

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO PULMONAR SOBRE COMPORTAMENTO EM
RATOS WISTAR EXPOSTOS À FUMAÇA DE CIGARRO**

Aluna: Máira Tereza Talma Chírco

Ouro Preto
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Influência da inflamação pulmonar sobre comportamento em ratos wistar
expostos à fumaça de cigarro**

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Orientador

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Coorientador

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

Ouro preto
2017

C445i

Chirico, Máira Tereza Talma.

Influência da inflamação pulmonar sobre comportamento em ratos wistar expostos à fumaça de cigarro [manuscrito] / Máira Tereza Talma Chirico. 2017. xiv, 75f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.
Coorientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Cigarros. 2. Inflamação. 3. Nicotina. 4. Ansiedade. I. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de . II. Bezerra, Frank Silva . III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 616.24-002

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

" Influência da inflamação pulmonar sobre comportamento em ratos wistar expostos à fumaça de cigarro".

Aos quinze dias do mês de março de 2017, às 09 horas, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Maira Tereza Talma Chirico**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Daniela Caldeira Costa
Examinadora (UFOP)

Prof.ª Dr.ª Daniele Cristina de Aguiar
Examinadora (UFMG)

Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 15/03/2017

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I - Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.408-000 - Ouro Preto - MG - Brasil Tel. 55 (31) 3500-1001
E-mail: ebiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/ebiol



APOIO FINANCEIRO

Este Trabalho foi realizado no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular** e no **Laboratório de Fisiopatologia Experimental** do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com auxílio da CAPES, CNPQ, FAPEMIG e UFOP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me guiar durante toda essa jornada; À minha mãe Edinéia, a melhor do mundo, que sempre lutou e acreditou nos meus sonhos mais que eu, por ser tão companheira, protetora e carinhosa; À minha irmã Mariana, pela cumplicidade, exemplo, amizade e admiração; Aos meus sobrinhos Arthur e Pedro, amor além da vida; Ao meu cunhado Marcelo, pela confiança e proteção; Ao Bruno, por ser um companheiro inigualável, por todo amor e por fazer parte da minha vida, você sabe que eu não conseguiria sem a sua enorme ajuda! Amo muito todos vocês!

Ao meu orientador Rodrigo, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, me incentivando e colaborando no desenvolvimento de minhas (nossas) ideias; por acreditar no meu potencial e por ter sido além de melhor orientador, um amigo. Serei eternamente grata;

Ao meu coorientador Frank, pelos ensinamentos e acréscimos a esse trabalho; por me acolher em sua equipe e me considerar parte dela;

Ao meu colaborador Deoclecio Chianca, por tanto incentivo, carinho e atenção a suas alunas;

A toda equipe LFC por ter se tornado uma família; por compartilhar tanto aprendizado e amizade; por ter sido essencial na execução e concretização deste trabalho. Em especial Glenda, Fernanda, Sylvana, Laura, Paulo, Franciny, Thayane, Aline Rezende, Aline Maria, Luís Henrique, Thayanne, Sr. Milton e Marli;

Ao LAFEx por ser minha segunda equipe, por me acolher tão bem no laboratório e colaborar muito neste trabalho, obrigada pelos ensinamentos. Em especial Keila, Mônica, Camila, Natália, Clarice, Thalles, Pâmela, Pedro Jr. e profª Silva Cangussú;

Às amigas Mariana Guedes e Ana Beatriz Farias por serem fiéis companheiras, cada uma a sua forma, desde o início dessa jornada;

Ao LIP-UFOP (Prof Luis Carlos Crocco, Amanda Figueiredo; e equipe); à Ana Carolina Silveira Rabelo e diversos outros laboratórios pela imensa disponibilidade, ensinamento e empréstimo de equipamentos;

A UFOP, por me proporcionar ainda mais conhecimento e orgulho de fazer parte dessa Instituição;

As professoras da banca examinadora, Prof^a Daniela Calsavara e Prof^a Daniele de Aguiar, por aceitar o convite, pela disponibilidade e contribuições a este trabalho;

À Ouro Preto pelos melhores anos da minha vida, por me fazer crescer e conhecer pessoas incríveis, por me proporcionar o espírito republicano;

A República Além da Lenda e respectivas lendárias, por serem minha companhia e conforto, afinal “Reza a lenda quem ninguém é feliz sozinho...” e de fato não é mesmo. Em especial as grandes amigas Infinity, Paulinha, Carol e Guilhotina que compartilharam de perto todo meu esforço e torceram pela minha vitória;

Aos meus amigos de Ubá, por todo carinho e por me fazerem acreditar que verdadeiras amizades duram uma vida toda independente da distância, em especial Mateus e Camila;

A TODOS que de alguma forma torceram por mim, torceram para que eu chegasse até aqui e para que eu vá ainda muito longe. OBRIGADA!!!

RESUMO

A fumaça de cigarro (FC) é uma combinação complexa, que contém mais de 7.000 substâncias químicas, as quais podem promover dano oxidativo no parênquima pulmonar e processo inflamatório. É importante ressaltar que a inflamação pulmonar leva a ativação de neurônios no sistema nervoso central. Entretanto, os mecanismos neurais implícitos e a relação da inflamação pulmonar com o comportamento do tipo pânico e ansiedade não é ainda claro. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência da inflamação pulmonar no comportamento de ansiedade de animais expostos à fumaça do cigarro com e sem tabaco. Vinte e quatro ratos Wistar machos (protocolo nº 2015/35) foram divididos em três grupos: grupo controle (GC); cigarro comum (CC) e cigarro de papel (CP), sem tabaco (por conseguinte, sem nicotina). Os animais foram expostos a doze cigarros por dia em três períodos (manhã, tarde e noite), durante oito dias consecutivos. Além da exposição à FC, os animais foram submetidos a testes comportamentais: Labirinto em T elevado e Campo aberto. Os animais foram eutanasiados para retirada do lavado broncoalveolar (LBA), do sangue e pulmão. O LBA foi usado para contagem total, diferencial de células e para a dosagem de citocinas pró-inflamatórias; o plasma sanguíneo foi analisado para dosagem de citocinas; e o pulmão foi usado para dosagem das Proteínas totais, sistema Glutationa, enzimas antioxidantes: SOD e CAT, TBARS e proteína carbonilada. A exposição à fumaça do CC reduziu os comportamentos do tipo ansiedade e pânico. Por outro lado, o CP induziu comportamento do tipo ansiedade e pânico. Os animais expostos a FC comum e de papel apresentaram um aumento do influxo de células inflamatórias (CC: $170 \pm 3,162 \times 10^3/\text{ml}$ e CP: $180 \pm 6,547 \times 10^3/\text{ml}$ vs. GC: $118 \pm 6,665 \times 10^3/\text{ml}$); aumento da atividade das enzimas antioxidantes: SOD (CC: $34,86 \pm 1,855 \text{ U/mg prot}$ e CP: $40,65 \pm 3,444 \text{ U/mg prot}$ vs. GC: $25,73 \pm 1,092 \text{ U/mg prot}$) e CAT (CC: $0,96 \pm 0,06 \text{ U/mg prot}$ e CP: $0,94 \pm 0,10 \text{ U/mg prot}$ vs. GC: $0,68 \pm 0,10 \text{ U/mg prot}$). A exposição também gerou dano pulmonar como demonstrado pelo aumento dos níveis de TBARS (CC: $1,39 \pm 0,15 \text{ nM/mg prot}$ e CP: $1,54 \pm 0,10 \text{ nM/mg prot}$ vs. GC: $1,02 \pm 0,05 \text{ nM/mg prot}$) e redução da razão GSH/GSSG (CC: $4,016 \pm 0,5503 \mu\text{M}$ e CP: $3,316 \pm 0,8901 \mu\text{M}$ vs. GC: $7,283 \pm 0,6019, \mu\text{M}$). Além da análise estereológica dos cortes de pulmão, que evidenciaram alteração da histoarquitetura por meio do aumento do volume do espaço alveolar (CC: $57,46 \pm 1,92 \text{ \%/mm}^2$ e CP: $53,40 \pm 1,83 \text{ \%/mm}^2$ vs. GC: $43,36 \pm 3,46 \text{ \%/mm}^2$) e redução do volume do septo alveolar (CC: $41,60 \pm 1,95 \text{ \%/mm}^2$ e CP: $46,21 \pm 1,85 \text{ \%/mm}^2$ vs. GC: $55,28 \pm 3,52 \text{ \%/mm}^2$) nos animais expostos. A exposição à fumaça do cigarro comum bem como a do cigarro de papel (sem tabaco) conduziu igualmente a processo inflamatório e dano pulmonar, que pode promover alteração de comportamento do tipo pânico e ansiedade.

Palavras chave: Fumaça de cigarro. Inflamação. Comportamento.

ABSTRACT

Cigarette smoke (CF) is a complex combination that contains more than 7,000 chemicals, which can promote oxidative damage to the lung parenchyma and inflammatory process. It is important to emphasize that pulmonary inflammation leads to the activation of neurons in the central nervous system. However, the neural mechanisms implicit and the relationship between lung inflammation and panic and anxiety behavior are not clear. The aim of the present study was to evaluate the influence of pulmonary inflammation on anxiety behavior of animals exposed to cigarette smoke with and without tobacco. Twenty-four male Wistar rats (protocol n. 2015/35) were divided into three groups: control group (CG); Common cigarette (CC) and paper cigarette (CP), without tobacco (therefore without nicotine). The animals were exposed to twelve cigarettes per day in three periods (morning, afternoon and night) for eight consecutive days. In addition to CF exposure, the animals were submitted to behavioral tests: Elevated T-maze and open field. The animals were euthanized for removal of bronchoalveolar lavage (BAL), blood and lung. LBA was used for total count, cell differential and for the measurement of pro-inflammatory cytokines; Blood plasma was analyzed for cytokine dosing; And the lung was used for dosage of the total Proteins, Glutathione system, antioxidant enzymes: SOD and CAT, TBARS and carbonylated protein. Exposure to CC smoke reduced anxiety and panick-like behaviors. On the other hand, CP induced panic and anxiety behaviors. Animals exposed to common and paper CF showed an increase in influx of inflammatory cells (CC: $170 \pm 3.162 \times 10^3/\text{ml}$ and CP: $180 \pm 6.547 \times 10^3/\text{ml}$ vs. CG: $118 \pm 6.665 \times 10^3/\text{ml}$); increased activity of antioxidant enzymes: SOD (CC: $34.86 \pm 1.855 \text{ U/mg prot}$ and CP: $40.65 \pm 3.444 \text{ U/mg prot}$ vs. CG: $25.73 \pm 1.092 \text{ U/mg prot}$) and CAT (CC : $0.96 \pm 0.06 \text{ U/mg prot}$ and CP: $0.94 \pm 0.10 \text{ U/mg prot}$ vs. CG: $0.68 \pm 0.10 \text{ U/mg prot}$). The exposure also generated lung damage as demonstrated by increased TBARS levels (CC: $1.39 \pm 0.15 \text{ nM/mg prot}$ and CP: $1.54 \pm 0.10 \text{ nM/mg prot}$ vs. GC: $1.02 \pm 0.05 \text{ nM/mg prot}$) and reduction of the ratio GSH/GSSG (CC: $4.016 \pm 0.5503 \mu\text{M}$ and CP: $3.316 \pm 0.8901 \mu\text{M}$ vs. GC: $7.283 \pm 0.6019 \mu\text{M}$). In addition to the stereological analysis of the lung sections, which also showed alteration of histoarchitecture by increasing the volume of the alveolar space (CC: $57.46 \pm 1.92\%/\text{mm}^2$ and CP: $53.40 \pm 1.83\%/\text{mm}^2$ Vs. GC: $43.36 \pm 3.46\%/\text{mm}^2$) and alveolar septal volume reduction (CC: $41.60 \pm 1.95\%/\text{mm}^2$ and CP: $46.21 \pm 1.85\%/\text{mm}^2$ vs. GC: $55.28 \pm 3.52\%/\text{mm}^2$) in the exposed animals. Exposure to common cigarette smoke as well as paper cigarettes (without tobacco) led to an inflammatory process and lung damage, probably leading to a change in panic and anxiety behaviors.

Keywords: Cigarette smoke. Inflammation. Behavior.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Curva padrão de albumina.....	36
Quadro 2. Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão.....	38
Quadro 3. Reagentes utilizados para a dosagem.....	38
Quadro 4. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido Dismutase.....	39
Tabela 1. Hemograma.....	45
Tabela 2. Análise morfológica do pulmão.....	49
Tabela 3. Análise bioquímica de homogenato de pulmão.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da Câmara de Inalação.....	29
Figura 2. LTE (Insight ®) aparato utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga.....	31
Figura 3. Esquema do Campo aberto.....	32
Figura 4. Peso corporal.....	44
Figura 5. Quantificação de monócitos, linfócitos e neutrófilos no sangue.....	46
Figura 6. Percentagem de macrófagos, linfócitos e neutrófilos no LBA.....	47
Figura 7. Fotomicrografias de seções pulmonares.....	48
Figura 8. Teste de esquiva inibitória no LTE.....	52
Figura 9. Teste de pânico no LTE.....	53
Figura 10. Teste de atividade locomotora no CA.....	54
Figura 11. Concentração de citocinas no LBA.....	55
Figura 12. Concentração de citocinas no plasma.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- (NO•)- Óxido nítrico
(O₂•-)- Superóxido
(OH•)- Radical hidroxila
(ONOO-)- Ânion peroxinitrito
BHT-Butil hidroxitolueno
BSA- Albumina do soro bovino
butil hidroxitolueno (BHT)
CA- Campo aberto
CAT- Catalase
CC- Cigarro Comum
CO- Monóxido de carbono
CP- Cigarro de Papel
DNTB- ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
DPOC - Doença pulmonar Obstrutiva crônica
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EDTA- etilenodiamino tetra-acético
ELISA- Ensaio imunoenzimático
EROs - Espécies reativas de oxigênio
Esq 1- Esquiva 1.
Esq 2- Esquiva 2
F1- Fuga 1
F2- Fuga 2
F3- Fuga 3
FC- Fumaça de cigarro
GC- Grupo controle
GPx- Glutaciona peroxidase
GSH-Glutaciona reduzida
GSSG- Glutaciona oxidada
H₂O₂- Peróxido de hidrogênio
HCl- ácido clorídrico

HE- com hematoxilina e eosina
IL-1 β - Interleucina 1 beta
IL-6- interleucina 6
KH₂PO₄- Fosfato monopotássico
LB- Linha de base.
LBA- Lavado broncoalveolar
LCE- Labirinto em cruz elevado
LTE- Labirinto em T elevado
malondialdeído (MDA
Na₂HPO₄- Fosfato dissódico
NaOH- Hidróxido de sódio
NTS- Núcleo do trato solitário
PBS- Tampão fosfato salino
Peróxido de hidrogênio (H₂O₂
POMC- opiomelanocortina
ppm- parte por milhão
Prot- proteína
Pt-Pontos do sistema teste
RL- Radical livre
SDS- Dodecil sulfato de sódio
Seg- segundos
SNC- sistema nervoso central
SOD- Superóxido dismutase
SSA- ácido sulfosalicílico
TBARs- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA- Ácido tricloroacético
TEA -Trietanolamina
TNB - Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
U- Unidade
Vs- versus
Vva- espaços alveolares
Vvsa - volume dos septos alveolares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. Cigarro.....	15
1.1.1. Nicotina	16
1.2. Inflamação, cigarro e Estresse oxidativo	17
1.3. Inflamação e sistema nervoso central	20
1.4. Comportamento.....	22
1.4.1. Ansiedade	22
1.4.2. Teste comportamental.....	23
1.4.2.1. Labirinto em T Elevado (LTE)	23
2. JUSTIFICATIVA.....	24
3. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo geral	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Animais.....	27
4.2. Delineamento experimental.....	27
4.2.1. Grupos experimentais	27
4.2.2. Exposição à fumaça de cigarro	27
4.2.2.1. Cigarro Comum (CC)	28
4.2.2.2. Cigarro de Papel (CP).....	29
4.2.3. Teste comportamental.....	30
4.2.3.1. Labirinto em T Elevado	30
4.2.3.2. Campo Aberto.....	31
4.3. Coleta do sangue	32
4.4. Esfregaço sanguíneo.....	32
4.5. Lavado Broncoalveolar (LBA).....	33
4.5.1. Contagem total de células em câmara de Neubauer	33
4.5.2. Contagem diferencial	34
4.6. Processamento tecidual	34
4.7. Análise morfométrica – Estereologia	35

4.8.	Homogeneizado Pulmonar	35
4.9.	Dosagem de enzimas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo	35
4.9.1.	Proteínas Totais Bradford	35
4.9.2.	Atividade da Catalase (CAT)	36
4.9.3.	Glutathiona Total	37
4.9.4.	Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	39
4.9.5.	Proteína carbonilada	40
4.9.6.	TBARS	40
4.10.	Dosagem de citocinas	41
4.11.	Análises estatísticas	42
5.	RESULTADOS	43
5.1.	Peso corporal dos animais no início e no final da exposição	43
5.2.	Hemograma	44
5.3.	Diferenciação do perfil celular sanguíneo	46
5.4.	Análise do influxo de leucócitos e do perfil celular inflamatório do LBA	47
5.5.	Morfologia dos cortes histológicos de pulmão	48
5.6.	Análise bioquímica dos homogenatos de pulmão	49
5.7.	Teste comportamental	51
5.7.1.	Esquiva inibitória avaliada no Labirinto em T elevado	51
5.7.2.	Teste de fuga avaliada no Labirinto em T elevado	52
5.7.3.	Atividade locomotora avaliada no Campo Aberto	53
5.8.	Análises das citocinas inflamatórias	54
6.	DISCUSSÃO	55
7.	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS:	65
	ANEXO	75

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cigarro

A epidemia do tabagismo promove elevado número de mortes ao ano, cerca de seis milhões de pessoas, incluindo tanto fumantes passivos como ativos. A Organização Mundial de Saúde considera o óbito por uso do tabaco uma das mais importantes causas evitáveis de morte no mundo, e que métodos de prevenção são cruciais para garantia de saúde (Who, 2015).

