Pequena (pmoles)	Grande (nmoles)	Pequena (pmoles)
Primeiro local identificado:	Neurônio	Macrófago	Endotélio
Localização pulmonar preferencial:	Nervos NANC (não adrenérgico e não colinérgico)	Macrófagos, eosinófilos, epitélio das vias aéreas, epitélio alveolar	Endotélio brônquico, epitélio das vias aéreas
Principais funções:	Neurotransmissão (broncodilatação)	Imunocitotoxicidade (inflamação, defesa contra infecções, secreção de muco)	Vasodilatação (relaxamento do músculo liso vascular)

(Adaptado de Gross S.S., 1997; Gonçalves, P.A., 2000)

Na inflamação, o NO^\bullet é produzido em grandes quantidades através da NOS tipo II, demonstrando sua importância como mediador inflamatório (85). Está presente em várias condições inflamatórias como, por exemplo, a asma (91).

Crescentes evidências apontam o importante papel do NO^\bullet na fisiologia pulmonar, assim como em condições patológicas (92, 93). O NO^\bullet age na regulação do tônus vascular e brônquico, na modulação de condições inflamatórias e exerce uma função protetora contra a broncoconstrição excessiva; porém, em altas concentrações, promove a inflamação, hipersecreção da mucosa e lesão epitelial, contribuindo para a hiper-reatividade das vias aéreas (93).

A NOS tipo III tem um papel importante no relaxamento da musculatura lisa brônquica e, portanto, na broncodilatação (91). Essa enzima é, constantemente, expressa no epitélio bronquial humano, nos pneumócitos tipo II e acredita-se que também esteja presente no epitélio da mucosa nasal (92). A enzima NOS tipo II é, das três, a única cálcio-independente, tendo sua produção aumentada em resposta a mediadores inflamatórios, gerando um aumento na produção de NO^\bullet (91). A NOS II é encontrada não apenas em macrófagos, mas pode ser induzida em muitas células do trato respiratório, nos pneumócitos tipo II, nos fibroblastos pulmonares, nas células do músculo liso bronquial ou vasculares, nas células epiteliais das vias aéreas, em mastócitos, nas células endoteliais e em neutrófilos (92). A NOS tipo I está presente nos nervos das vias aéreas, sendo a principal mediadora neuronal para o relaxamento do músculo liso, nas vias aéreas (94).

O NO^\bullet gerado principalmente pela i-NOS é responsável pela destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO^\bullet resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO^\bullet consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (85, 95). Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO^\bullet e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO^\bullet consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO^\bullet e do $\text{O}_2^{\bullet-}$ resulta na formação de peroxinitrito (ONOO^-), um poderoso oxidante de proteínas. O ONOO^-

pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H^+), originando HO^\bullet , um radical altamente reativo e tóxico, aumentando efetivamente a ação tóxica do NO^\bullet e do $O_2^{\bullet-}$. O resumo das etapas da produção e expressão do NO^\bullet pode ser observado na figura 12.

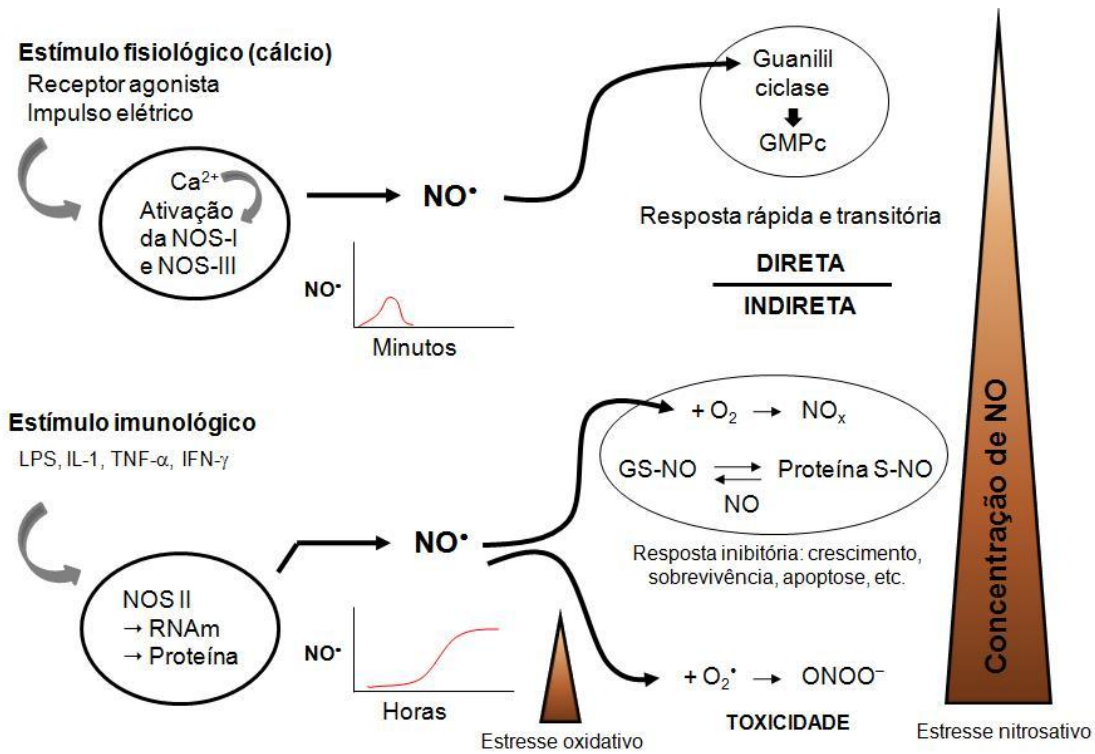


Figura 12 - Produção de óxido nítrico e sinalização. O óxido nítrico é gerado através das enzimas constitutivas NOS-I e NOS-III ou através da enzima induzível NOS-II. A NOS-I e a NOS-III são ativadas em resposta a um estímulo fisiológico que dá início a um sinal intracelular Ca²⁺; elas produzem NO• de forma rápida, transitória e em baixas quantidades. A NOS-II não é expressa em células em repouso, mas é induzida por estímulos imunológicos como o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano ou citocinas como IL-1, TNF-α ou IFN-γ. Após um intervalo, que corresponde à síntese de RNAm e proteínas, a NOS-II produz NO• em altos níveis de forma contínua. As ações do NO• são diretas em baixas concentrações, mas indiretas em altas concentrações. O NO• produzido em baixas concentrações pela NOS-I e NOS-III interage diretamente com o átomo de ferro do grupo heme da guanilil ciclase para ativar a enzima que produz GMPc, que por sua vez inicia uma resposta celular transitória rápida. As altas concentrações de NO• geradas pela NOS-II são instáveis e são rapidamente oxidadas sob condições aeróbicas transformando-se em espécies reativas de óxido de nitrogênio (RNOS) com a fórmula geral NO_x. O RNOS nitrosila o grupo tiol na glutathiona para produzir S-nitrosoglutathiona (GS-NO) ou nitrosila grupos tiol nas proteínas para gerar proteína S-NO. Essas *nitrosações* inibem a atividade de muitas proteínas, incluindo as enzimas mitocondriais e fatores de transcrição e produzem efeitos celulares de longa duração. Sob condições com altos níveis NO• combinadas com alto estresse oxidativo, o ânion superóxido (O₂^{•-}) interage com NO• para produzir o peroxinitrito (ONOO⁻), um ânion altamente tóxico. (Adaptado de Coleman JW. Int Immunopharmacol. 2001 Aug;1(8):1397-406)

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-Lornitina (L-NIO), N^G-amino-L-arginina (L-NAA), N^G-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (85, 96). Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS (97). Vários destes inibidores têm sido utilizados em estudos da função do NO^{*}, tanto em células isoladas como *in vivo*.

1.9 Terapêutica da DPOC

Os principais agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento da DPOC são os broncodilatadores de ação prolongada, incluindo os agonistas-β₂ (formoterol e salmeterol) e os anticolinérgicos (tiotrópio), que não modificam de forma expressiva a progressão e a mortalidade da doença.

As drogas com ação direta ou indireta sobre os mecanismos patogênicos da DPOC, incluindo os antagonistas de mediadores pró-inflamatórios, as drogas inibidoras das antiproteases e os agentes modificadores da resposta inflamatória, bem como as drogas capazes de alterar a resistência da inflamação da DPOC aos esteróides, são alternativas com o potencial de modificar a evolução e o prognóstico da doença (98, 99). Os agentes terapêuticos deste último grupo — modificadores da ação dos corticóides sobre a inflamação na DPOC — são considerados os mais promissores. Acredita-se que a resistência da inflamação aos corticóides na DPOC deva-se à redução da expressão e atividade da histona desacetilase 2 (HDAC2) pelo estresse oxidativo (74). Sabe-se que drogas, como as xantinas e alguns macrolídeos, podem aumentar a expressão do HDAC2 (100).

O estresse oxidativo, além de reduzir a expressão e a atividade da HDAC2, é apontado como um importante amplificador de outros mecanismos patogênicos da DPOC (63, 76). Portanto, o emprego de agentes antioxidantes pode, potencialmente, reduzir o dano direto do estresse oxidativo aos tecidos pulmonares e a sua ação amplificadora sobre os outros mecanismos envolvidos na DPOC, além

de reverter a resistência da inflamação aos esteróides. Até o presente, poucos agentes antioxidantes foram testados no tratamento de portadores de DPOC. A N-acetilcisteína, um precursor da glutathione, mostrou-se capaz de reduzir a concentração de H_2O_2 no condensado do ar exalado de pacientes com DPOC (101, 102); porém, não impediu a deterioração da função pulmonar, nem reduziu a frequência de exacerbações (103).

Substâncias com propriedades antioxidantes que podem influenciar na inflamação respiratória no nível molecular têm sido utilizadas para restabelecer o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em fumantes. Uma das estratégias é reduzir a migração dos neutrófilos dos capilares pulmonares para os espaços alveolares (104) utilizando drogas que interferem na capacidade de deformação das células, na adesão de moléculas ou que previnam a liberação de citocinas (ex., IL-8 e o leucotrieno B_4). Martorana e colaboradores (105) demonstraram, em um modelo experimental de camundongos expostos a fumaça de cigarro, uma melhora parcial da inflamação pulmonar e a total preservação da destruição do parênquima pulmonar através do uso do roflumilast, um inibidor da fosfodiesterase-4 (PDE4). Outros pesquisadores também mostraram efeitos terapêuticos em pacientes com DPOC utilizando um inibidor de fosfodiesterase-4, entretanto geralmente este inibidor apresenta poucos benefícios em pacientes com DPOC (106). Estas drogas agem aumentando o AMPc que causa uma diminuição na ativação dos neutrófilos (107). Outra droga que foi utilizada para aumentar a proteção antioxidante do pulmão foi a α -Phenil-N-tertbutylnitrone, que reage diretamente com os oxidantes no foco da inflamação (107).

As vitaminas C e E também vêm sendo utilizadas como antioxidantes em estudos com fumantes (108) e em modelos experimentais (109). Tentativas com suplementação de GSH para os pulmões, utilizando o GSH ou precursores, não foram eficazes (110). Por outro lado, a N-acetilcisteína age como um precursor celular de GSH e tem potencial de interagir diretamente com os oxidantes (8, 111). A *Nacystelyn* (NAL) é um sal de lisina derivada da NAC, e é também um mucolítico e um composto tiol oxidante. A utilização da NAL tem demonstrado um aumento na concentração de GSH nas células epiteliais dos alvéolos (112, 113), nos macrófagos

alveolares e inibição da produção de H_2O_2 e $\text{O}_2^{\bullet-}$ de neutrófilos de fumantes e de pacientes com DPOC (114).

Atualmente já existem evidências claras de que há um aumento na geração de espécies reativas na DPOC, e que isso tem importante papel na patogênese desta condição. Assim, uma vasta e efetiva terapia antioxidante que possua uma boa bioviabilidade e potência é imprescindível para controlar os processos oxidativos e inflamatórios localizados que ocorrem na patogênese da DPOC. Apesar dos tratamentos antioxidantes com tiol terem demonstrado efeitos promissores visando as espécies reativas e as alterações celulares mediadas por oxidantes, outros estudos *in vivo* com fumaça de cigarro e ensaios clínicos em pacientes com outras moléculas antioxidantes com dupla função (antioxidantes/anti-inflamatórias) são urgentemente necessários para validar estes compostos como as terapias utilizadas na clínica (115).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Verificar se o aumento ou a diminuição do óxido nítrico apresenta um efeito benéfico na proteção do parênquima pulmonar na enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro em camundongos.

Objetivos Específicos

- Analisar o padrão morfológico;
- Analisar o perfil de células do lavado broncoalveolar;
- Mensurar a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO);
- Mensurar a quantidade de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG);
- Mensurar o conteúdo de nitrito
- Observar o padrão de expressão do 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1 e TIMP-2 por western blotting;

3. METODOLOGIA

Animais

Foram utilizados 65 camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com oito semanas de idade e peso de 20-24g, obtidos do biotério central do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Fluminense (Niterói – RJ). Os animais foram acondicionados, em grupos de cinco animais por caixa, no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 horas (luzes artificiais, 19h00min-07h00min) e exaustão 15 min/h. Os animais receberam ração comercial (Nuvilab[®], Brasil) e água *ad libitum*. Foi realizada a aclimatização dos animais durante um período de duas semanas antes do início dos procedimentos experimentais. Todo o experimento foi realizado de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética para o Cuidado e uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEA) – protocolo nº CEA/258/2008.

Protocolo Experimental de Exposição à Fumaça de Cigarro

Durante um período de sessenta dias os camundongos ($n = 40$) foram expostos a doze cigarros comerciais (10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono) por dia, três vezes ao dia, utilizando uma câmara de inalação de fumaça de cigarro (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) já descrita previamente (116) (Figura 13).

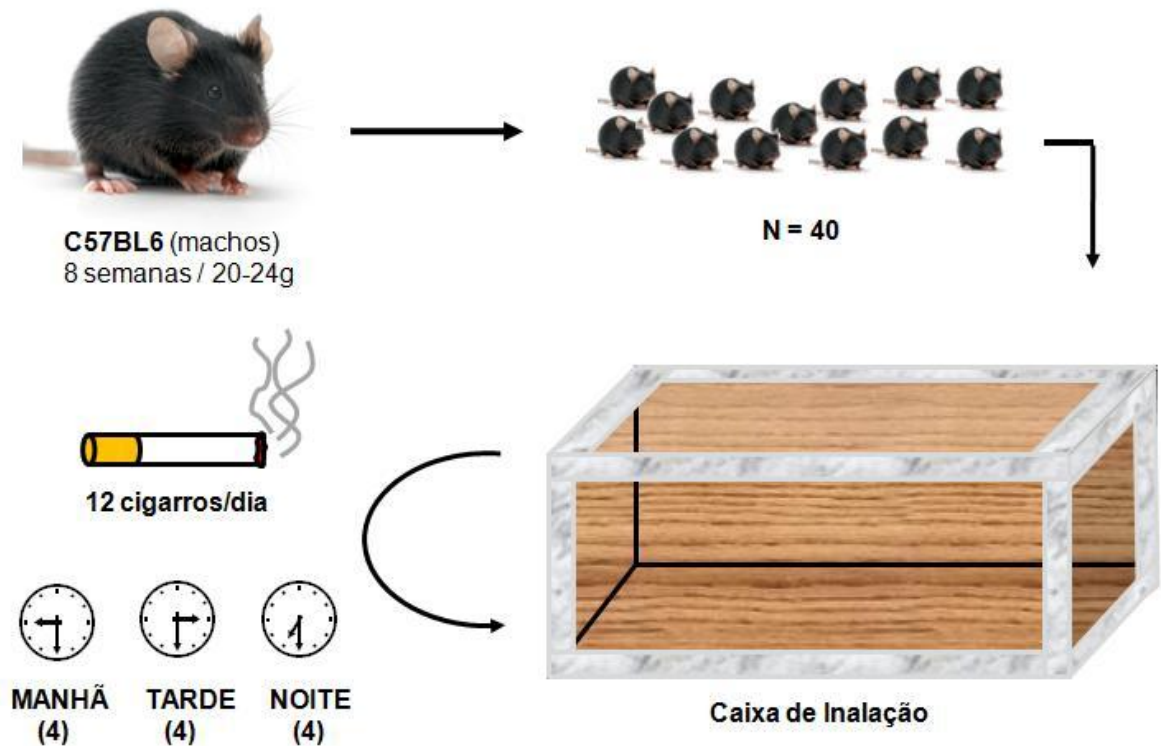


Figura 13. Protocolo experimental de exposição à fumaça de cigarro – Parte 1. Quarenta camundongos C57BL/6 foram colocados na caixa de inalação e submetidos à exposição à fumaça de 12 cigarros por dia, sendo 4 pela manhã, 4 à tarde e 4 à noite (desenho meramente esquemático).