A destilação e combustão dos constituintes do cigarro promovem a formação da fumaça que pode ser dividida em duas fases, a de partículas que é composta, sobretudo de alcatrão, água e nicotina e a fase gasosa constituída por monóxido de carbono, dióxido de carbono, cianeto dentre outros componentes químicos (United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General., 2010; Cantin e Richter, 2012).

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa composta por mais de 7.000 mil constituintes (United States. Public Health Service. Office of the Surgeon General., 2010), incluindo substâncias cancerígenas, mutagênicas e causadoras de tumor, sendo essas: fenóis, semiquinonas, superóxidos, epóxidos, peróxidos, oxido nítrico, dióxido de nitrogênio, peroxinitrito e peroxinitrato (Humans, 2004; Hecht, 2012; Ntp, 2014). Diversos estudos evidenciam que a inalação desses produtos tóxicos induz o desenvolvimento de várias doenças, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema, asma, câncer, doença cardiovascular, infecções respiratórias, acidente vascular, dentre outras (Kim *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). Ao atingir o pulmão a fumaça de cigarro desencadeia um processo inflamatório de recrutamento celular, peroxidação lipídica, produção de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Valenca, Bezerra, *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013; Pena *et al.*, 2016).

A exposição à fumaça do cigarro quando passiva é considerada uma exposição ambiental (involuntária) por indivíduos não tabagistas. Tal fumaça possui milhares de substâncias tóxicas tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, formaldeído, amônia, nitrosaminas dentre outros (Inca, 2008; 2009).

A queima do cigarro e a fumaça proveniente liberada no meio ambiente produz dois tipos de fumaça: a principal (10 a 20%) e a lateral (80 a 90%), sendo a principal aquela tragada diretamente pelo fumante e a lateral liberada na ponta do cigarro quando aceso. Por mais prejudicial que a inalação direta da fumaça de cigarro pelo fumante ativo seja significativa, a fumaça lateral possui uma maior toxicidade e níveis mais elevados de monóxido de carbono, amônia, nicotina e outras substâncias cancerígenas presentes no cigarro (Mello, 2005).

Dados clínicos e epidemiológicos indicam associação entre o alto consumo de tabaco e potencial susceptibilidade a sintomas depressivos e desordens psicológicas, que é sugerido ser o maior fator de relevância para prejudicar a cessação do tabagismo e induzir os sintomas de abstinência (Weinberger *et al.*, 2016).

1.1.1. Nicotina

A nicotina, princípio ativo do tabaco, é um alcaloide (substância orgânica nitrogenada) presente em concentrações variadas nos diferentes tipos de cigarro, com efeito sobre atividade psíquica ou mental, tais como euforia, excitação, redução do estresse e ansiedade, melhora cognitiva (Yuan *et al.*, 2015).

É o objeto principal de estudo do cigarro devido à hipótese de promover alterações comportamentais. Comumente, em estudos de modelo animal a nicotina é avaliada de forma isolada (Donny *et al.*, 1995; Stolerman e Jarvis, 1995), contudo, estudos mais recentes procuraram avaliar os efeitos da nicotina juntamente com os demais componentes do cigarro, confirmando a influência de ambos no comportamento de ansiedade (Abreu-Villaca *et al.*, 2015).

Constituindo-se de uma droga de alta absorção, uma vez inalada atinge os pulmões, entra em contato com a circulação e chega rapidamente ao cérebro. Implica-se que uma rápida administração dessa droga proporciona vulnerabilidade a dependência e promove plasticidade neurocomportamental (Samaha *et al.*, 2005). A droga age nos receptores colinérgicos nicotínicos do cérebro promovendo liberação de dopamina e outros neurotransmissores (Benowitz, 2010).

Em humanos, a nicotina é apreciada particularmente pelos seus efeitos psicoativos. Não obstante, quando administrada de forma aguda em roedores a

nicotina altera vários processos fisiológicos, dentre eles a nocicepção, comportamento do tipo ansiedade, locomoção e pode levar a dependência física por parte do animal (Decker *et al.*, 1995; Abreu-Villaca *et al.*, 2015).

Os sintomas iniciais do uso da nicotina são comumente desagradáveis, como tontura, mal-estar e enjoo, entretanto a exposição repetida promove neuroadaptações aos efeitos da nicotina (Wang e Sun, 2005). O uso contínuo causa dependência e, quando interrompido, o desejo de retomada é recorrente, permanecendo presente por um longo período como sintoma de abstinência (Benowitz, 2010).

A redução do teor de nicotina no tabaco partiu da hipótese de que atingir um limiar inferior à dependência da mesma, poderia proporcionar menos malefício à saúde (Benowitz e Henningfield, 1994; 2013).

A cessação do uso do tabaco pode ocasionar irritabilidade, alteração de humor e ansiedade; e a nicotina por si só é considerada responsável por diminuir o estresse, a ansiedade, além de induzir sentimento de prazer, sendo esses poderosos incentivos para a continuidade do uso do tabaco (Hughes e Hatsukami, 1986).

1.2. Inflamação, cigarro e Estresse oxidativo

A inflamação pulmonar é um processo imunológico estimulado por diversos agentes patológicos e fatores ambientais, dentre eles a fumaça de cigarro (FC). A ativação de mediadores inflamatórios, estimulados pela inalação a FC, promove vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, facilitando assim o extravasamento e a locomoção de células do sistema imunológico para o tecido inflamado, a fim de eliminar ou reduzir a causa dessa lesão. Dentre essas células estão presentes macrófagos, neutrófilos e linfócitos, cada um sendo recrutado de acordo com o tipo de resposta (aguda ou crônica) e grau de dano ocasionado (Tashkin e Murray, 2009; Campos *et al.*, 2013; Parikh *et al.*, 2016; Pena *et al.*, 2016).

A via respiratória por meio de sua exposição contínua é um potencial alvo a antígenos e patógenos existentes no meio ambiente, com isso, existem mecanismos específicos e inespecíficos de defesa que promovem a proteção ou remoção desses agentes invasores (Misharin *et al.*, 2013). A barreira epitelial presente nas vias aéreas é a primeira proteção, uma vez que o agente agressor consegue ultrapassá-la, o

organismo estabelece um influxo de células para combatê-lo (Adler e Li, 2001; Wong *et al.*, 2016).

O efeito da exposição à FC no processo inflamatório varia de acordo com o tempo de exposição e o número de cigarros inalados. A resposta inflamatória diverge entre a fase aguda e crônica, na aguda, período curto de exposição, há um influxo migratório de neutrófilos (leucócito polimorfonuclear) para os pulmões sendo os primeiros agentes defensores, essas células produzem espécies reativas de oxigênio que agem contra a inflamação ocasionada (Hoenderdos e Condliffe, 2013; Meijer *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2016). A inflamação crônica ocorre após exposição prolongada e persistente a um agente potencialmente tóxico, o influxo migratório é de células mononucleares (inflamação ativa). Os macrófagos, uma vez ativados, podem levar a destruição tecidual e fibrose que caracterizam esse tipo de inflamação. Além disso, essas células também podem produzir citocinas, principalmente IL-1 e TNF, que prolongam a resposta inflamatória por recrutarem leucócitos (Cotran., 2005).

O consumo do cigarro causa maior liberação de lisossomas que por si só promove a secreção de diversas substâncias como: metabólitos do ácido araquidônico; citocinas como: IL-1 β , IL-6 e TNF dentre outras; metabólitos do oxigênio como as enzimas metaloproteinases e elastases; óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Citocinas e quimiocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 beta (IL-1 β), produzidas por células epiteliais e inflamatórias, possuem um papel crucial, visto que estimulam o influxo e ativação de outras células imunes (Rufino e Lapa E Silva, 2006; Mills e Dunne, 2009; Striz *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016).

Os neutrófilos por liberarem a enzima que degrada elastina (elastase), foram considerados os primeiros mediadores do enfisema pulmonar induzido, que tem como principal causa o tabagismo. A elastina é o componente proteico principal da matriz extracelular dos pulmões, uma vez degradada promove dano direto no pulmão e perda parcial da funcionalidade. Essa teoria surgiu da confirmação que a deficiência genética da 1-antitripsina (glicoproteína), responsável por inibir a ação proteolítica da elastase neutrofílica, conduzia a enfisema pulmonar em jovens não tabagistas (Lee e Yang, 2012; Laurell e Eriksson, 2013).

É sabido que o tabagismo promove um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes podendo levar a um estresse oxidativo tanto nos pulmões como

sistemicamente. O grau de desequilíbrio varia de acordo com o tempo de exposição à FC, a quantidade de cigarros consumidos e o número de tragadas em cada cigarro (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Valença, Silva Bezerra, *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2015; Pena *et al.*, 2016). Esses oxidantes presentes no cigarro podem ocasionar dano nas células e tecidos, prejudicar os mecanismos de defesa do organismo e dar início ao processo inflamatório (Fischer *et al.*, 2015). Além disso, o consumo de cigarro promove também aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio das células inflamatórias, principalmente fagócitos (Reddy, 2008).

Os radicais livres (RL) não devem ser confundidos com EROs. Radicais livres são espécies altamente reativas com elétrons desemparelhados na última camada, já EROs não possuem elétrons desemparelhados, mas também são reativos. Dentre estas EROs estão o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o óxido nítrico (NO^{\bullet}) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), espécies produzidas potencialmente no processo inflamatório provocado pela exposição a FC (Campos *et al.*, 2013; Lushchak, 2015).

A ideia peculiar e de tempos remotos que essas EROs afetam apenas negativamente o organismo, deve ser abolida (Durackova, 2010; Lushchak, 2015). As espécies reativas de oxigênio são produzidas não só por meio da inflamação e exposição a agentes físicos, químicos e ambientais (FC), mas também através de condições fisiológicas normais do organismo (metabolismo celular aeróbio) e são essenciais para a vida (Durackova, 2010; Lima *et al.*, 2015).

O estresse oxidativo foi definido pela primeira vez por H. Sies em 1985 como o desbalanço na produção de espécies reativas de oxigênio em detrimento dos sistemas de defesa antioxidante perturbando e promovendo danos ao organismo. Após diversas novas pesquisas Lushchak em 2015 relacionou a intensidade do estresse com as vias de sinalização e o desfecho fisiológico, propôs uma nova definição onde o aumento exacerbado da geração de EROs pode promover diversos processos perturbadores na célula que levam a perda de função da mesma e possível morte por necrose ou apoptose. Essa nova definição enfatiza a implicação das EROs sobre os processos celulares (Sies, 1985; Lushchak, 2015).

A exposição à FC induz processo inflamatório e dano oxidativo observado em estudos por meio do influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar,

aumento da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) e alteração da atividade de enzimas antioxidantes. Frente a esse desequilíbrio, o organismo promove diversas alterações tanto a nível celular como enzimático com o propósito comum de evitar ou reduzir ao máximo possível o dano e o processo inflamatório causado pela exposição (Castro *et al.*, 2004; Silva Bezerra *et al.*, 2006; Valenca, Bezerra, *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013).

O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático e não enzimático e age de forma a combater e/ou reduzir a exacerbação das EROs, evitando seus potenciais efeitos deletérios. Além disso, uma vez produzidas em excesso as EROs, o sistema pode agir de forma a evitar sua ação ou ainda assim, atuar reparando os danos ocasionados pelas mesmas. Tal sistema enzimático é composto pela Superóxido dismutase (SOD) que catalisa a dismutação do superóxido, Catalase (CAT) e Glutathione peroxidase (GPx) que catalisa a conversão da molécula de peróxido de hidrogênio em água (Mccord e Fridovich, 1969; Clarkson e Thompson, 2000; Nordberg e Arner, 2001; Lushchak, 2015). A ação dessas enzimas, com o auxílio de outras moléculas (GSH,GR) e vias (NADPH), evita a formação do radical hidroxila, o qual não possui um sistema enzimático contra ele (Lushchak, 2015). O sistema não enzimático é composto por diversas substâncias antioxidante, que comumente são adquiridas através da dieta (Valenca, Bezerra, *et al.*, 2008).

1.3. Inflamação e sistema nervoso central

O processo inflamatório promove ativação imune broncopulmonar e dependendo da intensidade dessa e ausência de resposta anti-inflamatória, pode desencadear doença pulmonar. Uma questão pouco explorada que artigos vêm sugerindo ser de grande importância, é a via que sinaliza para o sistema nervoso central (SNC) o processo inflamatório pulmonar quando ocasionado, dando maior foco nas vias de sinalização vagal e da coluna vertebral aferente (Hale *et al.*, 2012).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas ou brônquios. Um estudo realizado com camundongos, modelo ideal de indução da asma, obteve resultados significativos da interface entre doença pulmonar e sistema nervoso

central. A administração intratraqueal de ovoalbumina nesses animais segundo estudo, ativou subconjuntos específicos de neurônios no tronco cerebral e no núcleo do trato solitário (NTS). Com o antígeno tendo localização específica, foi analisada a expressão de c-fos pós injeção de ovoalbumina. c-fos é um gene de expressão imediata que é acionado por neurônio ativo que desencadeia síntese de proteínas específicas. No caso da albumina, o c-fos promoveu ativação neural no NTS, parte dorsolateral, mas não na área postrema (AP) adjacente (Hale *et al.*, 2012). Injeções de mediadores pró-inflamatórios como IL-1 β promovem forte ativação da área postrema (Ericsson *et al.*, 1995; Buller *et al.*, 1998).

Inúmeras hipóteses têm sido sugeridas correlacionando ativação imune periférica e sinalização no SNC. A ativação do SNC e a inflamação broncopulmonar podem permanecer mesmo quando não há um aumento significativo de citocinas inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF. Resultados de estudos prévios sugerem que a estimulação das vias neurais por meio da presença de inflamação localizada pode ser a principal ativação do SNC em resposta a inflamação broncopulmonar (Lowry *et al.*, 2007).

Os pulmões e vias respiratórias são altamente inervados pelos sistemas simpático, parassimpático e sensorial. Portanto, desenvolvem diversas funções e enviam mensagens a diversas regiões do corpo (Belvisi, 2003). Uma dupla inervação aferente configura a sinalização pulmonar, a primeira delas é composta por projeções que seguem dos ramos nervosos simpáticos à coluna vertebral, e a segunda é formada por fibras não mielinizadas (fibras C) e mielinizadas que seguem do nervo vago ao NTS na medula (Hale *et al.*, 2012).

Exposição a FC, por ser um irritante broncopulmonar, pode resultar em hiperplasia das células endócrinas neuroepiteliais (CENs). As CENs são posicionadas de forma proposital a mediar os efeitos da estimulação vagal, inflamação neurogênica. Sua posição anatômica é distribuída ao longo dos bronquíolos terminais e brônquios. Em ratos, especificamente, uma maior proporção das células se encontra na traqueia e vão diminuindo gradualmente em direção a áreas mais distantes (Kleinerman *et al.*, 1981; Tabassian *et al.*, 1989). Nas doenças alérgicas, como a asma, a inflamação neurogênica desempenha um papel crucial. Quando induzida pela estimulação do nervo vago, sua ação é transitória e súbita, sendo a amplitude da resposta dependente do histórico da infecção (McDonald, 1988).

Os mecanismos neurais implícitos aos efeitos da inflamação broncopulmonar sobre o papel do SNC-dependente e a possível relação com o comportamento de ansiedade, não é ainda totalmente claro e por isso necessitam de mais pesquisas para melhor entendimento (Hale *et al.*, 2012).

1.4. Comportamento

1.4.1. Ansiedade

A busca por conhecimento e entendimento dos variados tipos de comportamento teve início com Darwin, desde então surgiram diversos estudos e testes comportamentais objetivando uma melhor compreensão do sistema nervoso central (Belzung e Griebel, 2001).

A ansiedade, um tipo de comportamento, é definida por Barlow *et al.*, (1996) como alta excitação do sistema nervoso central, sensação de agonia, aflição e apreensão por parte do indivíduo devido a antecipação a ameaça potencial. Já Freud (1953) considerava que o comportamento ansioso era construído a partir de um gradiente de tensão/medo que comprometia a homeostase. Outros autores ainda afirmam que o comportamento de ansiedade não é determinado por uma fonte específica, como no caso do medo (Freud, 1953; David H. Barlow, 1996; Belzung e Griebel, 2001; Landeira-Fernandez, 2012).

Seres humanos constantemente estão sobre processos adaptativos. Situações de perigo ou alerta, uma vez que provocam mudanças fisiológicas e comportamentais favorecem o processamento de memória, a fim de evitar a repetição de condições desagradáveis (Graeff, 2012; Landeira-Fernandez, 2012).

Sabe-se que a ansiedade parte de mecanismos neurais que provocam modificações diversas no organismo e que são estimuladas no animal por meio da manipulação experimental (Bourin, 2015).

Avaliar comportamento em modelo animal é um método criterioso. A manipulação do mesmo pelo experimentador provavelmente promove influência nos resultados dos testes comportamentais, afinal o toque manual do animal é o principal estimulador do teste. Porém, ao interpretar os dados obtidos através das

experimentações é essencial entender a causa do comportamento do animal e observar se alguma atitude do manipulador pode ter promovido interferência (Hanell e Marklund, 2014).

Os diversos tipos de modelos animais de ansiedade procuram expor os animais a circunstâncias de aversão e desconforto para avaliar a reação dos mesmos a diferentes situações ambientais: exposição a lugares altos e sem paredes laterais de proteção; confronto a animais alojados em gaiolas diferentes; situações de isolamento social; estímulos nociceptivos moderados, dentre outros (Treit, 1985; Cruz, 1997).

Acredita-se que animais e seres humanos possuam semelhança nas sensações subjetivas de ansiedade, contudo ainda não se tem dados que afirmem essa analogia. Principalmente os roedores, possivelmente por serem mamíferos, parecem ter similaridade aos seres humanos em relação aos mecanismos neurais e comportamento frente a situações ansiogênicas (Landeira-Fernandez, 2012).

Comportamento de ansiedade demonstrado por animais de laboratório não devem ser diretamente extrapolados a humanos, uma vez que não objetiva-se replicar todas as características e sintomas dos resultados obtidos na experimentação (Treit, 1985; Bourin *et al.*, 2007; Bourin, 2015).

Existem critérios como previsibilidade, semelhança e homologia que validam os modelos animais e pelo menos um deles deve ser levado em consideração. O modelo de previsibilidade é avaliado através da relação dos efeitos clínicos de uma droga sobre os seres humanos e o animal. A semelhança parte do pressuposto de avaliar a analogia no comportamento de ansiedade dentre os modelos experimentais e o humano; e a homologia está relacionada à similaridade de processos psicobiológicos no humano e no animal (Bourin *et al.*, 2007; Bourin, 2015).

1.4.2. Teste comportamental

1.4.2.1. Labirinto em T Elevado (LTE)

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparato que possui quatro braços distribuídos em forma de cruz, sendo dois fechados com paredes perpendiculares e dois abertos opostos, todos os braços são suspensos do chão. É sabido o receio de

ratos por local aberto e alto, sendo esse conhecimento a base para a construção do teste do labirinto (Handley e Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985; Zangrossi e Graeff, 2014).

O labirinto em T elevado é derivado do LCE, a diferença entre ambos está no número de braços e na alteração da realização da sessão experimental. No teste ao LTE o animal é exposto a um braço fechado e dois braços abertos, distribuídos em forma de T, o animal é colocado primeiramente no braço fechado, seu tempo de permanência no mesmo até a saída total com as quatro patas da demarcação final é cronometrado. O animal é exposto para exploração do braço por três vezes consecutivas. O mesmo procedimento é realizado no braço aberto (Handley e Mithani, 1984; Zangrossi e Graeff, 1997; 2014).

A construção do LTE teve como finalidade diferenciar os tipos de ansiedade. Atualmente é um teste de ansiedade muito utilizado e sua funcionalidade fundamenta-se na atividade exploratória espontânea e na aversão natural do animal pelos braços abertos. O novo aparato tornou possível que na mesma sessão experimental o animal execute a esquiva inibitória e o escape, a fim de testar se o escape é sinal de pânico e a esquiva inibitória algum transtorno de ansiedade. Diferenciando assim esses dois tipos de comportamento, o que não era possível em modelos anteriores (Graeff *et al.*, 1993; Viana *et al.*, 1994; Zangrossi e Graeff, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Tendo conhecimento que o cigarro induz a processo inflamatório, como confirmado por estudos prévios realizados em nosso laboratório, com camundongos, onde a exposição à fumaça de cigarro em curto prazo causou aumento do influxo inflamatório e dano oxidativo (Campos *et al.*, 2013; Pena *et al.*, 2016), e sabendo que a inflamação pulmonar leva a ativação de neurônios no sistema nervoso central (Hale *et al.*, 2012), hipotetizamos que o quadro inflamatório, devido à exposição à fumaça de cigarro, possa promover alterações de comportamento e não apenas os componentes intrínsecos do cigarro, como a nicotina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a influência da inflamação pulmonar provocada pela inalação da fumaça de cigarro sobre o comportamento de ratos Wistar.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar se a exposição à fumaça de cigarro comum e de papel interfere no peso do animal;

Analisar o influxo de células inflamatórias no lavado broncoalveolar na exposição à fumaça do cigarro comum e de papel;

Aferir o influxo de células inflamatórias no sangue dos ratos expostos à FC comum e de papel;

Analisar a morfologia dos cortes histológicos de pulmão em animais expostos à FC comum e de papel;

Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes em animais expostos à FC comum e de papel;

Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo pulmonar em animais expostos à FC comum e de papel;

Avaliar os níveis de citocinas inflamatórias no LBA e plasma dos animais expostos à FC comum e de papel;

Avaliar se o processo inflamatório pulmonar devido à fumaça de cigarro comum e de papel interfere no comportamento do animal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

Ratos de linhagem Wistar com três meses de idade, massa corporal de aproximadamente 180 gramas obtidos no Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram alocados no Biotério (CCA - UFOP) até estarem com peso adequado para realização dos procedimentos experimentais e após, foram mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Os ratos foram acondicionados em caixas de polipropileno, com quatro animais por caixa, mantidos em ambiente com condições de temperatura, luz, umidade controladas, e receberam dieta (*ad libitum*), ração comercial Nuvilab® e livre acesso à água. A espécie *Rattus Norvegicus* de linhagem Wistar é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório e a mais indicada para realização de testes comportamentais. São animais habilitados a processos de aprendizagem, comumente dóceis e de fácil manipulação. Os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Trabalhos com Animais de Experimentação (CEUA) da UFOP (Protocolo nº 2015/35, que consta no anexo I deste trabalho).

4.2. Delineamento experimental

4.2.1. Grupos experimentais

Os ratos foram separados aleatoriamente compondo cada um dos grupos; os grupos experimentais e os controles, sendo esses expostos apenas a ar ambiente. Grupo 1: Grupo controle (GC), para a análise bioquímica (n=8) e para a análise comportamental (n=13); grupo 2: cigarro comum (CC), para análise bioquímica (n=8) e para análise comportamental (n=13); grupo 3: cigarro de papel (CP), (n=8) tanto para a análise bioquímica quanto para análise comportamental.

4.2.2. Exposição à fumaça de cigarro

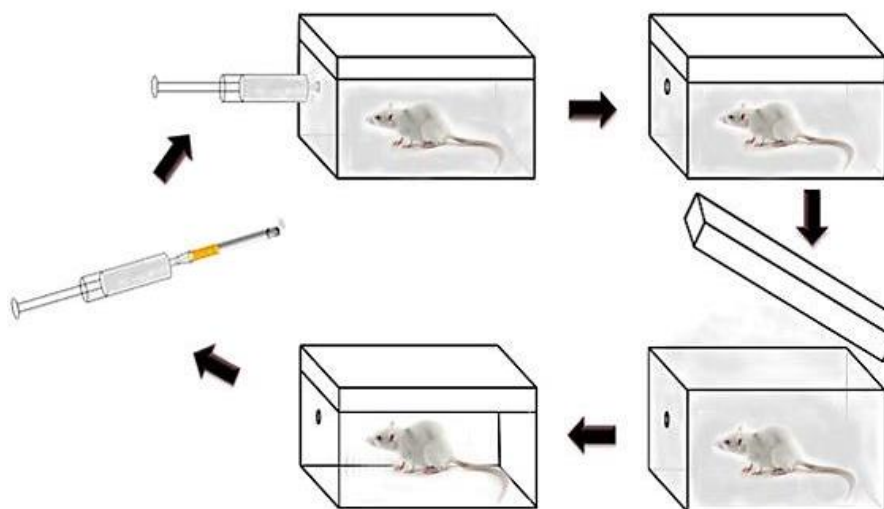
4.2.2.1. Cigarro Comum (CC)

Ratos Wistar do grupo CC durante oito dias seguidos foram expostos a um total de 12 cigarros comerciais por dia, divididos nos três períodos (manhã, tarde e noite). O cigarro comercial escolhido para este estudo foi o filtrado Marlboro com composição de 10 mg de alcatrão; 0,8 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono. Optou por essa marca específica de cigarro devido aos altos valores dos componentes de sua formulação e também por padronização em relação ao protocolo utilizado no Laboratório de Fisiopatologia Experimental da Universidade Federal de Ouro Preto.

Para ocasionar a inalação a FC pelos animais, cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60 ml com a qual também foi injetada a fumaça no interior da câmara de inalação (40- cm comprimento, 30 cm- largura e 25 cm- altura), dentro de uma capela exaustão. O procedimento de inalação a fumaça de cigarro pelo animal ocorreu da insuflação da seringa acoplada ao cigarro aceso e posterior expulsão (desinsuflação) da fumaça no interior da câmara. A queima do cigarro até o seu terço final, restando apenas o filtro, ocorreu quando realizado aproximadamente de 27 puffs (insuflação e desinsuflação da seringa). O tempo aproximado gasto para a queima de um cigarro foi de três minutos corridos e cada cigarro produziu cerca de um litro de fumaça que foi diluído em 30 litros presentes na câmara. A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% com duração de 6 minutos por cigarro (concentrações de CO que variam de 250 para 350 ppm no interior da câmara). Terminado o tempo de inalação a FC, a tampa da câmara foi retirada e exposta à exaustão da capela por mais um minuto para liberar toda a fumaça interna (Pena *et al.*, 2016).

Os ratos foram realojados em sua caixa onde permanecem até o próximo período de exposição. Os animais controle passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, exceto a fumaça de cigarro, uma vez que inalaram ar ambiente (Figura 1).

Figura 1. Esquema da Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).



Fonte: Adaptado de Campos *et al.*, 2013.

4.2.2.2. Cigarro de Papel (CP)

O CP também foi o filtrado Marlboro, porém, com a diferença que os componentes do tabaco (naftalina, metanol, uretano, tolueno, arsênio, formol, fenol, butano, nicotina, polônio, cádmio, dentre outros) foram retirados e em seu lugar foi adicionado papel de cigarro (Folha para cigarro; Marca Trevo; fabricado especialmente para a Souza Cruz; 76mm comprimento, 46mm de largura) para garantir fumaça suficiente durante a queima. No Marlboro permaneceu apenas o filtro e o papel utilizado na sua composição.

Os animais foram expostos a fumaça do cigarro de papel. O período de exposição foi de oito dias seguidos com um total de 12 cigarros modificados por dia, divididos nos três períodos (manhã, tarde e noite).

O teste de padronização da quantidade total de folhas de cigarro, necessárias ao estudo para a produção de fumaça, utilizou como parâmetros o peso, a quantidade de puffs produzidas e o tempo necessário para a queima total do cigarro Marlboro original.

A partir dos testes definiu-se como protocolo do cigarro modificado, a utilização de um cigarro Marlboro com apenas filtro e papel; adicionado no interior de oito folhas para cigarro. O tempo gasto para a queima total do cigarro modificado foi de aproximadamente 3 minutos.

Os CP foram acoplados a uma seringa de plástico e na mesma câmara de inalação que os expostos ao CC. O grupo controle passou pelos mesmos procedimentos, mas foi exposto a ar ambiente.

4.2.3. Teste comportamental

4.2.3.1. Labirinto em T Elevado

Todos os grupos de animais foram submetidos à exposição ao aparato para teste comportamental (LTE: equipamento composto basicamente por dois braços aberto (50cm x 10cm) e um braço fechado de mesma dimensão com parede de 40 cm de altura, sobrepostos do chão em 50 cm). Este aparato fica localizado em uma sala isolada, silenciosa, iluminada com luz alta, adequada para testes comportamentais. Ao final dos testes com cada animal o aparato foi higienizado com álcool 20%.

Foi realizado uma pré-exposição dos animais ao labirinto no dia anterior ao teste, seguindo o protocolo do laboratório. Nessa pré-exposição, os animais foram colocados na extremidade de um dos braços abertos do labirinto e os mesmos permaneceram explorando o ambiente por 30 minutos. A queda do animal do braço aberto eliminava o mesmo do teste (Campos, 2015; De Noronha *et al.*, 2017).

No teste do LTE cada animal foi colocado três vezes na extremidade do braço fechado e três na extremidade do braço aberto (o mesmo a qual o animal foi exposto no pré-teste), não excedendo o tempo de 5 minutos em cada exposição. Entre cada exposição nas diferentes vezes dos respectivos braços foi dado um intervalo de 30 segundos (Campos, 2015; De Noronha *et al.*, 2017).

Os animais foram ambientalizados por 30 minutos antes da realização do pré-teste e do teste, para reconhecimento da sala de experimentação (Campos, 2015; De Noronha *et al.*, 2017).

A exposição ao LTE possibilita a realização tanto do teste de esquiva inibitória como o de fuga. O teste de esquiva inibitória é o tempo que o animal depois de colocado no braço fechado leva para alcançar um dos braços abertos; e o teste de fuga considera o tempo que o animal leva para alcançar o braço fechado quando colocado na extremidade de um dos braços abertos (Zangrossi e Graeff, 2014).

A pré-exposição no labirinto em T elevado aconteceu no oitavo dia, já no nono foi realizado o teste ao LTE.

Figura 2. LTE (Insight ®) aparato utilizado nos testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga.



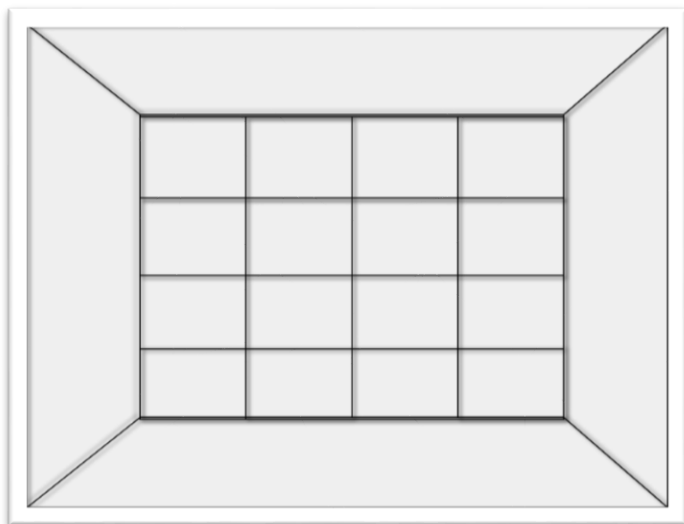
Fonte: Campos, 2015.

4.2.3.2. Campo Aberto

O teste tem como finalidade avaliar atividade locomotora e exploração do ambiente, onde o animal encontra-se em uma situação nova, isolado do seu grupo, além de estar alocado em um ambiente desconhecido. O procedimento experimental foi realizado após 30 segundos de intervalo do fim do teste no LTE, em uma arena retangular, com paredes perpendiculares e superfície subdividida em 16 quadrantes. As paredes impossibilitavam a saída do animal da arena. No teste, o animal foi colocado com cuidado no centro da arena e seu tempo de exploração ao ambiente foi cronometrado, totalizando 5 minutos, em apenas uma única exposição. Os quadrantes percorridos pelo animal nesse intervalo de tempo foram quantificados e anotados para avaliar locomoção do animal. Este aparato também fica localizado na mesma sala isolada, silenciosa, iluminada com luz alta, adequada para testes comportamentais. Ao final dos testes com cada animal o aparato foi higienizado com álcool 20% para

evitar viés no teste por influência de cheiro de outro animal (Hall, 1934; Bailey e Crawley, 2009; Campos, 2015; De Noronha *et al.*, 2017).

Figura 3. Esquema do Campo aberto (38cm de comprimento, 31cm de largura, 23cm de altura).



4.3. Coleta do sangue

Após 24 horas da última exposição à fumaça de cigarro, os animais foram eutanasiados com anestésico (0,1mL por 100g de peso animal da combinação ketamina e xilazina, sendo 10 mL de ketamina 10% (p/v) para 2,5 mL de xilazina 2,5% (p/v)). O tórax de cada animal foi aberto, pela dissecação anatômica, para realização da punção cardíaca entre o segundo e terceiro espaço intercostal. De cada animal foi coletado duas alíquotas sanguíneas em eppendorfs com 15 μ L de anticoagulante (heparina). O Hemograma foi feito no Laboratório de Imunopatologia LIMP-UFOP, e para essa análise utilizou-se a alíquota de 200 μ L de sangue coletada. A outra alíquota coletada (em média 1,5 mL) foi centrifugada (10.000 RPM) por 15 minutos. O sobrenadante obtido foi armazenado em -80°C para ser utilizado no ensaio imunoenzimático (Campos *et al.*, 2013).

4.4. Esfregaço sanguíneo

Para realização do esfregaço sanguíneo, foi utilizado uma gota de sangue (2 μ L) obtida também no momento da punção cardíaca. A gota de sangue foi adicionada na

extremidade de uma lâmina histológica, devidamente esterilizada. Outra lâmina posicionada a 45° dessa foi utilizada para realizar o movimento de deslizamento e deposição uniforme desse sangue em torno de toda a lâmina. Para garantir melhor observação microscópica dos diferentes tipos celulares presentes, o esfregaço sanguíneo deve ter como característica uma camada fina e uniforme de sangue em torno de toda lâmina. Após realização do esfregaço, as lâminas histológicas devidamente identificadas foram deixadas em repouso para total secagem e fixação do sangue, e então coradas com o *kit Panóptico Rápido*. O protocolo desse kit recomenda 5 banhos de imersão, na ordem indicada, em cada uma das três soluções: metanol, eosina e azul de metileno. Após imersão nas soluções desse kit, as lâminas foram mergulhadas em água corrente para a retirada do excesso dos corantes e deixadas em repouso para secarem em temperatura ambiente. A contagem total ficou estabelecida em 100 leucócitos por lâmina, diferenciando: monócitos, linfócitos e neutrófilos, através da morfologia do núcleo e do citoplasma, da coloração, e observação de grânulos citoplasmáticos (Pena *et al.*, 2016).

4.5. Lavado Broncoalveolar (LBA)

Para obtenção do LBA, posteriormente a realização da punção cardíaca, a traqueia foi exposta e canulada (PE90 tubing). O pulmão direito foi lavado com 3mL de solução salina (NaCl à 0,9%), para obtenção do lavado broncoalveolar. As amostras obtidas foram mantidas em gelo para evitar lise celular e ao fim de todos os grupos, as mesmas foram armazenadas em freezer (-80°C) para posterior realização de ensaio imunoenzimático (Pena *et al.*, 2016).

4.5.1. Contagem total de células em câmara de Neubauer

Coletado o LBA, imediatamente uma amostra de 10 microlitros da suspensão celular foi homogeneizada por um minuto no Vórtex e combinada com 30 microlitros de Azul de Tripán (Corante utilizado para diferenciar células vivas de células mortas). Após obtenção dessa mistura, uma alíquota de 10 microlitros foi colocada na Câmara

de Neubauer para a realização da contagem total de células através do microscópio (Pena *et al.*, 2016).

Como critério da contagem de células, foram enumeradas aquelas com núcleo bem visível; contadas as células isoladas como uma célula; contada cada célula de grumos que apresentasse células com núcleos e citoplasmas distinguíveis e aqueles grumos cujas células foram difíceis de serem distinguidas, foi contado como um único grupo. O sentido da contagem também foi definido, começando pelo lado esquerdo e seguindo uma sequência para garantir padronização e que nenhum quadrante deixasse de ser contado (Pena *et al.*, 2016).