Após os animais serem colocados na câmara de inalação, a mesma foi levada e posicionada dentro da capela de exaustão. Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de vidro de 60 mL que depois de insuflada era preenchida pela fumaça, que foi logo em seguida expelida para dentro da câmara de inalação (Figura 14). O procedimento de insuflar e desinsuflar terminou com a queima do cigarro até seu terço final, o que durou em média 3 minutos. Um cigarro gera aproximadamente 1 litro de fumaça, que é diluído em 30 litros (volume da câmara) gerando uma concentração de 3% de fumaça de cigarro para inalação durante um total de 6 minutos. Após o término desse período de exposição (ar + fumaça de cigarro), a tampa da caixa foi removida para a evacuação da fumaça do cigarro durante 1 minuto através da capela de exaustão. Em cada sessão de exposição dos

camundongos à fumaça do cigarro, foram utilizados sequencialmente 4 cigarros (4 x 6 minutos) com intervalos de 1 minuto (exaustão) entre as exposições. Este procedimento foi realizado três vezes por dia (uma sessão pela manhã, uma à tarde e uma à noite) resultando em 72 minutos de exposição à fumaça em decorrência da queima de 12 cigarros (3 períodos x 4 cigarros x 6 minutos). Os animais do grupo controle também foram submetidos à mesma manipulação dos grupos expostos à fumaça de cigarro, sem a presença da fumaça.

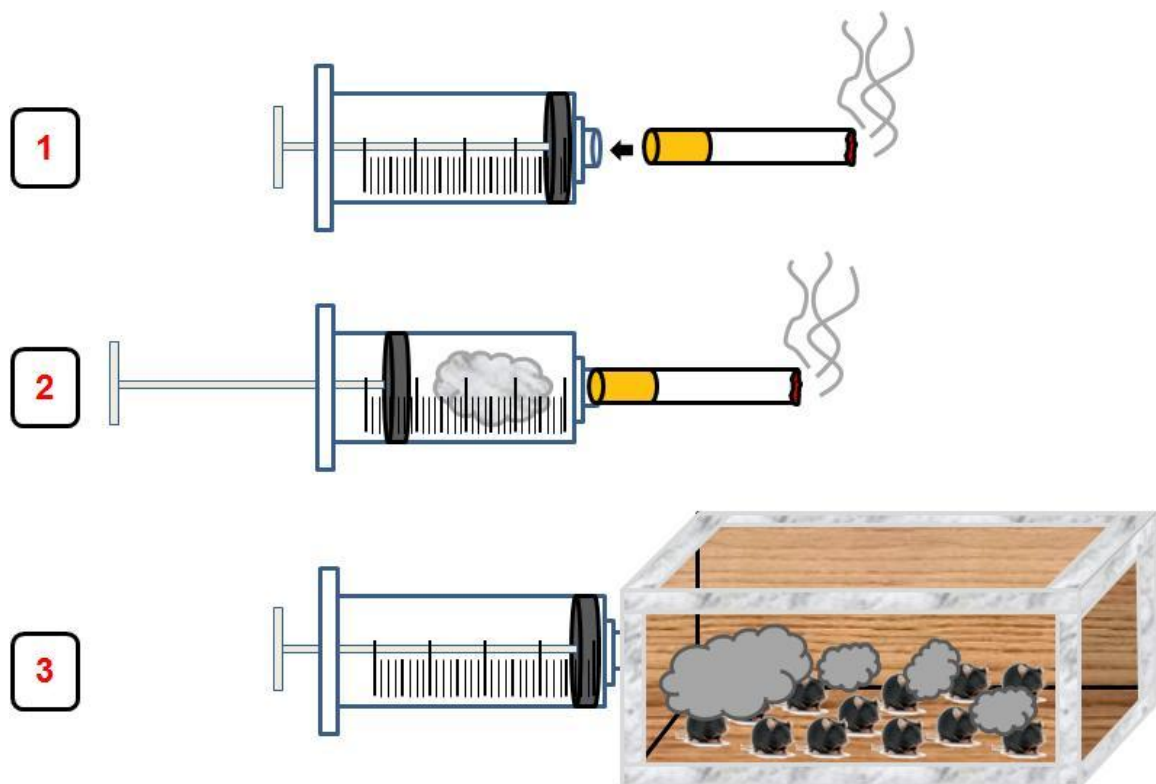


Figura 14. Protocolo experimental de exposição à fumaça de cigarro – Parte 2. Uma seringa foi acoplada ao cigarro (1) e, após ser insuflada (2), a fumaça foi ejetada dentro da caixa de inalação (3) sob uma câmara de exaustão (desenho meramente esquemático).

Cada cigarro inalado produz aproximadamente 300 mg/m^3 de partículas suspensas na câmara (analisado pela pesagem dos filtros Pallfex) (17). A concentração de carboxi-hemoglobina (COHb) foi previamente monitorada em

camundongos utilizando o mesmo protocolo experimental e considerada não-tóxica (117).

Os animais foram divididos em cinco grupos (cada um com um $n = 10$) definidos como:

Grupo CTR	Camundongos expostos ao ar ambiente (controle) + veículo
Grupo FC	Camundongos expostos à fumaça de cigarro + veículo
Grupo FC+LN	Camundongos expostos à FC + L-NAME
Grupo FC+LA	Camundongos expostos à FC + L-arginina
Grupo FC+NAC	Camundongos expostos à FC + N-acetilcisteína

Todas as drogas foram diluídas em água filtrada e administradas diariamente por gavagem orogástrica no período da manhã (Figura 15). Os camundongos do grupo controle ($n = 10$) expostos ao ar ambiente e os camundongos do grupo fumaça de cigarro ($n = 10$) foram submetidos à gavagens orogástricas com o veículo (100 μ L de salina). O L-NAME (Sigma, Saint Louis, EUA) foi administrado na dose de 60 mg/kg, a L-arginina (Sigma, Saint Louis, EUA) foi administrada na concentração de 120 mg/kg e a NAC (Sigma, Saint Louis, EUA) foi administrada na concentração de 200 mg/kg. As doses de L-NAME e L-arginina foram utilizadas tendo como base um estudo anterior do nosso grupo (17). A dose de NAC foi baseada no estudo de Rubio e colaboradores (118).

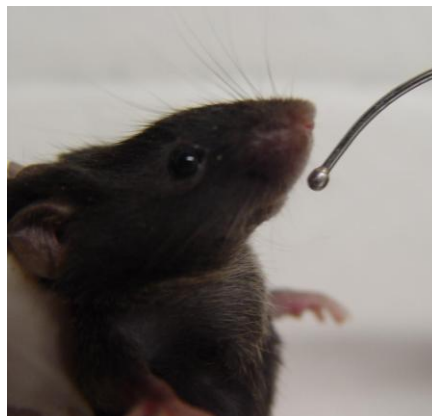


Figura 15. Gavagem orogástrica. Os camundongos foram gavados diariamente com o veículo e com as drogas (L-NAME, L-arginina e NAC). A figura mostra o preparo do animal antes do procedimento e a agulha de gavagem.

Grupos separados de camundongos C57BL/6 machos ($n = 5$, por grupo) foram expostos ao ar ambiente e tratados com L-NAME (60mg/kg), L-arginina (120mg/kg) e NAC (200mg/kg).

Grupo CTR	Camundongos expostos ao ar ambiente + veículo
Grupo LN	Camundongos expostos ao ar ambiente + L-NAME
Grupo LA	Camundongos expostos ao ar ambiente + L-arginina
Grupo NAC	Camundongos expostos ao ar ambiente + NAC

Morfologia

Vinte e quatro horas após a última exposição ao ar ambiente ou à fumaça do cigarro, os animais foram sacrificados através do deslocamento cervical. Os pulmões direitos foram fixados em formalina tamponada (4%) numa pressão constante de 25 cm H₂O e armazenados em temperatura ambiente por 48 horas. Após a fixação, as amostras foram processadas segundo a rotina do laboratório e incluídas em parafina de modo a se obter fragmentos do ápice, terço médio e base. Foram realizados cortes de 5 µm de espessura e as lâminas foram coradas com hematoxilina & eosina (HE) para análise histopatológica (Figura 16, a-c).

O enfisema pulmonar foi quantificado histologicamente com base no grau de alargamento dos espaços aéreos determinado pela medida do diâmetro alveolar médio (Lm) em micrômetros, como descrito previamente (119). Resumidamente, essa técnica consiste na determinação do número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa interceptam um conjunto de retas coerentes. Dessa forma, no caso de presença de enfisema, o número de interceptos das estruturas alveolares com o sistema de retas será menor, indicando destruição das paredes alveolares. O Lm é obtido pela equação $Lm = Ltot/Li$, em que Ltot é o comprimento total das retas do campo microscópico e Li é o número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo. Para tanto, 16 campos de cada lâmina (3

lâminas por animal) foram contados e observados a uma magnificação total de 200x através de um retículo acoplado ao monitor. Alternativamente, o enfisema pulmonar foi quantificado por estereologia através da densidade de superfície (Sv) dos septos alveolares (116). Foi utilizado um sistema-teste composto por 21 interseções e uma área-teste conhecida onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema-teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. O número de interseções que interceptaram os septos alveolares foram contados e multiplicados por 2. O resultado foi dividido por Lt, que significa o número total de interseções multiplicado pelo comprimento (em micrômetros) da interseção (d). Temos que $Sv = 2 \times I / Lt$. Onde $Lt = 21 \times d$ (figura 16, d-e).

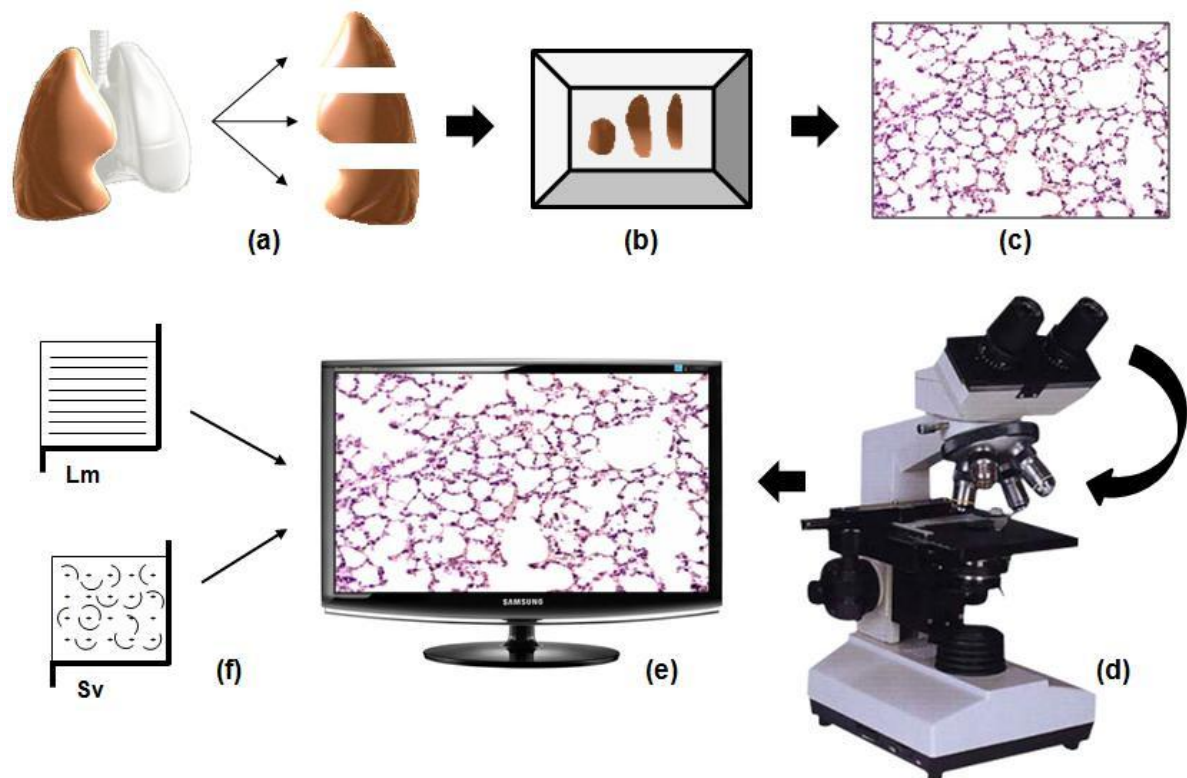


Figura 16. Análises do pulmão direito. O pulmão direito foi retirado (a) processado e incluído em parafina (b). As lâminas foram coradas com HE (c), levadas ao microscópio (d) e analisadas em uma tela acoplada do sistema de captura acoplado ao computador (e) onde utilizamos as grades (sistema-teste) para a estereologia (f) (desenho meramente esquemático).

Lavado Broncoalveolar (BAL)

A traqueia dos animais foi canulada e os espaços aéreos pulmonares foram lavados com solução salina (500 μ L) três vezes (volume final de 1,2-1,5 mL). O líquido coletado do BAL foi estocado imediatamente em gelo picado a fim de evitar a lise celular (Figura 17). Os números totais de células mononucleares e polimorfonucleares foram determinados através da câmara de Neubauer (New Optik). O preparo das lâminas para contagem diferencial de células foi feita após citocentrifugação por 1000 RPM/10 minutos, 122,9 G (FANEM[®], SP, Brasil) e corados com panótico (Laborclin, PR, Brasil). Pelo menos 200 células por amostra de BAL foram contadas utilizando critérios morfológicos de metacromasia e granulação (120).

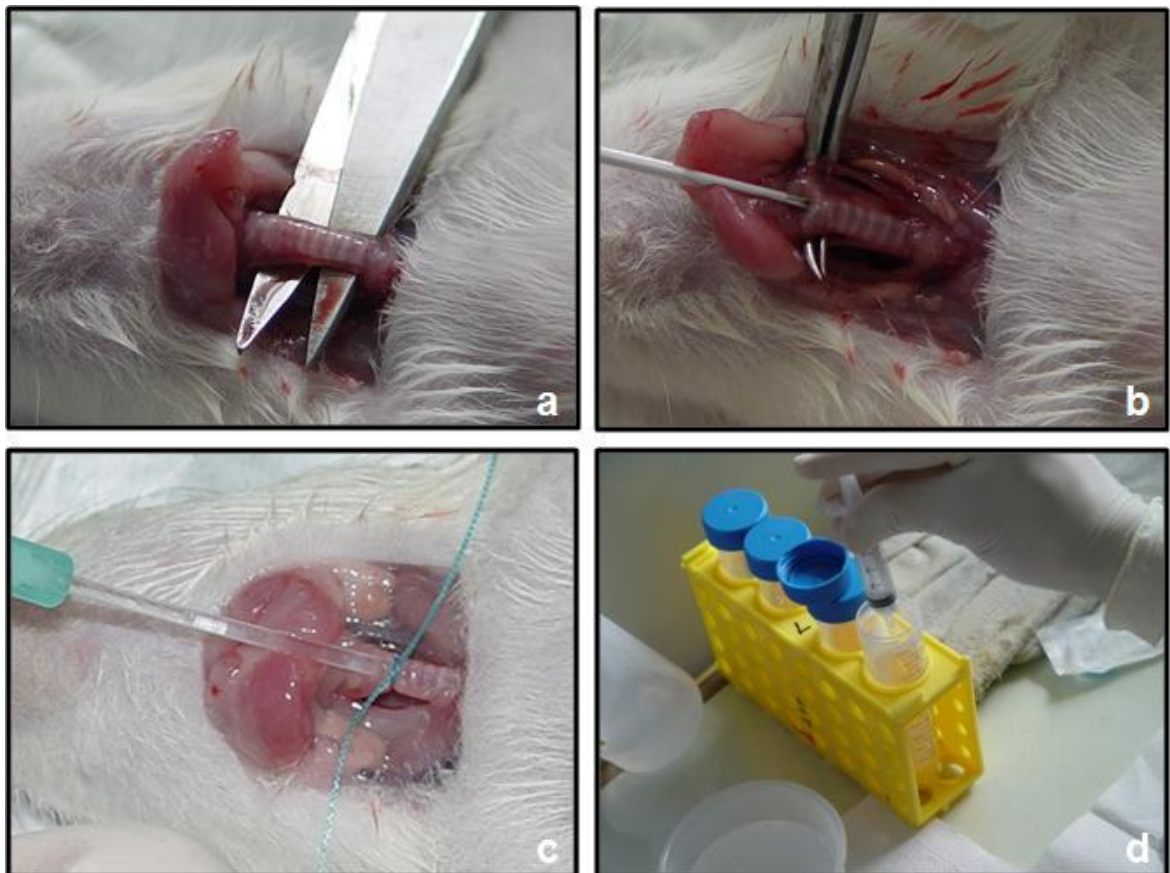


Figura 17. Lavado broncoalveolar. A traqueia foi exposta (a), canulada (b) e, em seguida instilada com salina para lavar os espaços aéreos pulmonares (c). O líquido coletado foi armazenado e estocado em gelo para as análises celulares (d). Nestas imagens foram utilizados ratos Wistar, apenas para ilustração da técnica.