4.5.2. Contagem diferencial

Para a contagem diferencial do LBA, as amostras foram cito-centrifugadas em uma centrífuga cytospin (Shandon, Waltham, MA, EUA). Na centrífuga, 250 µL de amostra foi colocado no recipiente acoplado a uma lâmina e um filtro, centrifugados a 1.000 RPM durante 1 minuto. Após centrifugação e obtenção das lâminas já com as células, essas foram coradas com o *kit Panótico Rápido*, seguindo o protocolo, assim como na contagem diferencial do esfregaço sanguíneo. Um total de 100 células por lâmina foram contabilizadas e diferenciadas entre macrófagos, linfócitos e neutrófilos (Pena *et al.*, 2016).

4.6. Processamento tecidual

Após a eutanásia, o ventrículo direito foi perfundido com 40 ml de solução salina (0,9%) para retirada do sangue nos pulmões. O pulmão esquerdo dos animais foi removido e armazenado em formalina tamponada a 10% por 48h, posteriormente foi realizado o processamento segundo a rotina do laboratório: banho em água corrente por 30 minutos; banho de uma hora em cada álcool (70% e 90%) em recipientes distintos; 2 banhos seguidos em álcool a 100% também com a permanência de 1 hora em cada; 2 banhos de xilol também com intervalo de 1 hora de duração em cada; 2 banhos em parafina (1 hora imerso em cada), por fim, inclusão direta em parafina.

Após inclusão e secagem total do material obtido, foi realizado cortes seriados (4 micrômetros de espessura), depositados em lâminas histológica, devidamente fixados e corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise morfométrica (Campos *et al.*, 2015).

4.7. Análise morfométrica – Estereologia

Um sistema-teste constituído por 16 pontos em uma área-teste conhecida (Starcher, 2000) foi utilizado como método de análise do volume dos septos alveolares (V_{vsa}) e dos espaços alveolares (V_{va}), a área de mensuração era delimitada evitando potenciais superestimacões. O sistema-teste foi conectado a um monitor vinculado a um microscópio. O número de pontos (P_p) que abrangeram os V_{vsa} e os V_{va} foi analisado de acordo com número total de pontos do sistema teste (P_t), sendo $V_v = P_p/P_t$. Cada amostra de pulmão foi analisada em 16 pontos aleatórios do sistema-teste em 20 micrografias da lâmina (representativa de áreas distintas), sendo a média estimada para reduzir o viés e tornar as amostras mais uniformes e proporcionais ao pulmão. A área total de teste, delimitada de 1,94 mm², foi utilizada para determinar os septos alveolares e os espaços alveolares em cortes corados respectivamente com hematoxilina e eosina (HE) (Campos *et al.*, 2015).

4.8. Homogeneizado Pulmonar

O pulmão direito também foi removido e armazenado em eppendorfs devidamente etiquetados no freezer (-80) para posterior realização dos procedimentos de homogeneização necessários as diferentes análises bioquímicas (Campos *et al.*, 2013).

4.9. Dosagem de enzimas antioxidantes e marcadores de dano oxidativo

4.9.1. Proteínas Totais Bradford

A dosagem bioquímica de proteínas totais foi realizada por meio do Método de Bradford (1976) com amostras de pulmão homogeneizadas com tampão KPE (Reagentes utilizados para formulação: 2,72g de KH_2PO_4 , 17g de K_2HPO_4 e água destilada). Coomassie brilhante azul é um corante do reagente de Bradford e em solução ácida tem a característica de se acoplar a proteínas presentes na amostra, modificando a absorvância da amostra de 465nm para 595nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Seguindo o protocolo do laboratório, foi feita uma curva padrão da proteína albumina com concentrações crescentes conforme mostrado no quadro a seguir. A curva padrão e as amostras foram pipetadas em duplicata na placa para posterior leitura e realização dos cálculos necessários.

Quadro 1. Curva padrão de Albumina.

Curva de diluição Albumina	Albumina 0,01 g/mL	Água Mili-Q
0,5 mg/mL	1000 uL	_____
0,4 mg/mL	800 uL	200 uL
0,3 mg/mL	600 uL	400 uL
0,2 mg/mL	400 uL	600 uL
0,1 mg/mL	200 uL	800 uL
0,05 mg/mL	100 uL	900 uL

Fonte: Protocolo do Laboratório de Fisiopatologia experimental, UFOP-MG, 2016.

4.9.2. Atividade da Catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (representada por U/mg de proteína) foi avaliada através de um método de cinética enzimática. Segundo Aebi, essa enzima é capaz de converter H_2O_2 em água e O_2 molecular (Aebi, 1984). Para preparo das amostras, foi pesado 100 mg de pulmão e homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), o homogenato formado foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM a 4°C, sendo o sobrenadante posteriormente coletado e utilizado como amostra. Os reagentes utilizados na dosagem bioquímica, tampão Fosfato e peróxido de hidrogênio, foram preparados respectivamente de acordo com o seguinte protocolo:

1. Tampão – PBS Modificado:

Obs.: Diluiu-se em água destilada com volume final de 1000 ml (conservando em geladeira). O pH da solução foi ajustado à 7,2 com HCl ou NaOH.

2. Tampão com peróxido (Mix) = 25 ml de tampão PBS modificado para 40 µl de peróxido de hidrogênio (30%). Por manipular um reagente fotossensível atentou-se a manter as amostras sob condições de ausência de luz.

Para realizar a leitura no espectrofotômetro foi determinada absorvância de 240 nm, o equipamento foi zerado com 1 mL de Tampão PBS Modificado. Foram pipetados 30 µL de amostra e 970 µL do mix, sendo homogenizado com o auxílio de uma pipeta e posteriormente as amostras foram colocadas uma a uma na cubeta de quartzo. A leitura das amostras foi realizada no período de 1 minuto, sendo registrada a sua absorvância imediatamente a cada 10 segundos (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60). A atividade da catalase foi calculada segundo a lei de Lambert Beer (1870) onde "A intensidade da luz emitida diminui exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente". A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido da primeira e da última absorvância lida (absorvância final - absorvância inicial). O coeficiente de extinção molar utilizado foi o do H₂O₂ (39,4 M⁻¹cm⁻¹), onde uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

4.9.3. Glutathione Total

Segundo Akerboom e colaboradores (Akerboom e Sies, 1981) foi determinada enzimaticamente a glutathione total que é composta pelo somatório da reduzida (GSH) com a oxidada (GSSG). O ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DNTB) promove a reação cinética de oxidação da GSH a GSSG e o ácido sulfosalicílico (SSA) promove precipitação das proteínas da amostra. A GSH presente na amostra reage com o DTNB, produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e GSSG. Para preparo dos reagentes de estoque foram utilizados: SSA a 5%; tampão fosfato de potássio (500 mM), contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); solução padrão estoque de glutathione – 10mM (0,3 mg de glutathione reduzida em 0,1 mL de água destilada); solução estoque de NADPH, dissolvendo 25 mg do conteúdo em 0,625 mL de água destilada, obtendo uma solução de 40 mg/mL; e solução de estoque de DNTB (8 mg de DNTB foram diluídos em 5,33 mL de DMSO) o que resultou em uma solução

com 1,5 mg/mL. Para realização das dosagens, 100 mg de pulmão foi homogeneizado em 1 mL de SSA a 5%, a mistura obtida foi centrifugada a 10.000 RPM, por 10 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra. Os reagentes da solução de uso, preparados no momento da dosagem e de acordo com a quantidade de amostras foram: solução de enzima diluída (4,11 µL de glutationa redutase diluída em 175 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM); solução de NADPH (da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 12 µL de NADPH para 3 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM); mistura de trabalho (6 mL de tampão 100 mM, 171 µL da solução de enzimas diluída e 171 µL de DTNB da solução de estoque); solução padrão de glutationa – preparada para a curva padrão (foi diluído 10 µL de solução estoque de glutationa padrão com 2 mL de SSA 5%). As amostras e a curva padrão foram pipetadas na placa de Elisa seguindo a sequência de adições de reagentes, conforme mostradas nos quadros a seguir.

Quadro 2. Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão.

POÇO	1	2	3	4	5
[GSH] µM	50	25	12,5	6,25	3,125
Solução de GSH (µL)	50	25 (tubo 1)	25 (tubo 2)	25 (tubo 3)	25 (tubo 4)
SSA 5% (µL)	-	25	25	25	25
nmoles de GSH em 10µL	0,5	0,25	0,125	0,062	0,0312

Fonte: Protocolo do Laboratório de Fisiopatologia experimental, UFOP-MG, 2016.

Quadro 3. Reagentes utilizados para a dosagem.

	Volume da amostra (µl)	SSA 5% (µl)	Mistura de trabalho (µl)	NADPH (µl) de uso
Branco	-	10 µl	150 µl	50 µl
Padrão (5 pontos)	10 µl	-	150 µl	50 µl
Amostra	10 µl	-	150 µl	50 µl

Fonte: Protocolo do Laboratório de Fisiopatologia experimental, UFOP-MG, 2016.

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente adicionou-se o NADPH e imediatamente foi colocada a placa no aparelho para iniciar a leitura. As absorbâncias foram lidas em intervalo de 1 minuto durante 5 minutos corridos, no leitor de Elisa no comprimento de onda de 412 nm. As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutationa reduzida foram determinadas e a GSSG já presente na amostra foi reduzida a GSH pela presença de NADPH (chamado

de método enzimático), medido após derivação da glutatona total com acréscimo de 2-vinilpiridina (2-VP) e Trietanolamina (TEA). Após análise de regressão linear, foi determinada a equação da reta [Concentração = a*(delta das absorvâncias) + b]. Essa equação foi utilizada para determinar a concentração em nmols de glutatona total em 10 µl de amostra, e esse valor extrapolado para 1 mL de amostra.

4.9.4. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

Segundo o método de Marklund (Marklund e Marklund, 1974), baseado na habilidade da SOD de eliminar o superóxido e reduzir a razão de autooxidação do pirogalol, foi mensurado a atividade da enzima antioxidante nas amostras. Para dosagem da atividade, 100 mg de pulmão foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50mM), pH 7,0, centrifugados por 10 minutos a 12.000 g a 4°C. O sobrenadante foi coletado e usado como amostra para realização das dosagens. Os reagentes utilizados foram: KH₂PO₄, Na₂HPO₄, Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio) e DMSO (dimetilsulfóxido).

Em uma placa de Elisa os reagentes foram adicionados conforme o quadro a seguir:

Quadro 4. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido Dismutase.

POÇO	Amostra	Tampão	MTT (1,25 Mm)	Pirogalol (100µM)
Branco	-	144µl	6 µl	-
Padrão	-	129µl	6µl	15µl
Amostra	30µl	99 µl	6µl	15µl

Fonte: Protocolo do Laboratório de Fisiopatologia experimental, UFOP-MG, 2016.

A placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C. Posteriormente, 150 µL de DMSO foram pipetados em todos os poços da placa para parar a reação. Em um leitor de Elisa foi realizado a leitura das respectivas absorvâncias das amostras, em comprimento de onda definido: 570 nm. Levando em consideração que 50% de pirogalol é oxidado por uma unidade de SOD (U), por conversão, a absorvância do padrão adquirido em unidades de SOD, é transformada em absorvância da amostra adquirida em unidades de SOD. A absorvância obtida de cada amostra foi simultaneamente subtraída da absorvância obtida por meio da leitura do branco, e o

valor encontrado nesse cálculo, foi dividido pelo obtido do cálculo de subtração do padrão pelo branco.

4.9.5. Proteína carbonilada

A formação de derivados carbonílicos provem da oxidação da parte proteica da membrana celular por parte das EROs. O método de determinação de proteína carbonilada utilizado neste estudo é baseado no descrito por Levine (Levine *et al.*, 1994). As amostras de pulmão foram homogeneizadas com tampão KPE (KH₂PO₄; K₂HPO₄ e H₂O destilada), centrifugadas por 10 minutos a 4°, 5.000 rpm, sendo utilizado o sobrenadante como amostra. 500 µL de amostra foi precipitado com TCA (ácido tricloroacético) a 10%, a mistura foi passada no vortex para melhor homogeneização, centrifugada por 10 minutos a 4°, 5.000 rpm, descartado o sobrenadante. Ao *pelete* (precipitado) foi adicionado 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), incubado no escuro em temperatura ambiente por 1 hora e homogeneizado no vórtex a cada 15 minutos (0', 15', 30', 45', 60'). Posteriormente, foi adicionado 500 µL TCA 10%, homogeneizado no vortex e seguido de centrifugação por 10 minutos a 4°, 5.000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado e utilizado apenas o *pelete*. As amostras (*pelete*) foram lavadas duas vezes com o composto etanol/acetato de etila (1:1) e dissolvidas em 1mL de SDS (dodecilsulfato de sódio) 6%, homogeneizada no vortex, centrifugadas por 10 minutos a 4°, 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro à 370 nm. Para o branco foi utilizado apenas o SDS. Por definição, o coeficiente de extinção molar de 22 000 M⁻¹ cm⁻¹ foi utilizado para realização dos cálculos do conteúdo de proteína carbonilada das amostras. Os resultados foram demonstrados em nmol/mg proteína.

4.9.6. TBARS

O método de ensaio de substâncias reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Draper foi utilizado como índice de dano oxidativo, determinando a peroxidação lipídica do parênquima pulmonar (Draper *et al.*, 1993). Seguindo o protocolo do laboratório, amostras de 100 mg do parênquima pulmonar foram

homogenizadas com tampão (1 mL), o homogenato foi colocado na centrifuga refrigerada (4°) por 10 minutos a 10000 rpm para formação de *pelete* e obtenção do sobrenadante. Uma alíquota de 500 µL do sobrenadante das amostras de pulmão foi misturada com 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v em HCL 0,25N), 250 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) (1% em ácido) e 125 µL de butil hidroxitolueno (BHT), agitou-se a mistura final no vórtex a fim de torna-la homogênea. Submeteu a mistura a banho maria (95°) por 15 minutos, retirou-se e imediatamente submeteu-a a banho em água com gelo por 5 minutos. Agitou novamente no vórtex e colocou na centrifuga refrigerada (4°) por 10 minutos a 13000 rpm. A absorbância do sobrenadante final obtido da amostra de pulmão foi lida a 535 nm, por espectrofotometria. Os níveis de TBARS foram expressos como equivalentes de malondialdeído (MDA nM/mg de proteína). Água destilada foi utilizada como branco. A concentração de TBARS foi calculada através do coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). De acordo com a lei de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), onde: A = absorbância; ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de $\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; b = caminho óptico; c = concentração da enzima expressa em mol L^{-1} .

4.10. Dosagem de citocinas

O método de imunoabsorção enzimática (ELISA) foi realizado nas amostras de plasma e lavado. As citocinas analisadas foram: IL-1 β , IL-6 e TNF- α . Através de teste de amostra, foi padronizado que o LBA não necessitava de diluição para detecção e, portanto, seria utilizado 100 µl de amostras biológica. Contudo, por ser mais concentrado, o plasma precisou de diluição 1:2, garantindo assim melhor detecção das citocinas na amostra submetida ao ELISA. Há várias maneiras de se processar o método imunoenzimático, e seguindo padronização do laboratório, optou-se pelo método sanduíche ou captura. Para realização dos ensaios foi utilizado o kit (*PeptoTech- 900-K73*) sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e alíquotados de acordo com as orientações dos fabricantes. Em placas de 96 poços foram adicionados 100 µl de anticorpo de captura, diluído em PBS, sendo estas placas incubadas em overnight a temperatura ambiente (estufa programada). Após o tempo de overnight, o líquido das placas foi eliminado, sendo posteriormente submetida a

sucessivas lavagens em PBS-Tween (PBS adicionado de 0,05% de Tween-20), permanecendo na placa apenas os anticorpos que foram realmente adsorvidos. Após secagem superficial dos poços das placas, essas foram bloqueadas com 100 µl/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, sendo colocada em repouso durante 1 hora a temperatura ambiente. Após o tempo de repouso, as placas foram novamente lavadas e secadas superficialmente. As amostras de lavado foram pipetadas em um volume de 100 µl para cada poço, enquanto as de plasma foram pipetadas em um volume de 50 µl para 50 µl de diluente (0,05% Tween-20, PBS-BSA 0,1%). Paralelamente, o padrão de cada citocina foi diluído em concentrações seriadas para o estabelecimento da curva padrão. Posteriormente, as placas foram incubadas por 2 horas em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as placas foram novamente lavadas e secadas superficialmente. O anticorpo de detecção, diluído em diluente, foi pipetado em todos os poços da placa e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa foi novamente lavada e secada superficialmente, 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em solução diluente foram adicionados à placa e a mesma incubada por 30 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno utilizado para revelação foi o ABTS (segundo o kit da *PeptoTech*), que foi preparado e diluído com citrato fosfato e misturado com água oxigenada (30%) no momento de colocar na placa. Após ter pipetado toda a placa, a mesma foi incubada na estufa (25°) até completar o tempo de reação. Após, foi interrompida a reação enzimática da peroxidase por meio da utilização do SDS (Dodecil sulfato de sódio) e realizada a leitura da placa na absorbância de 405 nm.

4.11. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média ± erro padrão da média. Para os dados com distribuição normal foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA one-way) e bivariada (ANOVA two-way) seguidas pelo pós-teste de Newman-keuls. Utilizamos $p < 0,05$ como valor de significância. Todas as análises foram realizadas

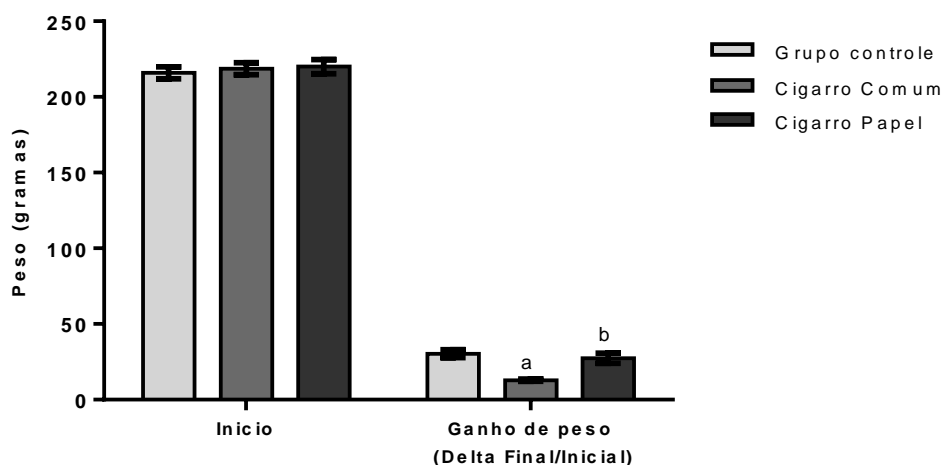
utilizando o software GraphPad Prism versão 6.00 para Windows 8, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Peso corporal dos animais no início e no final da exposição

A fim de registrar uma possível variação do peso dos animais, os grupos expostos à fumaça do cigarro comum e do cigarro de papel foram pesados antes dos primeiros procedimentos de exposição, e os animais controle (expostos a ar ambiente) também foram pesados para parâmetro de comparação. Os pesos obtidos estão expressos na Figura 4 abaixo.