Homogeneizado Tecidual

Os pulmões esquerdos foram removidos, homogeneizados em gelo com 10% (w/v) PBS (pH 7,3) usando um homogeneizador (NOVA TÉCNICA, SP, Brasil) e em seguida, centrifugados a 3000G por 5 minutos (FANEM®, SP, Brasil). O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras foi ajustado para 1,5 mL com tampão fosfato de potássio. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C para as análises da atividade enzimática (SOD, CAT e MPO) e do sistema glutationa (GSH/GSSG), para a análise dos valores de nitrito e da expressão de 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1 e TIMP-2 (Figura 18).

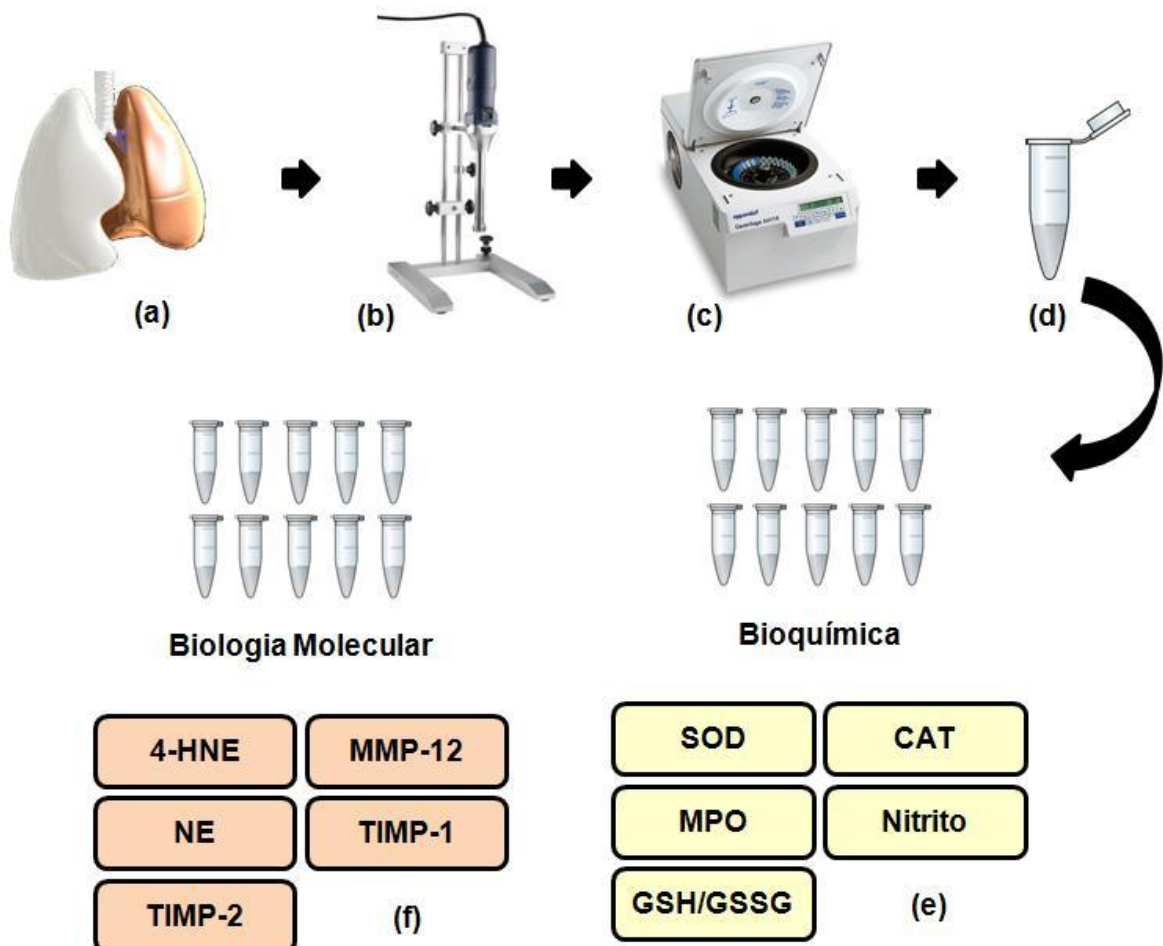


Figura 18. Análises do pulmão esquerdo. O pulmão esquerdo (a) foi coletado, homogeneizado (b), centrifugado (c) e alíquotado (d). As amostras foram divididas para as análises bioquímicas (e) e de biologia molecular (f).

Superóxido Dismutase (SOD)

Alíquotas de homogeneizado foram utilizadas no ensaio cinético de mensuração da atividade enzimática da superóxido dismutase de acordo com o modelo proposto por Bannister e Calabrese (121). A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular do radical livre ânion superóxido, transformando-o em peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática é estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480 nm). A adrenalina quando oxidada pelo ânion superóxido forma um produto róseo, o adrenocromo. A leitura foi feita adicionando-se 1.920 µL de tampão glicina (50 mM, pH 10,2), 20, 40 e 60 µL de amostra (separadamente), 40 µL de epinefrina 2 µM e 20 µL de catalase (2,4 mg/mL). A mistura foi homogeneizada na cubeta e a absorbância mensurada a 480 nm (Amersham - Biosciences mod Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Inglaterra) em um tempo de 180 segundos, com intervalos de 10 segundos. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína.

Catalase (CAT)

Alíquotas de homogeneizado foram utilizadas para dosar a atividade da catalase produzida pelas células (122). Essa enzima catalisa a degradação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O ensaio foi realizado a partir da mistura de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3) + peróxido de hidrogênio 30% (1940 µL) com adição de 60 µL de amostra. O consumo de H₂O₂ gera diferença de cor mensurada em espectrofotômetro. A mistura foi homogeneizada na cubeta e a absorbância mensurada a 240 nm em um tempo total de 60 segundos, com intervalos de 10 segundos. A atividade enzimática foi expressa em U/mg proteína.

Razão Glutationa Reduzida e Oxidada (GSH/GSSG)

A razão GSH/GSSG é considerada um marcador de estresse oxidativo (123). Esse ensaio é baseado na reação da GSH ou GSSG com 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzóico) que produz o 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) (124). Para determinar GSSG, as amostras foram tratadas previamente com 2-vinilpiridina, que reage covalentemente com GSH (mas não com GSSG). O excesso de 2-vinilpiridina é neutralizado com trietanolamina. A taxa de formação de TNB, mensurada espectrofotometricamente, é proporcional à concentração de GSH ou GSSG na amostra. A concentração de uma amostra conhecida é determinada pelo cálculo de uma regressão linear gerada a partir de uma curva padrão de GSH ou GSSG. Alíquotas de homogeneizados foram tratadas com ácido sulfossalicílico 20% na proporção de 1:1 e centrifugadas a $500 \times g$ (FANEM[®], SP, Brasil) por 10 minutos a fim de retirar os debris celulares. Duzentos microlitros do sobrenadante para leitura da GSH foram adicionados a 1400 μL de tampão de fosfato de potássio (KPE 0,1 M, pH 7,3), 200 μL de amostra, 120 μL de DTNB 3 μM , 120 μL de glutatona redutase (GR 13,3 U/mL) e 120 μL de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH 1,5 mM). Em seguida 200 μL do sobrenadante para a leitura da GSSG foi incubada por 60 min com 4 μL de 2-vinilpiridina e em seguida tratadas com 65 μL de trietanolamina, a fim de ajustar o pH entre 6,0-7,0. Após o preparo das amostras, as leituras foram realizadas da mesma forma que a GSH. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 412 nm, em um tempo total de 120 segundos, com intervalos de 30 segundos.

Mieloperoxidase (MPO)

Alíquotas de homogeneizado foram utilizadas para dosar os níveis de mieloperoxidase (125), enzima liberada por neutrófilos, que participa da via oxidativa na injúria pulmonar. A atividade de MPO foi mensurada através da incubação sequencial com 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e tampão acetato de sódio (NaOAc) sob aquecimento (37°C) em amostras

centrifugadas com hexadeciltrimetilamonio bromídrico (HTAB). Inicialmente 100 μL da amostra foram centrifugados com 900 μL de HTAB 0,5% a $11.000 \times g$ por 15 minutos. Posteriormente 75 μL do sobrenadante foi incubado com 5 μL de TMB 20 mM por 5 minutos a 37°C . A solução foi então incubada com 50 μL de H_2O_2 30% por 10 minutos a 37°C . A seguir foram adicionado 125 μL de tampão NaOAc 0,5 M, pH 5,0. A reação foi lida em leitor de ELISA a 630 nm.

Nitrito (NO_2^-)

O nitrito é um produto da degradação do óxido nítrico. O nível de nitrito pode ser utilizado como um método indireto de dosagem de óxido nítrico, sendo referenciado com reação de Griess (126). O método de Griess compreende uma reação entre o nitrito com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário. Este, por sua vez, reage com o N-naftil-etilenodiamina formando um composto azo, estável, de coloração púrpura. A quantidade de nitrito foi estimada através da reação da sulfanilamida 1% em solução de ácido fosfórico a 2,5% (solução 1) e solução naftilenodiamina com ácido fosfórico a 2,5% (solução 2). Para a reação foram utilizados 100 μL da amostra em duplicata, em seguida foi adicionado 50 μL da solução 1 que foi deixada na estufa por 10 minutos. Após isso foi adicionado 50 μL da solução 2. Por fim as amostras foram lidas em leitor de ELISA a 550 nm.

Western Blotting

Alíquotas de homogeneizado pulmonar foram utilizadas para analisar a expressão de 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1 e TIMP-2. Após dosagem de proteínas pelo método de Bradford, as amostras foram corridas em gel de poli(acrilamida) a uma concentração de 29:1 por 2 horas. A eletrotransferência foi realizada com utilização de membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com anticorpo primário policlonal (1:1000) para 4-HNE, MMP-12, NE, TIMP-1 e TIMP-2 (Santa Cruz

Biotechnology. California, EUA). Para revelação, as membranas foram incubadas com um kit contendo anticorpo secundário biotinilado conjugado a estreptavidina (Santa Cruz Biotechnology. California, EUA). Um kit de quimioluminescência (Amershan Pittsburgh, EUA) foi usado para revelação e as imagens foram reveladas em filme radiográfico (Amershan Pittsburgh, EUA). Os controles negativos foram feitos substituindo o anticorpo primário por soro de cabra.

Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão. As diferenças das variáveis entre os grupos foram testadas pela análise de variância One-way ANOVA. As diferenças intergrupais foram testadas a partir do pós-teste de Tukey. As análises estereológicas foram testadas pelo Kruskal-Wallis e as análises entre os grupos foram feitas utilizando-se o pós-teste de Dunn. Diferença significativa foi considerada quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do o programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Prism 5.0 for Windows 95, GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Histologia

O aspecto morfológico pulmonar dos grupos estudados está representado na figura 19. O grupo controle (Figura 19a) apresenta o aspecto normal do parênquima pulmonar (com os septos alveolares íntegros e espaços alveolares preservados) dos animais que foram expostos ao ar ambiente. No grupo FC, é possível observar áreas de condensação septal, septos confluentes, espaços aéreos alargados e presença de células inflamatórias (Figura 19b). Nos animais dos grupos FC+LN e FC+LA pode-se observar áreas preservadas e menor quantidade de células inflamatórias (Figuras 19c e 19d). Nos animais do grupo FC+NAC houve preservação do parênquima pulmonar, poucos espaços aéreos alargados, porém com grande número de células inflamatórias (Figura 19e).

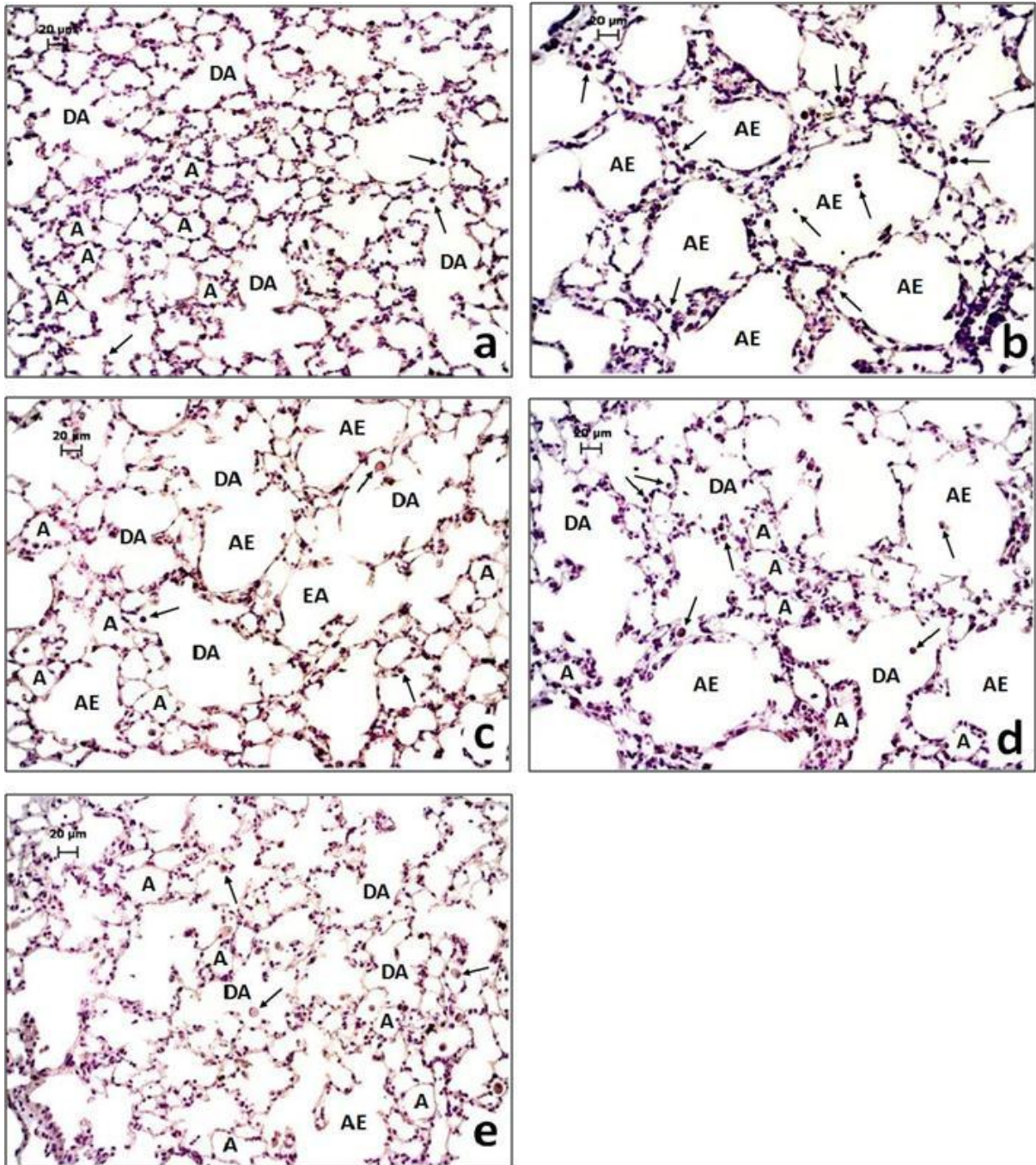


Figura 19. Histologia do pulmão. As fotomicrografias mostram o aspecto histológico do parênquima pulmonar dos camundongos expostos ao ar ambiente (a), expostos à fumaça de cigarro (b) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (c), com L-arginina (d) e com N-acetilcisteína (e). Alvéolos (A); Ductos alveolares (DA); Áreas enfisematosas (AE); Leucócitos (→). Coloração de hematoxilina e eosina.

Através da análise da densidade de superfície do septo alveolar (Sv) observamos que os animais do grupo FC apresentaram uma redução em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$). Entretanto, todos os animais dos grupos tratados com drogas (FC+LN, FC+LA e FC+NAC) apresentaram um aumento em relação aos animais do grupo FC ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) assemelhando-se ao grupo controle (Figura 20).