Figura 4. Peso corporal



Análise do ganho de peso do animal durante o período de exposição. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram expressos como média \pm EPM ($n = 8$) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Como era de se esperar, nossos resultados mostraram ganho de peso por parte dos animais de todos os grupos (controle, comum e papel) ao longo do tempo. Entretanto, os animais expostos à fumaça do cigarro comum tiveram um ganho de peso significativamente menor em relação ao controle e ao cigarro de papel (CC: $12,86 \pm 0,74$ gramas; CP: $27,38 \pm 3,31$ gramas e GC: $30,38 \pm 2,66$ gramas; $p = 0,0051$).

5.2. Hemograma

Almejando analisar os elementos constituintes do sangue e alteração do mesmo após exposição à fumaça de cigarro foi realizado o teste do hemograma, e os resultados estão demonstrados na tabela 1 abaixo.

Tabela 1. Hemograma.

	GC	CC	CP	p^*
--	----	----	----	-------

WBC (x 10⁹/L)	6,41 ± 0,56	5,77 ± 0,56	3,55 ± 0,22 ^{a,b}	0,0009
RBC (x 10¹²/L)	7,45 ± 0,23	7,62 ± 0,10	7,01 ± 0,04 ^b	0,0314
HGB (g/dL)	14,93 ± 0,31	15,21 ± 0,18	13,63 ± 0,25 ^{a,b}	0,0004
HCT (%)	42,21 ± 0,73	42,83 ± 0,63	28,43 ± 0,51 ^{a,b}	< 0,0001
PLT (x10⁹/L)	387,4 ± 19,48	345,3 ± 20,67	233,4 ± 13,32 ^{a,b}	< 0,0001

WBC: Leucócitos. RBC: Hemácias. HGB: Hemoglobina. HCT: Hematocrito. PLT: Plaqueta. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 8) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls (p <0,05).

Através da observação visual durante a punção cardíaca verificou-se nos animais expostos à fumaça do cigarro, um sangue mais viscoso e escuro, o que o diferenciava dos animais não expostos, porém, esse não pode ser considerado um parâmetro de comprovação de alteração. A análise hematológica do sangue foi realizada e segundo os valores de leucócitos, glóbulos brancos do sangue, houve diferença significativa dos animais expostos à fumaça do cigarro de papel em comparação ao controle e ao cigarro comum (CP: 3,55 ± 0,22 x 10⁹/L comparativamente com GC: 6,41 ± 0,56 x 10⁹/L e CC: 5,77 ± 0,56 x 10⁹/L; p = 0,0009). Segundo nossos resultados a exposição à fumaça do cigarro de papel promove redução significativa do sistema imunitário do organismo que, portanto, torna-se mais susceptível a infecções.

A análise da concentração de hemácias, glóbulos vermelhos, responsáveis pelo transporte de oxigênio no sangue, não demonstrou diferença significativa entre os animais expostos e os não expostos. Havendo uma pequena diferença entre os animais expostos a fumaça do cigarro de papel e a fumaça do cigarro comum (CP: 7,01 ± 0,04 x 10¹²/L em relação ao CC: 7,62 ± 0,10 x 10¹²/L; p = 0,0314).

A hemoglobina, uma metaloproteína e também outro elemento sanguíneo importante, demonstrou variação nos animais expostos ao cigarro de papel (GC: 14,93 ± 0,31 g/dL; CC: 15,21 ± 0,18 g/dL e CP: 13,63 ± 0,25 g/dL; p = 0,0004) com diferença significativa para o grupo controle e para o grupo exposto a fumaça do cigarro comum.

A avaliação do hematócrito no sangue mostrou também diferença significativa apenas do grupo exposto a fumaça do cigarro de papel em relação aos demais (GC: 42,21 ± 0,73 %; CC: 42,83 ± 0,63 % e CP: 28,43 ± 0,51 %; p < 0,0001).

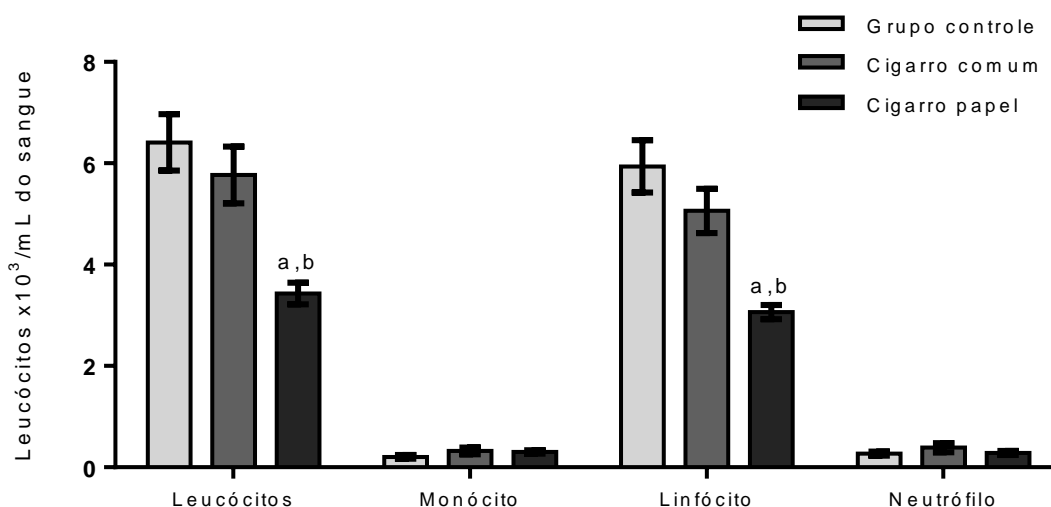
E por último a análise da concentração de plaquetas no sangue também demonstrou diferença significativa dos animais expostos à fumaça do cigarro de papel para o grupo controle e expostos ao cigarro comum (GC: 387,4 ± 19,48 x 10⁹/L; CC:

345,3 ± 20,67 x 10⁹ / L e CP: 233,4 ± 13,32 x 10⁹ / L; *p* <0,0001) confirmando que a exposição à fumaça do cigarro de papel altera os elementos sanguíneos de forma significativa.

5.3. Diferenciação do perfil celular sanguíneo

O sangue obtido na punção cardíaca também foi utilizado para realização do esfregaço sanguíneo com o intuito de diferenciar o perfil celular. Foi contabilizado, por meio de um microscópio, a quantidade de macrófagos, linfócitos e neutrófilos na lâmina do esfregaço sanguíneo de cada animal, e a relação de porcentagem foi calculada em razão do total de leucócitos sanguíneos, os resultados estão apresentados na Figura 5 seguinte.

Figura 5. Quantificação de monócitos, linfócitos e neutrófilos no sangue.



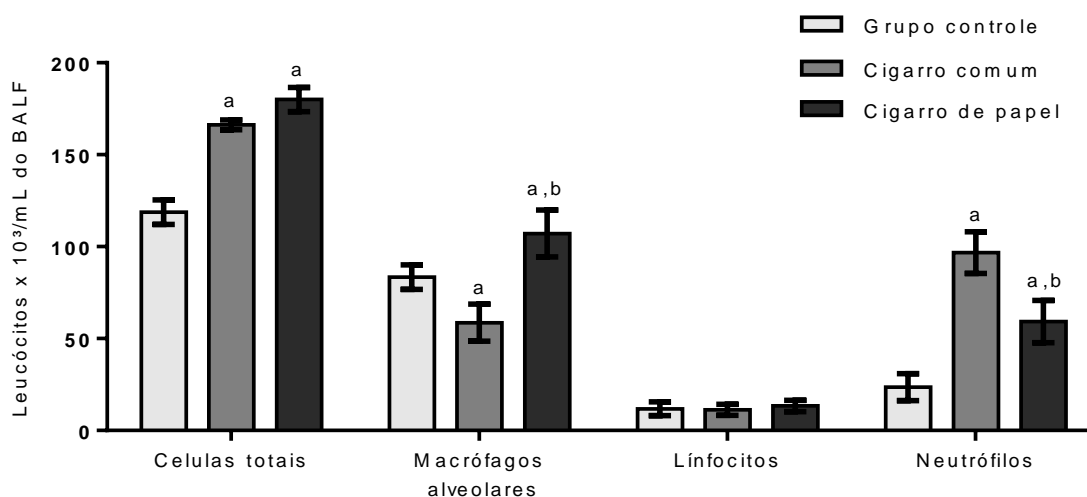
Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram expressos como média ± EPM (*n* = 8) e foram analisados por Two-way ANOVA seguido por pós-teste Newman-Keuls (*p* <0,05).

A diferenciação dos leucócitos em monócitos, linfócitos e neutrófilos obteve como diferença significativa entre os grupos apenas a contagem dos linfócitos (CC: 5,06 ± 0,44 x 10³ / mL; CP: 3,06 ± 0,14 x 10³ / mL e GC: 5,94 ± 0,52 x 10³ / mL; *p* =0,0004). Demonstrando redução significativa do total de linfócitos no sangue dos animais expostos a fumaça do cigarro de papel tanto em relação ao grupo exposto ao cigarro comum, quanto ao controle.

5.4. Análise do influxo de leucócitos e do perfil celular inflamatório do LBA

Com o propósito de avaliar o influxo celular inflamatório e a percentagem de diferenciação das células em macrófagos alveolares, linfócitos e neutrófilos no período de oito dias de exposição à fumaça de cigarro, os grupos cigarro comum (CC) e cigarro de papel (CP) foram analisados em relação a eles mesmos e ao grupo controle (GC). Os resultados obtidos estão representados na Figura 6.

Figura 6. Percentagem de macrófagos alveolares, linfócitos e neutrófilos no LBA.



Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram expressos como média \pm EPM ($n = 8$) e foram analisados por Two-way ANOVA seguido por pós-teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Os animais dos grupos expostos à fumaça de cigarro, tanto a partir de cigarro comum, como cigarro de papel apresentaram um aumento do influxo de células inflamatórias em comparação com animais do grupo não exposto (CC: $166 \pm 2,63 \times 10^3 / \text{mL}$ e CP: $180 \pm 6,55 \times 10^3 / \text{mL}$ comparativamente com GC: $118 \pm 6,66 \times 10^3 / \text{mL}$; $p < 0,0001$). A exposição à fumaça de cigarro causou um aumento do influxo celular inflamatório nos animais expostos tanto ao cigarro comum, quanto ao de papel, havendo diferença significativa desses para o grupo controle.

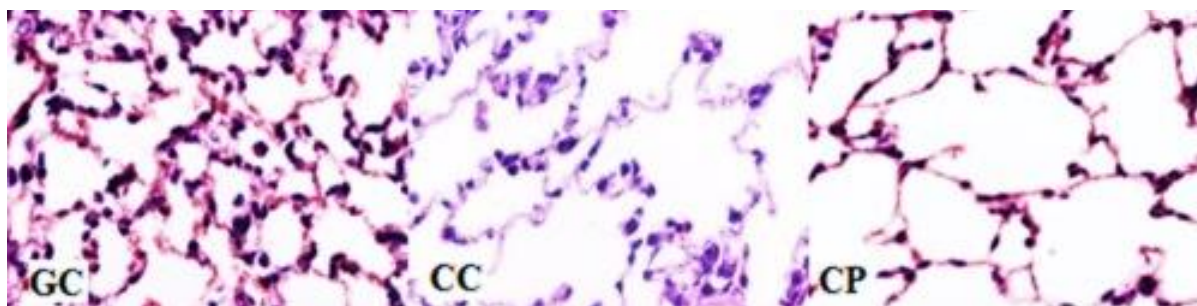
Em relação ao perfil inflamatório, foi observado um aumento significativo do número de macrófagos alveolares no grupo CP, sendo esse significativamente maior

que no grupo CC. O número de macrófagos no grupo CC foi significativamente menor em relação ao grupo controle. O percentual de linfócitos não demonstrou diferença significativa entre os grupos, permanecendo o mesmo com ou sem exposição à fumaça de cigarro. Contudo, o percentual de neutrófilos apresentou diferença significativa em todos os grupos, quando comparados entre si. O grupo CC apresentou o maior influxo de neutrófilos, tendo diferença significativa tanto do grupo CP, quanto do GC. O número de neutrófilos também foi maior e estatisticamente diferente quando comparado ao GC.

5.5. Morfologia dos cortes histológicos de pulmão

Após eutanásia, parte do pulmão dos animais foi imerso no formol para posterior realização do processamento tecidual e da análise estereológica. Os cortes de pulmão corados em hematoxilina-eosina (HE) apresentaram os seguintes resultados mostrados na figura 7 e tabela 2.

Figura 7. Fotomicrografias de seções pulmonares.



Cortes de pulmão corados com hematoxilina e eosina. GC: Grupo controle. CC: Cigarro comum. CP: Cigarro de papel. Ampliação de 40x.

Tabela 2. Análise morfológica do pulmão.

Grupos	Estereologia	
	Vva (%/mm ²)	Vvsa (%/mm ²)
GC	43,36 ± 3,46	55,28 ± 3,52
CC	57,46 ± 1,92 ^a	41,60 ± 1,95 ^a
CP	53,40 ± 1,83 ^a	46,21 ± 1,85 ^a

Vva: espaços alveolares: Vvsa: volume do septo alveolar. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 8) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

A análise dos resultados da morfológica do parênquima pulmonar demonstrou diferença significativa na densidade de volume de espaço alveolar (Vva) entre os animais expostos quando comparado aos controles (GC: $43,36 \pm 3,46$ %/mm²; CC: $57,46 \pm 1,92$ %/mm² e CP: $53,40 \pm 1,83$ %/mm²; $p = 0,0022$). E também houve diferença significativa na densidade de volume de septos alveolares (Vvsa) entre os animais expostos quando comparado aos controles (GC: $55,28 \pm 3,52$ %/mm²; CC: $41,60 \pm 1,95$ %/mm² e CP: $46,21 \pm 1,85$ %/mm²; $p = 0,0037$).

5.6. Análise bioquímica dos homogenatos de pulmão

A exposição à fumaça de cigarro promove um aumento da produção de espécies oxidantes em analogia aos antioxidantes. O organismo a fim de neutralizar esse desequilíbrio, promove mudanças fisiológicas. Para estimar essas alterações, nós mensuramos quantitativamente o teor proteínas totais presente nos homogenatos de pulmão, sendo esse valor utilizado como parâmetro de cálculo para as outras dosagens. Avaliamos a formação de TBARS; a atividades das enzimas antioxidantes SOD e CAT; a formação de glutathiona reduzida e oxidada, e a razão das mesmas; e a proteína carbonilada como marcador biológico do estresse oxidativo, sendo, todas as dosagens realizadas com o homogeneizado pulmonar. Os dados estão apresentados abaixo, na Tabela 3.

Tabela 3. Análise bioquímica de homogeneizado de pulmão.

	GC	CC	CP	p*
Proteínas Totais (mg)	$1,77 \pm 0,061$	$1,23 \pm 0,08^a$	$1,13 \pm 0,09^a$	< 0,0001
TBARS (nM/mg prot)	$1,00 \pm 0,07$	$1,57 \pm 0,14^a$	$1,54 \pm 0,10^a$	0,0033
SOD (U/mg prot)	$25,73 \pm 1,09$	$34,9 \pm 1,86^a$	$40,65 \pm 3,44^a$	0,0012

CAT (U/mg prot)	0,48 ± 0,06	0,96 ± 0,06 ^a	0,94 ± 0,10 ^a	0,0003
GSH (µM)	79,56 ± 7,52	29,14 ± 2,26 ^a	42,08 ± 14,23 ^a	0,0037
GSSG (µM)	10,96 ± 0,74	6,85 ± 0,57 ^a	11,8 ± 1,85 ^b	0,0164
Razão GSH / GSSG	7,28 ± 0,60	4,02 ± 0,55 ^a	3,32 ± 0,89 ^a	0,0037
Proteína Carbonilada (nmol/mg)	9,93 ± 0,75	7,07 ± 0,81	12,88 ± 1,68 ^b	0,0073

TBARS: ácido tiobarbitúrico. SOD: superóxido dismutase. CAT: catalase. GSH: glutationa reduzida. GSSG: glutationa oxidada. GC: grupo controle. CC: cigarro comum. CP: cigarro de papel. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 8) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

No valor obtido de proteínas totais, houve diferença significativa do grupo exposto tanto à fumaça do cigarro comum, como a fumaça do cigarro de papel em comparação ao grupo controle (CC: 1,23 ± 0,08 /mg e CP: 1,13 ± 0,09 /mg comparativamente com GC: 1,77 ± 0,061 /mg; $p < 0,0001$). Demonstrando assim, que a exposição à fumaça de ambos os cigarros (comum e papel) aumenta os valores de proteínas totais dos homogenatos de pulmão.

O índice de peroxidação lipídica obtido por meio da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), evidenciou diferença significativa entre os grupos analisados. Os animais expostos ao CC tiveram uma maior formação de TBARS, seguido pelos expostos ao CP (CC: 1,57 ± 0,14 nM/mg prot e CP: 1,54 ± 0,10 nM/mg prot comparativamente com GC: 1,00 ± 0,07 nM/mg prot; $p = 0,0033$). Determinando assim, que os componentes da fumaça de cigarro, tanto do CC quanto do CP, sendo esse em menor proporção, aumentam a peroxidação lipídica do parênquima pulmonar.

A atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) foi mensurada e obteve resultados significativos e comparativamente semelhantes. A avaliação da atividade da enzima SOD resultou em aumento nos animais expostos a ambos os cigarros quando correlacionado aos não expostos (CC: 34,9 ± 1,86 U/mg prot e CP: 40,65 ± 3,44 U/mg prot comparativamente com GC: 25,73 ± 1,09 U/mg prot; $p = 0,0012$). E na exposição à fumaça do CP esse aumento da atividade da enzima foi significativamente maior que nos animais expostos ao CC. A avaliação da atividade da enzima CAT, corroborou com resultados semelhantes, uma

vez que a exposição a fumaça de ambos os cigarros também promoveu aumento significativo da atividade da enzima (CC: $0,96 \pm 0,06$ U/mg prot e CP: $0,94 \pm 0,10$ U/mg prot comparativamente com GC: $0,48 \pm 0,06$ U/mg prot; $p=0,0003$).

A glutationa reduzida (GC: $79,56 \pm 7,52$ μ M; CC: $29,14 \pm 2,26$ μ M e CP: $42,08 \pm 14,23$ μ M; $p=0,0037$) e oxidada (GC: $10,96 \pm 0,74$ / μ M; CC: $6,85 \pm 0,57$ / μ M e CP: $11,8 \pm 1,85$ / μ M; $p=0,0164$) foram mensuradas, e a razão glutationa reduzida/oxidada foi utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos. A razão GSH/GSSG (GC: $7,28 \pm 0,60$ / μ M; CC: $4,02 \pm 0,55$ / μ M e CP: $3,32 \pm 0,89$ / μ M; $p=0,0037$) mostrou uma redução significativa por parte dos animais expostos, tanto para os expostos à fumaça do CC, quanto do CP em comparação ao GC.

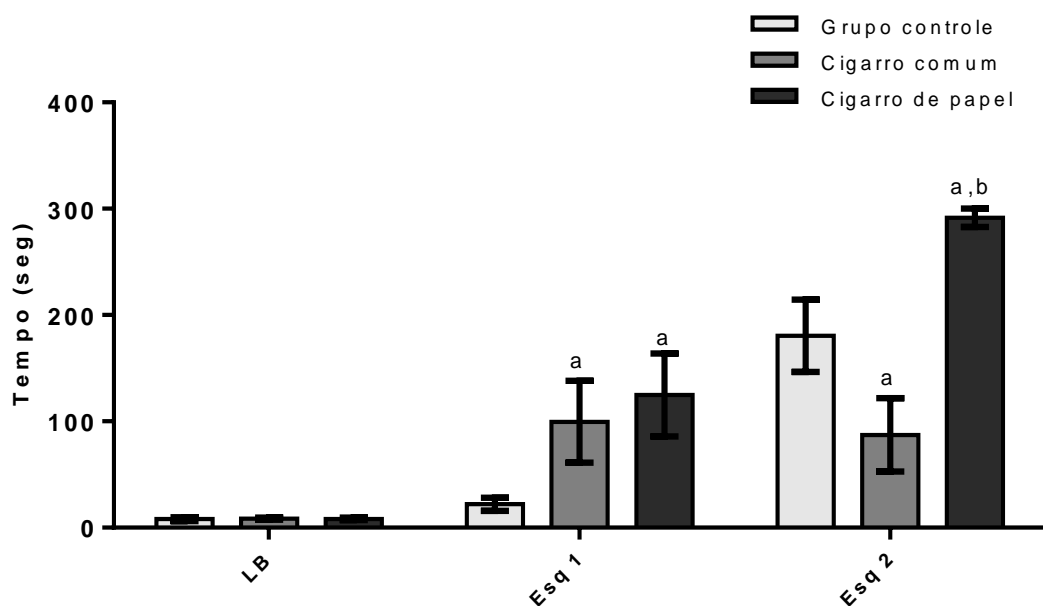
A proteína carbonilada, outro marcador biológico de estresse oxidativo, é representativa do dano provocado na parte proteica da membrana. Os resultados dessa dosagem mostraram aumento significativo apenas por parte dos animais expostos ao cigarro de papel (GC: $9,93 \pm 0,75$ / μ M; CC: $7,07 \pm 0,81$ / μ M e CP: $12,88 \pm 1,68$ / μ M; $p=0,0073$).

5.7. Teste comportamental

5.7.1. Esquiva inibitória avaliada no Labirinto em T elevado

No Labirinto em T elevado primeiramente foi avaliado a esquiva inibitória do animal, registrada em três tentativas consecutivas (LB, Esq 1 e Esq 2), com intervalos de 30 segundos entre as tentativas. Os dados obtidos estão mostrados na Figura 8 seguinte.

Figura 8. Teste de esquiva inibitória no LTE.



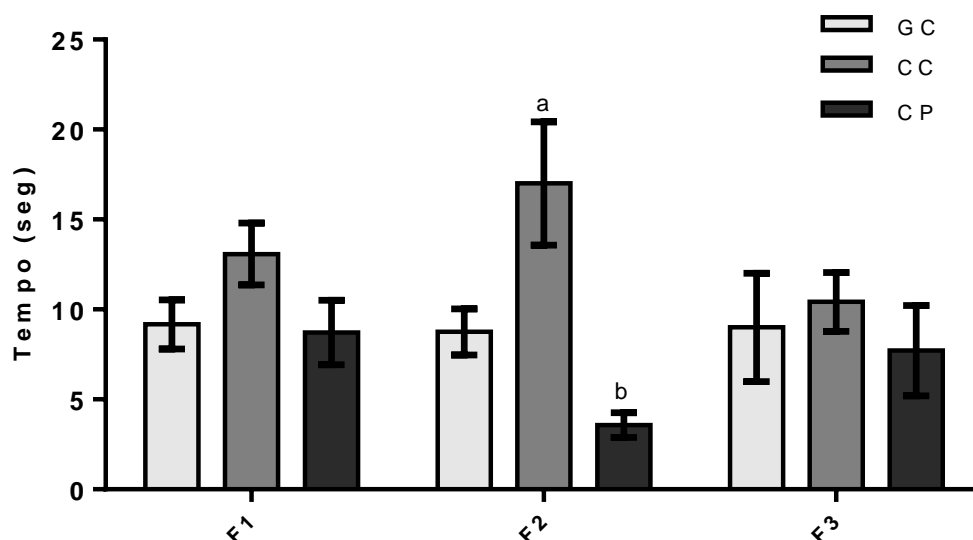
Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída do braço fechado do LTE (LB, Esq 1 e Esq 2). LB: Linha de base. Esq 1: Esquiva 1. Esq 2: Esquiva 2. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

De acordo com as análises estatísticas observou-se um aumento no tempo de latência, dos animais do grupo controle e do cigarro de papel, ao longo das três tentativas de esquiva inibitória no LTE, o que demonstra uma capacidade de aprendizado destes animais. Porém, o grupo exposto ao cigarro comum obteve aumento da latência apenas na segunda tentativa (Esq 1), indicando que a presença da nicotina no cigarro provoca mesmo o efeito ansiolítico proveniente da droga [$F(2, 58) = 46,06; p < 0,0001$]. Além disso, foi observada diferença estatística em relação ao tratamento nos grupos [$F(2, 29) = 3,79; p = 0,0344$] e a interação (tentativas vs tratamento) do grupo controle e dos grupos tratado com fumaça de cigarro comum e de papel [$F(4, 58) = 7,84; p < 0,0001$].

5.7.2. Teste de fuga avaliado no Labirinto em T elevado

Posteriormente a inserção do animal no braço fechado, foi realizado o teste de fuga no braço aberto (F1, F2 e F3), com intervalos entre as tentativas, sendo o tempo de latência registrado e demonstrado na Figura 9 abaixo.

Figura 9. Teste de fuga no LTE.



Média (\pm EPM) das latências (em segundos) de saída de um dos braços abertos do LTE (F1, F2 e F3). F1: Fuga 1. F2: Fuga 2. F3: Fuga 3. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Letra (b) representa a diferença entre cigarro comum e cigarro de papel. Os dados foram analisados por Two-way ANOVA seguido também por pelo pós-teste Newman-Keuls ($p < 0,05$).

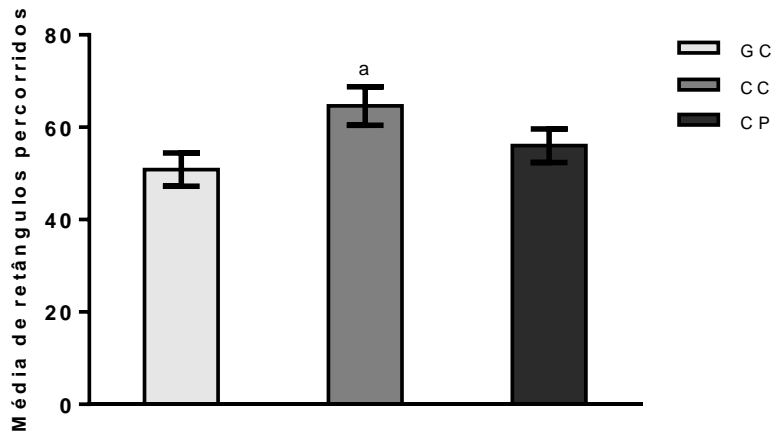
Como representado nos resultados, não houve diferença significativa entre os grupos (controle, comum e papel) na primeira exposição ao braço aberto (F1). Contudo, na segunda tentativa (F2) os animais do grupo exposto à fumaça do cigarro comum aumentaram a latência no braço aberto, sendo sua permanência no mesmo significativamente maior do que a do grupo controle, sugerindo um aumento do comportamento do tipo pânico por parte desses animais. Enquanto que os animais expostos à fumaça do cigarro de papel saíram do F2 significativamente ainda mais rápido que do F1. O registro das latências de saída do braço aberto na F3 não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

De acordo com as análises estatísticas não houve diferença significativa na interação nem nas tentativas. Porém, houve diferença no tratamento (exposição à fumaça do cigarro comum e de papel) [$F(2, 28) = 4,77$; $p = 0,0165$].

5.7.3. Atividade locomotora avaliada no Campo Aberto

Subsequente ao teste do labirinto em T elevado, o animal foi colocado no centro do CA e a média de retângulos percorridos pelo mesmo foi registrada no tempo total de 5 minutos, os dados estão evidenciados na Figura 10 abaixo.

Figura 10. Teste de atividade locomotora no CA.



Média de retângulos percorridos por cada grupo experimental. Letra (a) representa a diferença dos grupos expostos (cigarro comum e de papel) para o controle. Os dados foram expressos como média \pm EPM e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

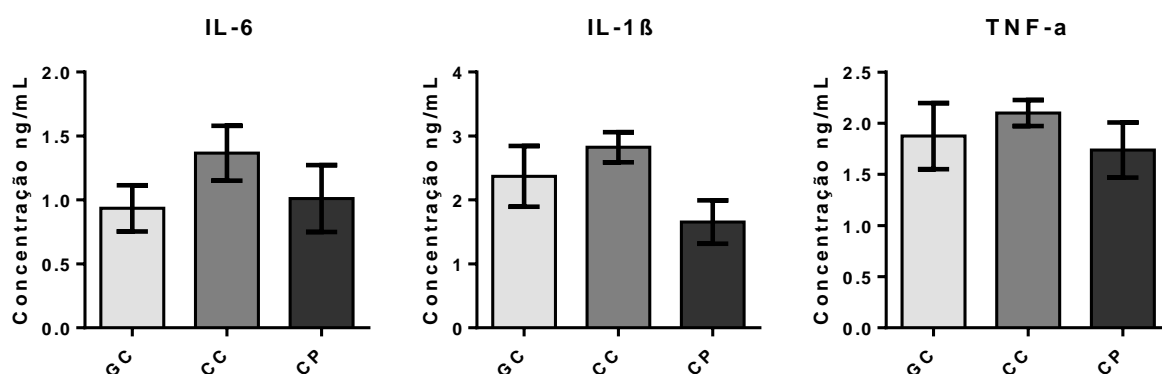
Ao avaliar a atividade locomotora do animal obteve como resultado significativo apenas uma maior locomoção por parte do grupo exposto à fumaça do cigarro comum em relação ao controle (GC: $50,85 \pm 3,62$ unidade; CC: $64,62 \pm 4,18$ unidade e CP: $56,00 \pm 3,612$ unidade; $p = 0,0422$).

5.8. Análises das citocinas inflamatórias

5.8.1. Dosagem de citocinas das amostras do LBA

Para avaliar as citocinas inflamatórias foi utilizado o ensaio imunoenzimático. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 11 abaixo.

Figura 11. Concentração de citocinas no LBA.



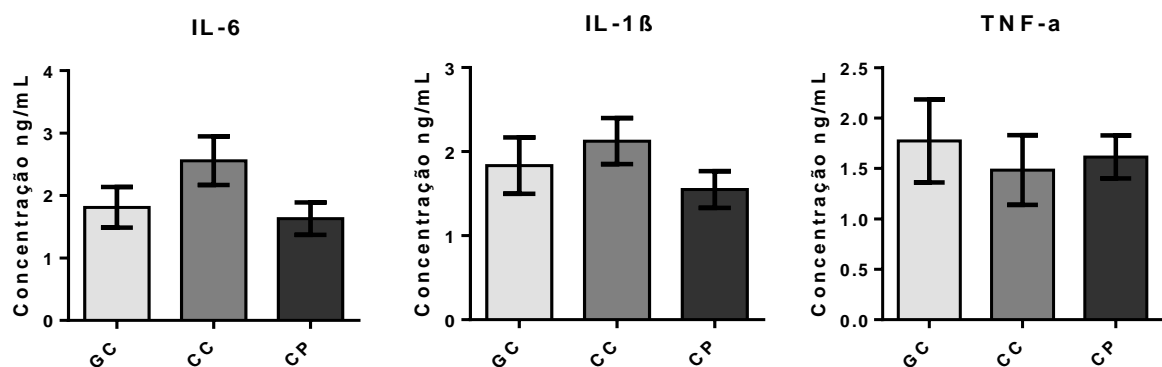
IL-6: Interleucina 6. IL-1β: Interleucina 1 beta. TNF-α: Fator de necrose tumoral GC: grupo controle. CC: cigarro comum. CP: cigarro de papel. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 8) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

A análise estatística das citocinas pró-inflamatórias no plasma não demonstrou diferença significativa entre os grupos.

5.8.2. Dosagem de citocinas das amostras de Plasma

Ainda avaliando as citocinas pró-inflamatórias, a Figura 12 abaixo mostra os resultados provenientes da análise no plasma.

Figura 12. Concentração de citocinas no plasma.



IL-6: Interleucina 6. IL-1β: Interleucina 1 beta. TNF-α: Fator de necrose tumoral GC: grupo controle. CC: cigarro comum. CP: cigarro de papel. Os dados foram expressos como média ± EPM (n = 8) e foram analisados por one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$).

Assim como nos resultados obtidos do LBA, as análises estatísticas do plasma não geraram diferença significativa entre os grupos.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho verificamos se o período de oito dias de exposição à fumaça de cigarro (cigarro comum-CC e cigarro de papel-CP) seria suficiente em induzir inflamação pulmonar. Observamos aumento do influxo celular inflamatório, aumento de TBARS, redução da razão GSH/GSSG, aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) e alteração da histoarquitetura do pulmão, evidenciaram que oito dias de exposição de ratos Wistar à fumaça de cigarro não só foram suficiente em causar processo inflamatório como também promoveram dano pulmonar nesses animais. Assim, diante desses achados, focamos em avaliar se esse processo inflamatório pulmonar induzido pela exposição promoveria alteração de comportamento. Nossos dados demonstraram que a exposição dos animais à fumaça do cigarro comum, portanto, com nicotina, promove redução gradativa na latência de saída do braço fechado no teste de esquiva inibitória do braço fechado do LTE, evidenciando comportamento do tipo ansiolítico, e aumenta a latência na fuga 2 do braço aberto, evidenciando comportamento do tipo panicolítico. Por outro lado, animais expostos à fumaça do cigarro de papel, portanto sem nicotina, apresentaram comportamento do tipo ansiogênico, caracterizado pelo aumento consecutivo das latências na esquiva inibitória do braço fechado, e panicogênico, devido à redução da latência de saída do braço aberto (aversivo) no teste de fuga. Nossos dados sugerem que a inflamação pulmonar, ocasionada pela exposição à fumaça de cigarro, pode ser a determinante da alteração de comportamento do tipo pânico e ansiedade independente da presença de nicotina. O modelo de exposição à fumaça de cigarro utilizado nesse estudo tem como princípio influenciar o mínimo possível no comportamento de estresse do animal, por isso, todos os animais passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, exceto a exposição à fumaça de cigarro, como demonstrado em trabalhos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2014). A maior crítica, no entanto, em relação a essa exposição, está no fato do animal se sentir incomodado com a fumaça. A escolha dos testes comportamentais empregados nesse trabalho também partiu de estudos prévios realizados em nosso laboratório (De Noronha *et al.*, 2017) onde foi validado o teste e padronizado.

O estudo foi desenvolvido com machos a fim de minimizar os efeitos comportamentais provocados pelas alterações hormonais evidenciadas em fêmeas, como nos achados de estudos prévios do nosso grupo de pesquisa (Campos, 2015).

A exposição à fumaça do cigarro comum ocasionou aos animais um ganho de peso menor em relação ao grupo controle. Não se pode afirmar que à fumaça de cigarro promove perda de peso por parte dos animais, por mais que a percepção comumente seja essa, mas talvez o ganho seja comprometido pelo procedimento experimental da exposição que pode ser estressante para o animal e interferir nas propriedades organolépticas dos alimentos (Abreu-Villaca *et al.*, 2015). A exposição à fumaça do cigarro de papel não promoveu alteração do ganho de peso, confirmando assim, que a fumaça por si só não é a responsável por essa mudança, e que sim, algum constituinte intrínseco do cigarro comum pode ter interferido nesse menor ganho. Sabe-se que a nicotina possui como características: aumentar o gasto energético (tanto por efeitos diretos nos tecidos periféricos, como por ação no sistema nervoso central regulando o metabolismo), diminuir o apetite (pela transmissão de sinais, para cessação da ingestão, a neurônios chamados opiomelanocortina-POMC situados no hipotálamo), aumentar a saciedade e com isso diminuir a ingestão alimentar (Audrain-McGovern e Benowitz, 2011; Mineur *et al.*, 2011). Portanto, a presença da mesma no cigarro comum pode ter condicionado a esse menor ganho de peso por parte dos animais desse grupo.