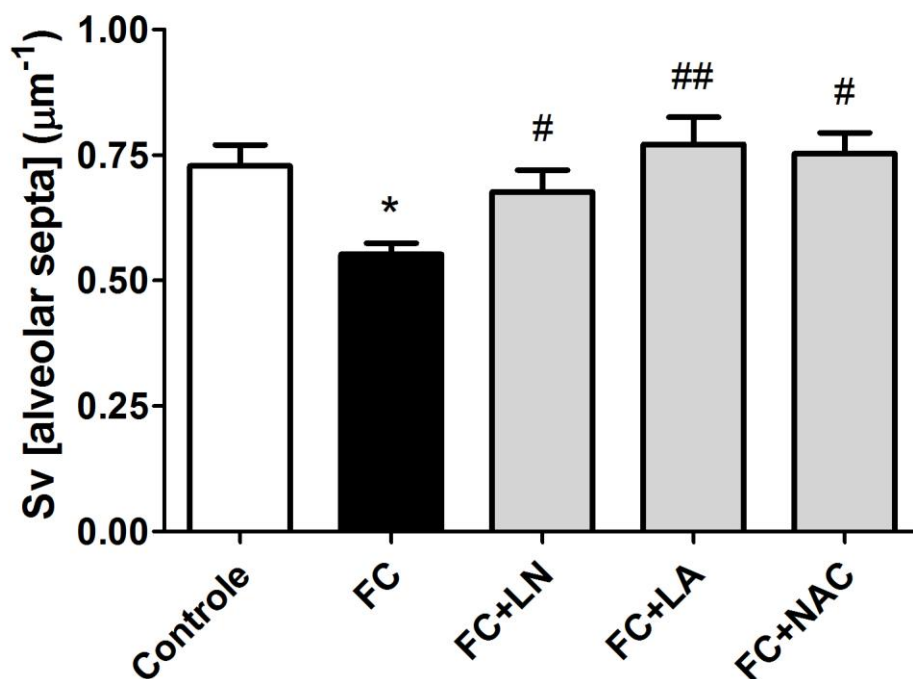


Figura 20. Medida densidade de superfície dos septos alveolares (Sv) do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Avaliamos também o diâmetro alveolar médio (Lm) como índice de destruição do espaço alveolar. Observamos um aumento dos espaços alveolares no grupo FC e no grupo FC+LN quando comparados com o grupo controle ($p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente). O grupo FC+NAC apresentou uma diminuição dos espaços alveolares quando comparado ao grupo FC ($p < 0,05$) (Figura 21).

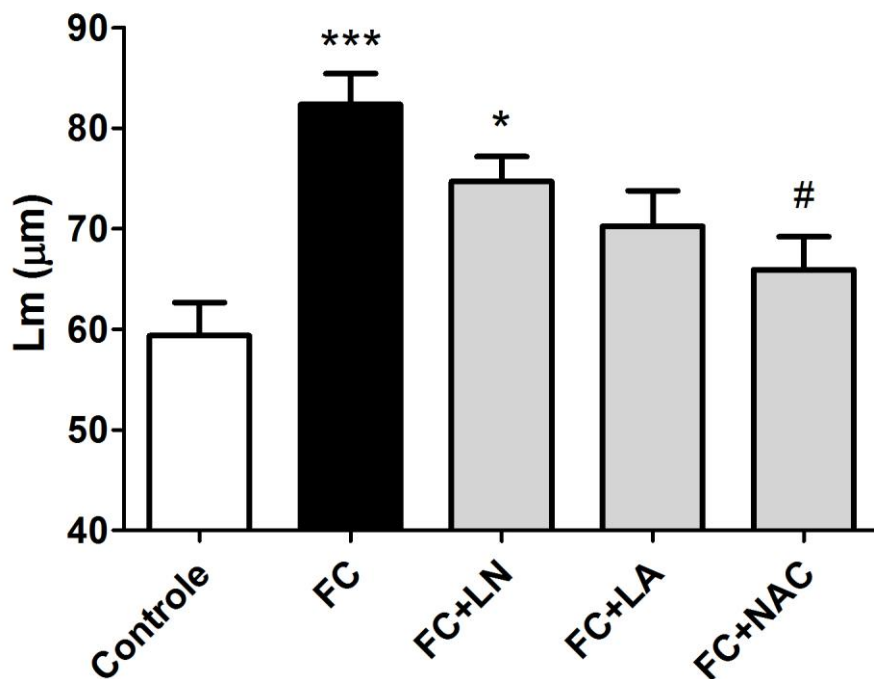


Figura 21. Medida do diâmetro alveolar médio (Lm) do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Lavado Broncoalveolar (BAL)

Observamos um aumento do número de leucócitos totais em todos os grupos expostos à fumaça de cigarro em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). Entretanto, os grupos FC+LN, FC+LA e FC+NAC, que receberam as drogas, apresentaram uma diminuição do número de leucócitos totais quando comparados ao grupo FC ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 22).

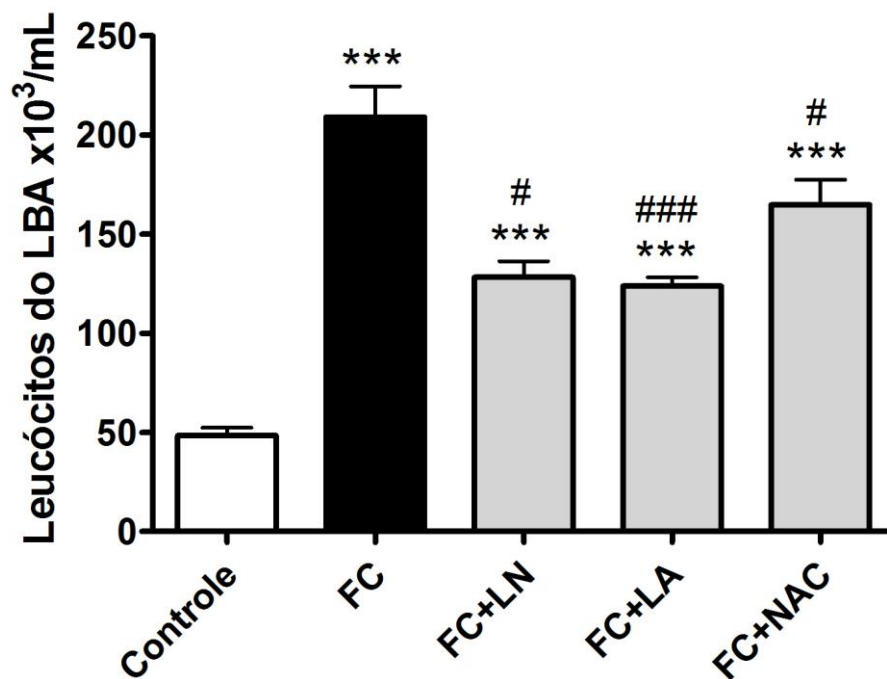


Figura 22. Número de leucócitos totais do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

A quantidade de macrófagos alveolares aumentou 140,7% no grupo FC e 65,6% no grupo FC+LN em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$). Contudo, quando comparamos o número de macrófagos dos animais tratados com os animais expostos somente à fumaça de cigarro, houve uma diminuição de 31,1% no grupo FC+LN, de 60,8% no grupo FC+LA e de 63,3% no grupo FC+NAC ($p < 0,001$) (Figura 23).

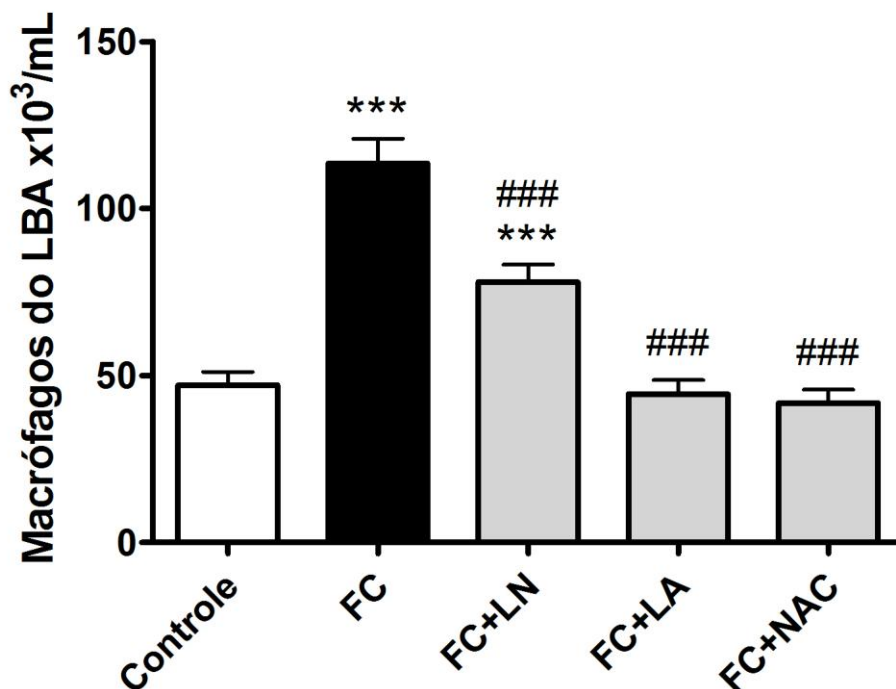


Figura 23. Número de macrófagos alveolares do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

A contagem dos neutrófilos nos espaços alveolares do pulmão mostrou um aumento no número de neutrófilos em todos os grupos que foram expostos à fumaça de cigarro quando comparados ao grupo controle ($p < 0,001$). Porém, evidenciamos uma diminuição de 46% e de 22,8% na quantidade de neutrófilos dos grupos FC+LN ($p < 0,001$) e FC+LA ($p < 0,05$) em comparação com o grupo FC, respectivamente. O grupo FC+NAC, por sua vez, mostrou um aumento de 35,3% do número de neutrófilos em comparação com o grupo FC ($p < 0,001$) (Figura 24).

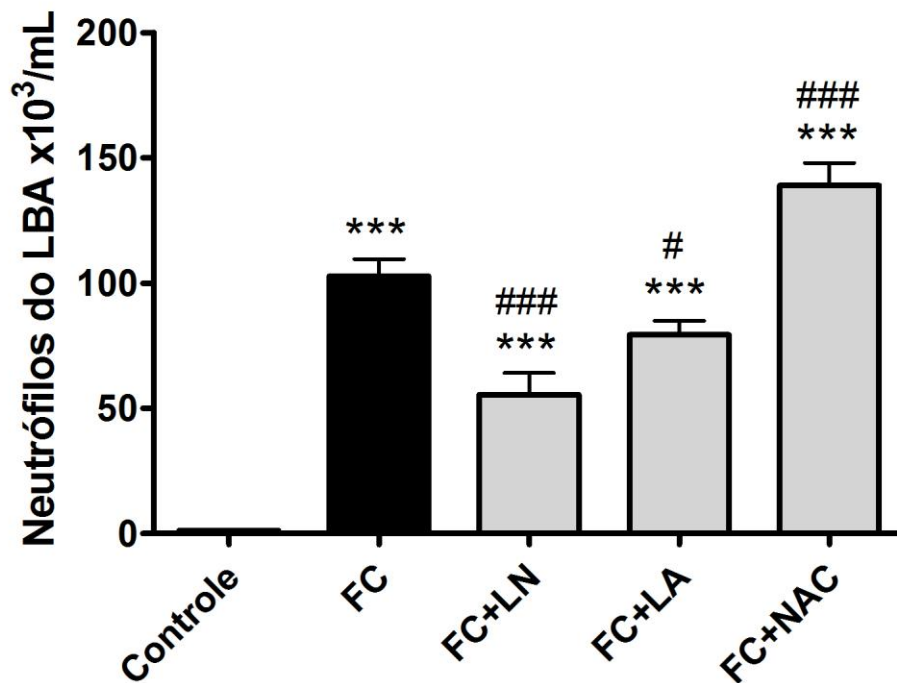


Figura 24. Número de neutrófilos do lavado broncoalveolar (BAL) de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da SOD estava diminuída em todos os grupos expostos à fumaça de cigarro em comparação com o grupo controle ($p < 0,001$) (Figura 25).

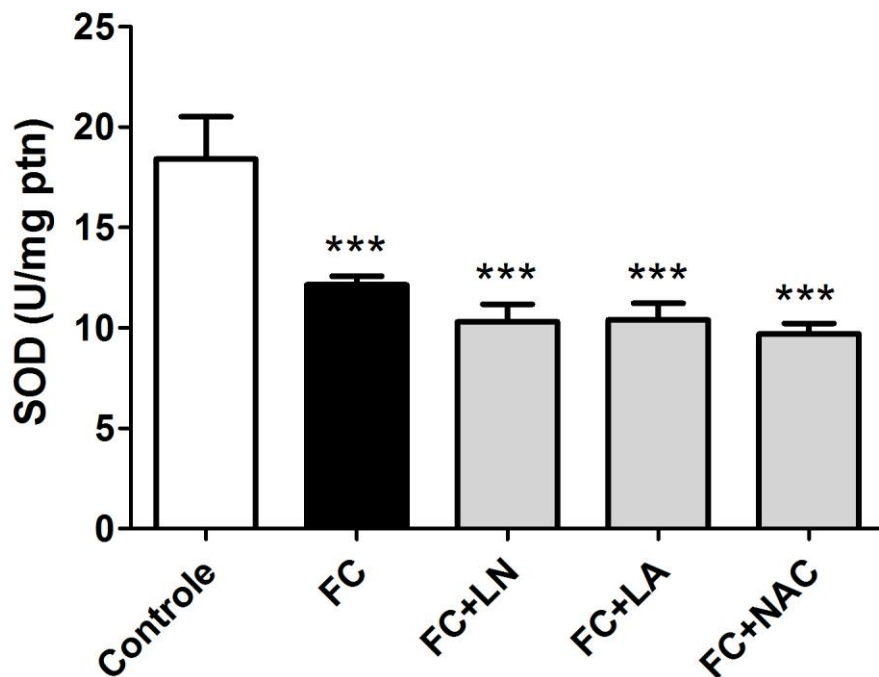


Figura 25. Atividade da superóxido dismutase (SOD) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

A figura 26 mostra a atividade da catalase nos pulmões dos camundongos. Os pulmões dos animais dos grupos FC, FC+LA e FC+NAC demonstraram uma diminuição da atividade desta enzima em relação aos animais do grupo Controle ($p < 0,001$, $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente). Os pulmões dos animais do grupo FC+LN demonstraram um aumento da atividade da catalase quando comparados aos pulmões dos animais do grupo FC ($p < 0,05$).

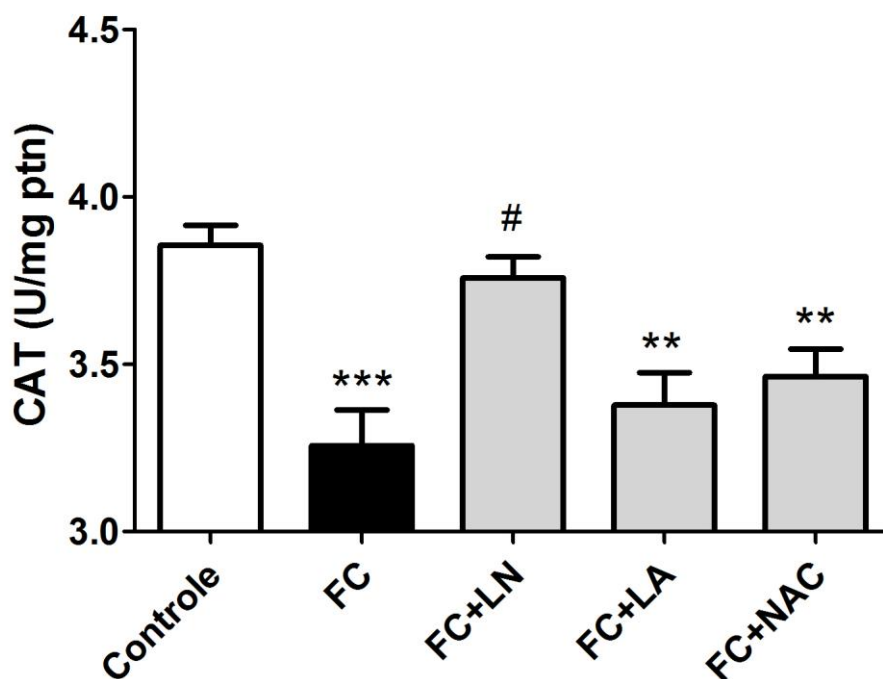


Figura 26. Atividade da catalase (CAT) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

O aumento da atividade da mieloperoxidase foi detectado no grupo FC ($p < 0,05$) e em todos os grupos tratados, FC+LN, FC+LA e FC+NAC ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente), quando comparados ao grupo Controle. Entretanto, apenas evidenciamos um aumento da MPO nos grupos FC+LA e FC+NAC ($p < 0,001$) em comparação com o grupo FC (Figura 27).

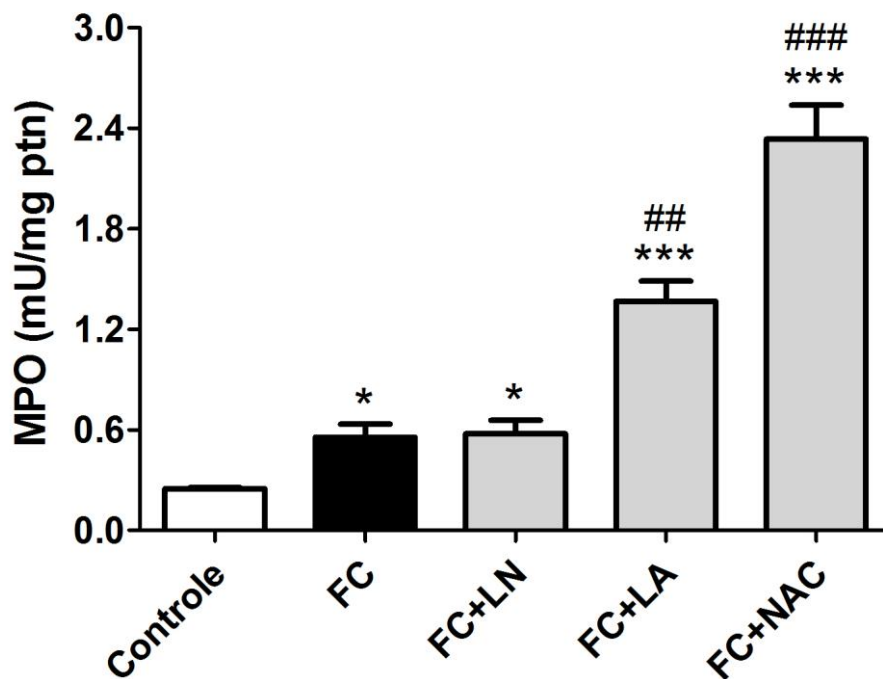


Figura 27. Atividade da mieloperoxidase (MPO) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Razão Glutationa Reduzida e Oxidada (GSH/GSSG)

A glutathiona reduzida (GSH) reage com as espécies reativas para produzir a glutathiona oxidada (GSSG) que, através da reação com a glutathiona redutase (GR) é convertida novamente em GSH. Dessa forma, os níveis relativos de GSH/GSSG refletem as condições de estresse oxidativo e o estado redox do pulmão. A razão GSH/GSSG estava diminuída no grupo FC em relação ao grupo controle ($p < 0,01$) e aumentada no grupo FC+NAC quando comparado ao grupo FC ($p < 0,01$) (Figura 28).

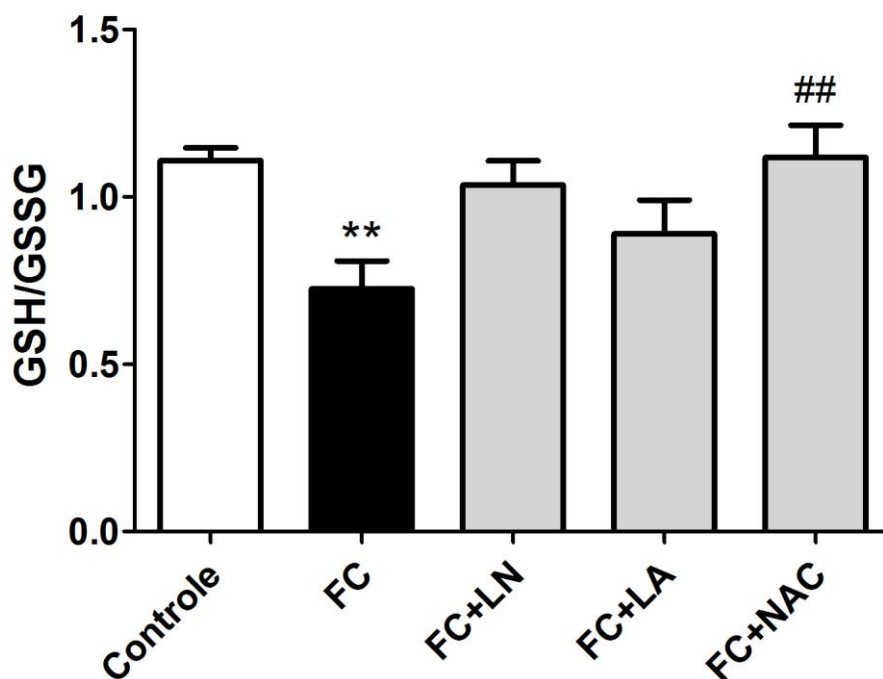


Figura 28. Razão da glutathiona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Nitrito (NO_2^-)

Encontramos um aumento do conteúdo de nitrito nos grupos FC, FC+LA e FC+NAC em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Ao compararmos os grupos com o grupo FC, evidenciamos uma diminuição do conteúdo de nitrito no grupo FC+LN ($p < 0,001$) e seu aumento no grupo FC+LA ($p < 0,001$) (Figura 29).

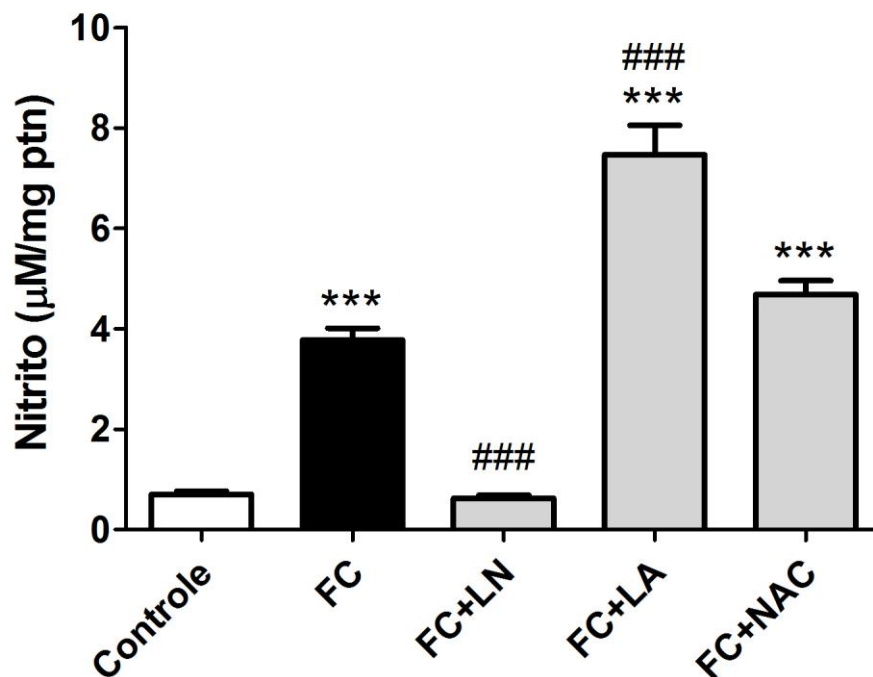


Figura 29. Conteúdo do nitrito no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (FC+LN), com L-arginina (FC+LA) e com N-acetilcisteína (FC+NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais por grupo. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (*) comparação com o grupo controle e (#) comparação com o grupo FC.

Razão Glutationa Reduzida e Oxidada (GSH/GSSG) e Nitrito (NO_2^-) nos Veículos

Um grande aumento da razão GSH/GSSG foi observado no grupo NAC ($p < 0,001$), que recebeu a N-acetilcisteína em comparação com o grupo Controle (Figura 30).

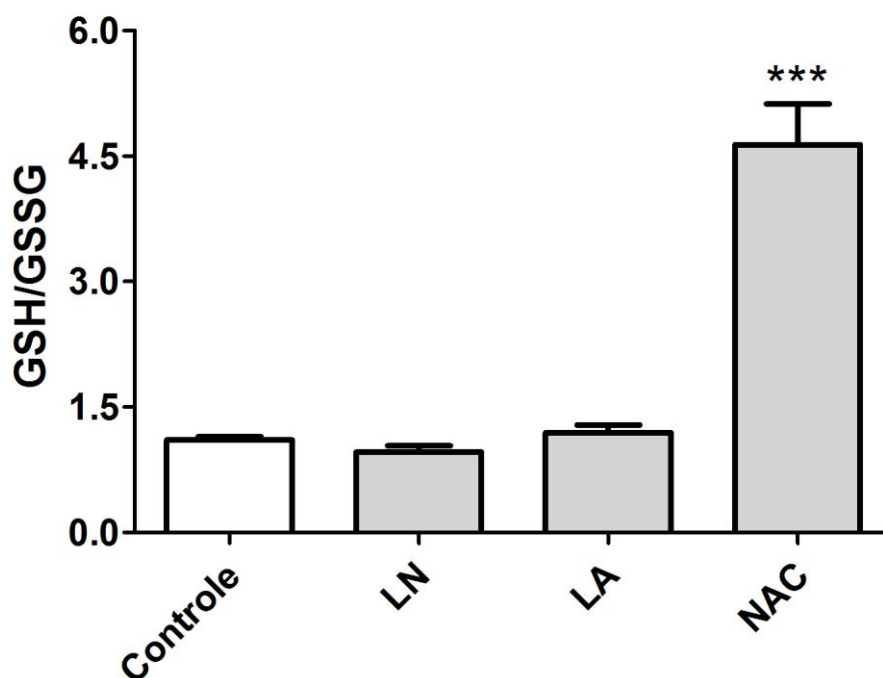


Figura 30. Razão da glutatona reduzida e oxidada (GSH/GSSG) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos somente ao ar ambiente mais o veículo (Controle) e expostos ao ar ambiente e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais para o grupo controle e $n = 5$ animais nos grupos restantes. Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos (*) correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente em comparação com o grupo controle.

Com relação ao conteúdo de nitrito, observamos um grande aumento nos grupos que receberam L-arginina e N-acetilcisteína ($p < 0,001$) em comparação com o grupo controle (Figura 31).

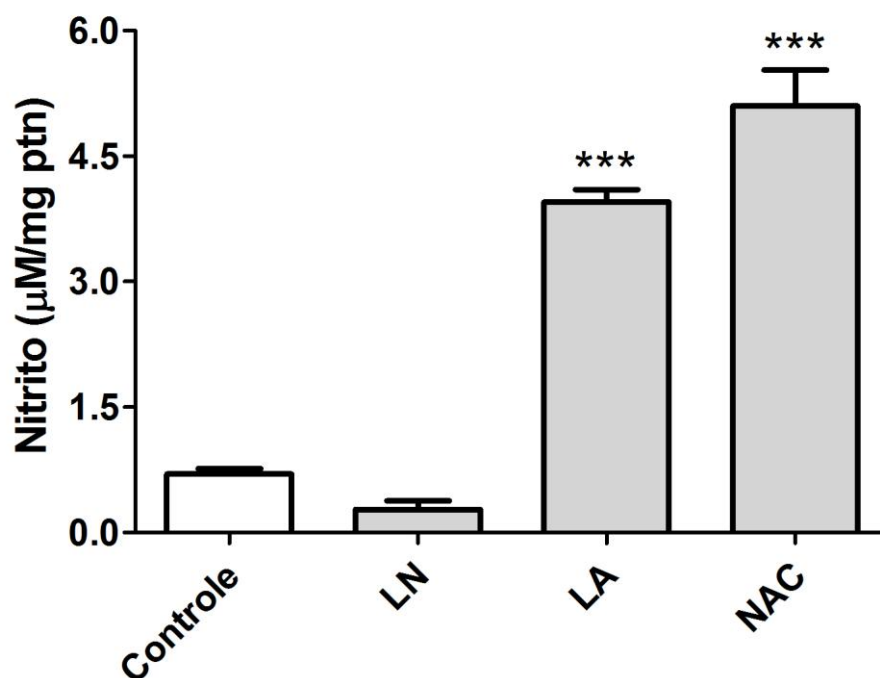


Figura 31. Conteúdo do nitrito no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos somente ao ar ambiente mais o veículo (Controle) e expostos ao ar ambiente e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC). Os dados estão expressos em média \pm EPM para um $n = 10$ animais para o grupo controle e $n = 5$ animais nos grupos restantes. One-way ANOVA seguido do pós-teste de Tukey, considerando $\alpha = 5\%$. Um, dois e três símbolos (*) correspondem a $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente em comparação com o grupo controle.

Western Blotting

Um aumento da expressão do 4-HNE, um importante marcador de peroxidação lipídica, foi evidenciado no grupo FC (Figura 32). A expressão de MMP-12 foi confirmada no grupo FC, mas obteve uma intensidade de marcação mais forte no grupo FC+NAC (Figura 33). A expressão da elastase de neutrófilo (NE), uma proteína que indica a atividade elastolítica por parte dos neutrófilos, ficou fortemente evidenciada nos grupos FC e FC+NAC (Figura 34). Também avaliamos a expressão da TIMP-1 e da TIMP-2, os principais inibidores teciduais de metaloproteases do pulmão. A expressão da TIMP-1 foi maior nos grupos FC+LN e FC+LA (figura 35) e da TIMP-2 no grupo FC+LN (Figura 36).

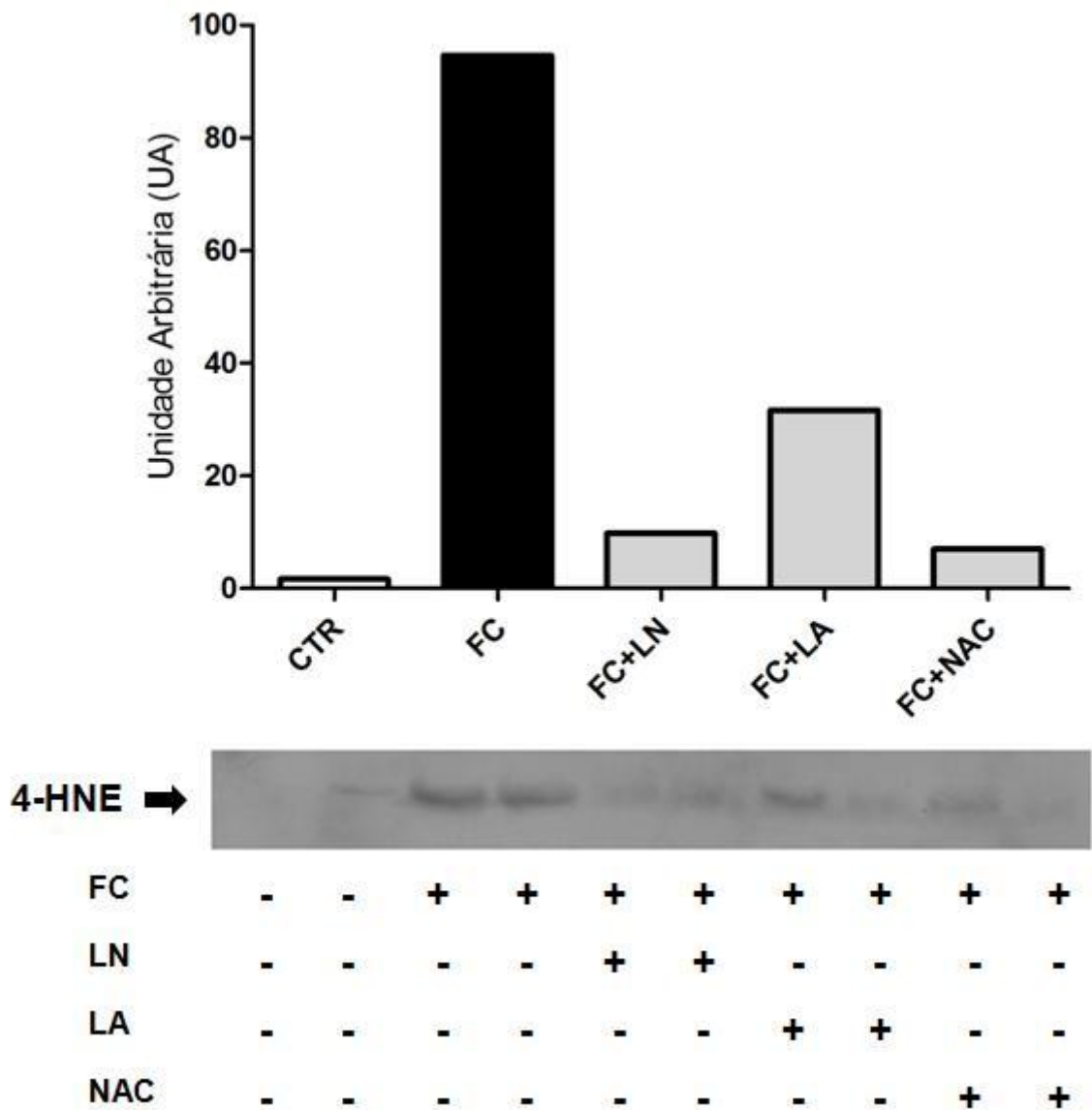


Figura 32. Expressão da 4-hidroxi-nonal (4-HNE) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC).

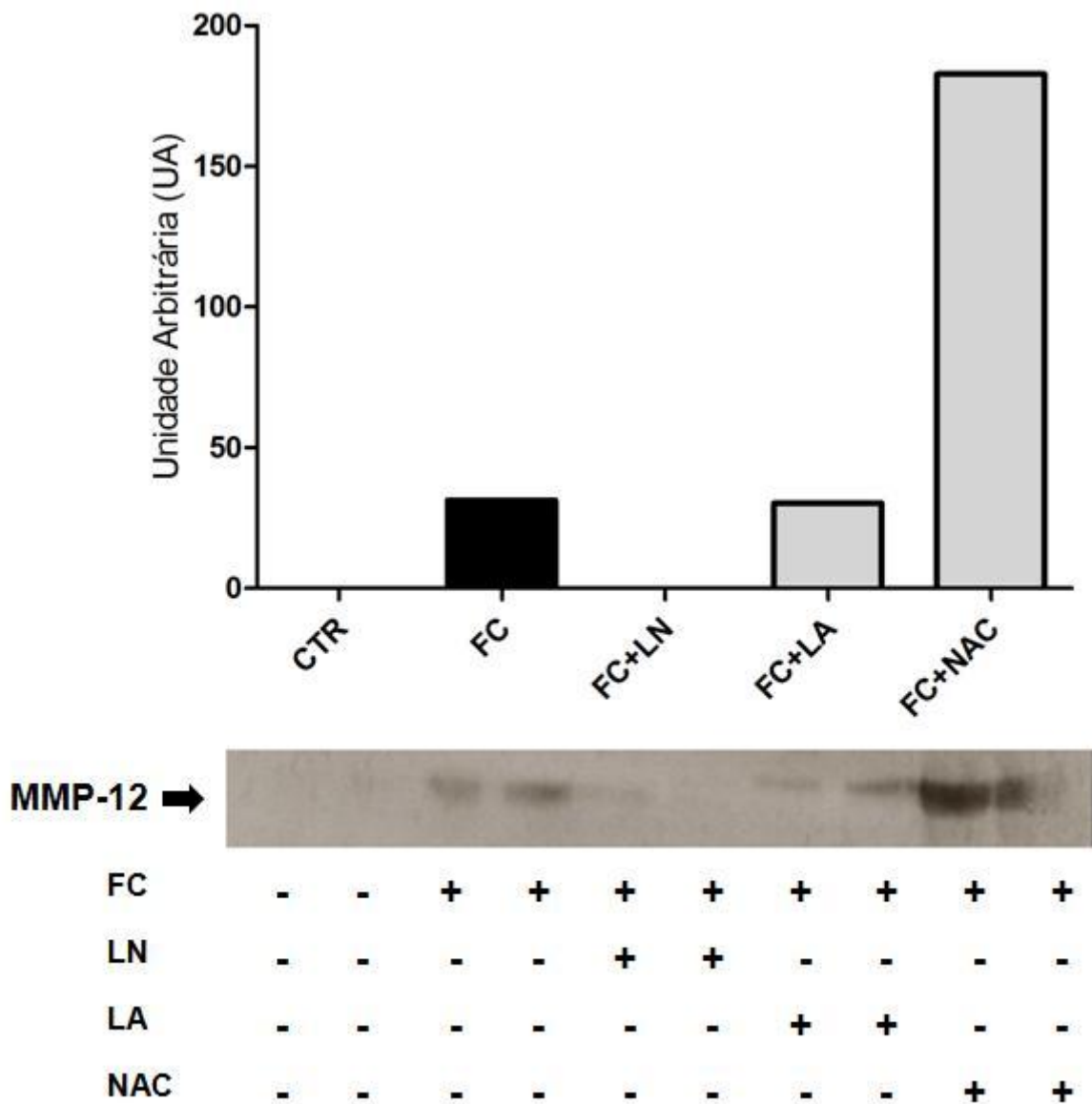


Figura 33. Expressão da metaloprotease 12 (MMP-12) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC).

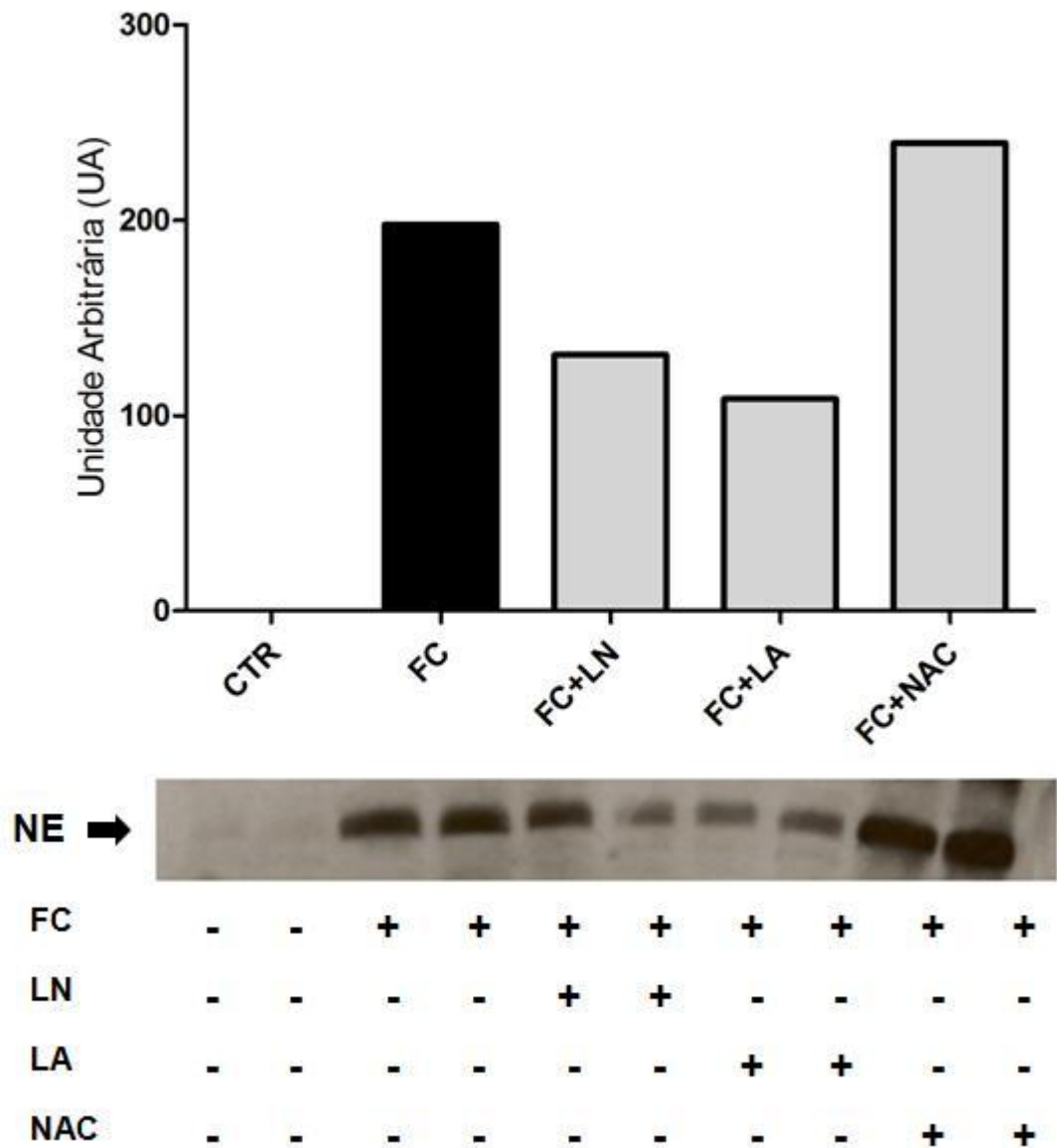


Figura 34. Expressão da elastase de neutrófilo (NE) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC).

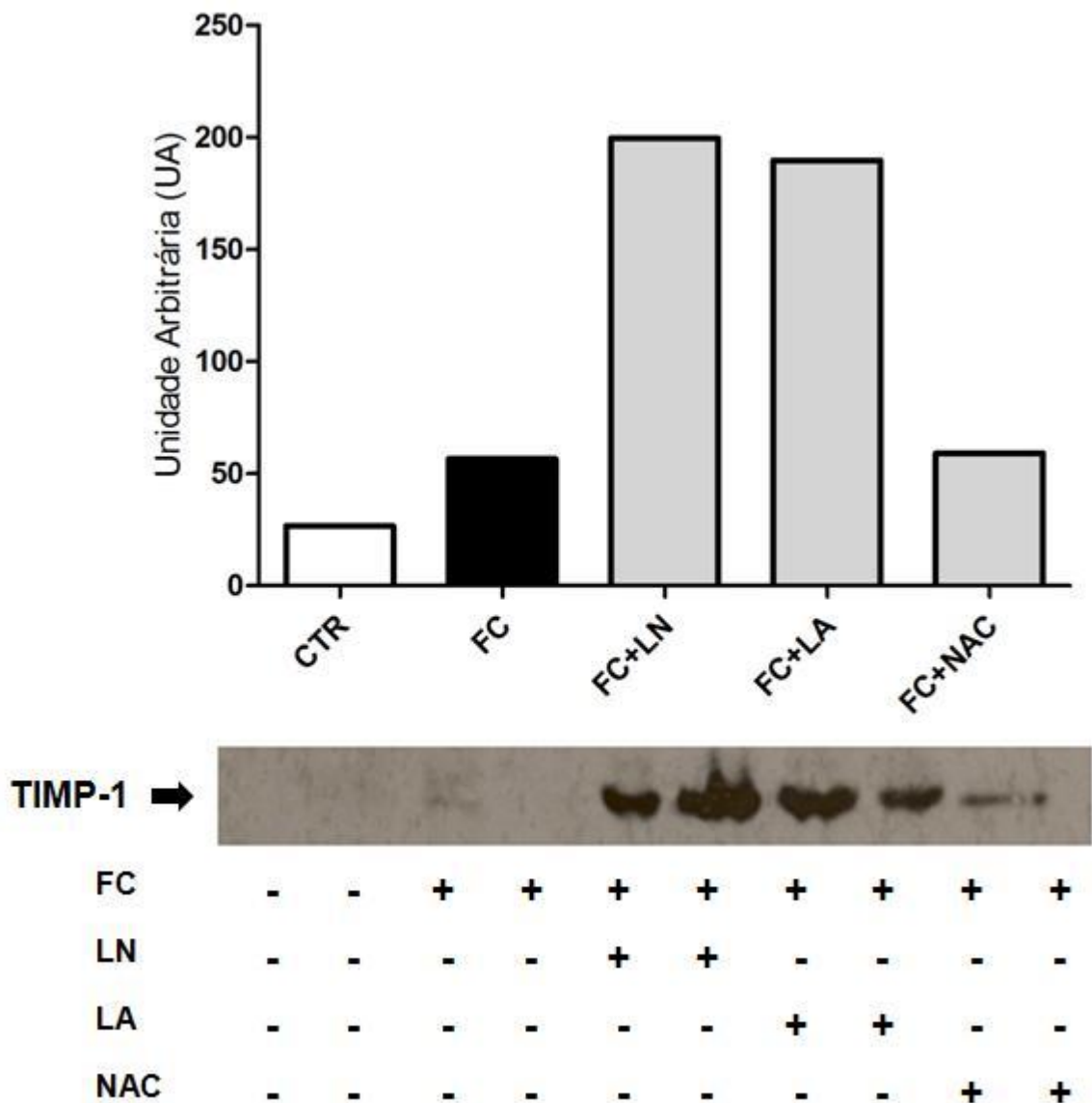


Figura 35. Expressão do inibidor tecidual de metaloprotease-1 (TIMP-1) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC).

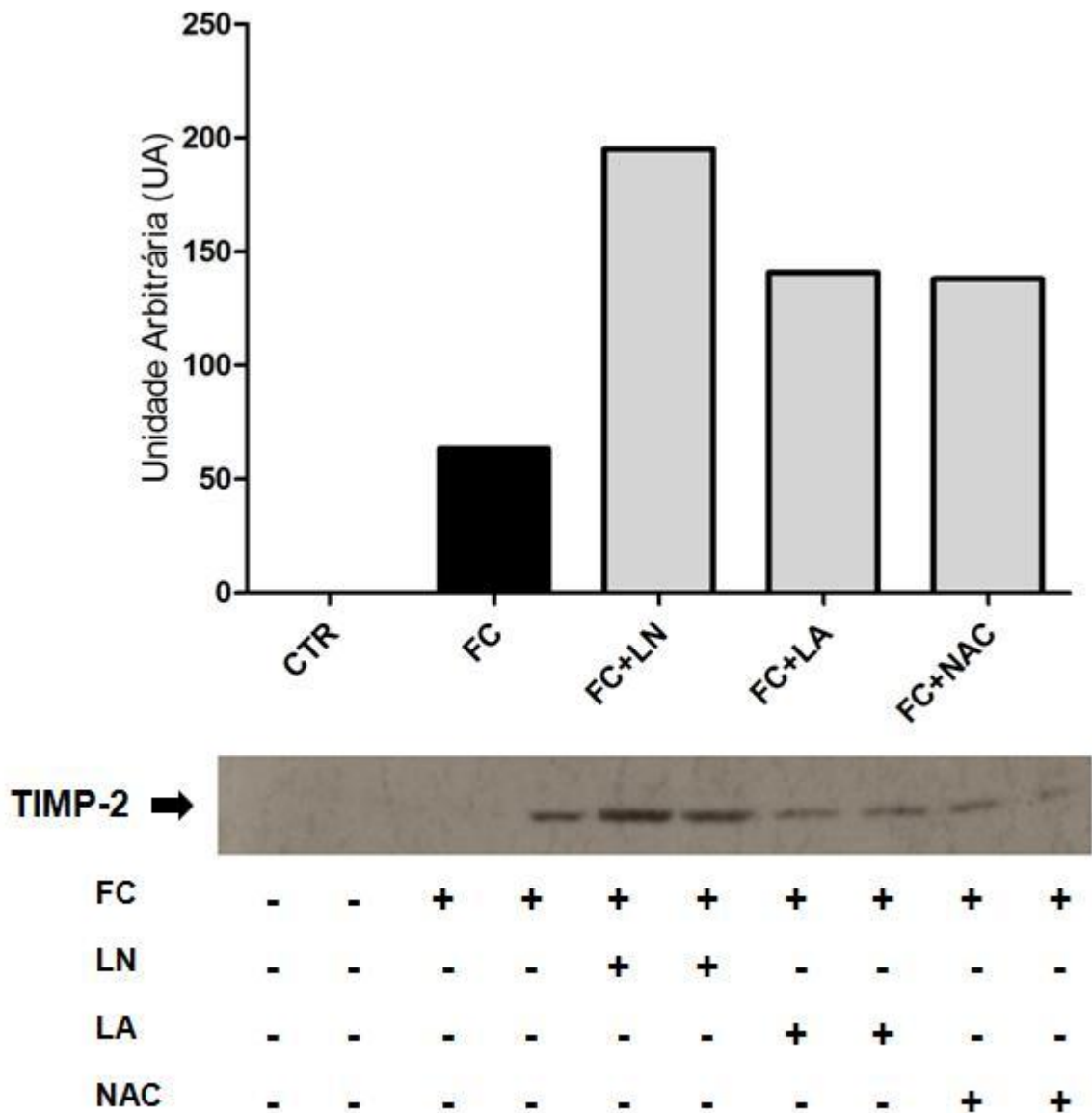


Figura 36. Expressão do inibidor tecidual de metaloprotease-2 (TIMP-2) no homogeneizado do pulmão de camundongos expostos ao ar ambiente (Controle), expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro (FC) e expostos à fumaça de cigarro e tratados com L-NAME (LN), com L-arginina (LA) e com N-acetilcisteína (NAC).

5. DISCUSSÃO

Muitas pesquisas com modelos experimentais e clínicos são realizadas para criar novas estratégias terapêuticas e/ou drogas que possam ser aplicadas no tratamento e cura da DPOC. Entretanto, nosso trabalho é o primeiro a estudar o controle do NO[•] como estratégia terapêutica para o enfisema, uma das enfermidades classificadas como DPOC. O NO[•] é reconhecido por participar de vários processos biológicos envolvidos na cascata inflamatória (12). Porém, em um estudo anterior (17) nós observamos que a administração de um doador (nitroglicerina) ou de um substrato (L-arginina) para a formação do NO[•], proporcionou redução do processo inflamatório em um modelo de exposição aguda à FC. Aqui, nossa hipótese é que a oferta de NO[•] ou sua inibição tem participação na proteção do tecido pulmonar no enfisema induzido por FC em camundongos. Para tanto utilizamos como controle positivo uma droga amplamente prescrita para o tratamento da DPOC, a NAC. Acreditamos que os resultados observados nesse estudo podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas no tratamento do enfisema pulmonar causado pela FC em humanos.

Existem duas teorias sobre o processo fisiopatológico da DPOC. Uma delas versa sobre o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes enquanto a outra descreve o desequilíbrio entre proteases e antiproteases (29, 75, 127). Encontramos na literatura evidências que ambas as teorias são fundamentais para o desenvolvimento da DPOC. Entretanto acreditamos que ambas as teorias possam coexistir contribuindo assim para o desenvolvimento de um tratamento complexo. O trato respiratório é um local de exposição contínua a agentes oxidantes presentes em gases inalados, poluição do ar e na FC (115). Dessa forma, um aumento desordenado da ação de macrófagos e neutrófilos frente a um insulto constante, como a FC, pode levar a uma resposta inflamatória anômala causando o desequilíbrio entre os sistemas oxidante-antioxidante e protease-antiprotease, o que parece ter um papel fundamental na gênese da DPOC (127). Com a persistência do estímulo inflamatório os neutrófilos passam a produzir metaloproteases, como a elastase de neutrófilo, que degrada as TIMPs, e os macrófagos que aumentam a produção metaloproteases que também degradam a α 1-AT e atuam como fatores

quimiotáticos para atrair monócitos da corrente sanguínea para o parênquima pulmonar potencializando a atividade proteolítica (49, 128). A fumaça do cigarro aumenta o estresse oxidativo através da adição e geração de novas espécies reativas, podendo também aumentar a inflamação nos pulmões (129, 130). A produção de espécies reativas tem uma relação direta com a oxidação de proteínas, lipídios e DNA, que pode causar um dano direto ao pulmão ou induzir uma variedade de respostas celulares através da geração metabólica de novas espécies reativas. As espécies reativas podem alterar o remodelamento da matriz extracelular e dos vasos sanguíneos, estimular a secreção de muco, inativar as antiproteases, causar apoptose e regular a proliferação celular (131, 132). Além disso, tem sido proposto que as espécies reativas produzidas por células recrutadas para o local da inflamação representam a principal causa de lesão celular e tecidual associada à inflamação crônica pulmonar incluindo a DPOC (131). Em relação à teoria protease/antiprotease, o estudo de Hautamaki et al. relatou a importância da MMP-12 demonstrando que animais *knockout* para elastase de macrófago (MMP-12) não desenvolvem enfisema (47) quando expostos cronicamente a FC. Outro estudo que reforça essa teoria foi descrito por Shapiro et al., onde mostraram que camundongos *knockout* para NE apresentaram uma proteção de 59% contra desenvolvimento do enfisema (133). Em resposta a FC, antiproteases importantes para o pulmão como TIMP-1 e TIMP-2, podem ter sua expressão reduzida (133).

O grupo FC+NAC apresentou um aumento do número de neutrófilos no BAL em relação ao controle e ao grupo FC. Este aumento coincide com o aumento da NE, mas sem um aumento concomitante do 4-HNE, que é um importante marcador de dano oxidativo. Isso nos leva a acreditar que temos dois marcadores relacionados ao remodelamento tecidual (MMP-12 relacionado aos macrófagos e células epiteliais e NE relacionado aos neutrófilos) sem dano tecidual. A diminuição da TIMP-1 e TIMP-2 no grupo FC+NAC é coerente uma vez que a NAC é um substrato para a formação da glutatona. A glutatona por sua vez é um potente antioxidante e reduz, além dos oxidantes, as MMPs e conseqüentemente as TIMPs. O aumento dos neutrófilos no grupo FC+NAC também está de acordo com o aumento da atividade da MPO neste grupo, o que também contribuiu para a proteção do parênquima pulmonar destes animais. Assim, este aumento dos neutrófilos do grupo FC+NAC parece agir como um mecanismo de remodelamento

em relação aos restos celulares e preservação da histoarquitetura pulmonar. Nossos dados corroboram com o estudo de Shapiro et al (133), que demonstrou a mesma relação entre o aumento do número de neutrófilos seguido do aumento da elastase de neutrófilos com a diminuição da TIMP-1. De acordo com nossos resultados a NAC interferiu na via oxidante-antioxidante, atuando como antioxidante. Entretanto, sugerimos que o L-NAME e a L-arginina interferem na via protease-antiprotease, uma vez que os grupos FC+LN e FC+LA diminuíram, até certo ponto, a produção da NE e da MMP-12 (proteases) e em contra partida aumentaram a produção de TIMP-1 e TIMP-2 (Figuras 33-36). Além disso, os grupos FC+LN e FC+LA demonstraram uma maior expressão de TIMP-1 e TIMP-2 que o grupo FC+NAC.

Muitas células inflamatórias são recrutadas para o pulmão em resposta à FC, as quais geram oxidantes (46, 127). O perfil das células inflamatórias em nosso estudo foi analisado pelo lavado broncoalveolar. Evidenciamos que todos os grupos que foram expostos à FC apresentaram um número elevado de leucócitos totais em relação ao grupo controle (Figura 21). Entretanto L-NAME, L-arginina e NAC quando utilizadas concomitantemente com a FC conseguiram reduzir o número de leucócitos totais em comparação com o grupo FC. No grupo FC+LN houve uma diminuição de 46% no número de neutrófilos em comparação com o grupo FC, paralelo a um aumento de 65% no número de macrófagos em relação ao grupo controle; essa distribuição de células não foi observada nos outros grupos tratados (Figuras 23 e 24). Isso indica que o L-NAME interferiu no influxo de células inflamatórias via diminuição do NO^{\bullet} . O macrófago produz NO^{\bullet} e a ação *scavenger* dos macrófagos para o remodelamento pode estar relacionada com o NO^{\bullet} . Ao reduzir a produção de NO^{\bullet} em função do efeito do L-NAME, sugerimos um aumento no número de macrófagos como uma resposta compensatória em relação à participação destas células no processo de proteção do parênquima do pulmão. Por outro lado, os grupos tratados com L-arginina e NAC mantiveram os números de macrófagos alveolares semelhantes ao grupo controle.

O 4-HNE é um produto da peroxidação lipídica (1) e um importante marcador de dano oxidativo. O aumento da expressão de 4-HNE apenas no grupo FC corrobora a afirmação de que todos os grupos tratados apresentaram redução do dano oxidativo, apesar de apresentarem algum grau de dano tecidual (Figura 32). O

dano tecidual foi evidenciado pelas imagens histológicas onde observamos no grupo FC, uma histoarquitetura do parênquima pulmonar com áreas de septo alveolar espessado com sinais de fibrose inicial e espaços aéreos alargados (Figura 19). Todos os grupos tratados apresentaram aspecto morfológico melhor dos septos alveolares e alvéolos (Figuras 19 e 20). Os grupos tratados com L-NAME e L-arginina, além do aspecto morfológico preservado do pulmão em relação ao grupo FC, apresentaram redução da quantidade de células inflamatórias (Figuras 19 e 22). O grupo tratado com NAC demonstrou melhor preservação do parênquima pulmonar com poucos espaços aéreos alargados (Figuras 19 e 21). Acreditamos que o L-NAME e a L-arginina interagiram com o epitélio e com a matriz extracelular do pulmão causando alterações no *turnover* de macromoléculas, do influxo de células inflamatórias e organização tecidual, o que possibilitou uma proteção do tecido frente ao insulto da FC.

A SOD constitui a primeira linha de defesa antioxidante e catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ convertendo-o em O_2 e H_2O_2 (58). Em nosso estudo a FC causou um *burden* oxidativo grande o suficiente para exaurir esta linha de defesa. Nesse sentido, nenhuma das drogas utilizadas foi capaz de preservar a atividade da SOD. Embora o desequilíbrio redox esteja evidente através da mensuração da atividade de SOD em todos os grupos tratados (Figura 25), ao analisarmos a CAT observamos uma restauração do equilíbrio redox somente no grupo FC+LN, o que nos leva a pensar que a proteção tecidual observada neste grupo (Figura 26) se dá, concomitantemente, ao aumento da atividade da CAT. Não sabemos se o L-NAME aumenta a atividade da catalase ou se reage diretamente com o H_2O_2 , mas imaginamos que a segunda opção seja mais plausível, uma vez que o grupo controle tratado com L-NAME durante o mesmo período não apresentou aumento de CAT (dado não apresentado). Com a redução da SOD, houve um aumento do H_2O_2 devido ao excesso de $O_2^{\bullet-}$. Este aumento do peróxido de hidrogênio concomitante a redução da CAT sugere que o peróxido de hidrogênio sirva como substrato para a atividade de MPO, observada nos grupos tratados com L-arginina e NAC, uma vez que o H_2O_2 tem uma afinidade maior para reação com a MPO (122) do com a CAT. Além disso, o aumento da atividade da MPO nestes grupos esta de acordo com o aumento do número de neutrófilos no BAL (Figuras 24 e 27), reforçando nossa hipótese de que estes aumentos protegeram o tecido pulmonar nestes grupos. De

acordo com a medida da razão GSH/GSSG, um importante indicador de estresse oxidativo (134), podemos afirmar que os grupos tratados apresentaram redução do estresse oxidativo em comparação ao grupo FC. Além da proteção tecidual e da redução da expressão do 4-HNE nos grupos tratados, verificamos uma diminuição da razão GSH/GSSG apenas no grupo FC enquanto que não houve diferença entre os animais tratados e os animais controles (Figura 28). O grupo FC+NAC além de uma melhora no diâmetro alveolar médio (Figura 21) também apresentou um aumento já esperado da razão GSH/GSSG em comparação com o grupo FC, uma vez que a NAC é um precursor para a produção de glutatona. Essa afirmação poder ser comprovada pela figura 30 onde observamos um aumento natural da razão GSH/GSSG no grupo tratado apenas com NAC.

A figura 29 mostra o conteúdo de nitrito entre os grupos estudados. No grupo FC houve um aumento já esperado do nitrito, pois a fase gasosa da fumaça de cigarro possui NO^\bullet radical dentre seus componentes (56). A diminuição do nitrito no grupo FC+LN é explicada pelo fato de que o L-NAME inibe a síntese do NO^\bullet . O grupo FC+LA demonstrou um aumento do nitrito, pois a L-arginina é um substrato para a formação do NO^\bullet . Entretanto, no grupo FC+NAC observamos o mesmo aumento no conteúdo do nitrito que foi observado grupo FC. Com base nesse achado, poderíamos pensar em duas hipóteses: a NAC interfere na via do NO^\bullet aumentando sua produção ou a ação da NAC é óxido nítrico independente. O ideal seria ter um grupo com administração de NAC e L-NAME. Entretanto, o grupo tratado com NAC sem a exposição da fumaça de cigarro durante 60 dias, demonstrou que há um aumento do nitrito no grupo NAC e isso nos leva a acreditar que a NAC, de alguma maneira, aumenta a produção de NO^\bullet (Figura 31). Com o aumento do NO^\bullet , há uma melhora da função endotelial e capilar (135-137). Nós sugerimos também que como o NO^\bullet participa da via oxidante através da formação de peroxinitrito, a administração de L-arginina pode ter favorecido a produção e liberação de oxidantes e com conseqüente potencialização da velocidade dessas reações. A produção e liberação de oxidantes e o aumento da velocidade de reação pode favorecer a proteção tecidual uma vez que os oxidantes agem por um tempo menor (Figura 37a). Essa condição é inversamente proporcional a uma situação

onde um insulto, como a FC, mantém uma carga constante de oxidantes, porém com um tempo de ação mais prolongado. (Figura 37b).

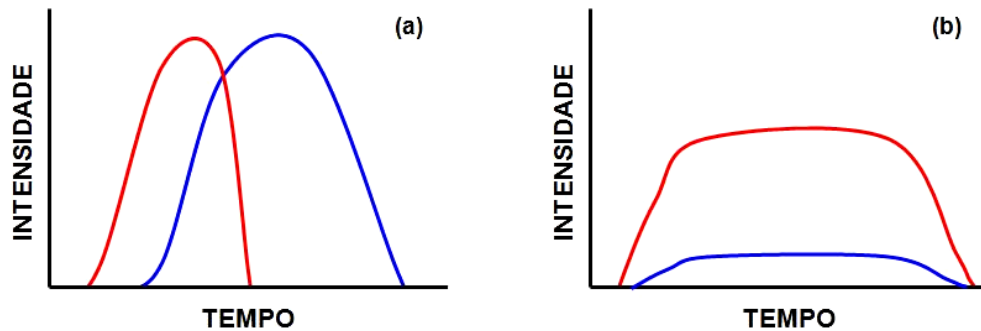


Figura 37. Relação da intensidade vs tempo entre os processos de estresse oxidativo e proteção tecidual 1. Estresse oxidativo (linha vermelha) e proteção tecidual (linha azul) considerando a intensidade e duração desses eventos. A figura (a) representa a situação onde o estresse oxidativo é intenso, porém ocorre em um curto período de tempo. Em consequência disso, a proteção do tecido é proporcional em intensidade, porém ocorre de forma mais duradoura. Na figura (b) o estresse oxidativo ocorre com menor intensidade, porém durante um tempo maior, fazendo com que a proteção tecidual aconteça de forma menos eficiente.

Considerando o exposto anteriormente sugerimos que L-arginina atuou na via oxidante através da produção de substrato para a formação do peroxinitrito (135, 138). Nós sugerimos um aumento na produção desse oxidante concomitante a uma redução no seu tempo de ação (Figura 38). Por outro lado, o L-NAME eliminou a ação do ONOO^- em função da inibição do NO^* . Nesse sentido, sugerimos que a proteção do tecido é inversamente proporcional ao estresse oxidativo.

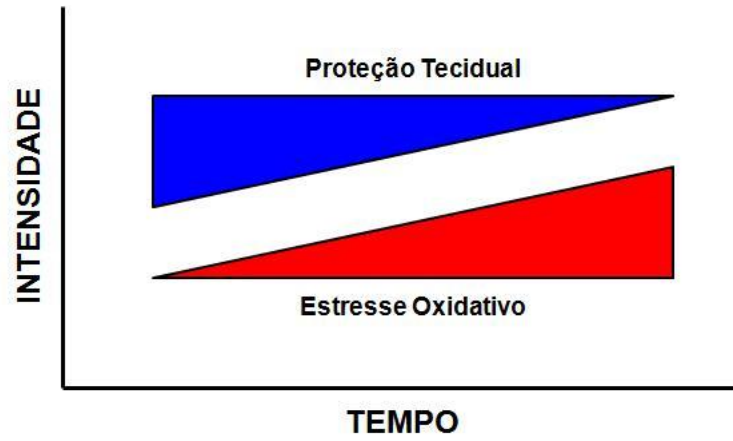


Figura 38. Relação da intensidade vs tempo entre os processos de estresse oxidativo e proteção tecidual 2. O estresse oxidativo (vermelho) é inversamente proporcional à proteção tecidual (azul). À medida que o estresse oxidativo aumenta em tempo e intensidade, a proteção tecidual diminui.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo comparamos os efeitos de duas drogas muito utilizadas para o estudo da via do NO[•] (L-NAME e L-arginina) com uma droga já conhecida como protetora do pulmão (NAC). Este é o primeiro estudo que inclui a participação do NO[•] em animais expostos à fumaça de cigarro em um modelo crônico. Apesar de termos conseguido um padrão histológico melhor do que o grupo FC com o uso do L-NAME e da L-arginina, não alcançamos um resultado tão bom quanto do grupo FC+NAC. Como utilizamos doses de L-NAME e L-arginina já descritas na literatura, sugerimos que estudos com doses mais altas podem indicar melhores resultados.

Em resumo, sugerimos que o L-NAME e a L-arginina tem um efeito protetor sobre a matriz extracelular do pulmão (via protease-antiprotease). Entretanto, a L-arginina também apresenta um efeito sobre a via oxidantes-antioxidantes, assim como a NAC. Porém, a NAC atua aumentando os níveis de glutathione, potente antioxidante que reduz a ação dos oxidantes, enquanto a L-arginina interfere aumentando a quantidade de oxidantes derivados do NO[•] concomitante a uma redução do tempo de ação. Além disso, a L-arginina aumenta a função endotelial favorecendo o influxo de células inflamatórias. Nesse sentido, a via do NO[•] poderia ser alvo de estudo mais aprofundado para fins terapêuticos na DPOC.

Concluimos que tanto o favorecimento para a produção e liberação do NO[•] através da administração da L-arginina quanto a inibição do NO[•] pela utilização do L-NAME foi eficiente na proteção pulmão com relação ao desenvolvimento do enfisema, apesar de ambas as drogas não atingirem um efeito melhor do que a NAC.

7. REFERÊNCIAS

1. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):373-85; discussion 94-5.
2. Perlstein TS, Lee RT. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Feb;26(2):250-6.
3. Balasubramanian VP, Varkey B. Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs. *Curr Opin Pulm Med.* 2006 Mar;12(2):106-12.
4. Drost EM, Skwarski KM, Sauleda J, Soler N, Roca J, Agusti A, et al. Oxidative stress and airway inflammation in severe exacerbations of COPD. *Thorax.* 2005 Apr;60(4):293-300.
5. Nenan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP. Macrophage elastase (MMP-12): a pro-inflammatory mediator? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Mar;100 Suppl 1:167-72.
6. Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev.* 2004 Dec;56(4):515-48.
7. Kinnula VL. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. *Thorax.* 2005 Aug;60(8):693-700.
8. Dekhuijzen PN. Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J.* 2004 Apr;23(4):629-36.
9. Levy RM, Prince JM, Billiar TR. Nitric oxide: a clinical primer. *Crit Care Med.* 2005 Dec;33(12 Suppl):S492-5.
10. Friebe A, Koesling D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res.* 2003 Jul 25;93(2):96-105.
11. Ziche M, Morbidelli L. Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol.* 2000 Oct-Nov;50(1-2):139-48.
12. Adams HR. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Vet Med Assoc.* 1996 Oct 1;209(7):1297-302.
13. Barrachina MD, Panes J, Esplugues JV. Role of nitric oxide in gastrointestinal inflammatory and ulcerative diseases: perspective for drugs development. *Curr Pharm Des.* 2001 Jan;7(1):31-48.
14. Gibaldi M. What is nitric oxide and why are so many people studying it? *J Clin Pharmacol.* 1993 Jun;33(6):488-96.
15. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 2001 Apr 27;88(8):756-62.
16. Shapira S, Kadar T, Weissman BA. Dose-dependent effect of nitric oxide synthase inhibition following transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res.* 1994 Dec 30;668(1-2):80-4.
17. Valenca SS, Pimenta WA, Rueff-Barroso CR, Ferreira TS, Resende AC, Moura RS, et al. Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide.* 2009 May;20(3):175-81.
18. Gately I. *La Diva Nicotina. The history of how tobacco seduced the world.* London: Simon and Schuster; 2001.
19. Routh HB, Bhowmik KR, Parish JL, Parish LC. Historical aspects of tobacco use and smoking. *Clin Dermatol.* 1998 Sep-Oct;16(5):539-44.
20. Musk AW, de Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology.* 2003 Sep;8(3):286-90.
21. Heiman RK. *Tobacco and Americans.* New York: McGraw-Hill; 1960.
22. Institute TT. *Tobacco: deeply rooted in American heritage.* Washington, DC; 1908.
23. Castiglioni A. The use of tobacco among American Indians. *Ciba Symp.* 1942:1426-35.
24. Cain AH. *Young people and smoking: The use and abuse of cigarette tobacco.* New York:John Day; 1964.
25. Goodman J. *Tobacco in history: The cultures of dependence.* New York:Routledge; 1993.

26. Glanz SA, Slade J, Bero LA, Hanaucer P, Barnes DE. The cigarette papers. Berkeley: University of California Press; 1996.
27. Winstanley M, Woodward S, Walker N. Tobacco in Australia. Facts and issues. Melbourne: Victorian Smoking and Health Program; 1995.
28. White C. Research on smoking and lung cancer: a landmark in the history of chronic disease epidemiology. *Yale J Biol Med.* 1990 Jan-Feb;63(1):29-46.
29. Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J.* 1950 Sep 30;2(4682):739-48.
30. Wynder EL, Graham EA. Tobacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma; a study of 684 proved cases. *J Am Med Assoc.* 1950 May 27;143(4):329-36.
31. Levin ML, Goldstein H, Gerhardt PR. Cancer and tobacco smoking; a preliminary report. *J Am Med Assoc.* 1950 May 27;143(4):336-8.
32. Hurt RD. Treat tobacco dependence and "bend the trend". *Bull World Health Organ.* 1999;77(5):367.
33. Ezzati M, Lopez AD. Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet.* 2003 Sep 13;362(9387):847-52.
34. Bank TW. Curbing the epidemic: governments and economics of tobacco control. Washington, DC; 1999.
35. Yach D, Wipfli H. A century of smoke. *Ann Trop Med Parasitol.* 2006 Jul-Sep;100(5-6):465-79.
36. Brasil MdS, Saúde OPd. Tabaco e pobreza, um ciclo vicioso - a convenção-quadro de controle do tabaco: uma resposta. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
37. World Health Organization - World health report 2008 [database on the Internet]. 2008 [cited. Available from: <http://www.who.int/whr/2008/en/index.html>].
38. Menezes AM, Jardim JR, Perez-Padilla R, Camelier A, Rosa F, Nascimento O, et al. Prevalence of chronic obstructive pulmonary disease and associated factors: the PLATINO Study in Sao Paulo, Brazil. *Cad Saude Publica.* 2005 Sep-Oct;21(5):1565-73.
39. Graaff VD. Human Anatomy. 6th ed. London: McGraw-Hill; 2002.
40. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
41. Moore KL, Dalley AF. Clinically oriented anatomy. 5th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2006.
42. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. 3th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.
43. Telser AG, Young JK, Baldwin KM. Elsevier's integrated histology. Philadelphia: Elsevier; 2007.
44. Snider GL, J. K, Thurlbeck WM, Bengali ZK. The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Division of Lung Diseases, Workshop. *Am Rev Respir Dis* 1985(132):182-5.
45. Wright JL, Churg A. Smoke-induced emphysema in guinea pigs is associated with morphometric evidence of collagen breakdown and repair. *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 1):L17-20.
46. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Apr;163(5):1256-76.
47. Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2002-4.
48. Barnes PJ. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med.* 2003;54:113-29.
49. Shapiro SD. The macrophage in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Nov;160(5 Pt 2):S29-32.
50. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharmacol Ther.* 2006 Aug;111(2):476-94.
51. Andrade Jr DR, Souza RB, Andrade DR. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *J Bras Pneumol.* 2005;31(1):60-8.

52. Mak JC. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 Apr;12(4):368-74.
53. Rajendrasozhan S, Yang SR, Edirisinghe I, Yao H, Adenuga D, Rahman I. Deacetylases and NF-kappaB in redox regulation of cigarette smoke-induced lung inflammation: epigenetics in pathogenesis of COPD. *Antioxid Redox Signal.* 2008 Apr;10(4):799-811.
54. Park HS, Kim SR, Lee YC. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology.* 2009 Jan;14(1):27-38.
55. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
56. Pryor WA, Prier DG, Church DF. Electron-spin resonance study of mainstream and sidestream cigarette smoke: nature of the free radicals in gas-phase smoke and in cigarette tar. *Environ Health Perspect.* 1983 Jan;47:345-55.
57. Levitz JS, Bradley TP, Golden AL. Overview of smoking and all cancers. *Med Clin North Am.* 2004 Nov;88(6):1655-75, xiii.
58. Fridovich I. Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:147-59.
59. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000 May;117(5 Suppl 1):303S-17S.
60. Vasconcelos SMI, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova.* 2007;30(5):1323-38.
61. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med.* 2001 Feb;7(2):55-62.
62. MacNee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(4):258-66; discussion 90-1.
63. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2005;2(1):50-60.
64. Macnee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med.* 2007 Sep;28(3):479-513, v.
65. Rahman I, Skwarska E, Henry M, Davis M, O'Connor CM, FitzGerald MX, et al. Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 1999 Jul;27(1-2):60-8.
66. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1977 Jun 25;1(6077):1645-8.
67. Lokke A, Lange P, Scharling H, Fabricius P, Vestbo J. Developing COPD: a 25 year follow up study of the general population. *Thorax.* 2006 Nov;61(11):935-9.
68. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000 Jul;109(1):33-44.
69. Cavarra E, Bartalesi B, Lucattelli M, Fineschi S, Lunghi B, Gambelli F, et al. Effects of cigarette smoke in mice with different levels of alpha(1)-proteinase inhibitor and sensitivity to oxidants. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Sep 1;164(5):886-90.
70. Evans MD, Pryor WA. Cigarette smoking, emphysema, and damage to alpha 1-proteinase inhibitor. *Am J Physiol.* 1994 Jun;266(6 Pt 1):L593-611.
71. Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev Bras Cienc Farm.* 2001;37(3):293-303.
72. Petersen DR, Doorn JA. Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med.* 2004 Oct 1;37(7):937-45.
73. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):715S-24S; discussion 24S-25S.
74. Barnes PJ. Role of HDAC2 in the pathophysiology of COPD. *Annu Rev Physiol.* 2009;71:451-64.
75. Kanazawa H, Yoshikawa J. Elevated oxidative stress and reciprocal reduction of vascular endothelial growth factor levels with severity of COPD. *Chest.* 2005 Nov;128(5):3191-7.
76. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J.* 2003 Oct;22(4):672-88.

77. Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, FitzGerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):240-7.
78. Shapiro SD. Evolving concepts in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2000 Dec;21(4):621-32.
79. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980 Nov 27;288(5789):373-6.
80. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Dec;84(24):9265-9.
81. Khan MT, Furchgott RF. Similarities of behaviour of nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in a perfusion cascade bioassay system. *Proc Fed Am Soc Exp Biol*. 1987;6:385.
82. Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB J*. 1993 Oct;7(13):1293-9.
83. Koshland DE, Jr. The molecule of the year. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1861.
84. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147 Suppl 1:S193-201.
85. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 Jun;43(2):109-42.
86. Mendes Ribeiro AC, Brunini TM, Ellory JC, Mann GE. Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2001 Mar;49(4):697-712.
87. Lane P, Gross SS. Cell signaling by nitric oxide. *Semin Nephrol*. 1999 May;19(3):215-29.
88. Ignarro LJ. Wei Lun Visiting Professorial Lecture: Nitric oxide in the regulation of vascular function: an historical overview. *J Card Surg*. 2002 Jul-Aug;17(4):301-6.
89. Huynh NN, Chin-Dusting J. Amino acids, arginase and nitric oxide in vascular health. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006 Jan-Feb;33(1-2):1-8.
90. Fan Chung K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):110-7.
91. Zimmermann N, Rothenberg ME. The arginine-arginase balance in asthma and lung inflammation. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):253-62.
92. Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*. 2004 Jul;84(3):731-65.
93. Reynaert NL, Ckless K, Wouters EF, van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Nitric oxide and redox signaling in allergic airway inflammation. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jan-Feb;7(1-2):129-43.
94. Fischer A, Folkerts G, Geppetti P, Groneberg DA. Mediators of asthma: nitric oxide. *Pulm Pharmacol Ther*. 2002;15(2):73-81.
95. James SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev*. 1995 Dec;59(4):533-47.
96. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990 Nov;101(3):746-52.
97. Szabo C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. *New Horiz*. 1995 Feb;3(1):2-32.
98. Barnes PJ. Future treatments for chronic obstructive pulmonary disease and its comorbidities. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Dec 1;5(8):857-64.
99. de Boer WI, Yao H, Rahman I. Future therapeutic treatment of COPD: struggle between oxidants and cytokines. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2(3):205-28.
100. Adcock IM, Barnes PJ. Molecular mechanisms of corticosteroid resistance. *Chest*. 2008 Aug;134(2):394-401.
101. Kasielski M, Nowak D. Long-term administration of N-acetylcysteine decreases hydrogen peroxide exhalation in subjects with chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2001 Jun;95(6):448-56.

102. De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Pela R, et al. Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD. *Pulm Pharmacol Ther.* 2005;18(1):41-7.
103. Decramer M, Rutten-van Molken M, Dekhuijzen PN, Troosters T, van Herwaarden C, Pellegrino R, et al. Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2005 Apr 30-May 6;365(9470):1552-60.
104. Macnee W, Rahman I. Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Nov;160(5 Pt 2):S58-65.
105. Martorana PA, Beume R, Lucattelli M, Wollin L, Lungarella G. Roflumilast fully prevents emphysema in mice chronically exposed to cigarette smoke. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Oct 1;172(7):848-53.
106. Domej W, Foldes-Papp Z, Flogel E, Haditsch B. Chronic obstructive pulmonary disease and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol.* 2006 Apr;7(2):117-23.
107. Barber R, Baillie GS, Bergmann R, Shepherd MC, Sepper R, Houslay MD, et al. Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Aug;287(2):L332-43.
108. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. *Am J Clin Nutr.* 1998 Aug;68(2):319-27.
109. Valenca SS, Bezerra FS, Romana-Souza B, Paiva RO, Costa AM, Porto LC. Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. *J Nutr Biochem.* 2008 Sep;19(9):604-11.
110. Marrades RM, Roca J, Barbera JA, de Jover L, MacNee W, Rodriguez-Roisin R. Nebulized glutathione induces bronchoconstriction in patients with mild asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Aug;156(2 Pt 1):425-30.
111. Bridgeman MM, Marsden M, Selby C, Morrison D, MacNee W. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax.* 1994 Jul;49(7):670-5.
112. Antonicelli F, Parmentier M, Drost EM, Hirani N, Rahman I, Donaldson K, et al. Nacystelyn inhibits oxidant-mediated interleukin-8 expression and NF-kappaB nuclear binding in alveolar epithelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2002 Mar 15;32(6):492-502.
113. Gillissen A, Jaworska M, Orth M, Coffiner M, Maes P, App EM, et al. Nacystelyn, a novel lysine salt of N-acetylcysteine, to augment cellular antioxidant defence in vitro. *Respir Med.* 1997 Mar;91(3):159-68.
114. Nagy AM, Vanderbist F, Parij N, Maes P, Fondu P, Neve J. Effect of the mucoactive drug nacystelyn on the respiratory burst of human blood polymorphonuclear neutrophils. *Pulm Pharmacol Ther.* 1997 Oct-Dec;10(5-6):287-92.
115. Rahman I, Kilty I. Antioxidant therapeutic targets in COPD. *Curr Drug Targets.* 2006 Jun;7(6):707-20.
116. Valenca SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004 May-Jun;32(3):351-6.
117. Valenca SS, Silva Bezerra F, Lopes AA, Romana-Souza B, Marinho Cavalcante MC, Lima AB, et al. Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. *Environ Res.* 2008 Oct;108(2):199-204.
118. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, Gonzalez-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest.* 2004 Apr;125(4):1500-6.
119. Valenca SS, Porto LC. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke*. *J Bras Pneumol.* 2008 Oct;34(10):787-95.

120. Castro P, Legora-Machado A, Cardilo-Reis L, Valenca S, Porto LC, Walker C, et al. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur J Pharmacol*. 2004 Sep 13;498(1-3):279-86.
121. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*. 1987;32:279-312.
122. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
123. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Sep-Oct;8(9-10):1865-79.
124. Rahman I, Biswas SK, Kode A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. *Eur J Pharmacol*. 2006 Mar 8;533(1-3):222-39.
125. Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T, Fujikura T. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem*. 1983 Jul 15;132(2):345-52.
126. Verdon CP, Burton BA, Prior RL. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by NADP+ when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Anal Biochem*. 1995 Jan 20;224(2):502-8.
127. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med*. 1991 Sep 30;91(3C):2S-13S.
128. Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science*. 1981 May 22;212(4497):925-7.
129. Rahman I, MacNee W. Role of transcription factors in inflammatory lung diseases. *Thorax*. 1998 Jul;53(7):601-12.
130. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):2234-42.
131. Rahman I, MacNee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(5):669-81.
132. Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease. *Am J Physiol*. 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1067-88.
133. Shapiro SD, Goldstein NM, Houghton AM, Kobayashi DK, Kelley D, Belaaouaj A. Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Am J Pathol*. 2003 Dec;163(6):2329-35.
134. Ghezzi P, Bonetto V, Fratelli M. Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2005 Jul-Aug;7(7-8):964-72.
135. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(4):1620-4.
136. O'Donnel VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001;88:12-21.
137. Oeckler RA, Wolin MS. New concepts in vascular nitric oxide signaling. *Curr Atheroscler Rep*. 2000 Sep;2(5):437-44.
138. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 1992 Dec 18;258(5090):1898-902.

8. ANEXOS

8.1 Produção Científica Durante o Período do Doutorado