Almejando observar além de processo inflamatório local (no caso, pulmonar) possível presença de inflamação sistêmica, decidimos por analisar os elementos sanguíneos dos animais (hemograma). Diversos são os tipos celulares envolvidos na inflamação pulmonar e dentre esses estão às células epiteliais que compõe as vias aéreas e alvéolos e as células imunológicas sanguíneas (Wong *et al.*, 2016). Nossos resultados evidenciaram apenas uma redução da hemoglobina por parte dos animais expostos a FC do cigarro de papel, demonstrando que a exposição a esse cigarro pode comprometer de certo modo o transporte de oxigênio pelo sangue, uma vez que a hemoglobina é a molécula carreadora desse transporte. O volume de hematócrito também foi significativamente menor nos animais expostos a esse tipo de cigarro. Contudo, uma vez que as células vermelhas desses animais se encontram em valores similares a dos demais grupos, esse valor reduzido de hematócrito por parte do grupo exposto à fumaça do cigarro de papel pode ser devido a um aumento do volume

plasmático em comparação a porcentagem de volume ocupado pelas hemácias, no volume total de sangue. A redução das plaquetas nos animais expostos à fumaça de cigarro de papel pode ser em virtude de um recrutamento das mesmas ao local da lesão, no caso o pulmão, resultado similar foi encontrado em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa que avaliou em ratos os efeitos oxidativos na resposta inflamatória pulmonar da exposição a diferentes concentrações de formaldeído (Murta *et al.*, 2016). A exposição ao cigarro de papel também causou redução significativa do sistema imunológico do organismo (concentração de leucócitos) que, portanto, aumentou a susceptibilidade desse grupo à inflamação.

A exposição à fumaça de cigarro (tanto comum, como papel) promoveu aumento significativo do influxo celular inflamatório no lavado broncoalveolar, esses resultados corroboram a estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e outros autores que também demonstraram aumento celular no LBA de animais expostos à FC (Castro *et al.*, 2004; Silva Bezerra *et al.*, 2006; Valença, Bezerra, *et al.*, 2008; Valença, Silva Bezerra, *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2013; Lopes *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2015; He *et al.*, 2015), confirmando assim presença de processo inflamatório local. Bezerra, Castro, Campos e colaboradores, em seus respectivos estudos, ainda revelaram que o número de macrófagos foi maior em relação ao de neutrófilos na exposição à fumaça de cigarro (Castro *et al.*, 2004; Silva Bezerra *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2013), dados similares aos nossos resultados obtidos da exposição à fumaça do cigarro de papel. Entretanto, a exposição à fumaça do cigarro comum em nosso trabalho acarretou influxo maior de neutrófilos em comparação aos macrófagos, e esse resultado corrobora a estudos que presumem que durante a fase de inflamação há um aumento significativo de neutrófilos na área afetada (no caso, os pulmões) ampliando por consequência a produção de espécies reativas de oxigênio (Hoenderdos e Condliffe, 2013; Meijer *et al.*, 2013; Lerner *et al.*, 2016). Assim, nossos resultados evidenciam que o cigarro de papel, portanto, sem nicotina, induziu a processo inflamatório assim como o cigarro comum (com nicotina), havendo apenas uma diferença do tipo celular mais predominante em cada tipo de exposição.

Considerando os resultados obtidos por meio da análise do influxo celular inflamatório, julgamos necessário avaliar a histoarquitetura do parênquima pulmonar, a fim de observar possível diferença significativa entre os grupos (controle, cigarro comum e papel). As lâminas de cortes seriados histológicos de pulmão, coradas com

eosina e hematoxilina, foram analisadas por meio de microscópio. A exposição à fumaça de cigarro (comum e papel) gerou aumento do volume dos alvéolos e redução do volume dos septos do pulmão, confirmando a hipótese de dano no parênquima pulmonar quando comparado aos animais expostos a ar ambiente (controle). Assim sendo, novamente, a exposição ao cigarro comum, bem como ao de papel apresentaram resultados similares, promoveram alteração da histoarquitetura pulmonar, indicando dano. Estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa com exposição à fumaça de cigarro por 60 dias consecutivos (Bezerra *et al.*, 2011) corroboram aos nossos resultados e estudo anterior (Ross *et al.*, 1962) demonstra que esse remodelamento é característico de enfisema. Mahadeva, Shapiro, Wright e Churg acreditam que o período necessário para causar enfisema varia entre animais e que a tendência ao enfisema depende da dose de cigarros inalados e do método de exposição utilizado (Wright e Churg, 2002; Mahadeva e Shapiro, 2005).

De longe é sabido os males que a inalação à fumaça de cigarro em curto e em longo prazo causam a saúde tanto dos animais, como dos seres humanos e estudos utilizados como embasamento deste trabalho, confirmam esses dados (Inca, 2008; Bezerra *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2013; Mcdermott *et al.*, 2013; Baiardini *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2014; Abreu-Villaca *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Who, 2015). Portanto, além do influxo inflamatório e da histoarquitetura pulmonar, consideramos que seria imprescindível analisar também o estresse oxidativo e a variação das enzimas antioxidantes durante o processo de exposição à fumaça de cigarro por oito dias consecutivos. Em relação ao dano oxidativo avaliado por meio da concentração de TBARS, houve um aumento significativo por parte dos animais expostos à fumaça de cigarro em comparação ao controle, esse resultado indica peroxidação lipídica do parênquima pulmonar e corrobora a estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa tanto na exposição em curto prazo (Silva Bezerra *et al.*, 2006; Campos *et al.*, 2013), como em longo prazo (Campos *et al.*, 2014). Outra forma de avaliar o dano no parênquima pulmonar, porém, relacionado a dano na parte proteica da membrana, é por meio da análise da concentração de proteína carbonilada no tecido. O resultado aumentado da concentração de proteína carbonilada obtido neste estudo, em relação à exposição à fumaça do cigarro de papel, foi similar aos achados pelo nosso grupo de pesquisa em um trabalho que procurava avaliar os efeitos da exposição a formaldeído e também dosou as concentrações de proteína carbonilada nos tecidos

pós-exposição (Murta *et al.*, 2016). Porém, não corrobora ao nosso resultado em relação à exposição à fumaça do cigarro comum, que apresentou redução da concentração de proteína carbonilada. Indicando assim, que talvez o período (oito dias) de exposição à fumaça do cigarro comum não seja potencialmente suficiente em danificar a parte proteica da membrana. Mas que outros componentes do cigarro, que não a nicotina, quando em maiores concentrações (como no cigarro de papel) podem causar ainda uma maior lesão no parênquima, atingindo até a parte proteica. Esses achados sugerem que a ausência ou presença de nicotina apenas tem influência psicológica sobre os animais, que os males provocados pelos cigarros contendo ou não a substância, são semelhantes ou algumas vezes podem ser até maiores na exposição à fumaça de um cigarro contendo apenas papel.

Segundo Ballatori (2009) a razão glutaciona reduzida pela oxidada é também um indicador de estresse oxidativo e tecidos saudáveis de órgãos no geral possuem em sua maior parte a glutaciona em sua forma reduzida (Ballatori *et al.*, 2009). Os achados do nosso estudo convergem no mesmo sentido dos apresentados por outros autores (Santos-Silva *et al.*, 2013; Murta *et al.*, 2016) que revelaram também uma redução significativa da razão glutaciona reduzida/oxidada nos animais expostos à fumaça de cigarro em comparação ao controle, indicando assim dano oxidativo do parênquima pulmonar. Mais uma vez temos semelhança dos resultados apresentados pela exposição ao cigarro comum e de papel (redução da razão da glutaciona) indicando que a presença ou não de nicotina promove do mesmo modo processo inflamatório e dano pulmonar.

Outra forma que optamos por utilizar neste estudo para avaliar o estado redox foi por meio da análise de duas enzimas antioxidantes cruciais no processo de equilíbrio dos oxidantes/antioxidantes. A atividade da superóxido dismutase e da catalase demonstraram resultados semelhantes, uma vez que ambas aumentaram a atividade durante o período de exposição à fumaça de cigarro (comum e papel) esses dados se assemelham aos apresentados por Lopes, Valença e colaboradores em seus estudos (Valença, Silva Bezerra, *et al.*, 2008; Lopes *et al.*, 2013). Portanto, o organismo frente à exposição à fumaça de cigarro e consequente aumento da obtenção e formação de oxidantes, promove ampliação da atividade da superóxido dismutase e a catalase a fim de tentar reverter esse quadro oxidativo, além de evitar

a formação do radical hidroxila que não possui um sistema de defesa contra ele (Lushchak, 2015).

As citocinas inflamatórias que demos foco neste trabalho foram: IL-1 β , IL-6 e TNF, optamos por avaliar estas em razão do importante papel na inflamação e por comumente terem sua secreção alterada durante a exposição à fumaça de cigarro (Rufino e Lapa E Silva, 2006; Mills e Dunne, 2009; Striz *et al.*, 2014; Wong *et al.*, 2016). Surpreendentemente, a concentração destas citocinas analisadas no LBA dos animais expostos ao cigarro comum, não aumentou em comparação aos controles, ao contrário do observado em estudo realizado com camundongos por Valença (Valença *et al.*, 2008). E, além disso, a análise do plasma também não demonstrou diferença significativa entre os grupos (controle, comum e papel). Porém, segundo Lowry e colaboradores (2007) a inflamação broncopulmonar pode permanecer mesmo quando não há um aumento significativo de citocinas inflamatórias plasmáticas, corroborando assim aos nossos resultados. Portanto, uma vez que a exposição a ambos os tipos de cigarro (comum e papel) não promoveu aumento significativo das citocinas inflamatórias analisadas neste estudo, acredita-se que o período de oito dias de exposição por mais que tenha ocasionado inflamação pulmonar e dano oxidativo do pulmão, não foi suficiente em gerar diferença significativa entre os grupos expostos e não expostos na análise do ensaio imunoenzimático.

Tendo em mãos uma gama de resultados que indicam processo inflamatório e lesão pulmonar independente da presença de nicotina no cigarro, visto que mostramos que o cigarro de papel induz da mesma forma a inflamação que o cigarro comum, demos foco na nossa hipótese que sugere que apenas a inflamação pulmonar seria suficiente em alterar o comportamento. Para isso, realizamos os testes comportamentais de esquiva inibitória e fuga no labirinto em T elevado (LTE) e o teste para avaliar a atividade locomotora no campo aberto (CA) (Zangrossi e Graeff, 2014).

O resultado referente ao teste de esquiva inibitória no LTE dos animais expostos à fumaça do cigarro comum demonstrou aumento da latência apenas na segunda tentativa, permanecendo constante na terceira, indicando que os animais expostos ao cigarro com nicotina tendem a ter uma redução no comportamento do tipo ansiedade (Sant'ana *et al.*, 2016; De Noronha *et al.*, 2017) e que a presença da mesma no cigarro pode ter sido a responsável por essa alteração, devido ao efeito ansiolítico da droga (Benowitz, 2010). Estes resultados corroboram ao fato que a

nicotina pode ter efeitos tanto ansiolíticos como ansiogênicos em animais e essa variação depende da dose administrada, sendo considerado que altas doses comumente induzem a uma ação ansiogênica e baixas uma ação ansiolítica (Irvine *et al.*, 2001; Picciotto *et al.*, 2002). Os efeitos da nicotina na exposição à fumaça de cigarro são relevantes, contudo, evidências sugerem que a nicotina não é o único componente do cigarro que provoca alterações no sistema nervoso central (Abreu-Villaca *et al.*, 2015).

Com relação aos resultados adquiridos no teste de fuga dos animais expostos ao cigarro comum obteve-se um aumento significativo da latência na segunda tentativa quando comparado ao controle, indicando redução no comportamento do tipo pânico (Pinheiro *et al.*, 2008; Roncon *et al.*, 2012; Zangrossi e Graeff, 2014).

Ao final do teste no labirinto em T elevado, os animais foram colocados no campo aberto e sua atividade locomotora foi avaliada, a fim de, validar e confirmar a resposta comportamental vista no aparato (Zangrossi e Graeff, 2014). Nossos achados nos levaram a acreditar que o comportamento emitido, tanto na esquiwa inibitória quando na fuga, pelos animais do grupo exposto ao cigarro comum não foi induzido por alteração da atividade locomotora, ao menos que os mesmos também tivessem entrado mais rápido na fuga 2.

Os animais expostos à fumaça do cigarro de papel, portanto, sem nicotina, na exposição ao LTE, reproduziram aumento gradativo da esquiwa inibitória nas tentativas, sugerindo capacidade de aprendizado por parte desses animais ao evitar o ambiente aberto e alto (braço aberto) e maior propensão ao comportamento do tipo ansiedade (Morais *et al.*, 2016; De Noronha *et al.*, 2017), do que o controle e os expostos à fumaça do cigarro comum. Estudos mais recentes tem proposto que o tabagismo aumenta o estresse por parte dos fumantes e não diminui como se pensava, e que o período pós a cessação desse hábito, imediatamente gera ansiedade devido à abstinência da nicotina (substância presente na composição do cigarro) e não do ato de fumar em si (Mcdermott *et al.*, 2013; Baiardini *et al.*, 2014; Taylor *et al.*, 2014). Porém, nossos resultados nos conduzem a interpretar essas alterações de forma diferente. Uma vez que demonstramos que o cigarro de papel, portanto, sem tabaco, além de causar inflamação provoca também aumento da ansiedade, acreditamos que a inflamação possa estar diretamente envolvida nessa

alteração de comportamento, e que o aumento da ansiedade no período de cessação possa também ser resultado da inflamação e não apenas da abstinência.

Com referência ao resultado do teste de fuga nos animais exposto à fumaça do cigarro de papel, houve uma redução significativa da latência na fuga 2, indicando comportamento do tipo pânico (Pinheiro *et al.*, 2008; Roncon *et al.*, 2012; Zangrossi e Graeff, 2014). Ademais, esse grupo ainda apresentou aumento da latência na fuga 3, sugerindo que o animal está menos estressado (ansioso) reforçando assim novamente a ideia do efeito ansiolítico da nicotina presente no cigarro comum. E assim como no grupo exposto ao cigarro comum, foi avaliada a atividade locomotora dos animais expostos ao cigarro de papel, a fim de minimizar interferências externa. E os resultados do campo aberto evidenciaram novamente que nenhum resultado de comportamento foi induzido por alteração da atividade locomotora.

Portanto, a análise comportamental em relação à exposição aos dois tipos de cigarro (comum e papel) revelou que o processo inflamatório, independente da nicotina, pode promover alteração no comportamento do tipo ansiedade, resultados que corroboram aos expostos por Hale e colaboradores em seu estudo (Hale *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a exposição à fumaça do cigarro comum (com tabaco) bem como a do cigarro de papel (sem tabaco) conduziu a alteração nos parâmetros inflamatórios e no status redox, além de promover alteração de comportamento. A exposição à fumaça do cigarro comum reduziu os comportamentos do tipo ansiedade e pânico. Por outro lado, o cigarro de papel induziu comportamento do tipo ansiedade e pânico. Acreditamos que a inflamação, devido à exposição à fumaça de cigarro, possa ser a responsável pelo aumento da ansiedade e não a ausência da nicotina em si, contudo, o cigarro que possui essa substância em sua composição provavelmente reduza a ansiedade pela ação desse composto químico.

REFERÊNCIAS:

ABREU-VILLACA, Y. et al. Tobacco smoke containing high or low levels of nicotine during adolescence: effects on novelty-seeking and anxiety-like behaviors in mice. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 232, n. 10, p. 1693-703, May 2015. ISSN 1432-2072 (Electronic) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25401170> >.

ADLER, K. B.; LI, Y. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 25, n. 4, p. 397-400, Oct 2001. ISSN 1044-1549 (Print) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694442> >.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.

AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-82, 1981. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329314> >.

AUDRAIN-MCGOVERN, J.; BENOWITZ, N. L. Cigarette smoking, nicotine, and body weight. **Clin Pharmacol Ther**, v. 90, n. 1, p. 164-8, Jul 2011. ISSN 1532-6535 (Electronic) 0009-9236 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633341> >.

BAIARDINI, I. et al. Smoking cessation, anxiety, mood and quality of life: reassuring evidences. **Minerva Med**, v. 105, n. 5 Suppl 1, p. 15-21, Oct 2014. ISSN 1827-1669 (Electronic) 0026-4806 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25396688> >.

BAILEY, K. R.; CRAWLEY, J. N. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: BUCCAFUSCO, J. J. (Ed.). **Methods of Behavior Analysis in Neuroscience**. 2nd. Boca Raton (FL), 2009. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781420052343.

BALLATORI, N. et al. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. **Biol Chem**, v. 390, n. 3, p. 191-214, Mar 2009. ISSN 1431-6730 (Print) 1431-6730 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166318> >.

BELVISI, M. G. Sensory nerves and airway inflammation: role of A delta and C-fibres. **Pulm Pharmacol Ther**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2003. ISSN 1094-5539 (Print) 1094-5539 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657494> >.

BELZUNG, C.; GRIEBEL, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. **Behav Brain Res**, v. 125, n. 1-2, p. 141-9, Nov 1 2001. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682105> >.

BENOWITZ, N. L. Nicotine addiction. **N Engl J Med**, v. 362, n. 24, p. 2295-303, Jun 17 2010. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554984> >.

BENOWITZ, N. L.; HENNINGFIELD, J. E. Establishing a nicotine threshold for addiction. The implications for tobacco regulation. **N Engl J Med**, v. 331, n. 2, p. 123-5, Jul 14 1994. ISSN 0028-4793 (Print) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7818638> >.

_____. Reducing the nicotine content to make cigarettes less addictive. **Tob Control**, v. 22 Suppl 1, p. i14-7, May 2013. ISSN 1468-3318 (Electronic) 0964-4563 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23591498> >.

BEZERRA, F. S. et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 177, n. 2, p. 120-6, Jul 31 2011. ISSN 1878-1519 (Electronic) 1569-9048 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457800> >.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 295-303, Sep 2015. ISSN 1958-5969 (Electronic) 1294-8322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487810> >.

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 21, n. 6, p. 567-74, Dec 2007. ISSN 0767-3981 (Print) 0767-3981 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034657> >.

BULLER, K. M.; XU, Y.; DAY, T. A. Indomethacin attenuates oxytocin and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to systemic interleukin-1 beta. **J Neuroendocrinol**, v. 10, n. 7, p. 519-28, Jul 1998. ISSN 0953-8194 (Print) 0953-8194 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700679> >.

CAMPOS, G. S. V. Influência do estradiol nos transtornos de ansiedade em ratas fischer submetidas à restrição alimentar. . p. 67f, 2015. Disponível em: < <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/6438> >.

CAMPOS, K. K. et al. Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. **Exp Lung Res**, v. 40, n. 4, p. 164-71, Apr 2014. ISSN 1521-0499 (Electronic) 0190-2148 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669879> >.

CAMPOS, K. K. et al. Long-term exposure to ultrasonically nebulized distilled water and saline causes cellular influx and oxidative stress in lung tissue of rats. **Exp Lung Res**, v. 41, n. 10, p. 546-53, 2015. ISSN 1521-0499 (Electronic) 0190-2148 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26651882> >.

CAMPOS, K. K. et al. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol**, v. 284, n. 1-2, p. 29-36, Jul-Aug 2013. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921078> >.

CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette smoke-induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 7, p. 836-49, Aug 2012. ISSN 1875-

5666 (Electronic) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697342> >.

CASTRO, P. et al. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. **Eur J Pharmacol**, v. 498, n. 1-3, p. 279-86, Sep 13 2004. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15364006> >.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2 Suppl, p. 637S-46S, Aug 2000. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919970> >.

COTRAN., R. **Patologia - Bases Patológicas Das Doenças**. 7ª, cap 2. 2005.

CRUZ, A. P. M. Z. J., H.; GRAEFF, F. G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicol. teor. pesqui.**, v. 13, n. 3, p. 269-78, 1997.

DAVID H. BARLOW, B. F. C., AND JULIA TUROVSKY. **Perspectives on anxiety, panic, and fear**. Lincoln, NE: University of Nebraska Press. , 1996.

DE NORONHA, S. R. et al. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 38-46, Jan 1 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27566182> >.

DECKER, M. W. et al. Diversity of neuronal nicotinic acetylcholine receptors: lessons from behavior and implications for CNS therapeutics. **Life Sci**, v. 56, n. 8, p. 545-70, 1995. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869835> >.

DONNY, E. C. et al. Nicotine self-administration in rats. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 122, n. 4, p. 390-94, Dec 1995. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657839> >.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radic Biol Med**, v. 15, n. 4, p. 353-63, Oct 1993. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8225017> >.

DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol Res**, v. 59, n. 4, p. 459-69, 2010. ISSN 0862-8408 (Print) 0862-8408 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19929132> >.

ERICSSON, A. et al. Type 1 interleukin-1 receptor in the rat brain: distribution, regulation, and relationship to sites of IL-1-induced cellular activation. **J Comp Neurol**, v. 361, n. 4, p. 681-98, Oct 30 1995. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8576422> >.

FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; GHIO, A. J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 10, p. 261-76, 2015. ISSN 1178-

2005 (Electronic) 1176-9106 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25673984> >.

FREUD, S. **The Standard Edition of the Complete Psychological works of Sigmund Freud.** . 1953.

GRAEFF, F. G.; VIANA, M. B.; TOMAZ, C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**, v. 26, n. 1, p. 67-70, 1993. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8220269> >.

GRAEFF, F. G. G., F.S. **Fundamentos de psicofarmacologia.** Segunda. São Paulo: Ateneu., 2012.

HALE, M. W.; ROOK, G. A.; LOWRY, C. A. Pathways underlying afferent signaling of bronchopulmonary immune activation to the central nervous system. **Chem Immunol Allergy**, v. 98, p. 118-41, 2012. ISSN 1662-2898 (Electronic) 0079-6034 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22767061> >.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.** , v. 18, n. 3, p. 385-403, 1934.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 327, n. 1, p. 1-5, Aug 1984. ISSN 0028-1298 (Print) 0028-1298 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6149466> >.

HANELL, A.; MARKLUND, N. Structured evaluation of rodent behavioral tests used in drug discovery research. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 252, 2014. ISSN 1662-5153 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100962> >.

HE, Z. H. et al. Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema. **Tob Induc Dis**, v. 13, n. 1, p. 6, 2015. ISSN 2070-7266 (Print) 1617-9625 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25814921> >.

HECHT, S. S. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. **Int J Cancer**, v. 131, n. 12, p. 2724-32, Dec 15 2012. ISSN 1097-0215 (Electronic) 0020-7136 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22945513> >.

HOENDERDOS, K.; CONDLIFFE, A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 48, n. 5, p. 531-9, May 2013. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328639> >.

HUGHES, J. R.; HATSUKAMI, D. Signs and symptoms of tobacco withdrawal. **Arch Gen Psychiatry**, v. 43, n. 3, p. 289-94, Mar 1986. ISSN 0003-990X (Print) 0003-990X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3954551> >.

HUMANS, I. W. G. O. T. E. O. C. R. T. Tobacco smoke and involuntary smoking. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 83, p. 1-1438, 2004. ISSN 1017-1606 (Print)

1017-1606 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15285078> >.

INCA. Mortalidade atribuível ao tabagismo passivo na população urbana do Brasil. 2008. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em: 17/9/2016.

_____. Advertências Sanitárias nas Embalagens dos Produtos de Tabaco. . 2009. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em: 17/9/2016.

IRVINE, E. E.; CHEETA, S.; FILE, S. E. Tolerance to nicotine's effects in the elevated plus-maze and increased anxiety during withdrawal. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 68, n. 2, p. 319-25, Feb 2001. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267637> >.

KIM, K. H.; JAHAN, S. A.; KABIR, E. A review of diseases associated with household air pollution due to the use of biomass fuels. **J Hazard Mater**, v. 192, n. 2, p. 425-31, Aug 30 2011. ISSN 1873-3336 (Electronic) 0304-3894 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21705140> >.

KLEINERMAN, J.; MARCHEVSKY, A. M.; THORNTON, J. Quantitative studies of APUD cells in airways of rats. The effects of diethylnitrosamine and NO₂. **Am Rev Respir Dis**, v. 124, n. 4, p. 458-62, Oct 1981. ISSN 0003-0805 (Print) 0003-0805 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6117239> >.

LANDEIRA-FERNANDEZ, J. F., S. **Métodos em Neurociência**. . 2012. Disponível em: < http://www.nnce.org/Arquivos/Artigos/2012/cruz_etal_2012.pdf >.

LAURELL, C.-B.; ERIKSSON, S. The Electrophoretic α 1-Globulin Pattern of Serum in α 1-Antitrypsin Deficiency. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 10, n. sup1, p. 3-8, 2013/03/07 2013. ISSN 1541-2555. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/15412555.2013.771956> >.

LEE, I. T.; YANG, C. M. Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. **Biochem Pharmacol**, v. 84, n. 5, p. 581-90, Sep 1 2012. ISSN 1873-2968 (Electronic) 0006-2952 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22587816> >.

LERNER, C. A. et al. Genetic Ablation of CXCR2 Protects against Cigarette Smoke-Induced Lung Inflammation and Injury. **Front Pharmacol**, v. 7, p. 391, 2016. ISSN 1663-9812 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27826243> >.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. ISSN 0076-6879 (Print) 0076-6879 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469> >.

LIMA, L. F. et al. Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea and diaphragm muscle of adult rats. **Ann Anat**, v. 202, p. 45-51, Nov 2015. ISSN 1618-0402 (Electronic) 0940-9602 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26342159> >.

LIU, M. H. et al. Eicosapentaenoic acid attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. **Front Physiol**, v. 5,

p. 440, 2014. ISSN 1664-042X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452730> >.

LOPES, A. A. et al. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. **Bioorg Med Chem**, v. 21, n. 24, p. 7570-7, Dec 15 2013. ISSN 1464-3391 (Electronic) 0968-0896 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24262889> >.

LOWRY, C. A. et al. Identification of an immune-responsive mesolimbocortical serotonergic system: potential role in regulation of emotional behavior. **Neuroscience**, v. 146, n. 2, p. 756-72, May 11 2007. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17367941> >.

LUSHCHAK, V. I. Free Radicals, Reactive Oxygen Species, Oxidative Stresses and Their Classifications. **Ukr Biochem J**, v. 87, n. 6, p. 11-8, Nov-Dec 2015. ISSN 2409-4943 (Print) 2409-4943 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27025055> >.

MAHADEVA, R.; SHAPIRO, S. D. Animal models of pulmonary emphysema. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 4, n. 6, p. 665-73, Dec 2005. ISSN 1568-010X (Print) 1568-010X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17305522> >.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4215654> >.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J Biol Chem**, v. 244, n. 22, p. 6049-55, Nov 25 1969. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100> >.

MCDERMOTT, M. S. et al. Change in anxiety following successful and unsuccessful attempts at smoking cessation: cohort study. **Br J Psychiatry**, v. 202, n. 1, p. 62-7, Jan 2013. ISSN 1472-1465 (Electronic) 0007-1250 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23284151> >.

MCDONALD, D. M. Respiratory tract infections increase susceptibility to neurogenic inflammation in the rat trachea. **Am Rev Respir Dis**, v. 137, n. 6, p. 1432-40, Jun 1988. ISSN 0003-0805 (Print) 0003-0805 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2849333> >.

MEIJER, M.; RIJKERS, G. T.; VAN OVERVELD, F. J. Neutrophils and emerging targets for treatment in chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Rev Clin Immunol**, v. 9, n. 11, p. 1055-68, Nov 2013. ISSN 1744-8409 (Electronic) 1744-666X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24168412> >.

MELLO, P. R. O., T.S. DORES, E.F.G.C.; BOTELHO, C. Evaluation of experimental tobacco exposure using cotinine and carboxyhemoglobin as exposure markers. **Pulmão RJ**, v. 14, n. 3, p. 228-236, 2005.

MILLS, K. H.; DUNNE, A. Immune modulation: IL-1, master mediator or initiator of inflammation. **Nat Med**, v. 15, n. 12, p. 1363-4, Dec 2009. ISSN 1546-170X (Electronic) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19966773> >.

MINEUR, Y. S. et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1330-2, Jun 10 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659607> >.

MISHARIN, A. V. et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 49, n. 4, p. 503-10, Oct 2013. ISSN 1535-4989 (Electronic) 1044-1549 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672262> >.

MORAIS, J. S. et al. Galanin subtype 1 and subtype 2 receptors mediate opposite anxiety-like effects in the rat dorsal raphe nucleus. **Behav Brain Res**, v. 314, p. 125-33, Nov 01 2016. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27498247> >.

MURTA, G. L. et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environ Pollut**, v. 211, p. 206-13, Apr 2016. ISSN 1873-6424 (Electronic) 0269-7491 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26774767> >.

NORDBERG, J.; ARNER, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n. 11, p. 1287-312, Dec 1 2001. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11728801> >.

NTP. 13th Report on Carcinogens (RoC). **National Toxicology Program.**, 2014. Acesso em: 12/07/2016.

PARIKH, R.; SHAH, T. G.; TANDON, R. COPD exacerbation care bundle improves standard of care, length of stay, and readmission rates. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 577-83, 2016. ISSN 1178-2005 (Electronic) 1176-9106 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27042046> >.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67, Aug 1985. ISSN 0165-0270 (Print) 0165-0270 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2864480> >.

PENA, K. B. et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 3207-3217, 2016. ISSN 1178-2005 (Electronic) 1176-9106 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28008246> >.

PICCIOTTO, M. R.; BRUNZELL, D. H.; CALDARONE, B. J. Effect of nicotine and nicotinic receptors on anxiety and depression. **Neuroreport**, v. 13, n. 9, p. 1097-106, Jul 2 2002. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151749> >.

PINHEIRO, S. N. et al. Anxiolytic and panicolytic effects of escitalopram in the elevated T-maze. **J Psychopharmacol**, v. 22, n. 2, p. 132-7, Mar 2008. ISSN 0269-8811 (Print) 0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18208911> >.

REDDY, S. P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. **Curr Mol Med**, v. 8, n. 5, p. 376-83, Aug 2008. ISSN 1566-5240 (Print) 1566-5240 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691064> >.

RONCON, C. M. et al. The panicolytic-like effect of fluoxetine in the elevated T-maze is mediated by serotonin-induced activation of endogenous opioids in the dorsal periaqueductal grey. **J Psychopharmacol**, v. 26, n. 4, p. 525-31, Apr 2012. ISSN 1461-7285 (Electronic) 0269-8811 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22279131> >.

ROSS, J. C. et al. Functional residual capacity in patients with pulmonary emphysema. A comparative study using gas dilution and plethysmographic techniques for measurement. **Ann Intern Med**, v. 57, p. 18-28, Jul 1962. ISSN 0003-4819 (Print) 0003-4819 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14494179> >.

RUFINO, R.; LAPA E SILVA, J. R. Cellular and biochemical bases of chronic obstructive pulmonary disease. **J Bras Pneumol**, v. 32, n. 3, p. 241-8, May-Jun 2006. ISSN 1806-3756 (Electronic) 1806-3713 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17273614> >.

SAMAHA, A. N. et al. Rapid delivery of nicotine promotes behavioral sensitization and alters its neurobiological impact. **Biol Psychiatry**, v. 57, n. 4, p. 351-60, Feb 15 2005. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705350> >.

SANT'ANA, A. B. et al. Panic-modulating effects of alprazolam, moclobemide and sumatriptan in the rat elevated T-maze. **Behav Brain Res**, v. 315, p. 115-22, Dec 15 2016. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27531502> >.

SANTOS-SILVA, M. A. et al. The oxidative response of mouse hearts is modulated by genetic background. **Arq Bras Cardiol**, v. 100, n. 2, p. 157-63, Feb 2013. ISSN 1678-4170 (Electronic) 0066-782X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23503825> >.

SIES, H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. **Academic. Press.**, p. 1-8. , 1985.

SILVA BEZERRA, F. et al. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11-12, p. 1192-201, Nov-Dec 2006. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095405> >.

SILVA, R.; OYARZUN, M.; OLLOQUEQUI, J. Pathogenic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke exposure. **Arch Bronconeumol**, v. 51, n. 6, p. 285-92, Jun 2015. ISSN 1579-2129 (Electronic) 0300-2896 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25614376> >.

STARCHER, B. C. Lung elastin and matrix. **Chest**, v. 117, n. 5 Suppl 1, p. 229S-34S, May 2000. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10843923> >.

STOLERMAN, I. P.; JARVIS, M. J. The scientific case that nicotine is addictive. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 117, n. 1, p. 2-10; discussion 14-20, Jan 1995. ISSN 0033-3158 (Print) 0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7724697> >.

STRIZ, I. et al. Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. **Clin Sci (Lond)**, v. 126, n. 9, p. 593-612, May 2014. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24450743> >.

TABASSIAN, A. R. et al. Stimulation of hamster pulmonary neuroendocrine cells and associated peptides by repeated exposure to cigarette smoke. **Am Rev Respir Dis**, v. 140, n. 2, p. 436-40, Aug 1989. ISSN 0003-0805 (Print) 0003-0805 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764380> >.

TASHKIN, D. P.; MURRAY, R. P. Smoking cessation in chronic obstructive pulmonary disease. **Respir Med**, v. 103, n. 7, p. 963-74, Jul 2009. ISSN 1532-3064 (Electronic) 0954-6111 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19285850> >.

TAYLOR, G. et al. Change in mental health after smoking cessation: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, v. 348, p. g1151, Feb 13 2014. ISSN 1756-1833 (Electronic) 0959-535X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24524926> >.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 9, n. 2, p. 203-22, Summer 1985. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861589> >.

UNITED STATES. PUBLIC HEALTH SERVICE. OFFICE OF THE SURGEON GENERAL. **How tobacco smoke causes disease : the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease : a report of the Surgeon General**. Rockville, M Washington, DC: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O., 2010. xv, 704 p ISBN 9780160840784.

VALENCA, S. S. et al. Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. **J Nutr Biochem**, v. 19, n. 9, p. 604-11, Sep 2008. ISSN 0955-2863 (Print) 0955-2863 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155509> >.

VALENCA, S. S. et al. Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. **Environ Res**, v. 108, n. 2, p. 199-204, Oct 2008. ISSN 1096-0953 (Electronic) 0013-9351 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721919> >.

VIANA, M. B.; TOMAZ, C.; GRAEFF, F. G. The elevated T-maze: a new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 3, p. 549-54, Nov 1994.

ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7862706> >.

WANG, H.; SUN, X. Desensitized nicotinic receptors in brain. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 48, n. 3, p. 420-37, Jun 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15914250> >.

WEINBERGER, A. H. et al. Depression and cigarette smoking behavior: a critical review of population-based studies. **Am J Drug Alcohol Abuse**, p. 1-16, Jun 10 2016. ISSN 1097-9891 (Electronic) 0095-2990 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27286288> >.

WHO. **Tobacco** 2015.

WONG, J.; MAGUN, B. E.; WOOD, L. J. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, v. 11, p. 1391-401, 2016. ISSN 1178-2005 (Electronic) 1176-9106 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27382275> >.

WRIGHT, J. L.; CHURG, A. Animal models of cigarette smoke-induced COPD. **Chest**, v. 122, n. 6 Suppl, p. 301S-306S, Dec 2002. ISSN 0012-3692 (Print) 0012-3692 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475805> >.

YUAN, M. et al. Nicotine and the adolescent brain. **J Physiol**, v. 593, n. 16, p. 3397-412, Aug 15 2015. ISSN 1469-7793 (Electronic) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26018031> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Behavioral validation of the elevated T-maze, a new animal model of anxiety. **Brain Res Bull**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1997. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288825> >.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 46 Pt 3, p. 397-406, Oct 2014. ISSN 1873-7528 (Electronic) 0149-7634 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657635> >.

ANEXO



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone: (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2015/35, intitulado "*Influência da inflamação pulmonar sobre comportamento de ansiedade em ratos Wistar expostos á fumaça de cigarro.*", que tem como responsável o/a Prof(a). Dr(a). Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados			
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo
Rato Wistar	136	3 MESES	MACHO

Restrição de dieta: () sim (x) não

Especificar:

Este Certificado expira em: **05/01/2020**

Ouro Preto, 11 de dezembro de 2015.

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP