

Karla Luciana Magnani

**ESTUDO MORFO-FUNCIONAL, BIOQUÍMICO E
IMUNOHISTOQUÍMICO DO APARELHO
RESPIRATÓRIO EM RATOS EXPOSTOS À
FUMAÇA DO CIGARRO E AO ÁLCOOL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bases Gerais da Cirurgia Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP-SP para a obtenção de Título de Doutor Área de Concentração: Reparação, Regeneração e Transplante de Tecidos e Órgãos.

Orientador: Dr Antônio José Maria Cataneo

Co-orientadora: Dra Daniele Cristina Cataneo

BOTUCATU

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Magnani, Karla Luciana.

Estudo morfo-funcional, bioquímico e imunohistoquímico do aparelho respiratório em ratos expostos à fumaça do cigarro e ao álcool / Karla Luciana Magnani. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Antônio José Maria Cataneo

Co-orientadora: Daniele Cristina Cataneo

Assunto CAPES: 40101126

1. Alcoolismo 2. Tabagismo 3. Pulmões - Doenças - Estudos experimentais

CDD 618.39

Palavras chave: Alcoolismo; Apoptose; Estresse oxidativo; Ratos wistars; Tabagismo

DEDICATÓRIA

“Agradeço a Deus, por me auxiliar na realização desta pesquisa, com saúde, perseverança, persistência e sabedoria”.

Dedico esta pesquisa a todos meus familiares, em especial aos meus pais Eurides e Dimer e ao meu marido, Alessandro Rodrigo Seki, que mais do que qualquer outra pessoa me auxiliou na conclusão desta etapa. Seki te agradeço por estar intensamente ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis. Tenho certeza que nosso amor será eterno.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao orientador **Prof. Antônio José Maria Cataneo** primeiramente por ter confiado a mim a realização desta pesquisa. Agradeço a paciência, compreensão, dedicação e conhecimentos fundamentais para meu crescimento científico e profissional, indispensáveis para a conclusão deste trabalho. Agradeço a atenção e expresso nesta dedicatória minha profunda admiração e respeito.

À co-orientadora **Profa. Daniele Cristina Cataneo** pela sugestão do tema da pesquisa e orientação na realização da mesma.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que colaboraram na elaboração desta pesquisa e em especial:

Aos patologistas **Maria Aparecida Custódio Domingues** e **Júlio Defaveri** da Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia e à **Vera Luiza Capelozzi** da Universidade de São Paulo, do Departamento de Patologia. À **Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues** agradeço imensamente a disponibilidade em me ensinar tudo que aprendi sobre patologia e imunohistoquímica. Nossa relação ultrapassou a relação professor-aluno e hoje a considero como uma grande amiga. Desejo profundamente que sua vida profissional lhe traga muitos bons frutos e satisfação, além de plena realização pessoal. À **Dra. Vera Luiza Capelozzi** agradeço imensamente por ter aberto com tanto carinho e dedicação as portas de seu laboratório para a conclusão desta pesquisa. Sua dedicação à pesquisa é contagiante e imensurável. Agradeço também aos Técnicos de Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu **Marcos Roberto Francchi** e **Sandra de Moraes Fernezlian**, da Faculdade de São Paulo pelo excelente trabalho realizado. Agradeço também ao biomédico **Igor Otávio Minatel** pela total dedicação e ensinamentos de microscopia óptica e análise de imagens. **Igor Otávio Minatel** você foi realmente essencial para a realização desta pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório Experimental da Clínica Médica **José Carlos Georgete** e **Mário Batista Bruno**, que representaram para mim a alma da minha pesquisa, já que sem a dedicação de vocês, o trabalho simplesmente não teria sido concluído. Agradeço em especial a paciência dedicada a mim pelo **José Carlos Georgete**.

Aos funcionários do Laboratório Experimental em Cirurgia e Ortopedia **Maria Cecília Salgado Mercadante** e **Danilo Chaguri**, pela dedicação aos cuidados e sacrifícios dos animais estudados.

Aos pós-graduandos **Marcos Vinicius Cataneo** e **Luciana Cataneo Souza** pelo auxílio nos sacrifícios dos animais.

À Prof. **Débora Damasceno** e a sua pós-graduanda **Ana Paula Machado Spada** do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia pela imensa dedicação na análise dos biomarcadores do estresse oxidativo. O conhecimento de vocês foi fundamental para meu aprendizado.

Às queridas **Regina Célia Spadin** e **Lilian Cristina N. Nunes**, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP). Agradeço, especialmente, à **Regina Célia Spadin** que conheci desde o mestrado e até hoje é meu anjo da guarda. Desejo a você muita felicidade, paz e prosperidade.

À amiga tão especial **Fernanda Chagas Bueno**, que não mediu esforços para que eu concluísse esta pesquisa, meu profundo e sincero agradecimento.

A Prof. **Lídia Raquel de Carvalho**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências do Campus de Botucatu (UNESP) que, gentilmente e sem medir esforços realizou as análises estatísticas.

Aos funcionários do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), especialmente as secretárias **Solange Aparecida de Albuquerque Clara**, **Roberta Ribeiro Magro**, pela imensurável dedicação e disponibilidade.

Ao Sr. **Carlos Luís Miguel**, Técnico em Informática do Departamento de Cirurgia e Ortopedia da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP), pelo carinho e preocupação dedicados a mim durante a realização deste trabalho. Agradeço ainda imensamente pela digitação, montagem e edição das tabelas e figuras e edição do texto, com competência, praticidade e dedicação.

ΕΠÍΓΡΑΦΕ

Certeza
De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos
Sempre começando...
A certeza de que seremos
Interrompidos antes de terminar...
Por tanto devemos:
Fazer da interrupção
Um caminho novo...
Da queda um passo
de dança
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro.
Fernando Pessoa.

RESUMO

RESUMO

Magnani KL. **ESTUDO MORFO-FUNCIONAL, BIOQUÍMICO E IMUNOHISTOQUÍMICO DO APARELHO RESPIRATÓRIO EM RATOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO CIGARRO E AO ÁLCOOL.** [Tese de Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia] Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista; 2009.

Introdução: Visto que 80–95% dos estilistas são também tabagistas, é desejável que modelos experimentais de estudo dos efeitos deletérios do consumo crônico do álcool incluam grupos com a associação de etilismo e tabagismo, permitindo desta forma, mimetizar, de maneira mais precisa, os efeitos do abuso crônico do álcool em humanos.

Objetivo: Investigar os efeitos da exposição crônica à fumaça do cigarro e ao álcool no estresse oxidativo, nas alterações morfo-funcionais e distúrbios imunohistoquímicos provocados por estas agressões no aparelho respiratório de ratos.

Método: cento e vinte ratos machos Wistar foram divididos em oito subgrupos de quinze animais (controle, tabagista, alcoolista e alcoolista + tabagista) em dois tempos experimentais (180 e 260 dias). Os biomarcadores de estresse oxidativo (superóxido dismutase, concentração da proteína tiol, glutathione peroxidase e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foram pesquisados em hemáceas lavadas. As alterações morfo-funcionais pulmonares (presença de reação inflamatória e estimativa de enfisema) foram avaliadas através do estudo histológico em microscopia óptica e estudo do pulmão isolado (complacência e complacência específica). O estudo imunohistoquímico foi realizado através da pesquisa da expressão de survivina, proteína P53, antígeno nuclear de proliferação celular e do índice apoptótico, pela técnica de TUNEL, no parênquima pulmonar e na traquéia.

Resultados: o peso corpóreo dos três grupos experimentais foi menor que o grupo controle, sendo os menores valores os dos grupos alcoolista + tabagista, sendo a estimativa de enfisema pulmonar também maior nestes animais. Os animais dos grupos tabagistas e tabagistas + alcoolista apresentaram: menor complacência, maior incidência de bronquiolite, maior expressão para a survivina nas traqueias e maior índice apoptótico bronquiolar. Os animais expostos somente ao tabagismo apresentaram níveis elevados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e menor complacência específica. Os três grupos experimentais apresentaram redução da expressão do antígeno nuclear de proliferação celular e imunoexpressão negativa para a proteína P53.

Conclusão: o tempo de exposição de 260 dias às drogas estudadas resultou em alterações mais expressivas, sendo que o principal fator envolvido foi a exposição à fumaça do cigarro.

Descritores: tabagismo, alcoolismo, estresse oxidativo, apoptose, ratos wistar.

ABSTRACT

ABSTRACT

Magnani KL. MORPHO-FUNCTIONAL, BIOCHEMICAL AND IMMUNOHISTOCHEMISTRY STUDY OF RESPIRATORY SYSTEM IN RATS EXPOSED TO CIGARETTE SMOKE AND ALCOHOL.

[Tese de Doutorado em Bases Gerais da Cirurgia] Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP-Universidade Estadual Paulista; 2009.

Introduction: Since 80-95% of alcoholic are also smokers, it is desirable that study's experimental models of deleterious effects of chronic alcohol consumption includes groups with association of alcohol and tobacco, thus allowing, mimic, more accurately, the effects of chronic alcohol abuse in humans.

Objective: To investigate the effects of chronic exposure to cigarette smoke and alcohol on oxidative stress, on morpho-functional alterations and immunohistochemical disorders caused by these attacks to respiratory system of rats.

Method: one hundred and twenty Wistar rats were divided into eight subgroups of fifteen animals (control, smoking, alcohol and alcohol + smoking) in two experimental times (180 and 260 days). Biomarkers of oxidative stress (superoxide dismutase, tiol protein concentration, glutathione peroxidase and thiobarbituric acid reactive substances) were determined in washed red cells. The morpho-functional lung's alterations (presence of inflammatory reaction and estimate of emphysema) were evaluated by histological examination with optical microscopy and study of the isolated lung (compliance and specific compliance). The immunohistochemistry study was performed by investigating the expression of survivin, P53 protein, nuclear antigen of cell proliferation and apoptotic index by TUNEL technique, at pulmonary parenchyma and trachea.

Results: The weight of the three experimental groups was lower than the control group, with the lowest values at the alcoholism + smoking groups, and the estimated pulmonary emphysema was higher also in these animals. The smokers and smokers+alcoholic groups's animals showed: lower compliance, higher incidence of bronchiolitis, larger survivin expression to trachea and higher bronchiolar apoptotic index. Animals exposed only to smoking showed elevated levels of thiobarbituric acid reactive substances and lower specific compliance. The three experimental groups showed a reduction at the expression of nuclear antigen cell proliferation and negative immunoexpression for P53 protein.

Conclusion: the exposition time of 260 days to the studied drugs resulted in more significant changes, and the main factor involved was exposure to cigarette smoke.

Key-words: smoking, alcoholism, oxidative stress, apoptosis, Wistar rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Modelo logístico ajustado aos pesos médios semanais dos animais segundo tempo de exposição de 180 dias.....	64
Figura 2: Estimativa da assíntota (Parâmetro alfa) e respectivos intervalos de confiança para cada grupo para o tempo de exposição de 180 dias.....	65
Figura 3: Modelo logístico ajustado aos pesos médios semanais dos animais segundo grupo no tempo de exposição de 260 dias.....	66
Figura 4: Estimativa da assíntota (Parâmetro alfa) e respectivos intervalos de confiança para cada grupo para o tempo de exposição de 260 dias.....	66
Figura 5: Média e desvio-padrão referente à variável peso dos animais no dia do sacrifício, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	67
Figura 6: Média e desvio-padrão referente à variável massa pulmonar, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	69
Figura 7: Média e desvio-padrão referente à variável volume pulmonar pré-infusão de formol, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	70
Figura 8: Média e desvio-padrão referente à variável volume pulmonar pós-infusão de formol, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	71
Figura 9: Média e desvio-padrão referente à variável complacência segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	72
Figura 10: Média e desvio-padrão referente à variável TBARS segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	73

Figura 11: Média e desvio-padrão referente à variável SOD segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	74
Figura 12: Média e desvio-padrão referente à variável GSH-t segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	75
Figura 13: Média e desvio-padrão referente à variável GSH-Px segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	75
Figura 14: Média e desvio-padrão referente à variável % de bronquiolite, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	76
Figura 15: Destaca-se nesta figura a intensa bronquiolite (setas) encontrada em um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias), com um aumento de 200x.....	76
Figura 16: Destaca-se nesta figura a intensa alveolite (setas) encontrada em um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias), com um aumento de 200x.....	77
Figura 17: Média e desvio-padrão referente à variável estimativa de enfisema pulmonar (% de tecido), segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	78
Figuras 18A e 18B: Tecido pulmonar distal de um animal do grupo controle 260 dias (A) e de um animal do grupo álcool + tabaco 260 dias (B), ambas com aumento de 100x.....	78
Figura 19: Média e desvio-padrão referentes ao PCNA na traquéia segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	79

Figura 20: Média e desvio-padrão referentes ao PCNA no pulmão, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	80
Figuras 21A e 21B: Marcação nuclear do PCNA (parênquima pulmonar) evidenciando índice de proliferação celular baixa em animal do grupo álcool + tabaco 180dias (A) e álcool + tabaco 260 dias (B), ambas com aumento de 1000x.....	80
Figura 22: Imunoexpressão negativa no epitélio traqueal para a P53 de um animal do grupo álcool (180 dias), com aumento de 400x.....	81
Figura 23: Imunoexpressão positiva (setas) da survivina no citoplasma epitelial da traquéia de um animal exposto ao álcool + tabaco (260 dias), com aumento de 400x.....	83
Figura 24: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico na traquéia, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	84
Figuras 25A e 25B: Fotos da análise de apoptose traqueal pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose na traquéia de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.....	84
Figura 26: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos bronquíolos, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	85
Figuras 27A e 27B: Fotos da análise de apoptose ao nível de bronquíolos pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose no bronquíolo de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.....	85

Figura 28: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos vasos pulmonares, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	86
Figuras 29A e 29B: Fotos da análise de apoptose vascular pulmonar pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose vascular de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.....	86
Figura 30: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos alvéolos, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.....	87
Figuras 31A e 31B: Fotos da análise de apoptose alveolar pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose alveolar de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo álcool + tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.....	87

LISTA DE TABELAS

LISTA TABELAS

Tabela 1: Descrição dos marcadores de proliferação celular estudados.....	59
Tabela 2: Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes, referente à variável comprimento focinho-ânus, segundo experimento e grupo.....	68
Tabela 3: Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes referente à variável IMC segundo experimento e grupo.....	69
Tabela 4: Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes referente à variável complacência específica, segundo experimento e grupo.....	73
Tabela 5: Mediana, 1 ^o e 3 ^o quartil, entre colchetes referente à variável % de alveolite segundo experimento e grupo.....	77
Tabela 6: Distribuição de freqüências (Teste Qui-Quadrado) dos animais segundo grupo e resultado da survinina no experimento de 180 dias para a traquéia.....	82
Tabela 7: Distribuição de freqüências (Teste Qui-Quadrado) dos animais segundo grupo e resultado da survinina no experimento de 180 dias para o pulmão.....	82
Tabela 8: Distribuição de freqüências (Teste Qui-Quadrado) dos animais segundo grupo e resultado da survinina no experimento de 260 dias para a traquéia.....	82
Tabela 9: Distribuição de freqüências (Teste Qui-Quadrado) dos animais segundo grupo e resultado da survinina no experimento de 260 dias para o pulmão.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF: Fator Indutor de Apoptose, do inglês “Apoptosis Inhibitor Factor”

APAF-1: Fator de Ativação de Protease associado à Apoptose, do inglês “Apoptotic protease activating factor 1”.

CAT: Catalase

COX-2: Ciclooxygenase-2

CVF: Capacidade Vital Forçada

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FADD: “Fas Adaptor Death Domain”

GSH: Glutathione Reduzida

GSSH: Glutathione Oxidada

GSH-Px: Glutathione Peroxidase

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

IAP: Proteínas Inibidoras da Apoptose, do inglês “Inhibitor of Apoptosis Protein”

L•: Radical lipídico

LOO•: Radical peroxil

LOOH: Hidroperóxido de lipídio

LO•: Radical alcóxil

MDA: Malondialdeído

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato

NF- κ B: Fator nuclear kappa beta, do inglês “fator nuclear kappa beta”

O₂⁻ : Radical superóxido

OH⁻ : Íon Hidroxila

OH•: Radical Hidroxila

P53: proteína 53

p53: gene *p53*

PCNA: Antígeno Nuclear de proliferação Celular, do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”

rTNF: receptor de fator de necrose tumoral, do inglês: “Tumor Necrosis Factor receptor”.

Smac/DIABLO: “second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI”.

SOD: Superóxido Dismutase

TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês “Thiobarbituric Acid Reactive Substances”

TNF: Fator de necrose tumoral, do inglês “Tumor Necrosis Factor”

TRAIL: Receptores do Ligante Indutor de Apoptose Relacionado a TNF, do inglês “TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptors”

TUNEL: marcação *in situ* das extremidades nicadas de DNA, do inglês: TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling

VEF1: volume expiratório no primeiro segundo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	30
2. OBJETIVOS.....	50
3. MÉTODO.....	52
3.1 Animais Utilizados.....	52
3.2 Ambiente de Experimentação.....	52
3.3 Grupos Experimentais.....	52
3.4 Seqüência das Etapas Experimentais.....	53
3.4.1. Preparo e administração da solução de etanol.....	53
3.4.2 Exposição à fumaça do cigarro.....	53
3.4.3 Procedimento do sacrifício.....	54
3.4.4 Dosagem dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo em hemáceas lavadas.....	55
3.4.4.1 Determinação da peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	55
3.4.4.2 Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD).....	55
3.4.4.3 Determinação da concentração da proteína tiól (SH).....	56
3.4.4.4 Determinação da atividade enzimática de glutathione-peroxidase (GSH-Px)	56
3.4.5 Estudo dos volumes pulmonares pré e pós-infusão de formol.....	56
3.4.6 Estudo das alterações morfológicas e imunohistoquímicas pulmonares.....	57
3.4.6.1 Microscopia óptica (Hematoxilina-Eosina).....	57
3.4.6.2 Estimativa de enfisema pulmonar.....	57
3.4.6.3 Marcadores de proliferação celular.....	57
3.4.6.4 Protocolo imunohistoquímico para detecção de imuno-expressão de apoptose pelo método de TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL).....	59
3.5 Análise Estatística.....	62
4. RESULTADOS.....	64
4.1 Crescimento dos Animais	64
4.1.1 Acompanhamento dos pesos semanais dos animais dos subgrupos de 180 dias de exposição.....	64
4.1.2 Acompanhamento dos pesos semanais dos animais dos	

subgrupos de 260 dias de exposição.....	65
4.1.3 Pesagem dos animais no dia do sacrifício.....	67
4.1.4 Comprimento focinho-ânus.....	67
4.1.5 IMC.....	68
4.1.6 Massa pulmonar.....	69
4.2 Volumes Pulmonares.....	70
4.2.1 Volume pré-infusão de formol a 20 cm H₂O.....	70
4.2.2 Volume pós-infusão de formol a 20 cm H₂O.....	70
4.3 Complacência Pulmonar.....	71
4.3.1 Complacência específica.....	72
4.4 Dosagem dos Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo em Hemáceas Lavadas.....	73
4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	73
4.4.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	74
4.4.3 Determinação da Concentração da proteína tiól (SH).....	74
4.4.4 Atividade enzimática de glutathiona-peroxidase (GSH-Px).....	75
4.5 Alterações Morfológicas e Imunohistoquímicas Pulmonares.....	76
4.5.1 Bronquiolite.....	76
4.5.2 Alveolite.....	77
4.5.3 Estimativa de enfisema pulmonar.....	78
4.5.4 Marcadores imunohistoquímicos.....	79
4.5.4.1 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	79
4.5.4.2 Proteína 53 (P53).....	80
4.5.4.3 Survivina.....	81
4.5.4.4 Índice apoptótico na traquéia (TUNEL).....	83
4.5.4.5 Índice apoptótico nos bronquíolos (TUNEL).....	85
4.5.4.6 Índice apoptótico nos vasos pulmonares (TUNEL).....	86
4.5.4.7 Índice apoptótico nos alvéolos (TUNEL).....	87
5. DISCUSSÃO.....	89
5.1 Crescimento dos Animais.....	89
5.2 Estudo do Pulmão Isolado.....	91
5.5 Dosagem dos Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo em Hemáceas Lavadas.....	92

5.6 Alterações Morfológicas Pulmonares.....	95
5.6.1 Reações inflamatórias (bronquiolite e alveolite).....	95
5.6.1.1 Efeitos do tabaco.....	95
5.6.1.2 Efeito do álcool.....	96
5.6.2 Estimativa de Enfisema Pulmonar.....	97
5.7 Alterações Imunohistoquímicas Pulmonares.....	101
5.7.1 Efeito do tabaco na reação inflamatória e apoptose.....	101
5.7.2 Efeito do tabaco na apoptose e nos níveis de PCNA.....	103
5.7.3 Efeito do tabaco na proteína P53.....	104
5.7.4 Efeito do tabaco na expressão da survivina.....	106
5.7.5 Efeitos do álcool nas alterações imunohistoquímicas.....	107
6. CONCLUSÃO.....	111
7. REFERÊNCIAS.....	113

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As conseqüências biológicas do abuso do álcool têm sido reconhecidas por vários séculos. Visto que 80–95% dos estilistas são também tabagistas, (BIEN e BURGE, 1990), e que o tabagismo está, claramente, associado com o aumento na incidência e gravidade das doenças em diversos órgãos, (FINKLEA et al., 1971; NUORTI et al., 2000) é desejável que modelos experimentais de estudo dos efeitos deletérios do consumo crônico do álcool incluam grupos com a associação de etilismo e tabagismo (GENTRY-NIELSEN et al., 2004), permitindo desta forma, mimetizar, de maneira mais precisa, os efeitos do abuso crônico do álcool em humanos. Sabe-se também que os prejuízos à saúde associados a esta combinação são maiores que aqueles atribuídos a cada um dos fatores isolados (BLOT, 1992; SOBELL et al., 1990).

Segundo dados da World Health Organization (WHO) (1999) existem, no mundo, 1,26 bilhões de fumantes ativos, ou seja, um terço da população adulta mundial. O tabagismo é considerado a principal causa evitável de doenças e morte prematura, sendo a maior causa isolada de mortes na sociedade contemporânea, principalmente nos países desenvolvidos (CARVALHO, 2000). Atualmente, morrem por ano, quatro milhões de pessoas por doenças relacionadas ao tabagismo, sendo tal fator responsável por 1/6 de todas as mortes ocorridas no mundo. Se esse panorama não mudar, haverá cerca de dez milhões de mortes por ano em 2030 e 70% delas ocorrerão nos países em desenvolvimento (WHO, 1999). O tabagismo é considerado o fator de risco mais importante para o câncer de pulmão. O hábito de fumar tem sido ainda relacionado com câncer de boca, faringe, laringe, esôfago, estômago, bexiga urinária, e outros órgãos, além de aumentar a prevalência de

hipertensão arterial sistêmica, e o risco para doenças cardiovasculares, pulmonares, ósseas, entre outras (ROBBINS e COTRAN, 2005).

O uso de álcool é uma prática bastante difundida no Brasil. Segundo os dados dos principais levantamentos nacionais de grande abrangência: V levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras (GALDURÓZ et al., 2004) e I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no Brasil (CARLINI et al., 2001), a idade de iniciação no uso de álcool tem sido de 12,5 anos, com frequência de uso na vida de 65,2% entre jovens estudantes de 12 a 17 anos. O uso regular de álcool na população geral (pelo menos três a quatro vezes por semana), em indivíduos com idade entre 15 e 65 anos, foi relatado por uma média de 5,2% da população entrevistada nas 107 maiores cidades brasileiras (CARLINI et al., 2001).

O etilismo é uma doença de alta prevalência em nosso meio, variando de 8,7 a 55% nas enfermarias clínicas e cirúrgicas e de 12,5 a 38% nos serviços de urgência. No Brasil estima-se que cerca de 10% da população seja dependente de álcool, sendo que o consumo de etanol em doses excessivas é inversamente proporcional ao nível sócio-econômico. Os efeitos deletérios do abuso do álcool agudamente atingem principalmente o sistema motor, no entanto, o uso crônico tem efeitos tóxicos para o fígado, pâncreas, coração, cérebro e ossos, causando lesões irreversíveis (FORTES e CARDO, 1991).

Mesmo sendo reconhecido há mais de um século, como um grande fator de risco para pneumonia, só atualmente o álcool foi considerado responsável por danos pulmonares, caracterizando o pulmão alcoólico (GUIDOT e HART, 2005). Ainda não há certeza dos verdadeiros mecanismos agressores, e se há ação direta nos alvéolos, como ocorre no fígado e no pâncreas. Estudos iniciados entre as décadas de 70 e 80 são totalmente controversos, pois avaliavam pequenos grupos de pacientes, sendo muitos deles também tabagistas crônicos (EMIRGIL e SOBOL 1972, BEVILACQUA et al., 1975). Somente no início deste século, com os estudos dos antioxidantes, como a glutatona, foi possível atribuir ao álcool a função de agressor da

membrana celular alveolar e medir o verdadeiro dano dessa droga para a função pulmonar.

Se a molécula não estiver em equilíbrio, isto é, o número de elétrons na sua órbita for diferente do número de prótons do núcleo, defini-se o termo radical livre. Este é uma molécula altamente instável, que tem uma vida média muito curta (microsegundos) e que tenta desesperadamente equilibrar-se, pareando os elétrons livres de sua órbita. Este fenômeno determina a formação de radicais livres em cascata, processo que só termina quando dois radicais livres se encontram, um deles ganha e outro perde elétrons, deixando de ser assim um radical livre (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

As reações de oxidação e redução ocorrem normalmente em nosso organismo. Um dos exemplos é a formação do trifosfato de adenosina (ATP) a partir do oxigênio e glicose no interior da mitocôndria (Ciclo de Krebs). O oxigênio consumido é reduzido por ação da citocromo-oxidase. Durante o curso deste metabolismo normal, o oxigênio pode receber um número diferente de elétrons, não pareando sua órbita, formando assim metabólitos oxigenados, que são citotóxicos.

O primeiro passo no processamento do oxigênio molecular consiste na adição de um elétron ferroso (Fe^{+2}) que se encontra na enzima mitocondrial denominada citocromo c. Como resultado, as ligações covalentes entre os dois átomos de oxigênio são parcialmente rompidas, resultando o radical superóxido (O_2^-). Na molécula de superóxido, o elétron tomado da molécula ferrosa se parecia com um dos radicais livres, deixando o outro não pareado, o qual se torna extremamente reativo, ávido por parear seu outro elétron. O superóxido é um radical livre instável, com vida média de milissegundos em um pH neutro. Ocorre nas células aeróbias, que realizam o metabolismo aeróbico, sendo liberado pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A maior parte da literatura sugere que o superóxido não é tóxico por si mesmo, mas age como precursor para a geração de radicais livres provenientes do metabolismo de oxigênio com propriedades citotóxicas mais acentuadas (peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) (FRIDOVICH, 1975).

Devido à natureza intrínseca dos radicais livres em procurar o equilíbrio pareando seus elétrons, é evidente que dois radicais livres se neutralizam sem a necessidade de participação enzimática devido a que cada

um deles carrega um elétron ímpar na sua órbita externa. As dismutações espontâneas são potencialmente úteis para a neutralização da formação de substâncias oxigênio-reativas, mas ocorrem com extrema lentidão. No entanto podem ser catalisadas por enzimas: superóxido dismutase (SOD), no caso dos superóxidos, glutathione e catalase, no caso do peróxido de hidrogênio. Assim duas moléculas de superóxido podem dismutar-se, dando moléculas neutras, processo que requer ácido (H^+), através da reação: $2O_2^- + 2H^+ \Rightarrow H_2O_2 + O_2$, que determina a formação de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) e oxigênio. O peróxido de hidrogênio não é considerado um verdadeiro radical livre, por ter sua órbita pareada, porém por ser uma substância altamente hidrossolúvel e por penetrar rápida e facilmente na célula age como precursor da formação de outros radicais livres (DROGE, 2002). Se este processo não é suficientemente rápido para proteger o organismo de lesões, o superóxido tenta ganhar um elétron de qualquer outra fonte. Uma importante fonte são os ácidos graxos insaturados encontrados na camada dupla de lipídeos das membranas celulares que são vitais para o funcionamento das células. A enzima SOD elimina tal reação. Se o superóxido não é destruído com suficiente rapidez, o peróxido de hidrogênio formado como resultado da dismutação vai reagir com o superóxido restante ($H_2O_2 + O_2^- \Rightarrow O_2 + OH^- + OH^\cdot$), reação conhecida como de Haber Weiss, que gera oxigênio molecular, íon hidroxila e radical hidroxila. Já que só um radical livre está agindo (superóxido), só sobra um radical livre: o radical hidroxila.

Esta reação é potencialmente perigosa, já que o radical livre hidroxila é muito mais reativo que o próprio superóxido, e que apesar de não existir uma enzima específica no organismo para inibi-lo, pode ser neutralizado por ácido, já que é um radical alcalino. O radical hidroxila atua na maioria dos sistemas biológicos, sendo considerado um oxidante extremamente poderoso, podendo ser produzido pela redução do H_2O_2 por um metal, como o ferro ou o cobre (FRIDOVICH, 1975).

O peróxido de hidrogênio gerado pelo superóxido normalmente é destruído pelas peroxidases. Os peróxidos de hidrogênio são neutralizados quando combinados com a glutathione reduzida (GSH) catalisada pela enzima glutathione peroxidase, formando glutathione oxidada e água: $H_2O_2 + 2GSH$

(glutathione peroxidase) $\Rightarrow$ 2GSSH + 2H₂O, ou pode ser neutralizado pela enzima catalase, que utiliza o ferro como metal de transição, gerando água e oxigênio: 2H₂O₂ (catalase) $\Rightarrow$ 2 H₂O + O₂ (HENSLEY et al., 2000).

Um quarto componente de radical livre é o oxigênio *SINGLET*, que não vem diretamente do metabolismo do oxigênio, mas é produzido secundariamente ao processo de fagocitose determinado pela presença de certos tipos de glóbulos brancos quando fagocitam bactérias, pela reação em que participam o íon hipoclorito e o peróxido de hidrogênio. É a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons não pareados em sua última camada, não sendo assim um radical livre. O oxigênio *SINGLET*, de acordo com Droge (2002), tem pouca importância em certos eventos biológicos, e poucos danos celulares foram relacionados a sua presença.

Radicais livres são extremamente reativos e capazes de alterar quimicamente muitos tipos de moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. Da ação de espécies reativas de oxigênio nos ácidos nucleicos, podem ocorrer modificações estruturais da molécula do ácido desoxirribonucleico (DNA), induzindo mutações gênicas. Nos carboidratos, podem induzir quebras nas cadeias, inibindo o reconhecimento do contato celular e levando a divisões celulares não limitadas pelo contato de células vizinhas (PERCARIO e FEUZ, 1995). Em proteínas, as espécies reativas de oxigênio causam a peroxidação protéica, responsável pela quebra de cadeias polipeptídicas, inativação de enzimas, resultando em formação de proteína carbolina e alterações funcionais nas células (SOHAL et al., 1994).

Nos lipídios, a ação das espécies reativas de oxigênio resulta na peroxidação lipídica. Os componentes lipídicos das membranas celulares são facilmente oxidáveis pelos radicais livres, conduzindo uma lipoperoxidação em cascata. A reação acima inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular, ou das organelas celulares, com conseqüente formação de um radical lipídico (L•). Depois de iniciado, o processo torna-se autocatalítico constituindo a fase de propagação. Na propagação, o L• reage com o oxigênio resultando o radical peroxil (LOO•) que é capaz de retirar um átomo de H de um ácido graxo adjacente, formando o hidroperóxido de lipídio (LOOH) e propagando a reação em cadeia da

lipoperoxidação. O hidroperóxido de lipídio na presença de Fe^{+3} pode originar o radical peroxil. Na presença de Fe^{+2} pode ser clivado em $\text{LO}\bullet$ e OH^- . O radical alcoxil ($\text{LO}\bullet$) pode propagar a lipoperoxidação retirando um hidrogênio de outro LH, produzindo LOH, ou ainda retirar um hidrogênio de LOOH, produzindo $\text{LOO}\bullet$. O radical peroxil ($\text{LOO}\bullet$) pode formar peróxidos cíclicos, os quais também podem ser clivados em aldeídos, como o malondialdeído (MDA), que aumenta consideravelmente a toxicidade de radicais livres, sendo considerado o “segundo mensageiro de toxicidade” (MEDEIROS, CARVALHO e FARIAS, 1995). O término ocorre quando um radical livre formado se encontrar com outro radical livre, levando à estabilização dos dois radicais livres ou pela presença de antioxidantes, que neutralizam a ação do radical livre.

Apesar do oxigênio representar a principal fonte de geração de energia nos animais, o mesmo tem potencial de apresentar-se como tóxico, através de seus metabólitos intermediários que podem alterar a estabilidade dos tecidos. Os sistemas biológicos se defendem contra a agressão dos radicais livres e outros derivados de oxigênio convertendo estes radicais livres em oxigênio por fenômenos de oxidação ou em água por fenômenos de redução. As lesões teciduais provocadas pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) estão presentes em várias condições, e dentre elas estão o tabagismo e alcoolismo. O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos das ERO constitui o sistema de defesa antioxidante, que são os enzimáticos como: a glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e os não-enzimáticos como: o ácido ascórbico, tocoferol e peptídeos ativos, representados pela glutathione reduzida (GSH) (PAPAS, 1996).

Os grupos antioxidantes considerados de primeira linha são a superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase. A superóxido dismutase acelera a dismutação, na qual duas moléculas de superóxido se combinam ($2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \Rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$). O peróxido de hidrogênio, que é moderadamente tóxico, pode ser decomposto em água e oxigênio, seja pela catalase, localizada nas organelas dos peroxisomas, seja pela glutathione peroxidase, que está localizada no citosol e na mitocôndria. A presença do SOD nas células aeróbicas é de extrema importância por minimizar os efeitos

tóxicos dos superóxidos nos tecidos. O SOD catalisa a dismutação do superóxido com extrema rapidez, aproximadamente 10 milhões de vezes mais rápido que a dismutação espontânea. Existem dois tipos de SOD: mitocondrial, que utiliza o cofator metálico manganês; e o SOD citoplasmático, que contém como cofatores metálicos o cobre e o zinco (FRIDOVICH, 1975).

A catalase é uma enzima que contém o fator heme, e utiliza o cobre como cofator metálico. Na reação da catalase uma das duas moléculas de peróxido é reduzida ao oxigênio, e a segunda é reduzida à água. A glutathione peroxidase constitui a primeira linha de defesa contra os peróxidos. E da mesma forma que o SOD, a glutathione peroxidase é altamente induzida em resposta à quantidade de substrato presente, porém esta resposta depende principalmente da quantidade de selênio presente (HENSLEY et al., 2000).

A glutathione peroxidase, que utiliza para sua ação o tripeptídeo: glutathione, que é formada por três aminoácidos: ácido glutâmico, cisteína e glicina. O aminoácido central, a cisteína, é a parte ativa e carrega consigo o grupo CH_2HSH , e por isto esta enzima é representada pela sigla GSH. A ação da glutathione é a destruição do peróxido de hidrogênio (catalisada pela glutathione peroxidase), representada pela seguinte reação: $2\text{GSH} + 2\text{H}_2\text{O} \Rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$. A glutathione carrega um aminoácido que contém enxofre, e como o organismo sintetiza glutathione, é importante uma adequada reposição de enxofre pela dieta. Uma vez utilizada a glutathione para remover o oxigênio do peróxido de hidrogênio, este deve ser reprogramado para ser novamente utilizado, fenômeno que é obtido através da enzima glutathione reductase, que supre o hidrogênio requerido pela glutathione pela seguinte reação: $\text{GSSG} + 2\text{H} \Rightarrow 2\text{GSH}$ (DROGE, et al., 2002).

O desequilíbrio entre a produção de ERO e defesas celulares constitui o estresse oxidativo (NISHIYAMA et al., 1998), que é deletério para os tecidos. Estresse oxidativo é o termo associado ao desequilíbrio entre a produção de oxidantes e as defesas do organismo. Oxidantes incluem ERO, espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outros (ABUJA e ALBERTINI, 2001).

O álcool e a nicotina têm sido relatados, individualmente, como importantes fontes de geração de espécies reativas de oxigênio (GUÉMOURI

et al., 1993; LEANDERSON e TAGESSON, 1992; MEHTA et al., 1998; WETSCHER et al., 1995). Além de representarem importantes fatores de risco para doenças cardiovasculares, cânceres e outras doenças (DEL BOCCIO et al., 1990; MASER, 1997; MCGINNIS e FOEGE, 1993). De acordo com Romberger e Grant (2004) a associação do tabagismo e etilismo promove maior dependência da nicotina, resultando em piores consequências relacionadas à saúde, incluindo cânceres de cabeça e pescoço.

Os pulmões são os primeiros órgãos que são expostos ao tabaco e são altamente susceptíveis à formação de ERO. As partículas do tabaco ficam retidas no filtro, que retém cerca de 99,9% de todas as partículas maiores que 0,1 μm . Os gases atravessam o filtro. As partículas do cigarro contêm mais de 10^{17} radicais livres por grama e os gases contêm mais de 10^{15} radicais livres por tragada (PRYOR e STONE, 1993). Os radicais das partículas têm longa-vida (horas a meses), enquanto os radicais dos gases têm tempo de vida curto (segundos) (PRYOR e STONE, 1993; SMITH e FISCHER, 2001; PRYOR et al., 1998). O cigarro contém inúmeras espécies reativas ao oxigênio e ao nitrogênio, além de geração endógena de uma série de outros radicais livres quando é inalado. Estas espécies reativas ao oxigênio podem induzir o estresse oxidativo, que está envolvido na geração e/ou progressão de inúmeras doenças pulmonares ou cardiovasculares (VALKO et al., 2007).

A inalação da fumaça do cigarro aumenta a ativação de fagócitos nos pulmões resultando em uma maior produção de espécies reativas ao oxigênio pelas células inflamatórias. Vários estudos têm enfatizado a importância da produção das ERO e da inflamação em tabagistas com a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (MORRISON et al., 1999; RAHMAN e MACNEE, 1999; RAHMAN et al., 1999).

Mak (2008) pesquisou os efeitos do estresse oxidativo na fisiopatologia do DPOC, através de uma revisão de literatura. O autor relata que os resultados são bastante conflitantes. Alguns estudos têm demonstrado uma marcante redução da capacidade antioxidante no plasma, enquanto outros têm apresentado resultados opostos. Mak (2008) argumenta que resultados tão conflitantes podem estar relacionados com diferenças individuais na capacidade antioxidante, como resultado de características específicas de cada população ou por diferentes métodos adotados nas

pesquisas, intensidade e/ou tempo de exposição e as condições de armazenamento dos cigarros. Sendo assim, existem muitas limitações em extrapolar os resultados obtidos em estudos experimentais para estudar os efeitos biológicos da exposição ao cigarro em humanos, já que nenhum protocolo padrão é utilizado.

O etanol é extensivamente metabolizado à acetaldeído no fígado pela enzima álcool-desidrogenase (SCOTT et al., 1999) e pela catalase (RUBIN, 1993). O acetaldeído também é oxidado a acetato pela enzima acetaldeído desidrogenase/oxidase, o que contribui para a geração de espécies reativas ao oxigênio e de radicais livres (GONTHIER et al., 1991; MIRA et al., 1995). O etanol também é oxidado pelo sistema microsomal oxidativo a acetaldeído e ao radical 1-hidroxietil pelo citocromo P-450 IIE1 (ANANDATHEERTHAVARADA et al., 1993; REINKE et al., 1994). O consumo agudo e crônico do etanol tem sido correlacionado com o aumento de radicais livres e aumento da peroxidação lipídica hepática (AKKUS et al., 1997). Montoliu et al. (1994) reportaram que a adição *in vitro* de diferentes concentrações de etanol aumenta a peroxidação lipídica de acordo com o aumento da dose de etanol administrado.

A geração de espécies reativas de oxigênio é um passo crucial na patogênese da lesão tecidual. Consequências do ataque de biomoléculas pelas espécies reativas de oxigênio, tais como: peroxidação lipídica, pode resultar, na alteração da estrutura de membranas biológicas e de lipoproteínas plasmáticas (MYLONAS e KOURETAS, 1999). Apesar do fato de se saber que o etanol induz o estresse oxidativo (LIEBER, 1998), os mecanismos envolvidos no comprometimento de alguns órgãos, tais como o pulmão, ainda não são totalmente esclarecidos.

Estudos epidemiológicos têm revelado uma associação entre o abuso de álcool e a síndrome da angústia respiratória aguda, em decorrência de alterações na homeostase da glutathione (MOSS et al., 2000). De fato, o álcool compromete tanto a secreção de surfactante quanto a homeostase da glutathione dos pneumócitos do tipo II nos alvéolos, aumentando assim a susceptibilidade ao edema pulmonar em ratos (HOLGUIN et al., 1998). Em adição, a ingestão de etanol aumenta a injúria pulmonar induzida por endotoxinas associado com a ativação de enzimas degradantes da matriz

celular (LOIS et al., 1999), causando assim um aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar. A depleção da glutathione pode tornar os lipídeos mais susceptíveis ao ataque das espécies reativas do oxigênio.

Indivíduos que consomem álcool cronicamente frequentemente também são tabagistas (HUGHES, 1993), o que pode potencializar os efeitos nocivos do estresse oxidativo induzidos por ambos, sendo assim é importante pesquisar a extensão da interação entre álcool e tabaco no mecanismo do sistema de defesa antioxidante e na peroxidação lipídica. A influência da interação do álcool e do tabaco/nicotina na geração do estresse oxidativo tem sido estudada em vários tecidos e/ou órgãos, tais como: cérebro (WATSON e LITTLE, 1999), coração (SANDHIR, SUBRAMANIAN e KOUL, 2003) pulmões (YEH et al., 2007) ou fígado, rins, pulmões e testículos em um mesmo estudo (HUSAIN et al., 2001), entre outros. A maioria de tais estudos relata sinergismo entre tabaco e álcool, o que potencializa os efeitos oxidativos de ambos.

O uso concomitante do álcool e tabaco tem sido considerado como fator de risco para desenvolvimento de doenças malignas nos diferentes órgãos, sendo bastante importante o câncer de vias aéreas. Geralmente este é compreendido como resultado final de um crescimento descontrolado que ocorre nas células do epitélio respiratório. Esse descontrole é visto como modificações genéticas que iriam alterar a atividade proliferativa e reguladora destas células. Neste sentido, torna-se importante o estudo das proteínas reguladoras do ciclo celular, como a proteína 53 (P53), o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), survivina e a evidência de células em apoptose.

Ao longo dos últimos anos, obteve-se importante avanço na compreensão da etiopatogenia das doenças neoplásicas através do desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, as quais possibilitam a identificação de mecanismos intra e extracelulares de controle do ciclo celular e o conseqüente comportamento biológico dos tumores, os quais estão relacionados à expressão e atuação de um grande número de moléculas, em sua maior parte composta por proteínas. A utilização crescente de técnicas como o sequenciamento genético e a imunohistoquímica expandiu em muito os conhecimentos a respeito do grande número de genes e funções de suas respectivas proteínas. Diversos métodos têm sido desenvolvidos para sua

detecção e quantificação por técnicas de DNA recombinante (PCR), porém a imunohistoquímica permanece como o método mais disponível para a análise em bases clínicas, devido ao seu custo reduzido e à possibilidade de sua realização em laboratórios convencionais de anatomia patológica (PINHO, et al., 2005).

O PCNA é uma proteína de 36kD associada à atividade proliferativa, sintetizada durante a interfase e que desaparece no final da mitose (CELIS e CELIS, 1985). Myiachi et al. (1978) descreveram, a partir do soro de pacientes com lupus eritematoso sistêmico, um antígeno nuclear presente em células proliferantes que inicialmente foi considerado como uma ciclina, em virtude de seu aparecimento cíclico. Posteriormente, Bravo et al. (1987) relataram que se tratava de uma proteína nuclear ácida de 36kDa, que funcionava como proteína auxiliar da DNA polimerase delta, associada tanto a replicação do DNA como ao reparo do mesmo (McMORMICK e HALL, 1992; QUEIROZ, 1997).

O PCNA representa uma proteína nuclear não histônica, que atua como um co-fator da DNA polimerase delta, sendo observada sua presença no ciclo celular na fase G1 tardia, com um pico na fase S e declínio durante a fase G2 e M. Geralmente, a demonstração da imunoexpressão do PCNA permite verificar a verdadeira fração proliferativa da entidade estudada (MIGHELL, 1995; SITTEL et al., 1999).

De acordo com McMormick e Hall (1992), o PCNA pode não ser específico da fase S ou, necessariamente, estar relacionado com o ciclo celular, podendo estar associado ao reparo do DNA ou ser expresso por influência de fatores de crescimento em células que não estejam no ciclo celular. Ainda, a expressão do PCNA pode estar desregulada próximo a tumores, em decorrência de fatores de crescimento autócrinos, que regulam a estabilidade e a expressão do RNAm da proteína (HALL et al., 1990; QUEIROZ, 1997).

Como os marcadores refletem apenas momentos da vida da célula é possível que determinada neoplasia apresente uma alta taxa de proliferação e um baixo percentual de células positivas (BROWN e GATTER, 1990). Portanto, sem conhecer o exato momento do ciclo celular não é possível determinar se o elevado número de células PCNA positivas em uma neoplasia

é fruto da alta renovação celular ou se indica uma grande proporção de células dividindo-se em prolongado ciclo celular.

A apoptose é a via de morte celular que é induzida por um programa intracelular altamente regulado, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas. A membrana plasmática da célula permanece intacta, mas sua estrutura é alterada de forma que a célula apoptótica se torna um alvo primário da fagocitose. A célula morta é eliminada rapidamente, antes que seu conteúdo possa extravasar, e desta forma, esse tipo de morte celular não desencadeia uma reação inflamatória pelo hospedeiro. Consequentemente, a apoptose é fundamentalmente diferente da necrose, que é caracterizada pela perda de integridade das membranas, digestão enzimática das células e onde frequentemente ocorre reação do hospedeiro. Entretanto, algumas vezes a apoptose e a necrose coexistem, podendo ter algumas características e mecanismos em comum (SAVILL e FADOK, 2000).

A apoptose foi inicialmente reconhecida em 1972 por sua morfologia distinta e nomeada pela designação grega para “decadência” (KERR et al., 1972). Ela ocorre normalmente em várias situações fisiológicas (destruição programada de células durante a embriogênese, ou morte de neutrófilos na resposta inflamatória aguda e dos linfócitos ao final da resposta imunológica, por exemplo) e serve para eliminar células indesejáveis ou potencialmente danosas ou com perda da sua utilidade. Também é um evento patológico quando as células são danificadas e não podem mais ser recuperadas, especialmente quando a lesão afeta seu DNA. Nestas situações a célula irremediavelmente danificada é eliminada (WYLLIE, 1997).

As células apoptóticas geralmente exibem uma constelação distinta de modificações bioquímicas, que são as bases das alterações estruturais da apoptose. Um aspecto característico da apoptose é a hidrólise das proteínas envolvendo a ativação de vários membros de uma família de cisteíno-proteases chamadas de caspases (STRASSER, O’CONNOR e DIXIT, 2000). Várias caspases estão presentes nas células normais como pré-enzimas inativas e precisam ser ativadas para induzir a apoptose. As caspases ativas clivam muitas proteínas celulares vitais, tais como as lamininas, destruindo a estrutura nuclear e o citoesqueleto; além disso, as caspases ativam as

DNases, que degradam o DNA nuclear. Essas mudanças são as bases das alterações estruturais vistas no núcleo e no citoplasma das células apoptóticas (VAUX e STRASSER, 1996).

São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases - 3, -6, -7, - 8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRIGT e SALVESEN, 2003). As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 estão envolvidas na maturação de citocinas, e sua contribuição na apoptose permanece não esclarecida (DENAULT e SALVESEN, 2002). As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios (HENGARTNER, 2000). Após um sinal de morte celular, são ativadas por clivagem proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (death domain) (BOATRIGT e SALVESEN, 2003). As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN, 2004). Entre os diversos substratos das caspases pode-se citar a mdm-2 (murine double minute), uma proteína que se liga à P53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a P53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes próapoptóticos como o Bax (SCHULER, MAURER e GOLDSTEIN, 2003).

Os membros da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER, 2000). A expressão de Bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular, bem como estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria (VANDER, HEIDEN, THOMPSON, 1999).

A homeostasia é mantida pelo controle da quantidade de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Estímulos, como dano ao DNA, levam ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas. Esse desequilíbrio induz a apoptose (PETROS, OLEJNICZAK e FESIK, 2004). Entre as proteínas mais estudadas, desta família, estão a Bax (pró-apoptótica) e a Bcl-2 (anti-

apoptótica) a qual é superexpressa em adenomas e carcinomas colorretais (BRONNER et al., 1995). As proteínas Bax e Bcl-2 são capazes de formar homodímeros (Bax-Bax e Bcl-2-Bcl-2) e heterodímeros (Bax-Bcl-2), sendo que o equilíbrio entre esses homodímeros e heterodímeros pode definir o balanço pró-apoptótico ou antiapoptótico na célula (PETROS, OLEJNICZAK e FESIK, 2004).

Após um estímulo de morte, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro de Bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana externa mitocondrial (MURPHY et al., 2000). A Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente da interação com proteínas antiapoptóticas (PETROS, OLEJNICZAK e FESIK, 2004). As proteínas inibidoras da apoptose ou IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) são moléculas que exercem seu papel antiapoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras -3 e -7, da caspase iniciadora -9 e de modularem o fator de transcrição NF- κ B. As IAP foram primeiramente isoladas do genoma de baculovírus (SHI, 2002).

Durante a apoptose, as IAP são removidas por uma proteína liberada da mitocôndria denominada Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI) (DU et al., 2002). Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c. Enquanto o citocromo c liga-se à APAF-1 (Fator de Ativação de Protease associado à Apoptose-1) e ativa diretamente a caspase-9, a Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (CHAI et al., 2000).

A família c-FLIP (FLICE-like inhibitory protein - proteína inibidora de FLICE) também atua regulando a apoptose. Essa proteína inibe a apoptose ligando-se ao FADD (Fas Adaptor Death Domain), uma proteína adaptadora ligada ao Fas, prevenindo assim a ativação da caspase-8/FLICE (BADLEY et al., 2000). Cinco diferentes membros das IAP já foram descritos: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e survivina (FERREIRA et al., 2002).

Um grande número de evidências indica que a survivina é uma proteína essencial na regulação da progressão da mitose, inibição da apoptose e resistência à radioterapia e à quimioterapia em diversos tipos de câncer (LI e

LING, 2006). A survivina é um enzima inibidora da apoptose, que está relacionada com a carcinogênese através da supressão da capacidade do organismo em limitar o crescimento celular anormal. A supressão da apoptose contribui para a carcinogênese por uma série de diferentes mecanismos, incluindo o aumento do tempo de vida de células anormais, facilitando assim o acúmulo de genes mutantes e promovendo a resistência à imunocitotoxicidade (THOMPSON, 1995; YANG e KORSMEYER, 1996, REED, 2001). *In vitro*, a survivina inibe a morte celular pelas duas vias da apoptose, extrínseca e intrínseca (mitocondrial) e está envolvida na organização do fuso mitótico e regulação das citocinas (REED, 2001).

Nas neoplasias epiteliais a localização da imuno-expressão da survivina a

torna alvo de diferentes estudos, como no adenocarcinoma de estômago, cólon, pulmão e próstata (MONZO, et al., 1999; PIZEM, COR e GALE, 2004; LU et al., 2004), impondo um prognóstico mais agressivo quando sua expressão é citoplasmática. Sua expressão está relacionada a um prognóstico pobre e uma diminuição na sobrevida dos pacientes (SARELA et al., 2001).

Tendo sido descrita pela primeira vez, em 1997 por Ambrosini, Adida e Altieri como integrante de uma família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP), muitos dos aspectos referentes à expressão da survivina permanecem ainda bastante controversos. Dentre estes, pode-se destacar os resultados a respeito da presença ou não desta proteína em tecidos normais. Reed (2001) e Grossman (2004) afirmam que "enquanto os tecidos fetais normais contém abundante survivina em mRNA e proteínas, a maior parte dos tecidos após o nascimento não a apresentam". Esta afirmação pode ser confirmada pelo relato de diversos autores como Knutsen, Adell e Sun (2004), os quais foram incapazes de detectar a presença de survivina através do método de imunohistoquímica na mucosa normal de 74 pacientes portadores de câncer de reto. Também utilizando a imunohistoquímica, Lin et al. (2003) falharam em encontrar qualquer reatividade para survivina em 30 fragmentos de mucosa intestinal normal. Por outro lado, alguns autores têm relatado a presença de survivina em tecidos normais. Gianani et al. (2001) e Zhang et al.

(2001) demonstraram a presença da survivina em amostras de mucosa colônica normal.

Existem fortes evidências da participação da proteína P53 na supressão da tumorigênese. Além disso, a maioria dos cânceres apresenta mutações no *p53* ou defeitos na sua regulação. O gene supressor de tumor *p53* codifica uma fosfoproteína nuclear cuja disfunção contribui para a tumorigênese e a agressividade do tumor (AGUARWAL et al., 1998). A proteína P53 participa da regulação do ponto de checagem de G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. Danos no DNA promovem a superexpressão e conseqüente ativação da P53, resultando na parada do ciclo celular em G1 e iniciando o reparo do DNA. Depois de realizado o reparo, a P53 aumenta a transcrição da proteína mdm-2, que age como inibidora da P53. A proteína mdm-2 se associa à P53, revertendo o bloqueio do ciclo celular e promovendo o avanço para a fase S (SHERR, 2000).

Quando os danos ao DNA não são passíveis de reparo, ocorre a ativação da apoptose (ASHKENAZI e DIXIT, 1998). Mutações no gene *p53* resultam em um descontrole do ponto de checagem de G1, possibilitando que células danificadas progridam para a fase S sem reparar as lesões, ou entrar em apoptose (AGUARWAL et al., 1998).

A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial). A via extrínseca é iniciada pela ativação de receptores de morte celular em várias células. Os receptores de morte mais conhecidos são os receptores TNF do tipo I (TNFR1) e uma proteína semelhante chamada de Fas (CD95). A via intrínseca resulta do aumento da permeabilidade mitocondrial e da liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a participação dos receptores de morte (RAVAGNAN, ROUMIER e KROEMER, 2002; SCORRANO e KORSMEYER, 2003).

A superfamília dos receptores fatores de necrose tumoral (tumor necrosis factor receptor, rTNF) inclui diversos receptores, entre eles o rTNFR-1, Fas/CD95, TRAIL. Os membros da família do rTNF têm por principal característica um domínio extracelular rico em cisteína (ASHKENAZI, 2002). A

inativação funcional dos rTNF com domínios de morte pode participar dos processos de tumorigênese, através da via extrínseca da apoptose, ou como elemento regulador do sistema imune (GHOBRIAL, WITZIG e ADJEI, 2005). O receptor e ligante CD95 desempenham um papel importante na apoptose durante a morte de células T maduras no final da resposta imune, morte de células infectadas por vírus. Foi observada uma correlação entre os níveis séricos de Fas/CD-95 solúvel e a incidência de linfomas.

A explicação para este achado é de que o Fas/CD-95 solúvel compete com o ligante natural inibindo a apoptose (KRAMMER, 2000). Também foi demonstrado que mutações que afetam a funcionalidade do Fas/CD-95 estão associadas a um efeito protetor da tumorigênese (FULDA e DEBATIN, 2006). Diversos são os fatores que podem desencadear a apoptose, entre eles: ligação de moléculas a receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000).

Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD/ MORT-1. Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (DANIEL et al., 2001). A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Os sinais que são transduzidos em resposta a estes insultos convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER, 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presentes (DESAGHER, 2000).

Quando sinais de morte alcançam a mitocôndria, levam ao colapso do potencial da membrana mitocondrial interna, bem como a uma transição da permeabilidade mitocondrial. Ao mesmo tempo, a água do espaço entre membranas passa para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e conseqüente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma

(GUPTA, 2003). Além da liberação de moléculas pela mitocôndria, a indução do potencial da membrana mitocondrial interna, e a transição da permeabilidade mitocondrial levam à perda da homeostasia celular, interrompendo a síntese de ATP e aumentando a produção de espécies reativas do oxigênio (KROEMER e REED, 2000).

O aumento nos níveis de ERO leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, aumentando o colapso do potencial de membrana mitocondrial (GREEN e KROEMER, 2004). A resposta da mitocôndria ao dano oxidativo é uma via importante no início da apoptose. Alguns estudos indicam que durante a apoptose ocorre a formação de um megaporo que contém diversas proteínas e abrange as membranas interna e externa da mitocôndria (WETZEL e GREEN, 1999). Através desse poro ocorre a liberação do citocromo c para o citoplasma onde participa da ativação da apoptose. Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pela mitocôndria, fazendo com que ocorra um desacoplamento da cadeia respiratória e conseqüente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol (GUPTA, 2003).

Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 e a caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (GREEN e KROEMER, 2004). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 que vai ocasionar a apoptose (RUPNARAIN, 2004). Mais recentemente, foi descrita a participação, na via mitocondrial, de uma flavoproteína conhecida por Fator Indutor de Apoptose (AIF). A AIF migra da mitocôndria para o núcleo após um estímulo de apoptose e induz a condensação da cromatina e fragmentação do DNA em fragmentos de 50Kb, independente da ativação das caspases (BRÖKER, KRUYT e GIACCONE, 2005).

A exposição prolongada ao cigarro pode resultar no desenvolvimento do enfisema pulmonar. Entre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos destacam-se: o desenvolvimento de uma reação inflamatória crônica, o desequilíbrio entre proteases/anti-proteases, estresse oxidativo e a apoptose das células das paredes alveolares. Estudos experimentais sugerem o envolvimento das caspases, deficiência do fator de crescimento vascular endotelial, oxidantes, ceramida, linfócitos T CD8⁺, elastases e interferon gama

na indução da apoptose das células das paredes alveolares (AOSHIBA, 2007; PARK, RYTER e CHOI, 2007).

Em relação à associação do consumo de álcool e os mecanismos envolvidos na apoptose do tecido pulmonar a maioria dos estudos são referentes ao mecanismo fisiopatológico ou tratamento da síndrome da angústia respiratória aguda (MOSS et al., 1996; MOSS et al., 2003; GUIDOT e HART, 2005; WAKABAYASHI e KATO, 2006). Entre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos são observados principalmente: a redução da produção de surfactante, a perda da integridade da membrana alvéolo-capilar e aumento da sensibilidade à apoptose induzida por citocinas *in vitro* e *in vivo*, dos pneumócitos do tipo II.

Como já exposto, a literatura mostra mais comumente os efeitos deletérios tanto do álcool como do tabaco de forma isolada, mas geralmente existe na prática a associação de ambos. Desta forma, o presente estudo visou analisar os efeitos destas duas eventualidades em ratos, em relação às alterações morfo-funcionais, imunohistoquímicas e ao estresse oxidativo.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

Investigar os efeitos da exposição crônica à fumaça do cigarro e ao álcool no estresse oxidativo, nas alterações morfo-funcionais e distúrbios imunohistoquímicos provocados por estas agressões no aparelho respiratório de ratos.

MÉTODO

3. MÉTODO

3.1 Animais Utilizados

O protocolo experimental foi realizado conforme o “Guia de procedimentos e utilização de animais de laboratório”, publicado pelo *U.S. National Institute of Health* e aprovado pelo “Comitê de Ética e Experimentação Animal” da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista (protocolo número: 557). Foram utilizados 120 ratos machos da linhagem Wistar, adultos com peso aproximado de 180-200 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP - Universidade Estadual Paulista.

3.2 Ambiente de Experimentação

Os ratos foram mantidos no Biotério do Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, onde permaneceram durante todo o período experimental, em sala fechada, à temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, controlada por ar condicionado, umidade de $60 \pm 5\%$ e período claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alojados em gaiolas de poliuretano, com cinco ratos em cada gaiola, recebendo ração comercial padrão (Purina®, Brasil) e água à vontade durante um período de aclimação de sete dias antes do início do experimento. Diariamente as gaiolas foram limpas e os animais pesados semanalmente (balança Mettler Toledo®, modelo: Spider 2).

3.3 Grupos Experimentais

Após o período de aclimação no Biotério de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental os animais foram distribuídos, por sorteio, segundo a tabela dos números casuais, em grupos como se segue:

GRUPO 1A - CONTROLE: 15 ratos que receberam ração e água à vontade por um período de 180 dias.

GRUPO 1B - CONTROLE: 15 ratos que receberam ração e água à vontade por um período de 260 dias.

GRUPO 2A - ÁLCOOL: 15 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30°GL com água destilada, e ração à vontade, por um período de 180 dias.

GRUPO 2B – ÁLCOOL: 15 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30°GL com água destilada, e ração à vontade, por um período de 260 dias.

GRUPO 3A - TABACO: 15 ratos que foram expostos à fumaça de 10 cigarros/dia, durante sete dias por semana, ração e água à vontade, por um período de 180 dias.

GRUPO 3B - TABACO: 15 ratos que foram expostos à fumaça de 10 cigarros/dia, durante sete dias por semana, ração e água à vontade, por um período de 260 dias.

GRUPO 4A - ÁLCOOL E TABACO: 15 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30°GL, com água destilada, exposição à fumaça de 10 cigarros/dia, durante sete dias por semana e ração à vontade por um período de 180 dias.

GRUPO 4B - ÁLCOOL E TABACO: 15 ratos que receberam solução de etanol diluído a 30°GL, com água destilada, exposição à fumaça de 10 cigarros/dia, durante sete dias por semana e ração à vontade por um período de 260 dias.

3.4 Seqüência das Etapas Experimentais

3.4.1. Preparo e administração da solução de etanol

Após o período de aclimação, durante sete dias foi oferecido aos ratos, dos grupos 2A, 2B, 4A e 4B, etanol diluído a 10°GL, com água destilada. Esta diluição foi aferida por um alcoômetro. Na segunda semana a diluição do etanol foi de 20°GL e a partir da terceira semana até a conclusão do

experimento (180 ou 260 dias), o etanol foi diluído a 30°GL. A água foi suspensa desde o início da introdução do etanol. Nos grupos controle (1A e 1B) e do tabaco (3A e 3B) foram oferecidos água à vontade e ração comercial padrão durante todo o período do estudo.

3.4.2 Exposição à fumaça do cigarro

Os animais dos grupos 3 e 4 foram submetidos, por um período de 180 dias (3A e 4A) ou 260 dias (3B e 4B), à fumaça do cigarro em incubadora modificada, através do método proposto por Simani et al. (1974), implementado por Wang et al. (1999) e já padronizado em nosso laboratório experimental (PAIVA et al., 2003). Os ratos foram colocados em câmara transparente, com um volume de aproximadamente 95x80x65 cm, conectado ao aparelho de fumar. Puffs de fumaça foram tirados do cigarro por vácuo, por meio do aparelho de fumar, e depois jogados na câmara, durante um período de 30 minutos. Após esse período, a fumaça foi exaurida. Durante a primeira semana, a fumaça foi liberada a uma taxa de 5 cigarros, uma vez ao dia, sete dias por semana, no período da manhã. O número de cigarros foi aumentado para uma taxa de 10 cigarros, uma vez por dia, sete dias por semana, no período da manhã, da segunda semana até o final do período de estudo. Assim, ao final, os animais foram expostos à fumaça de 10 cigarros ao dia. O cigarro utilizado foi o de marca comercial com a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono.

3.4.3 Procedimento do sacrifício

Após a conclusão do experimento (180 ou 260 dias) os animais foram mantidos em jejum por 12 horas e anestesiados com Pentobarbital sódico (30mg/kg) intra-peritoneal, podendo ser complementado com mais um terço da dose se o plano anestésico não estivesse satisfatório. Os ratos foram considerados anestesiados quando apresentaram respiração regular e superficial, associada à flacidez da musculatura esquelética e desaparecimento dos reflexos. A seguir foram submetidos à pesagem e mensuração do comprimento focinho-ânus e do IMC (peso em Kg/comprimento focinho-ânus²). Foram realizadas tricotomia cérvico-torácica e

abdominal, anti-sepsia com álcool iodado a 2% e laparotomia mediana xifopúbica. Após coleta de dois ml de sangue venoso (veia cava inferior) para a dosagem dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo em hemáceas lavadas (item 3.4.4), foi realizada a secção completa da veia cava inferior e da artéria aorta abdominal para o sacrifício por sangria.

Posteriormente, foram retirados os pulmões unidos pela traquéia, seccionada logo abaixo da cartilagem tireóide. Os pulmões unidos pela traquéia foram pesados e submetidos à mensuração de seus volumes pré e pós-infusão de formol tamponado a 10% a uma pressão de 20cmH₂O (item 3.4.5). A seguir, os pulmões unidos pelas traquéias, já insuflados com a solução de formol tamponado, foram armazenados em solução fixadora, com o objetivo da análise morfológica e imunohistoquímica.

3.4.4 Dosagem dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo em hemáceas lavadas

A dosagem dos marcadores bioquímicos do estresse oxidativo em hemáceas lavadas foi realizada em todos os animais dos subgrupos. As amostras de sangue foram coletadas em tubos de ensaio com anticoagulante e centrifugadas a 1.200 rpm por 10 minutos a 25°C. Para obtenção das hemáceas lavadas, o sangue foi lavado com tampão-salina-fosfato (PBS), a 4°C e centrifugado a 3500 rpm durante 15 minutos por três vezes para retirada do plasma, glóbulos brancos e plaquetas por aspiração. Em seguida, foi preparado um hemolisado, o qual foi utilizado para as determinações dos biomarcadores do estresse oxidativo: atividades enzimáticas de superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GSH-Px) e concentrações da proteína tiól e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) de acordo com a metodologia descrita por Ferreira et al. (1999).

3.4.4.1 Determinação da peroxidação lipídica – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O hemolisado foi preparado para adição de ácido tiobarbitúrico (TBA a 0,67%). A mistura foi aquecida a 80°C por 30 minutos e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 535 nm. Os

resultados foram expressos em nM de malonaldeído por grama de hemoglobina (nM/gHb) (FERREIRA et al., 1999).

3.4.4.2 Determinação da atividade de superóxido dismutase (SOD)

A atividade total da SOD foi determinada pela sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol[®] pelo ânion superóxido. Após preparo da amostra, a absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm (25°C). A quantidade de SOD capaz de produzir 50% de inibição da oxidação do pirogalol[®], por miligrama de hemoglobina, foi definida como uma unidade de atividade enzimática expressa em UI/mgHb (FERREIRA et al., 1999).

3.4.4.3 Determinação da concentração da proteína tiol (SH)

O conteúdo de grupos tióis foi determinado pela adição da forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que iniciou a reação enzimática do grupo SH com o ácido 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB) formando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A mistura consiste na adição de 1.290 µl de água destilada, 200 µl de tampão Tris/HCl (EDTA 1M; pH 8,0; 5mM), 200 µl de 10 UI/ml de glutathione redutase (GSH-Rd), 200 µl de NADPH (2mM) e 100 µl de DTNB (12 mM) a 10 µl de hemolisado. Para obtenção da curva padrão do grupo tióis, foi realizado o mesmo ensaio, substituindo-se a amostra de hemolisado por 10 µl de solução padrão 1:1000 glutathione oxidada (GSSG) a 33 µM. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 412 nm. A concentração de grupo tióis foi expressa em micromolar do substrato reduzido por grama de hemoglobina (µM/gHb).

3.4.4.4 Determinação da atividade enzimática de glutathione-peroxidase (GSH-Px)

A determinação da atividade da GSH-Px foi realizada pelo monitoramento da oxidação do NADPH. A amostra foi processada e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro com comprimento de onda

de 340 nm. A atividade da GSH-Px foi expressa em unidades de atividade enzimática por grama de hemoglobina (FERREIRA et al., 1999).

3.4.5 Estudo dos volumes pulmonares pré e pós-infusão de formol

Os pulmões dos animais de cada subgrupo, unidos pela traquéia, foram pesados em balança analítica YMC-CO JAPAN série Chyo JS-110 obtendo-se assim, a massa pulmonar (m). O volume dos pulmões foi aferido através de imersão em proveta com 60ml de solução de formol tamponado e este foi chamado de: volume pulmonar pré-infusão. Posteriormente foi injetada a mesma solução através da traquéia por meio de tubo de polietileno PE 240, a uma pressão de 20cm H₂O e foi novamente aferido seu volume. Este foi chamado de volume pulmonar pós-infusão. A complacência do pulmão isolado foi obtida através da fórmula: $C = \frac{\text{volume pulmonar pós-infusão} - \text{volume pulmonar pré-infusão}}{20}$, onde o denominador corresponde à pressão fixa de 20cm de água. A complacência específica foi calculada através da fórmula: $C_{esp} = C / \text{volume pulmonar pré-infusão}$.

3.4.6 Estudo das alterações morfológicas e imunohistoquímicas pulmonares

3.4.6.1 Microscopia óptica (Hematoxilina-Eosina):

Uma amostra longitudinal dos pulmões direito e esquerdo, de sete animais sorteados de cada um dos subgrupos foram processados para inclusão em parafina, cortados (três micras) e corados pela hematoxilina-eosina para o estudo de microscopia de luz, através do microscópio de luz (marca Carl Zeiss do Brasil Ltda; modelo Axiostar plus). As lâminas foram avaliadas pelo patologista do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, sem o conhecimento prévio de que grupos estavam sendo verificados. Foram avaliadas as presenças de infiltrados inflamatórios nas regiões brônquicas, bronquiolares e peri-alveolares, sendo essas alterações registradas como presentes ou ausentes e estimadas em porcentagem.

3.4.6.2 Estimativa de enfisema pulmonar

Para a avaliação da presença de enfisema pulmonar foram fotografados cinco campos por lâmina de cada um dos pulmões dos sete animais de cada subgrupo, com aumento de 100x, com o auxílio de um microscópio óptico Olympus Q color 5, modelo BX41TF ligado ao equipamento de análise de imagem por microcomputador Programa Q Capture. A seguir, tais imagens foram analisadas no Programa Image J para estimar a porcentagem de tecido que ocupava o campo analisado. Como no enfisema pulmonar há destruição alveolar, esperou-se que, em caso da presença do mesmo, a porcentagem de tecido examinada na lâmina estivesse reduzida.

3.4.6.3 Marcadores de proliferação celular

As secções de parafina de um dos pulmões e da traquéia, de sete animais sorteados de cada subgrupo, foram submetidas à reação de imunohistoquímica utilizando-se os anticorpos primários: PCNA, P53 e Survivina. A reação de imunohistoquímica foi realizada, pelo método de Avidina Biotina Peroxidase, segundo Hsu et al. (1998).

Após a desparafinização, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena por meio da incubação das lâminas com solução de peróxido de hidrogênio 3%, diluída em água destilada por 10 minutos, à temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, foi realizada a reativação antigênica pelo calor, utilizando-se forno de microondas e tampão ácido cítrico 0,21% pH 6.0/0,01mM por 15 minutos. Este procedimento foi realizado com a finalidade de recuperar sítios antigênicos mascarados pela fixação em formol e inclusão em parafina.

As amostras foram lavadas em tampão Fosfato (PBS) pH= 7.2-7.4 por 10 minutos, à temperatura ambiente. O excesso de líquido foi retirado e os cortes receberam os anticorpos primários diluídos previamente. Estes foram incubados por 18 horas, em câmara úmida, a 8°C. Os anticorpos foram retirados por meio de aspiração negativa e as lâminas foram lavadas em dois banhos de PBS, à temperatura ambiente, por cinco minutos cada banho. Por fim, os cortes foram recobertos pelo anticorpo secundário biotinilados e posteriormente o complexo ABC por uma hora à temperatura ambiente. Foram novamente lavados em dois banhos de PBS, por cinco minutos cada banho. A

reação foi revelada pelo cromógeno e pelo substrato 3,3-diaminobenzidina. As lâminas foram lavadas em água corrente por 30 segundos e contra-coradas com Hematoxilina de Mayer. Os cortes foram desidratados por quatro banhos de álcool etílico PA, em concentrações crescentes de 60%, 65%, 95% e absoluto (100%), e foram diafanizados por três banhos de Xilol. As lâminas foram montadas com Permont e lamínulas 24 x 32 (KNITTEL), e lidas em microscópio óptico biocular (NIKON). Detalhes sobre os marcadores de proliferação estudados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1- Descrição dos marcadores de proliferação celular estudados.

Anticorpos	Monoclonal/ policlonal	Empresa/ país origem	Diluição	Método de recuperação do antígeno	Método secundário (padrão de marcação de cada anticorpo)
SURVIVINA (clone 5E8)	Monoclonal de Camundongo	LabVision/USA	1:100	Ácido Cítrico 0,21% pH 6.0 em forno de microondas por 15'.	Kit LSAB (DAKO)
PCNA (clone PC-10)	Monoclonal de Camundongo	DAKO/USA	1:100	Ácido Cítrico 0,21% pH 6.0 em forno de microondas por 15'.	Kit LSAB (DAKO)
P53 (clone DO-7)	Monoclonal de Camundongo	DAKO/USA	1:150	Ácido Cítrico 0,21% pH 6.0 em forno de microondas por 15'.	Kit LSAB (DAKO)

As células coradas pelo PCNA foram contadas e o índice de proliferação celular foi calculado pela contagem de 1000 núcleos em cada

lâmina usando a seguinte fórmula: (número de células marcadas/número de células coradas e não coradas) x 100. Foi considerado como padrão de positividade o aparecimento de coloração marrom acastanhada no núcleo para a reatividade ao PCNA. Da mesma forma, foi considerado como padrão de positividade o aparecimento de coloração marrom acastanhada nuclear para a reatividade à P53 e citoplasmática para survivina.

3.4.6.4 Protocolo imunohistoquímico para detecção de imuno-expressão de apoptose pelo método de TdT-mediated dUTP-digoxigenin nick-end labeling (TUNEL)

Os cortes histológicos (traquéia e pulmão) de sete animais de cada grupo estudado foram submetidos à reação imunohistoquímica do TUNEL, para a evidenciação de apoptose. Por meio desse método, é empregada a enzima desoxinucleotidil-transferase terminal (TdT), do grupo das transferases: enzimas que catalisam reações de transferências de grupamentos. A enzima desoxinucleotidil-transferase terminal se liga à extremidade 3'-OH do fragmento de DNA da célula que sofreu apoptose e catalisa a adição da biotina marcada aos desoxinucleotídeos não marcados.

Os nucleotídeos biotinizados são detectados pelo emprego do conjugado composto por estreptovindinahorseradish peroxidase (HRP). Na etapa posterior, a diaminobenzidina (DAB) é oxidada na presença da peroxidase, resultando em um precipitado insolúvel e marrom no sítio do fragmento de DNA visível ao microscópio. A contracoloração, empregando-se verde de metila, favorece a avaliação morfológica e a caracterização das células normais e das células apoptóticas. Para a aplicação do método, foi utilizado o: In situ Cell Death Detection Kit POD do fabricante Roche Applied Science Inc. Penzberg (Alemanha). As seções histológicas dos pulmões e das traquéias dos animais estudados foram submetidas às seguintes etapas:

Desparafinização e reidratação dos tecidos:

- Xilol I por 5 minutos.
- Xilol II por 5 minutos.
- Etanol I (100%) por 5 minutos.
- Etanol II (100%) por 5 minutos.

- Etanol 90% por 3 minutos.
- Etanol 80% por 3 minutos.
- Etanol 70% por 3 minutos.
- Lavagem em TBS 1X e secagem cuidadosa do fragmento de tecido demarcado.

Permeabilização:

- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl de Proteinase K na diluição de 1/100 em Tris pH 7,8, durante 20 minutos.
- Lavagem em TBS 1X e secagem do corte histológico.

Inativação da peroxidase endógena:

- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em TBS, por 5 minutos.
- Lavagem em TBS 1X e secagem cuidadosa do fragmento de tecido demarcado.

Equilíbrio e marcação da reação:

- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl de “TdT Equilibration Buffer” na diluição de 1/5 em água destilada, por 30 minutos.
- Incubação em câmara úmida a 37 °C com 60 µl da solução com 57 µl de “TdT Labeling Reaction Mixture” e 3 µl de “TdT enzyme”, por 1h30min.

Interrupção da reação:

- Lavagem em TBS 1X e secagem cuidadosa do fragmento de tecido demarcado.
- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl de “Stop Buffer”, por 5 minutos.
- Lavagem em TBS 1X e secagem cuidadosa do fragmento de tecido demarcado.

Deteção:

- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl de “Block Buffer”, por 10 minutos.
- Secagem do fragmento para retirada do excesso de solução bloqueadora.
- Incubação em câmara úmida à temperatura ambiente com 100 µl do “50X Conjugate” na concentração de 1/50, diluído na solução “Block Buffer”, por 30 minutos.

- Lavagem em TBS 1X e secagem cuidadosa do fragmento de tecido demarcado.
- Incubação à temperatura ambiente com 100 µl da solução DAB, cerca de 10 a 15 minutos, observando-se a intensidade da revelação da imunoreação.
- Lavagem em água destilada.

Contra-coloração:

- Contracoloração com 100 µl de verde de metila por 3 minutos.
- Etanol 100% (2 a 4 vezes).
- Secagem.
- Xilol (2 a 4 vezes).
- Montagem com permount®.

As alterações foram visualizadas através de um sistema de substrato em que os núcleos com fragmentação do DNA permaneciam com a coloração marrom. Como controles positivos foram utilizadas glândulas prostáticas de ratos castrados. A apoptose foi avaliada em dez campos de cada animal analisado com um aumento de 400x, através da utilização de uma gradícula de 100 pontos com uma área conhecida ($62500 \mu\text{m}^2$ a um aumento de 400x) acoplada à ocular do microscópio (GUNDERSEN et al., 1988). Primeiramente foi calculada a área septal pulmonar em cada campo, de acordo com o número de pontos em que o tecido pulmonar tocava as extremidades das retas perpendiculares. A seguir, foi contado o número de células em apoptose na área septal pulmonar. O cálculo do índice apoptótico foi realizado através da equação: número de células positivas para apoptose na área septal pulmonar/área septal pulmonar.

3.5 Análise Estatística

Para estudo do crescimento dos animais foi utilizada a função logística. Foi calculada a estimativa dos parâmetros para cada grupo em cada experimento. Foi também construído um intervalo de 95% de confiança para cada parâmetro.

Para as variáveis: peso, massa pulmonar, volume pulmonar pré e pós-infusão de formol, complacência, TBARS, SOD, GSH-t e GSH-Px, % de bronqueolite, estimativa de enfisema pulmonar, PCNA e índice apoptótico que

apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foi utilizada a análise de variância no esquema fatorial, estudando-se os fatores grupo e experimento e a interação grupo x experimento. Para as variáveis: complacência específica, comprimento focinho-ânus, IMC, e % de alveolite, que não apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis para comparação dos grupos e experimentos. Para a sobrevivência foi estudada a distribuição de frequência de resultados positivos, através do teste Qui-quadrado. O nível de significância utilizado foi de 5%.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Dos 120 animais que iniciaram o estudo, 117 o concluíram. Foi a óbito um animal de cada um dos respectivos grupos: 1B (Controle 260 dias), 2B (Etilismo 260 dias) e 3B (Tabagismo 260 dias).

4.1 Crescimento dos Animais

4.1.1 Acompanhamento dos pesos semanais dos animais dos subgrupos de 180 dias de exposição

De acordo com as figuras 1 e 2 pôde-se notar que, o grupo controle apresentou a maior assíntota, seguido do grupo tabaco. Os grupos expostos ao álcool (álcool e álcool + tabaco) obtiveram as menores assíntotas, indicando que o crescimento foi menor para estes últimos grupos.

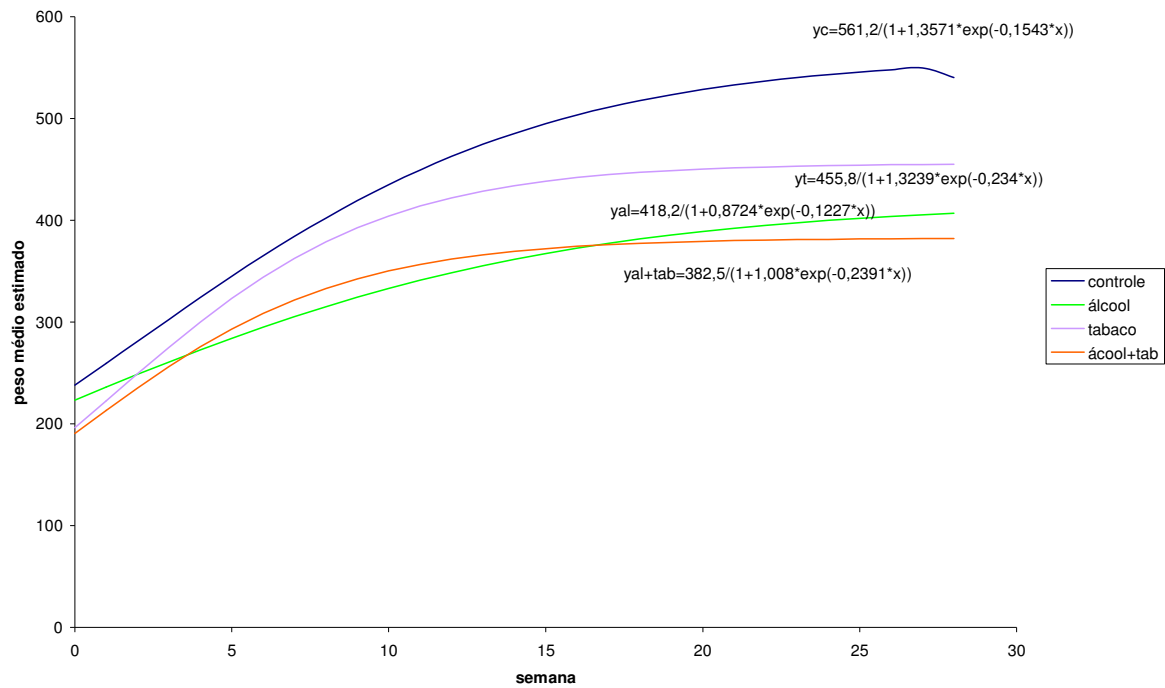


Figura 1: Modelo logístico ajustado aos pesos médios semanais dos animais segundo tempo de exposição de 180 dias.

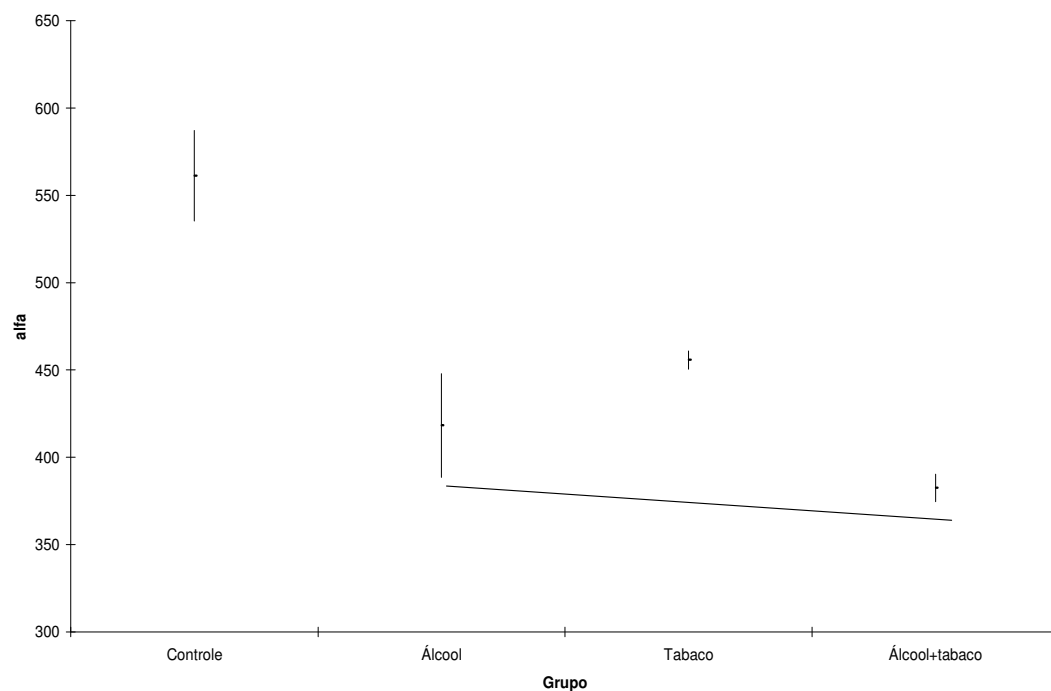


Figura 2: Estimativa da assíntota (Parâmetro alfa) e respectivos intervalos de confiança para cada grupo para o tempo de exposição de 180 dias.

4.1.2 Acompanhamento dos pesos semanais dos animais dos subgrupos de 260 dias de exposição

Em relação aos animais de tempo de exposição de 260 dias pôde-se notar que, o grupo controle obteve a maior assíntota, seguido dos grupos álcool e tabaco (sem diferença significativa entre si), e o grupo álcool + tabaco obteve a menor assíntota, indicando um crescimento menor (Figuras 3 e 4).

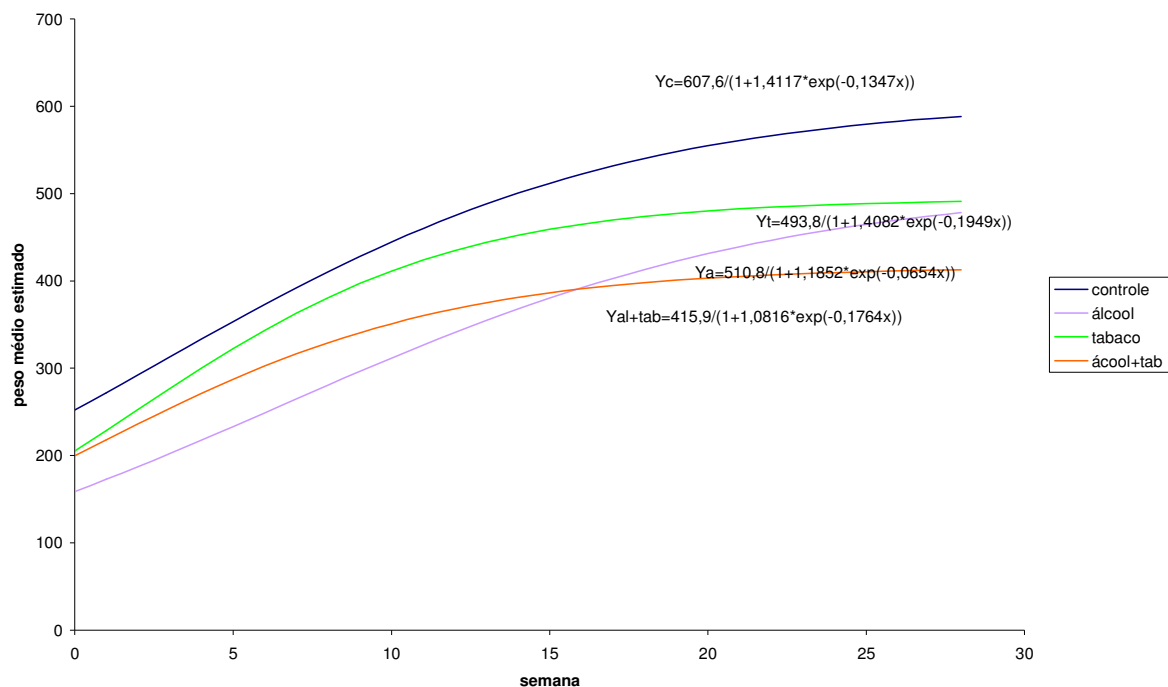


Figura 3: Modelo logístico ajustado aos pesos médios semanais dos animais segundo grupo no tempo de exposição de 260 dias.

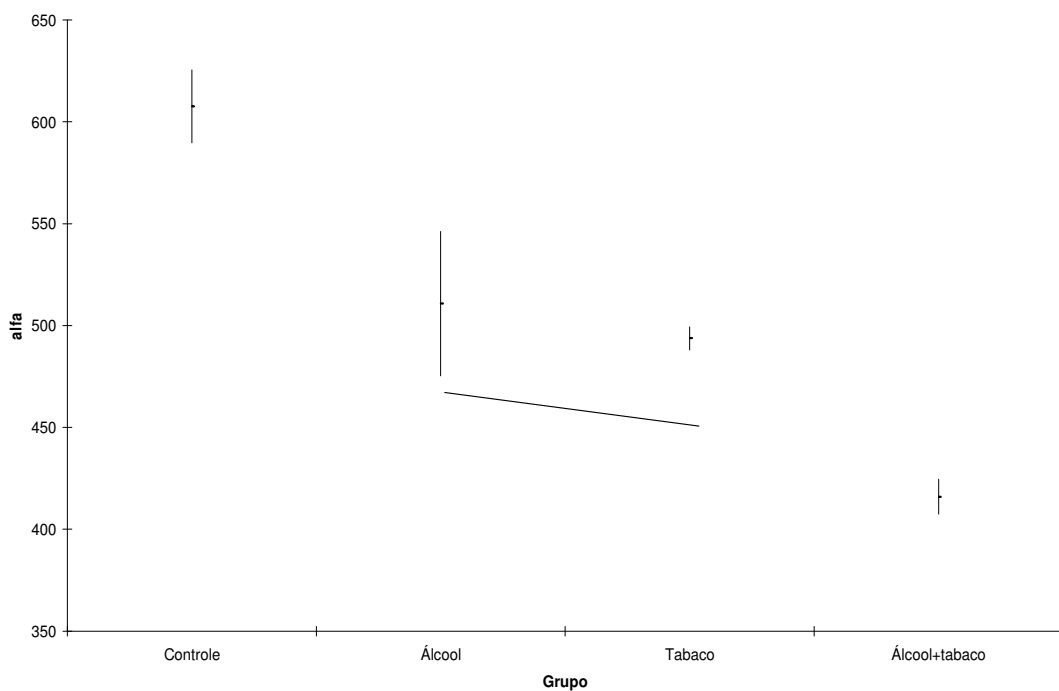


Figura 4: Estimativa da assíntota (Parâmetro alfa) e respectivos intervalos de confiança para cada grupo para o tempo de exposição de 260 dias.

4.1.3 Pesagem dos animais no dia do sacrifício

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 5. Tanto nos animais com 180 dias de exposição como nos animais de 260 dias, pôde-se observar que todos os animais dos subgrupos experimentais apresentaram pesos inferiores ao grupo controle. Os menores pesos foram dos grupos álcool + tabaco, sem diferença entre os animais dos grupos tabaco e álcool. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, notou-se que as médias dos pesos aos 260 dias foram sempre maiores que as de 180 dias, sendo esta indiferença significativa somente nos dois grupos expostos ao tabaco.

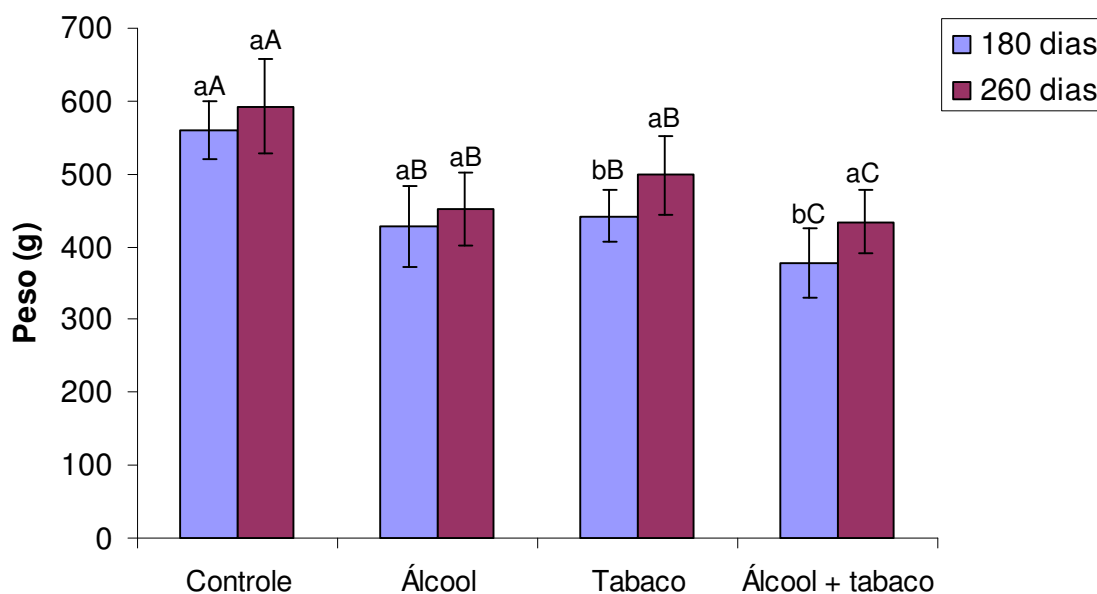


Figura 5: Média e desvio-padrão referente à variável peso dos animais no dia do sacrifício, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.1.4 Comprimento focinho-ânus

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na tabela 2. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que os

animais que consumiram álcool (álcool e álcool + tabaco) apresentaram valores inferiores ao grupo controle. O grupo tabaco não diferiu do grupo controle. A comparação entre os três subgrupos experimentais não revelou diferença significativa entre os mesmos. Já entre os animais com tempo de exposição de 260 dias observou-se que todos os animais dos subgrupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle, sem diferença significativa entre si. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição notou-se que o comprimento focinho-ânus só não foi significativamente maior aos 260 dias nos animais expostos ao tabaco.

Tabela 2: Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes, referente à variável comprimento focinho-ânus, segundo momento e grupo.

Grupo	Momento	
	180 dias	260 dias
Controle	26,0[26,0;26,9]b A	28,5[27,0;29,0]a A
Álcool	24,0[24,0;25,9]b B	26,5[26,0;27,0]a B
Tabaco	26,0[24,7;27,0]a AB	25,8[24,0;27,0]a B
Álcool + tabaco	25,0[24,0;25,6]a B	25,0[25,0;26,0]a B

4.1.5 IMC

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na tabela 3. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que todos os animais dos subgrupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle, sem diferença significativa entre si. Entre os animais com tempo de exposição de 260 dias todos os animais dos subgrupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle, com diferença significativa apenas entre os grupos tabaco e álcool. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, o comportamento do IMC foi bastante desuniforme, diminuindo em alguns e aumentando ou se mantendo em outros.

Tabela 3: Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes referente à variável IMC segundo momento e grupo

Grupo	Momento	
	180 dias	260 dias
Controle	8,3[7,8;8,6]a A	7,5[7,1;7,5]b A
Álcool	7,1[6,4;7,6]a B	6,4[6,1;6,8]b C
Tabaco	6,8[6,1;7,3]a B	7,1[6,6;8,5]a B
Álcool + tabaco	6,1[5,4;6,8]b B	6,7[6,4;6,9]a BC

4.1.6 Massa pulmonar

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 6. Os animais expostos ao álcool obtiveram valores médios da massa pulmonar inferiores ao grupo controle, não sendo essa diferença significativa somente no grupo álcool + tabaco aos 260 dias. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, as médias das massas pulmonares foram sempre maiores aos 260 dias, não sendo significativa esta diferença somente no grupo álcool, mostrando que apesar da agressão provocada pelas drogas, o pulmão continua crescendo.

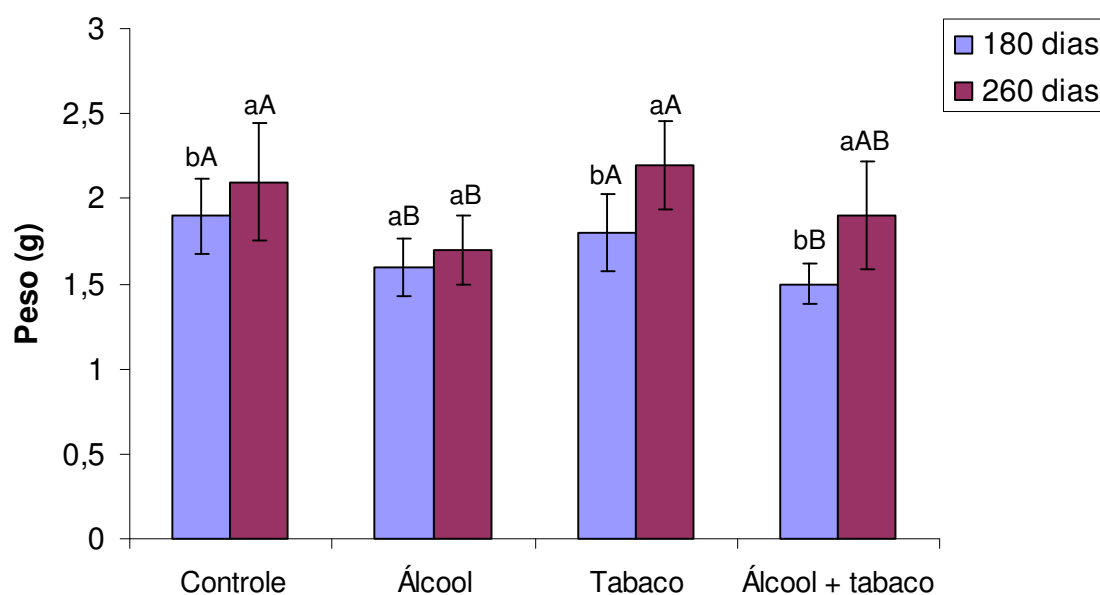


Figura 6: Média e desvio-padrão referente à variável massa pulmonar, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.2 Volumes Pulmonares

4.2.1 Volume pré-infusão de formol a 20 cm H₂O

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 7. Em todos os animais estudados (180 e 260 dias de exposição) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Em relação à comparação de cada um dos subgrupos nos diferentes tempos de exposição (180 ou 260 dias) pôde-se notar que em todos os animais estudados os valores do volume pulmonar pré-infusão foram superiores nos animais de 260 dias.

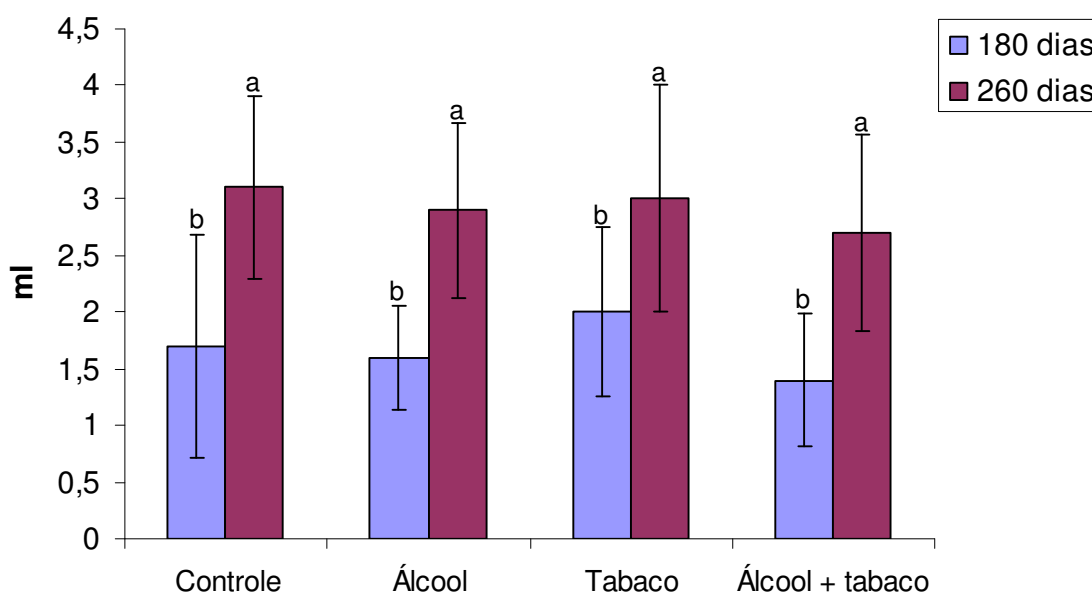


Figura 7: Média e desvio-padrão referente à variável volume pulmonar pré-infusão de formol, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.2.2 Volume pós-infusão de formol a 20 cm H₂O

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 8. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados.

Já nos animais com tempo de exposição de 260 dias notou-se que os animais expostos ao tabaco (tabaco e álcool + tabaco) apresentaram valores inferiores ao grupo controle, tendo o grupo álcool um valor intermediário. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, notou-se que o volume pulmonar não aumentou somente nos ratos expostos ao tabaco.

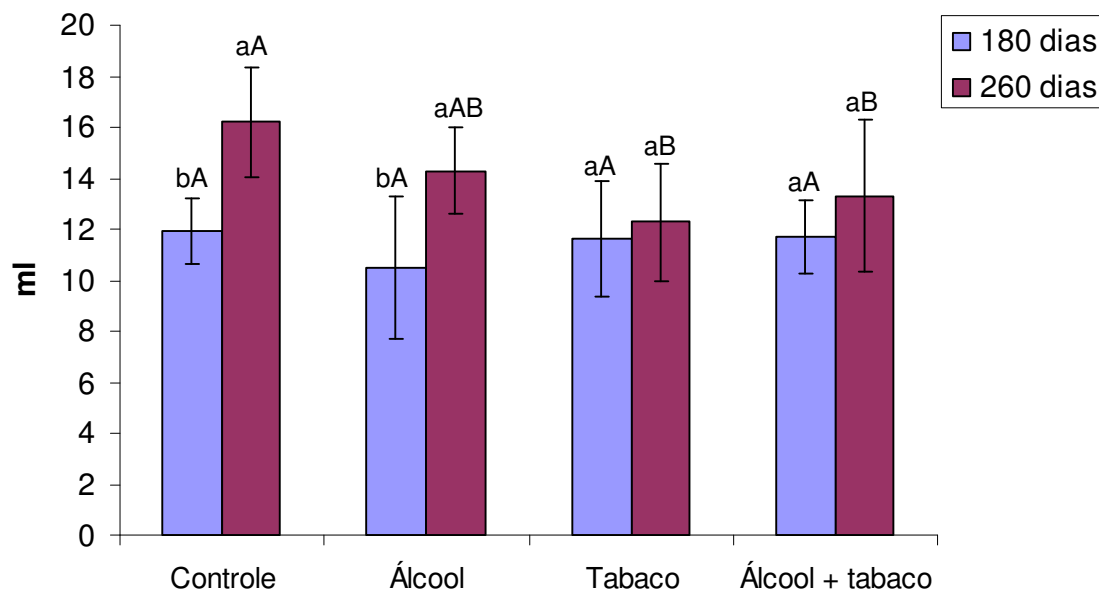


Figura 8: Média e desvio-padrão referente à variável volume pulmonar pós-infusão de formol, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.3 Complacência Pulmonar

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 9. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados. Já entre os animais de 260 dias pôde-se observar que os animais que foram expostos ao tabaco (tabaco e álcool + tabaco) apresentaram valores inferiores ao grupo controle. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, notou-se a complacência só foi significativamente maior nos grupos controle e álcool aos 260 dias.

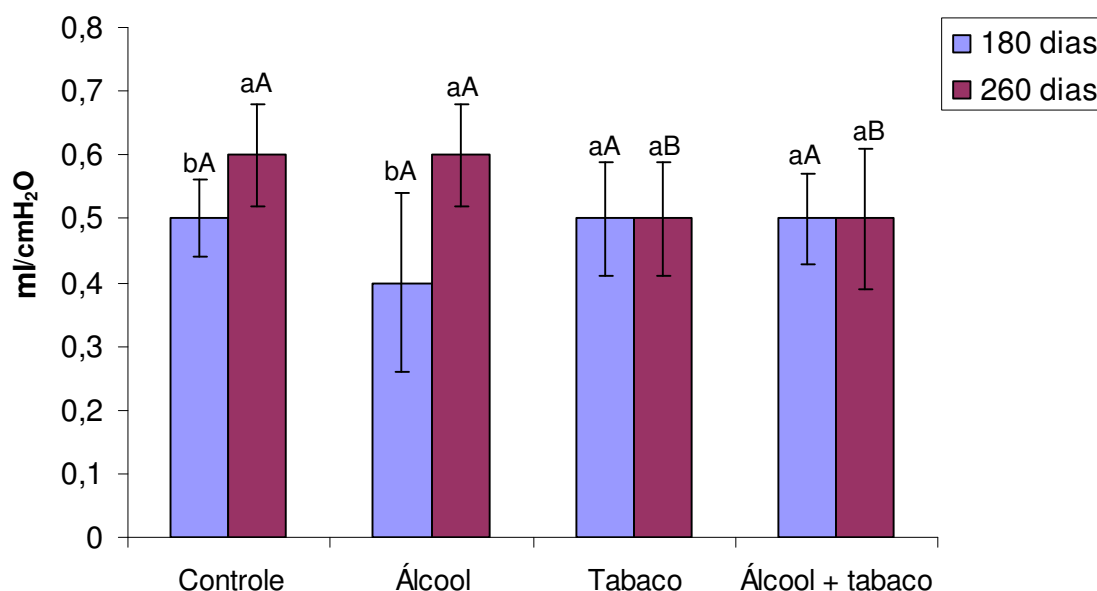


Figura 9: Média e desvio-padrão referente à variável complacência segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.3.1 Complacência específica

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Tabela 4. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos estudados. Já entre os animais de 260 dias pôde-se observar que houve uma tendência para que os três grupos experimentais apresentassem valores inferiores ao grupo controle, sendo significativa somente no grupo tabaco. Quando comparados os grupos em relação ao tempo de exposição, as medianas da complacência específica foram sempre menores nos expostos a 260 dias, mas esta diferença só foi significativa nos três grupos experimentais.

Tabela 4 - Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes referente à variável complacência específica, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

Grupo	Momento	
	180 dias	260 dias
Controle	0,28[0,19;0,56]a A	0,21[0,19;0,24]a A
Álcool	0,29[0,21;0,42]a A	0,20[0,18;0,26]b AB
Tabaco	0,27[0,19;0,31]a A	0,15[0,14;0,17]b B
Álcool + tabaco	0,38[0,30;0,55]a A	0,19[0,17;0,22]b AB

4.4 Dosagem dos Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo em Hemáceas Lavadas

4.4.1 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 10. As médias dos valores de TBARS foram maiores que no grupo controle nos três grupos experimentais aos 180 e 260 dias de exposição, mas esta diferença só foi significativa no grupo tabaco aos 260 dias.

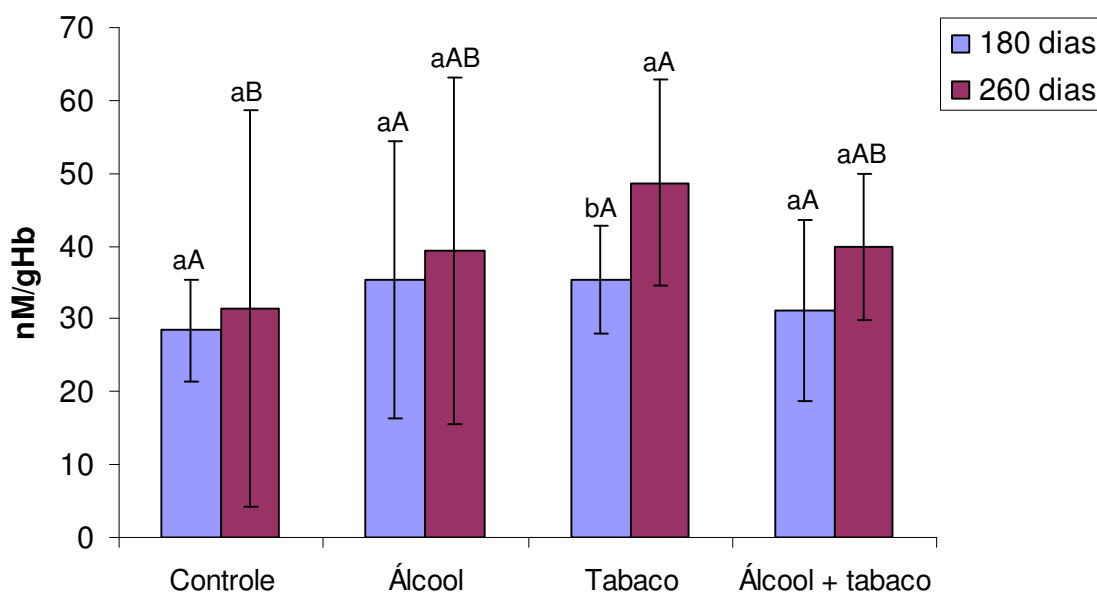


Figura 10: Média e desvio-padrão referente à variável TBARS segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.4.2 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 11. As médias dos valores de SOD foram superiores ao grupo controle nos três grupos experimentais, nos dois momentos estudados, mas esta diferença só foi significativa em todos os grupos experimentais aos 180 dias.

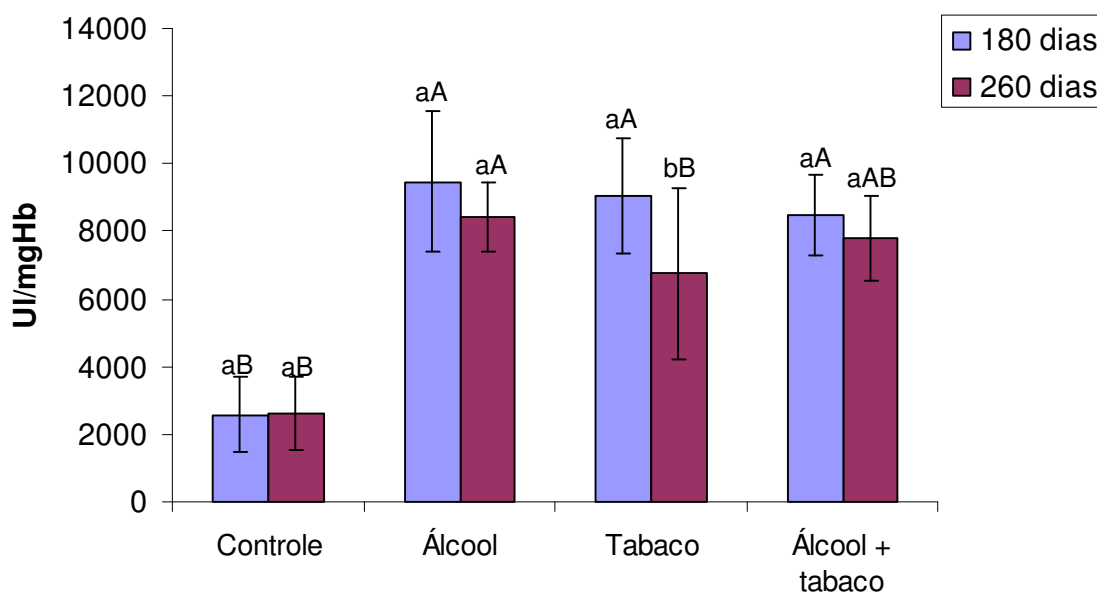


Figura 11: Média e desvio-padrão referente à variável SOD segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.4.3 Determinação da concentração da proteína tiól (SH)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 12. A diferença marcante na concentração da proteína tiól foi nos grupos expostos ao tabaco aos 180 dias, que foram significativamente menores que o grupo controle. Aos 260 dias houve recuperação dessa enzima no grupo exposto ao tabaco.

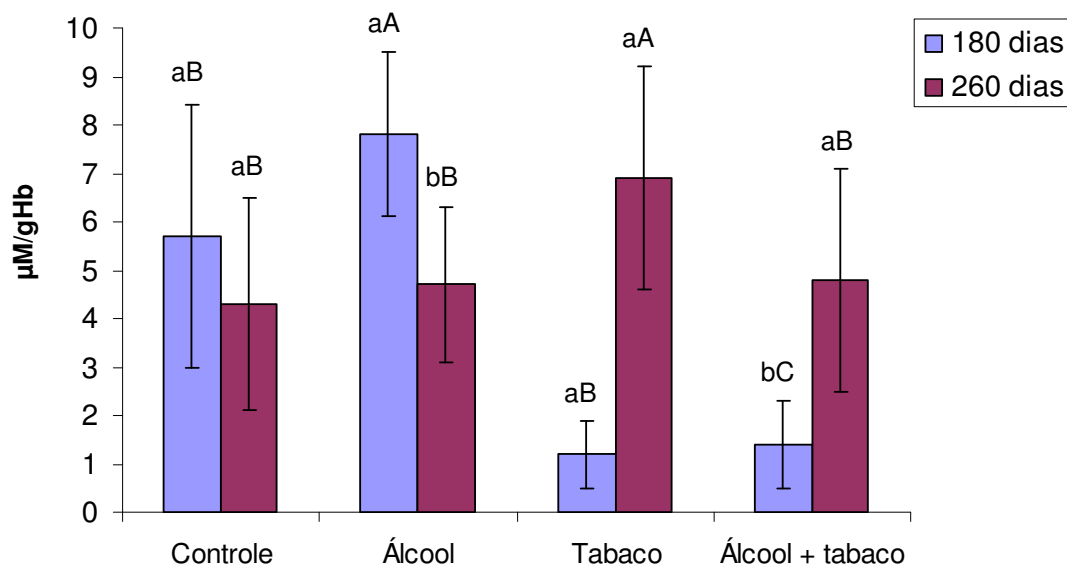


Figura 12: Média e desvio-padrão referente à variável GSH-t segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.4.4 Atividade enzimática de glutathiona-peroxidase (GSH-Px)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 13. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias todos os grupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle. Nos animais com tempo de exposição de 260 dias notou-se que os três grupos experimentais foram semelhantes ao grupo controle.

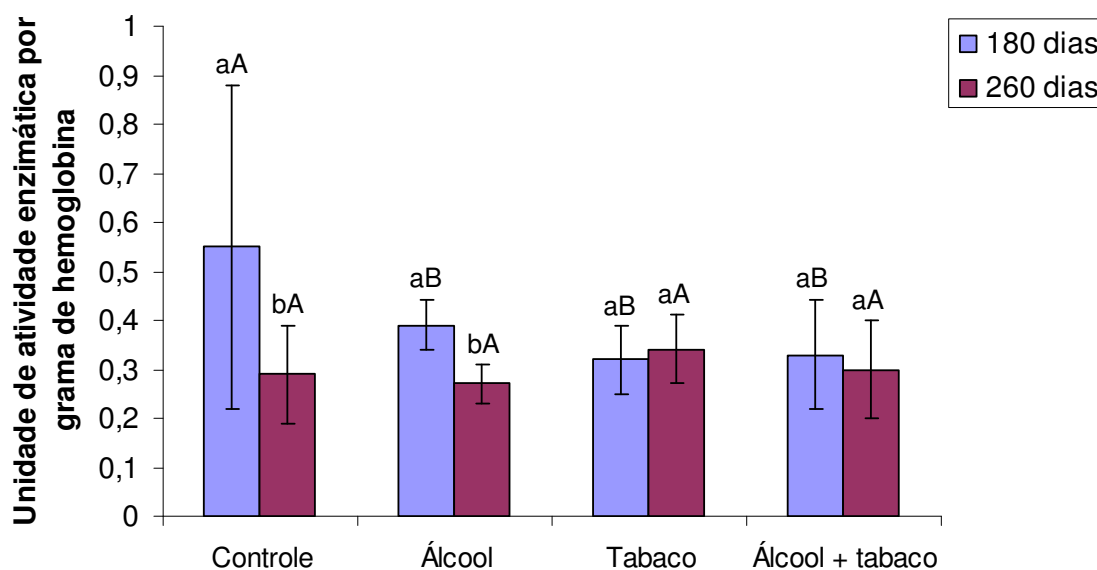


Figura 13: Média e desvio-padrão referente à variável GSH-Px segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

4.5 Alterações Morfológicas e Imunohistoquímicas Pulmonares

4.5.1 Bronquiolite

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 14. Apesar das médias de porcentagem de bronquiolite serem maiores nos três grupos experimentais em ambos os momentos estudados, esta só foi significativa nos animais expostos ao tabaco (tabaco e álcool + tabaco) aos 260 dias. A figura 15 refere-se à foto de um bronquíolo de um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias).

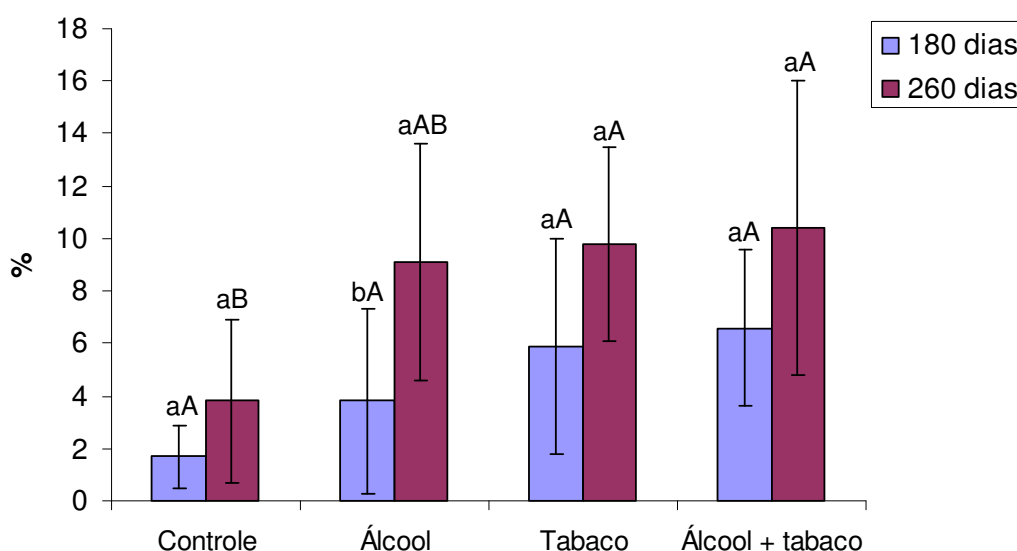


Figura 14: Média e desvio-padrão referente à variável % de bronquiolite, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

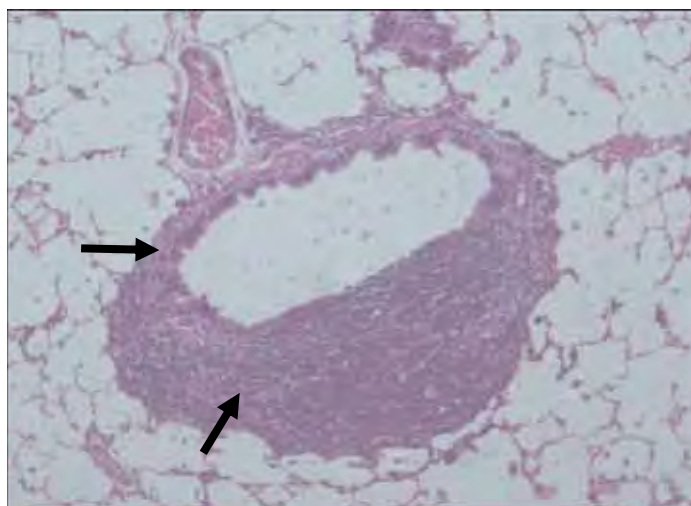


Figura 15: Destaca-se nesta figura a intensa bronquiolite (setas) encontrada em um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias), com um aumento de 200x.

4.5.2 Alveolite

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Tabela 5. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos e momentos estudados. A figura 16 refere-se à foto de um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias) com alveolite.

Tabela 5: Mediana, 1^o e 3^o quartil, entre colchetes referente à variável % de alveolite segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

Grupo	Momento	
	180 dias	260 dias
Controle	0,00[0,00;0,00]	0,00[0,00;0,38]
Álcool	0,00[0,00;0,50]	0,50[0,00;2,50]
Tabaco	0,00[0,00;0,38]	0,00[0,00;0,00]
Álcool + tabaco	0,00[0,00;0,00]	0,50[0,00;0,50]

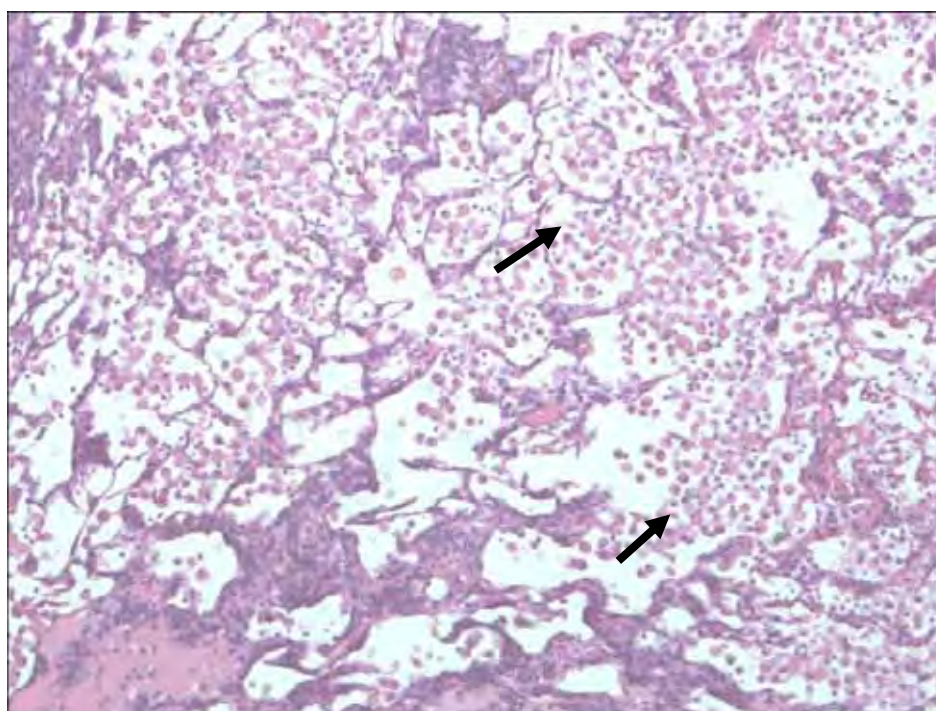


Figura 16: Destaca-se nesta figura a intensa alveolite (setas) encontrada em um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias), com um aumento de 200x.

4.5.3 Estimativa de enfisema pulmonar

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Figura 17. A porcentagem de tecido pulmonar estava significativamente reduzida somente no grupo álcool + tabaco nos dois momentos estudados, sugerindo a presença de enfisema pulmonar. As figuras 18A e 18B referem-se respectivamente às fotos do tecido pulmonar distal de um animal do grupo controle 260 dias e de um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias).

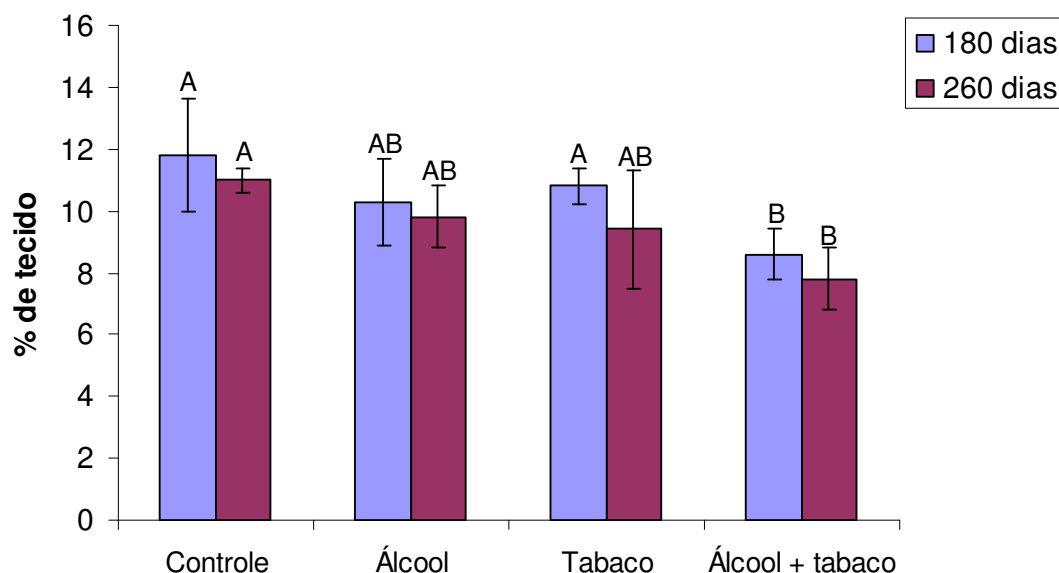
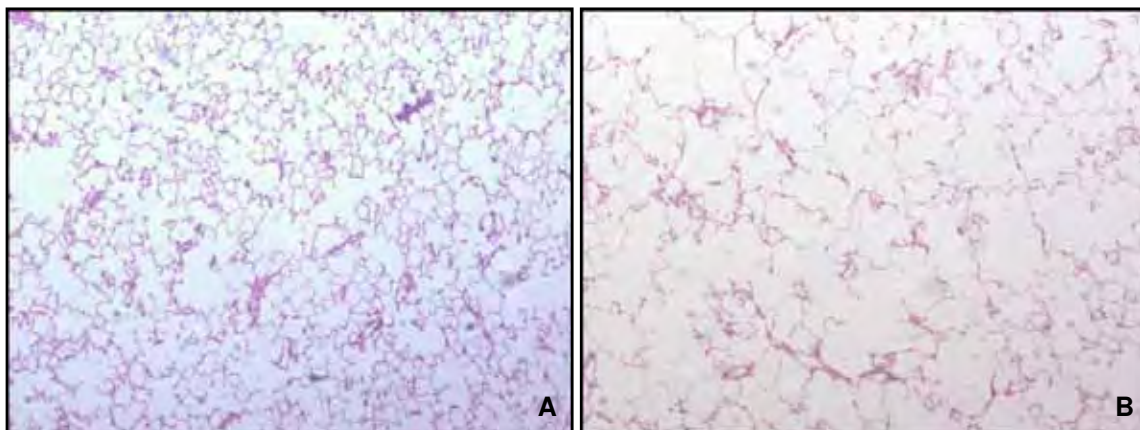


Figura 17: Média e desvio-padrão referente à variável estimativa de enfisema pulmonar (% de tecido), segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.

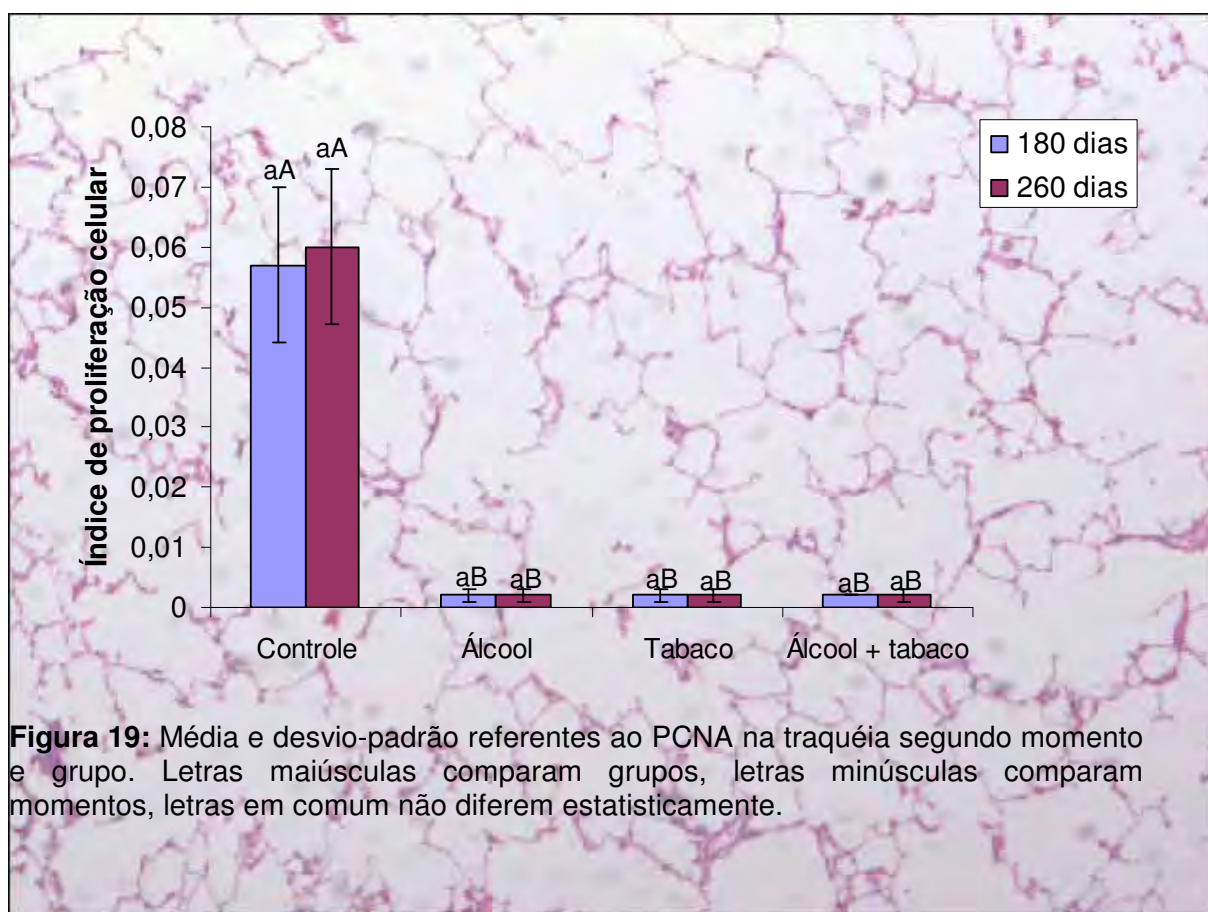


Figuras 18A e 18B: Tecido pulmonar distal de um animal do grupo controle 260 dias (A) e de um animal do grupo álcool + tabaco 260 dias (B), ambas com aumento de 100x.

4.5.4 Marcadores imunohistoquímicos

4.5.4.1 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos nas figuras 19 e 20. Em ambos os momentos estudados (180 e 260 dias), os animais dos grupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle (sem apresentar diferenças significativas entre si), tanto no tecido traqueal quanto no parênquima pulmonar. As figuras 21A e 21B referem-se, respectivamente, às fotos do marcador imunohistoquímico PCNA do parênquima pulmonar de um animal do grupo álcool + tabaco (180 dias) e de um animal do grupo álcool + tabaco (260 dias).



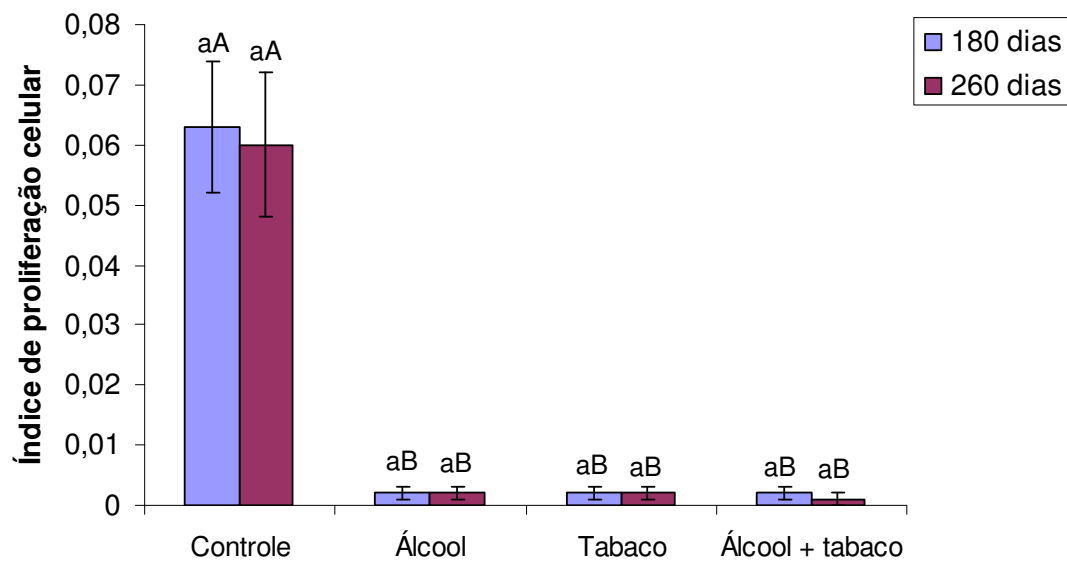
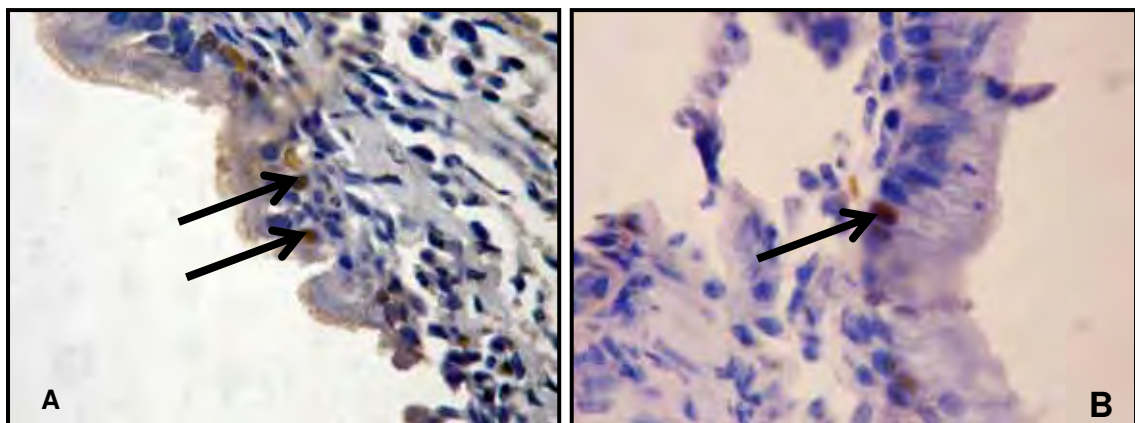


Figura 20: Média e desvio-padrão referentes ao PCNA no pulmão, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.



Figuras 21A e 21B: Marcação nuclear do PCNA (parênquima pulmonar) evidenciando índice de proliferação celular baixa em animal do grupo álcool + tabaco 180dias (A) e álcool + tabaco 260 dias (B), ambas com aumento de 1000x.

4.5.4.2 Proteína 53 (P53)

Em todos os grupos estudados a P53 foi negativa, tanto na traquéia como no tecido pulmonar e brônquios e bronquíolos. A figura 22 refere-se à

foto de um animal do grupo álcool 180 dias, que assim como todos os outros animais estudados, apresentou imunoexpressão negativa para a P53.

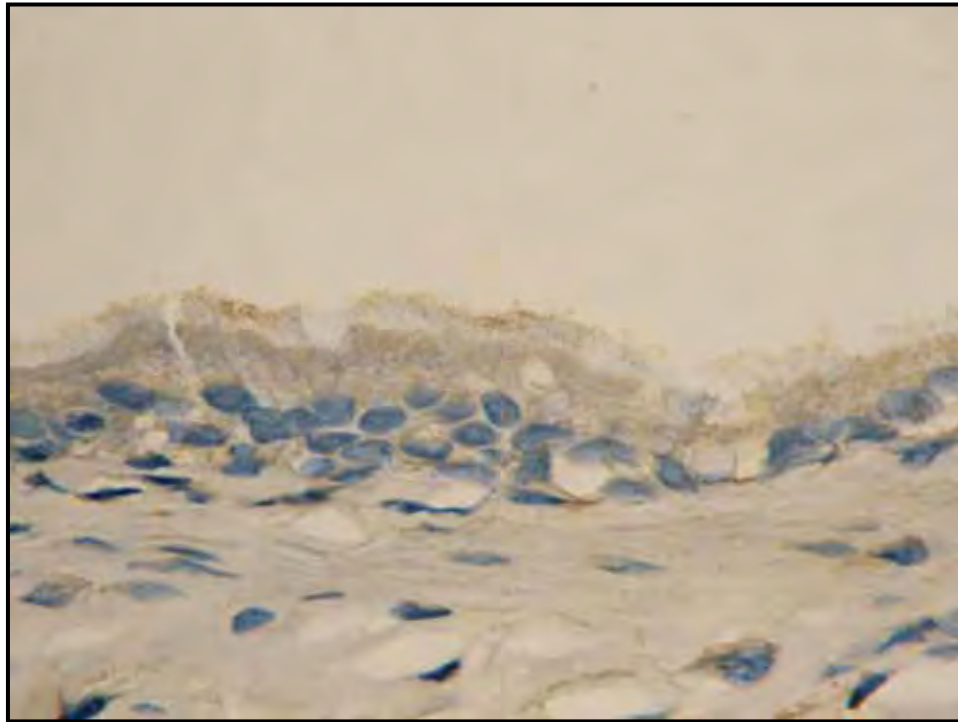


Figura 22: Imunoexpressão negativa no epitélio traqueal para a P53 de um animal do grupo álcool (180 dias), com aumento de 400x.

4.5.4.3 Survivina

Os resultados em relação a esta variável estão descritos nas Tabelas 6, 7 8 e 9. Foram estudados os seguintes tecidos: traquéia e pulmões. Nos animais de 180 dias pôde-se observar que o percentual de positivos na traquéia foi maior no grupo álcool e em segundo lugar no grupo tabaco. Para os mesmos animais (180 dias) em relação ao pulmão pôde-se observar que os resultados não foram estatisticamente significativos ($p= 0,087$), porém os grupos álcool e tabaco tiveram resultados positivos e os demais não. Entre os animais de 260 dias o percentual de positivos para a survivina nas traquéias foi de 100% para os grupos: tabaco e álcool + tabaco ($p= 0,000$). Já nos pulmões os resultados foram 100% negativos para todos os grupos. A figura 23

representa a marcação citoplasmática positiva traqueal em um animal do grupo álcool + tabaco 260 dias.

Tabela 6- Distribuição de freqüências dos animais segundo grupo e resultado da survinina no momento de 180 dias para a traquéia.

Grupo	Survinina				Total	
	Negativo		Positivo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Controle	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Álcool	1	16,7	5	83,3	6	100,0
Tabaco	2	28,6	5	71,4	7	100,0
Álcool + tabaco	6	85,7	1	14,3	7	100,0

$$\chi^2=14,08 \text{ p}=0,003$$

Tabela 7- Distribuição de freqüências dos animais segundo grupo e resultado da survinina no momento de 180 dias para o pulmão.

Grupo	Survinina				Total	
	Negativo		Positivo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Controle	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Álcool	4	57,1	3	42,9	7	100,0
Tabaco	5	71,4	2	28,6	7	100,0
Álcool + tabaco	7	100,0	-	0,0	7	100,0

$$\chi^2=6,54 \text{ p}=0,087$$

Tabela 8- Distribuição de freqüências dos animais segundo grupo e resultado da survinina no momento de 260 dias para a traquéia.

Grupo	Survinina				Total	
	Negativo		Positivo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Controle	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Álcool	6	85,7	1	14,3	7	100,0

Tabaco	-	0,0	7	100,0	7	100,0
Álcool + tabaco	-	0,0	4	100,0	4	100,0

$\chi^2=21,57$ $p=0,000$

Tabela 9- Distribuição de freqüências dos animais segundo grupo e resultado da survivina no momento de 260 dias para o pulmão.

Grupo	Survínina				Total	
	Negativo		Positivo			
	N ⁰	%	N ⁰	%	N ⁰	%
Controle	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Álcool	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Tabaco	7	100,0	-	0,0	7	100,0
Álcool + tabaco	7	100,0	-	0,0	7	100,0

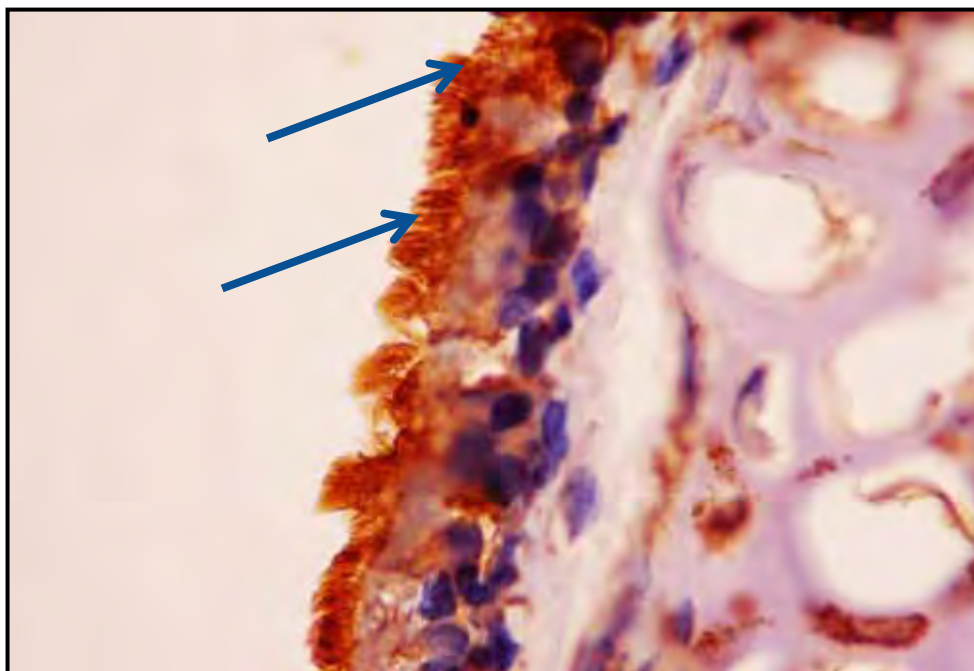


Figura 23: Imunoexpressão positiva (setas) da survivina no citoplasma epitelial da traquéia de um animal exposto ao álcool + tabaco (260 dias), com aumento de 400x.

4.5.4.4 Índice apoptótico na traquéia (TUNEL)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na figura 24. Em todos os animais estudados (180 e 260 dias de exposição) não houve diferença estatisticamente significativa. Em relação à comparação de cada um dos subgrupos nos diferentes tempos de exposição (180 ou 260 dias) também não houve diferença significativa em todos os animais estudados. As figuras 25A e 25B referem-se, respectivamente, às fotos de um animal do grupo controle 260 dias e a um animal do grupo tabaco 260 dias.

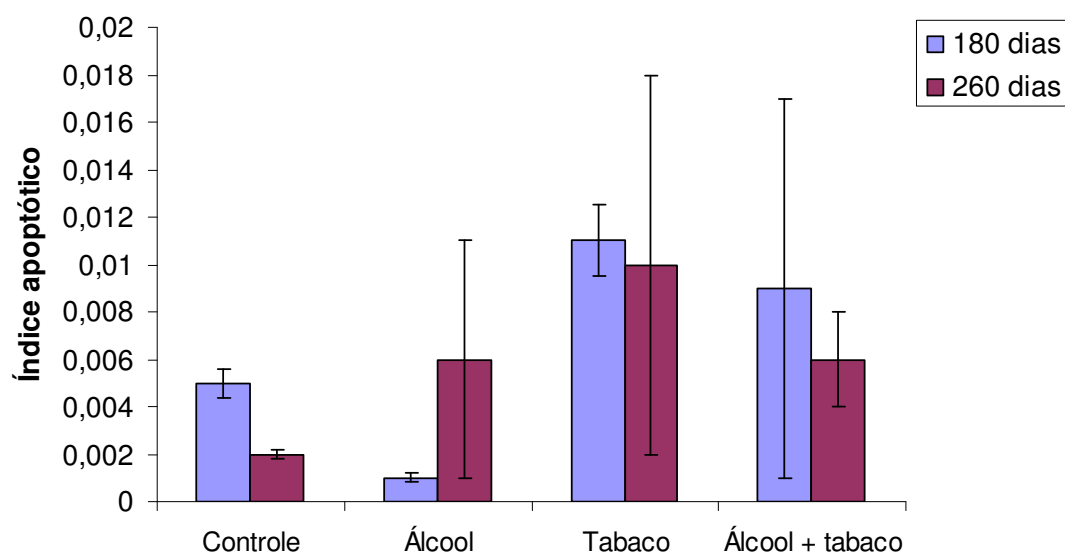
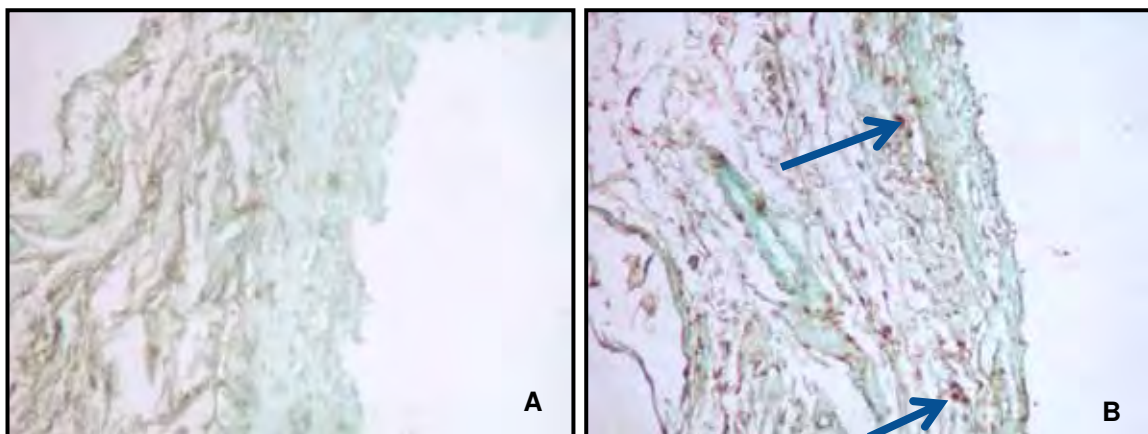


Figura 24: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico na traquéia, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.



Figuras 25A e 25B: Fotos da análise de apoptose traqueal pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose na traquéia de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.

4.5.4.5 Índice apoptótico nos bronquíolos (TUNEL)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Figura 26. Entre os animais com tempo de exposição de 180 dias observou-se que não houve diferenças entre os grupos estudados. Entre os animais com tempo de exposição de 260 dias observou-se que os grupos experimentais apresentaram valores superiores em relação ao grupo controle, mas esta diferença só foi significativa nos expostos ao tabaco (tabaco e tabaco + álcool). As figuras 27A e 27B referem-se, respectivamente, as fotos de um animal do grupo controle 260 dias e a um animal do grupo tabaco 260 dias.

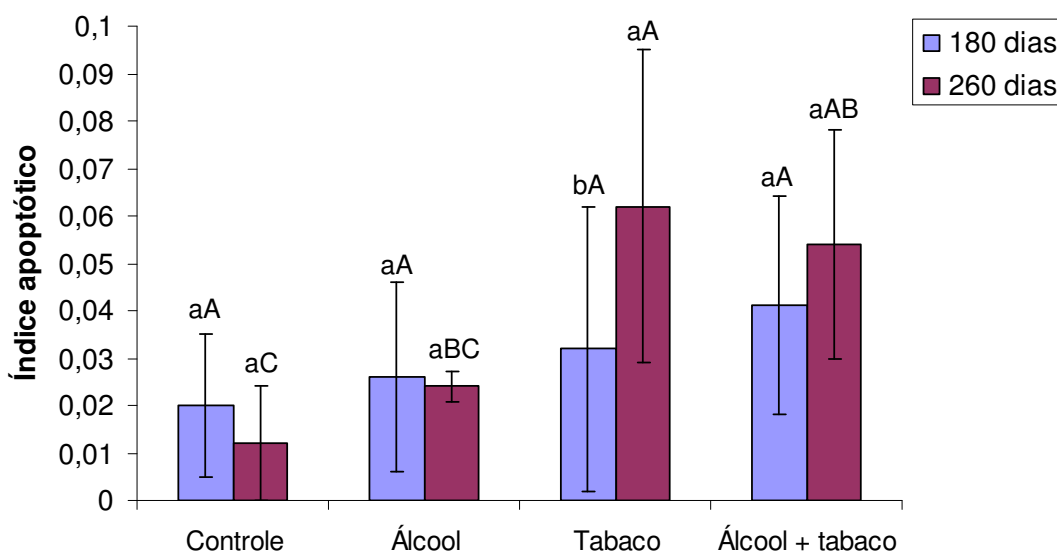
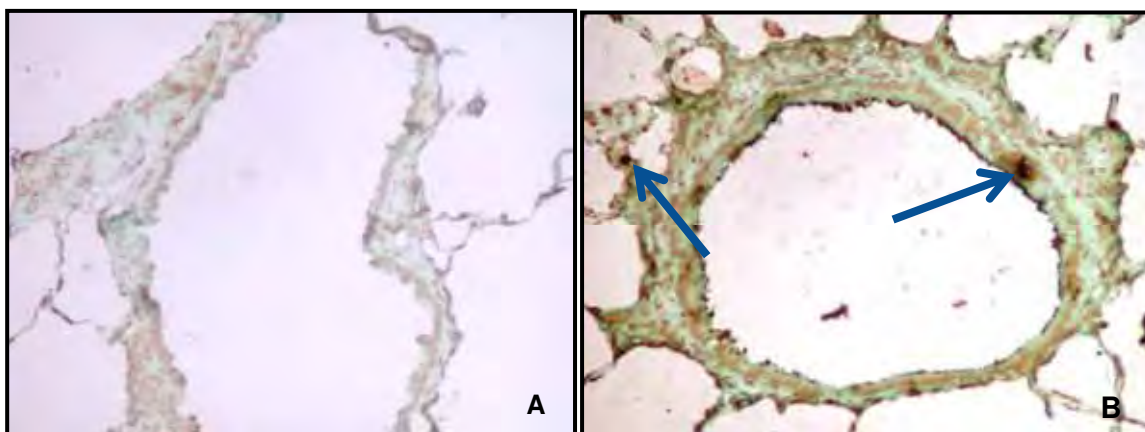


Figura 26: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos bronquíolos, segundo experimento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.



Figuras 27A e 27B: Fotos da análise de apoptose ao nível de bronquíolos pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose no bronquíolo de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.

4.5.4.6 Índice apoptótico nos vasos pulmonares (TUNEL)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Figura 28. Em todos os animais estudados (180 e 260 dias de exposição) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou momentos estudados. As figuras 29A e 29B referem-se, respectivamente, às fotos de um animal do grupo controle 260 dias e a um animal do grupo tabaco 260 dias, referentes à pesquisa de apoptose.

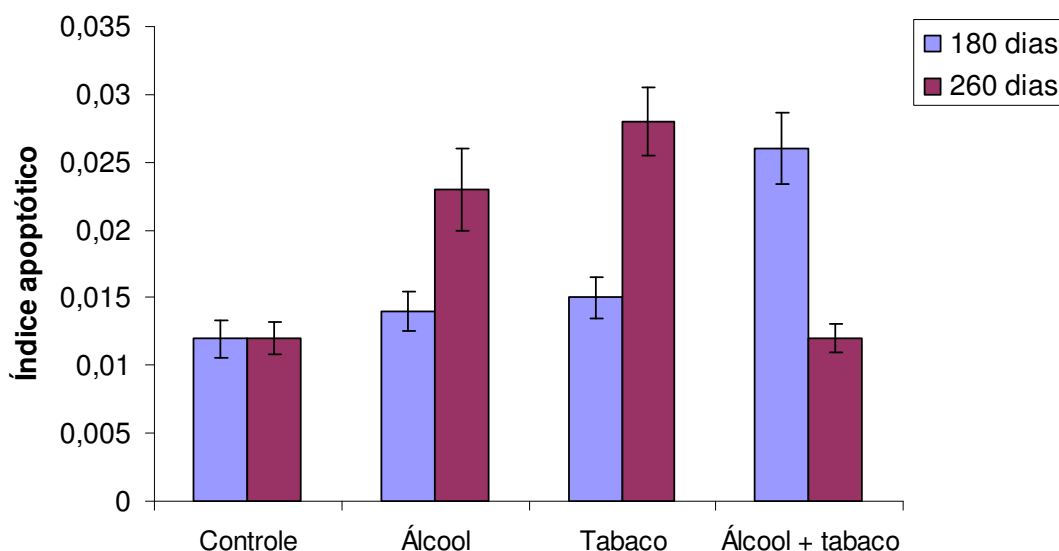
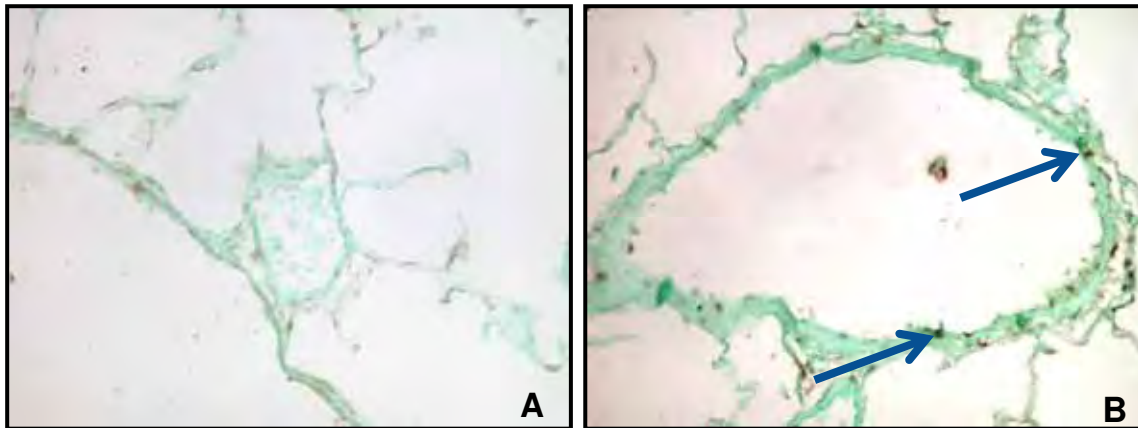


Figura 28: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos vasos pulmonares, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.



Figuras 29A e 29B: Fotos da análise de apoptose vascular pulmonar pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose vascular de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.

4.5.4.7 Índice apoptótico nos alvéolos (TUNEL)

Os resultados em relação a esta variável estão descritos na Figura 30. Em todos os animais estudados (180 e 260 dias de exposição) não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ou momentos estudados. As figuras 31A e 31B referem-se, respectivamente, as fotos de um animal do grupo controle 260 dias e a um animal do grupo álcool + tabaco 260 dias, referentes à pesquisa de apoptose.

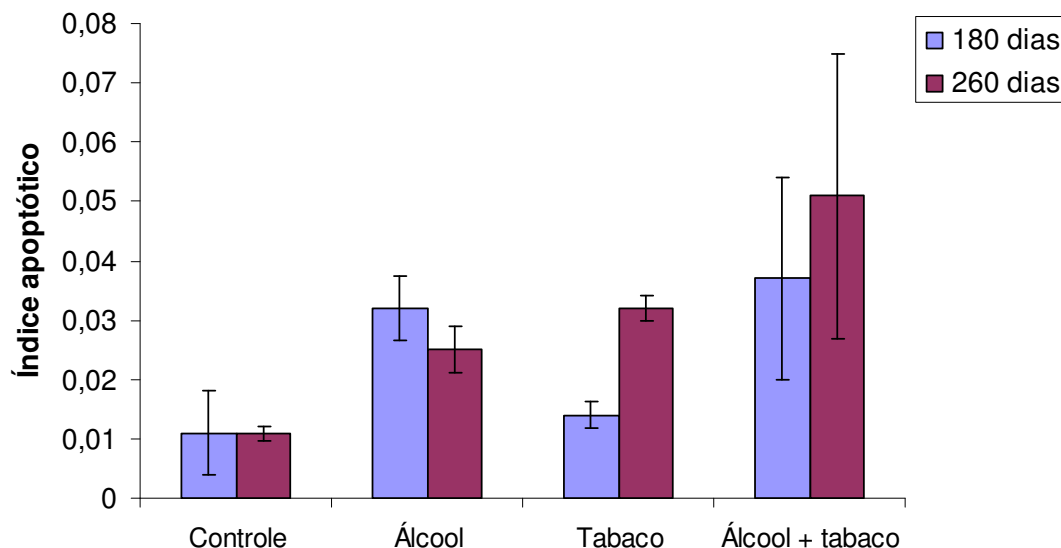
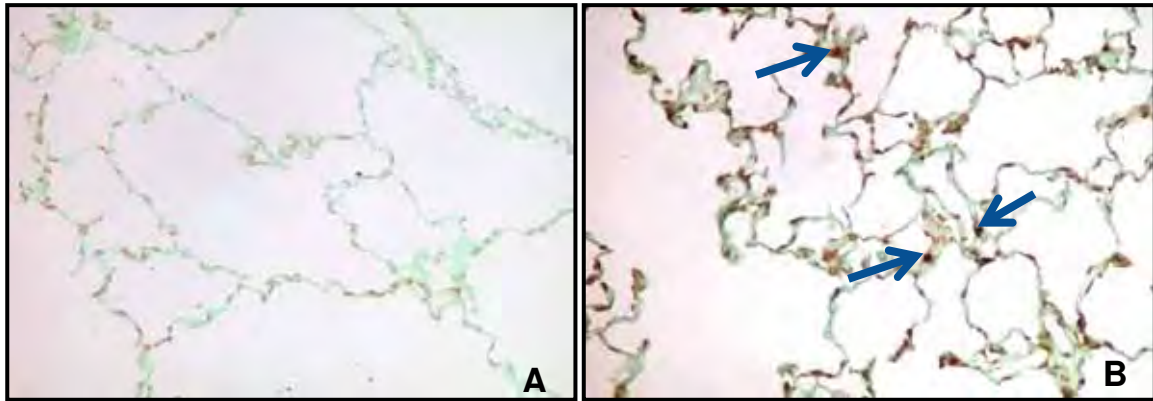


Figura 30: Média e desvio-padrão referentes ao índice apoptótico nos alvéolos, segundo momento e grupo. Letras maiúsculas comparam grupos, letras minúsculas comparam momentos, letras em comum não diferem estatisticamente.



Figuras 31A e 31B: Fotos da análise de apoptose alveolar pela técnica de TUNEL. Em A: nota-se a ausência de apoptose alveolar de um animal do grupo controle de 260 dias, já em B: nota-se a presença de células positivas para apoptose (setas) em um animal do grupo álcool + tabaco de 260 dias, ambas com aumento de 400x.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Crescimento dos Animais

Na presente pesquisa pôde-se observar claramente que a associação do tabaco e do álcool agiu sinergicamente para a redução de peso dos animais, já que em ambos os tempos experimentais os animais dos grupos da associação de ambos atingiu os menores pesos corpóreos. Em relação às variáveis: comprimento corpóreo e IMC houve uma tendência à influência negativa maior do álcool no comprimento entre os animais de 180 dias e no IMC entre os animais de 260 dias.

A inter-relação entre tabagismo e peso corporal já está sedimentada através de vários estudos bem delineados e publicados, em sua maioria, na década de 90 (FROOM, MELAMED e BENBASSAT, 1998; KLESGES et al., 1997). Fumantes freqüentemente apresentam menores índices de massa corporal, quando comparados a não fumantes, pareados por sexo e idade. Além disso, grandes estudos epidemiológicos transversais, alguns clássicos neste assunto, observaram significativa relação inversa entre o uso regular de tabaco e o peso corporal, sendo que este tende a ser mais baixo entre os fumantes quando comparados aos não fumantes (ALBANES et al., 1987; KLESGES et al., 1998).

A ação do fumo no peso corporal parece ser mediada pela nicotina. Estudos experimentais em animais indicam que a administração desta

substância induz à diminuição do peso corporal, provavelmente em consequência da supressão do apetite (CHEN et al., 2005). Em humanos, o tabagismo aumenta a atividade adrenérgica, o que induz termogênese e a consequente redução de peso corporal. Pacientes sob uso de terapia de reposição nicotínica, em processo de abandono do fumo, apresentam retardo no aumento de peso. Quando a medicação é suspensa, os pacientes reiniciam a aumentar de peso (PISINGER e JORGENSEN 2007; DALE et al., 1998; DOHERTY et al., 1996).

A inalação de nicotina através da fumaça do cigarro promove a elevação aguda da concentração no cérebro de alguns neurotransmissores, como dopamina e serotonina, substâncias inibidoras da ingestão de alimentos (KLEIN, CORWIN e CEBALLOS, 2004). Assim, provavelmente por este mecanismo, o fumante tem seu apetite diminuído. Outro aspecto a ser considerado é o efeito direto da nicotina sobre o metabolismo do tecido adiposo, ocorrendo maior oxidação de lipídeos em relação aos não fumantes, o que ajuda a explicar um menor IMC destes em relação aos não fumantes (FILOZOF, 2004; FERRARA et al., 2001).

A leptina é um hormônio peptídico liberado pelo tecido adiposo que sinaliza ao cérebro as informações sobre o tamanho do estoque de gorduras e sobre o estado nutricional do organismo (NICKLAS et al., 1999; PERKINS e FONTE, 2002). Tal sinalização é captada no sistema nervoso central que, através da liberação de neurotransmissores específicos, leva, conforme a situação, à atenuação ou ao aumento da ingestão de alimento, o que está associado ao respectivo aumento ou à diminuição da atividade metabólica. Esta cadeia de eventos resulta na redução ou no incremento do peso, tendendo a acontecer o retorno do equilíbrio corpóreo.

Seria razoável especular que níveis elevados de leptina sérica explicariam o IMC menor dos fumantes em comparação ao dos não fumantes, pois ao se ligar com seus receptores hipotalâmicos, a leptina promoveria a liberação dos neurotransmissores anorexígenos, ocorrendo a diminuição do peso corporal (NICKLAS et al., 1999).

Em termos de conteúdo calórico, o etanol é única droga cuja oxidação pela desidrogenase alcoólica produz 7,1 kcal por grama de etanol oxidado. Este suprimento energético para o organismo faz com que o indivíduo

não sinta necessidade de se alimentar. Em adição aos conhecidos efeitos tóxicos do etanol na absorção e síntese de nutrientes essenciais (LIEBER, 1991), algumas alterações metabólicas também são descritas. Pirola e Lieber (1976) reportaram que a ativação do sistema oxidante microsomal do etanol em hepatócitos de etilistas podem consumir 1/3 do conteúdo calórico do etanol e pode comprometer a síntese de ATP. Lands e Zakhari (1991) sugerem a existência de um inútil metabolismo do etanol, o qual resulta em perda de seis moléculas de ATP por grama de etanol oxidado. Tais autores propõem que o etanol pode ser metabolizado a acetaldeído, consumindo três moléculas de ATP, e que o acetaldeído pode ser novamente reduzido a etanol, consumindo outras três moléculas de ATP.

O consumo moderado do etanol parece favorecer o aumento do estoque de tecido adiposo, podendo resultar em ganho de peso, especialmente nos indivíduos com sobrepeso (LANDS, 1993). Em um estudo epidemiológico envolvendo 89.538 mulheres e 48.493 homens, Colditz et al. (1991) reportaram uma forte correlação negativa entre o consumo de álcool e peso corpóreo para mulheres e ausência desta associação para homens. Estudos experimentais são consistentes em reportar uma redução do peso corpóreo em ratos expostos ao etanol em soluções líquidas. Concentrações baixas de etanol 5% (v/v), similares às cervejas brasileiras, assim como em altas concentrações 40% (v/v), estiveram relacionadas com menor ganho de peso (MACIEIRA et al., 1997). Resultados similares também foram encontrados com concentrações de 20% (LAURE-ACHAGIOTIS, 1990).

Pelos resultados obtidos no presente estudo, vale ressaltar que tanto o tabaco quanto o álcool interferiram negativamente no crescimento dos ratos estudados. Se tais resultados pudessem ser transpostos para os humanos, seria importante a ênfase da coibição do consumo de tabaco e álcool por crianças e/ou adolescentes, que ainda estão em fase de crescimento.

5.2 Estudo do Pulmão Isolado

Os resultados da presente pesquisa sugerem que a associação entre tabaco e álcool não agiu sinergicamente nas variáveis estudadas. De acordo com os resultados obtidos, a exposição ao tabaco pode ter sido o principal fator que interferiu no estudo do pulmão isolado, já que a exposição

ao mesmo resultou em redução da complacência aos 260 dias. Apesar disso, o álcool se mostrou deletério ao crescimento pulmonar, observado pela massa dos pulmões reduzida nos grupos expostos a esta droga.

A redução da complacência nos animais expostos ao tabaco parece contraditória, visto que a porcentagem de tecido pulmonar das lâminas histológicas analisadas através de um programa de análise de imagens estava reduzida nos animais expostos à associação do álcool e tabaco, em ambos os momentos experimentais estudados, o que pode sugerir uma maior destruição de tecido pulmonar, resultando no desenvolvimento de enfisema.

Uma possível explicação fisiopatológica para a redução da complacência nos animais expostos ao tabaco é que na presente pesquisa notou-se que a exposição a 260 dias ao tabaco promoveu maior reação inflamatória ao nível dos bronquíolos.

5.5 Dosagem dos Marcadores Bioquímicos do Estresse Oxidativo Em Hemáceas Lavadas

Nos animais estudados pôde-se observar que as médias dos valores de SOD foram superiores ao grupo controle nos três grupos experimentais, nos dois momentos estudados, mas esta diferença só foi significativa em todos os grupos experimentais aos 180 dias. Em algumas situações pode ocorrer uma adaptação do organismo em resposta a geração dos radicais livres com o aumento da síntese de enzimas antioxidantes. O aumento da atividade antioxidante nos pulmões de fumantes e o aumento da atividade da SOD e da catalase nos pulmões de ratos expostos à fumaça do cigarro são exemplos da resposta antioxidante que ocorre em modelos de tolerância ao estresse oxidativo (McCUSKER e HOIDAL, 1990; KOCYIGIT, EREL e GUR, 2001; GOKKUSU et al., 2001; OZGUNER, KOYU e CESUR, 2005; NADEEM, RAJ e CHHABRA, 2005). A tolerância não é um fenômeno bem entendido, mas parece que um antecedente de grau moderado de estresse oxidativo pode conferir uma subsequente resistência adaptativa ao estresse oxidativo, sustentado pelo aumento das defesas antioxidantes (HEFFNER e REPINE, 1989; REPINE, 1994; HALLIWELL, 1996). Tal fato pode justificar não ter havido elevação dos níveis de TBARS nos animais expostos ao tabaco por 180 dias. E se o álcool também exercer este efeito de

adaptação, uma vez que os níveis de SOD também estavam elevados, tal fator também contribuiu para a não elevação do TBARS nos animais expostos ao álcool nos 180 dias.

A diferença marcante na concentração de GSH-t nos animais estudados foi nos grupos expostos ao tabaco aos 180 dias, que foram significativamente menores que o grupo controle. Aos 260 dias houve recuperação dessa enzima nestes grupos. Já em relação à GSH-Px, entre os animais com tempo de exposição de 180 dias todos os grupos experimentais apresentaram valores inferiores ao grupo controle. Nos animais com tempo de exposição de 260 dias notou-se que os três grupos experimentais foram semelhantes ao grupo controle.

Tais achados podem ser justificados com estudos que afirmam haver diferentes respostas das glutations frente a diferentes tempos de exposição à fumaça do cigarro. Alguns autores relatam que a exposição aguda ao cigarro promove a redução dos níveis de GSH (CANTIN et al., 1987; ROSTU, KODAVANTI e MEHENDALE, 1988; RAHMAN et al., 1996; RAHMAN et al., MACNEE, 1998; MORRISON et al., 1999), enquanto outros demonstraram que o tabagismo aumenta os níveis de GSH na mucosa do epitélio respiratório em fumantes crônicos (CANTIN et al., 1987; 1996; RAHMAN et al., 1996; RAHMAN et al., 1998; MORRISON et al., 1999). Desta forma, os animais da presente pesquisa poderiam estar respondendo ainda à fase aguda aos 180 dias e aos 260 dias já estariam recuperando esta enzima para uma posterior fase de aumento.

Outro fator importante é que o aumento dos níveis de GSH em fumantes crônicos pode representar uma adaptação crônica à injúria imposta pelo tabagismo, e tal evento pode dever-se ao aumento da estimulação das enzimas reguladoras da síntese da GSH (γ GSH e GSH sintetase). No entanto, o aumento dos níveis de GSH na mucosa do tecido epitelial pulmonar pode ser insuficiente na proteção da injúria celular induzida pelo tabaco, fato que pode ser observado nos animais expostos ao tabaco por 260 dias, visto que a elevação da GSH-t, sem a elevação das enzimas SOD e GSH-PX resultou em elevação dos níveis de TBARS.

Sudheer et al. (2008) relataram elevação dos níveis de TBARS em ratos expostos à administração subcutânea crônica (22 semanas) de nicotina.

O que, segundo os autores, pode estar associado à produção de radicais livres/espécies reativas do oxigênio, e então aumento da peroxidação lipídica. O mecanismo da produção de radicais livres pela ação da nicotina ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, Wetscher et al. (1995) demonstraram que a nicotina exerce uma ação quimiostática em leucócitos polimorfonucleares que aumenta a resposta dos mesmos na ativação do complemento C5a, gerando assim radicais livres. Outro possível mecanismo é que a nicotina induz a formação da cotinina e outros metabólitos, incluindo o formaldeído, pela estimulação do citocromo CYP2A6 (YAMAZAKI et al., 1999). Também, tem sido reportado que a nicotina rompe a cadeia respiratória mitocondrial, contribuindo para o aumento da geração de ânions superóxidos e peróxido de hidrogênio (GVOZDJAKOVA et al., 1992).

A peroxidação lipídica tem sido associada com várias doenças relacionadas à nicotina, tais como: câncer, doenças orais e cardiovasculares (THERRIAULT et al., 2003; BENOWITZ e GOURLY, 1997; REIBEL, 2003). A peroxidação lipídica das membranas celulares produz alterações marcantes na organização molecular dos lipídios, resultando no aumento da permeabilidade da membrana e extravasamento de substâncias citoplasmáticas para a circulação (MASON et al., 1997).

Bingol et al. (1999) reportaram que o tabagismo crônico causa reações peroxidativas no plasma e eritrócitos, que contribui para o aumento dos níveis de malondialdeído. Estudos similares têm demonstrado elevação dos níveis de MDA no plasma (UNLU et al., 2000; DAGA et al., 2003; NADEEM,RAJ e CHHABRA 2005) e no tecido pulmonar (UNLU et al., 2000).

Um resultado que chamou a atenção em relação ao estudo do estresse oxidativo nos animais estudados foi que nos animais do grupo tabaco + álcool 260 dias não houve elevação dos níveis de TBARS. Uma hipótese levantada para a explicação fisiológica de tal fato foi que talvez a concentração de etanol oferecida em nosso modelo experimental não tenha sido suficiente para estimular o estresse oxidativo. Ou que a combinação da dose e/ou do consumo médio diário de etanol nos animais estudados possa ter agido como um fator protetor contra o estresse oxidativo, uma vez que nenhum dos grupos expostos ao álcool, em ambos os momentos experimentais, apresentou níveis elevados de TBARS.

A partir do que já foi exposto, parece que o modelo experimental de exposição à fumaça do cigarro utilizado nesta presente pesquisa foi eficaz para demonstrar as alterações associadas ao estresse oxidativo, enquanto o modelo experimental do consumo de álcool deu a impressão de que o rato é bastante resistente ao álcool, o que estimula a aumentar a concentração desta droga em um próximo estudo.

5.6 Alterações Morfológicas Pulmonares

5.6.1 Reações inflamatórias (bronquiolite e alveolite)

5.6.1.1 Efeitos do tabaco

Na presente pesquisa notou-se que a exposição por 260 dias ao tabaco promoveu maior bronquiolite, com predomínio do recrutamento de células monolinfocitárias. A literatura concorda com tais resultados, mas ainda acrescenta o envolvimento dos neutrófilos (WAGNER e ROTH, 2000; JEFFERY, 1999), o que não pôde ser evidenciado nos animais estudados. Já em relação aos níveis de alveolite não houve diferença estatística significativa entre todos os grupos estudados, nos dois tempos de exposição.

O tabagismo está claramente associado a um processo inflamatório crônico do parênquima pulmonar, em que neutrófilos, linfócitos e macrófagos estão envolvidos (BARNES, SHAPIRO, PAUWELS, 2003). Estudos recentes (LAPA e SILVA et al., 1989; O'SHAUGHNESSY et al., 1997; SAETTA et al., 1998; DE JONG et al., 1997) evidenciam que a DPOC é uma doença com forte participação patogênica de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos. A excessiva e inapropriada estimulação dos mesmos, em modelos experimentais, tem demonstrado alterações patológicas destrutivas pulmonares (LAPA e SILVA et al., 1989). Alguns autores (O'SHAUGHNESSY et al., 1997; SAETTA et al., 1998) publicaram trabalhos que evidenciavam o aumento da concentração de tais linfócitos nos pulmões de pacientes com DPOC fumantes em relação a

não fumantes. Outros (DE JONG et al., 1997) também encontraram maior população dos mesmos no sangue periférico em pacientes com DPOC.

Os macrófagos apresentam um importante papel no desenvolvimento da DPOC e encontram-se em número aumentado tanto na parede brônquica quanto no parênquima pulmonar, especialmente nos espaços alveolares, em pacientes com DPOC (SHAPIRO, 1994). Os macrófagos fagocitam partículas ou antígenos; participam da apresentação de antígenos aos linfócitos T e são capazes de liberar várias citocinas e metabólitos ativos do ácido araquidônico (FELS e COHN, 1986). Em geral, os macrófagos representam 90% na contagem celular do lavado broncoalveolar das células aspiradas. Nos fumantes, pode até ser mantido este percentual; contudo, o número absoluto costuma ser quatro a cinco vezes maior (FINLAY et al., 1999). Mais uma vez vale ressaltar a concordância dos tipos celulares inflamatórias encontrados nos animais expostos ao tabaco na presente pesquisa com a literatura descrita.

5.6.1.2 Efeito do álcool

O efeito isolado do álcool não pôde ser demonstrado nesta pesquisa, pois apesar da média da porcentagem de bronquiolite ser muito maior nos ratos alcoólatras aos 260 dias, tornou-se significante somente no grupo exposto ao álcool e ao tabaco, provavelmente pela maior ação deletéria deste último sobre os bronquíolos.

Apesar da alta incidência de doença pulmonar crônica em etilistas ter sido aceita e documentada (BANNER, 1973; EMIRGIL et al., 1974) ainda se sabe pouco sobre os efeitos do álcool nos pulmões. Estudos experimentais em animais têm mostrado que metabólitos do álcool se acumulam nos pulmões (CASIER, 1962) e que a injeção intraperitoneal de álcool pode produzir alterações histoquímicas no tecido pulmonar (BURCH e DEPASCHALE, 1966). Também tem sido descrito que o álcool reduz a capacidade de eliminação de bactérias inaladas, o que aumenta a predisposição a infecções respiratórias (LAURENZI et al., 1963, GREEN e KASS, 1964). Ainda acredita-se que o álcool pode tornar os pulmões mais susceptíveis aos efeitos da injúria induzida pelo tabagismo.

A volatilidade do álcool promove a movimentação do mesmo da circulação brônquica para o epitélio das vias aéreas pulmonares. Esta exposição contribui para a geração de muitos efeitos biológicos do álcool na função pulmonar. O impacto do álcool nas funções das vias aéreas é dependente da concentração, duração e trajetória da exposição. Curtas exposições a uma moderada concentração de álcool podem intensificar o clearance mucociliar, através da produção de óxido nítrico e através da ativação das quinases cíclicas nucleotídeo- dependentes PKG e PKA, estimular a broncodilatação e provavelmente atenuar a reação inflamatória e injúria observada na asma e na DPOC (LEITCH, FRID e PHOENIX, 1985; FORGET et al., 2003). Já a exposição prolongada e em altas concentrações do álcool resultam em comprometimento do clearance mucociliar, piora da asma, piora da função pulmonar e maior mortalidade em portadores de DPOC (SISSON et al., 2005).

Como já foi justificado em relação ao consumo do álcool nos biomarcadores de estresse oxidativo, talvez maiores doses/concentração de álcool também seriam necessárias para evidenciar de forma mais clara a influência do álcool na reação inflamatória pulmonar dos animais estudados.

5.6.2 Estimativa de Enfisema Pulmonar

Na presente pesquisa observou-se que a porcentagem de tecido pulmonar das lâminas histológicas analisadas através de um programa de análise de imagens estava reduzida nos animais expostos à associação do álcool + tabaco, em ambos os momentos experimentais. Tal achado pode se relacionar à destruição das vias aéreas distais e desenvolvimento de enfisema pulmonar, como consequência da exposição crônica à fumaça do cigarro, e parece que o álcool contribuiu de forma sinérgica, pois apesar das médias de porcentagem de tecido pulmonar se encontrarem reduzidas em todos os grupos experimentais, esta redução só foi significativa no grupo álcool + tabaco. Em relação à patogênese envolvida para tal achado, pode-se citar a maior reação inflamatória bronquiolar observada nos animais expostos à fumaça do cigarro durante 260 dias e ao estresse oxidativo observado nos animais expostos ao tabaco por 260 dias. Já uma explicação fisiológica para a influência direta do álcool em tal resultado parece ainda obscura, pelo menos

em relação aos parâmetros analisados na presente pesquisa. Embora o estresse oxidativo não tenha sido detectado nos grupos da associação de álcool e tabaco, em ambos os momentos experimentais, vários estudos experimentais (FUSCO et al., 2004; VALENÇA et al., 2004; SEZER et al., 2006; VALENÇA e PORTO, 2008) têm observado enfisema pulmonar como resultado da exposição crônica à fumaça do cigarro.

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa com mais de 4.000 constituintes químicos, sendo o maior fator de risco para DPOC e enfisema, que parece ser a lesão mais grave (BORGERDING e KLUS, 2005).

Vários mecanismos contribuem para a patogênese da DPOC (BARNES, SHAPIRO, PAUWELS, 2003). Primeiramente, a inalação de partículas nocivas, tais como a fumaça do cigarro, causam um influxo de células inflamatórias (macrófagos, neutrófilos, linfócitos T CD8⁺) para o interior das vias aéreas, contribuindo para o desenvolvimento de um processo inflamatório crônico. Em segundo lugar, também, tem sido descrito um desequilíbrio no balanço das moléculas proteolíticas e anti-proteolíticas nos pulmões de portadores de DPOC. Tal fator causa a destruição do parênquima pulmonar, contribuindo para o desenvolvimento do enfisema.

Um terceiro mecanismo envolvido na patogênese da DPOC é o estresse oxidativo, no qual há um excesso de produção de espécies reativas de oxigênio e uma redução dos mecanismos de defesa antioxidante (BARNES, SHAPIRO, PAUWELS, 2003). As espécies reativas de oxigênio são produzidas nas vias aéreas pela inalação da fumaça do cigarro ou pela ação dos leucócitos. O estresse oxidativo pode contribuir para a disfunção ou morte celular e pode induzir a uma lesão da matriz extracelular. Além do mais, o estresse oxidativo influencia no desequilíbrio do balanço proteínases anti-proteínases. Adicionalmente, os oxidantes contribuem para a reação inflamatória pela ativação da transcrição do fator NF- κ B, o que pode induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios. Estudos recentes em animais (TANG et al., 2004) e em humanos (IMAI et al., 2005; YOKOHORI, AOSHIBA e NAGAI, 2004; HODGE et al., 2005) têm descrito um quarto fator envolvido na patogênese da DPOC: a perda do balanço entre a apoptose e a recuperação de estruturas celulares pulmonares, que podem contribuir para a destruição do tecido pulmonar em resposta à exposição à fumaça do cigarro, resultando em

enfisema pulmonar. Nos animais expostos à fumaça do cigarro durante 260 dias, o índice apoptótico estava elevado nos bronquíolos, podendo ter contribuído com este último fator citado.

A associação entre o consumo crônico de álcool e doenças pulmonares crônicas foi mais amplamente estudada em relação à asma, do que em relação à DPOC. Aparentemente ainda não está totalmente esclarecida se há ou não influência do consumo de álcool na patogênese da DPOC (SISSON, 2007).

Sisson (2007) em uma extensa revisão dos efeitos do álcool no sistema respiratório afirma que é difícil definir as influências do álcool na patogênese da DPOC baseado nos estudos realizados nas últimas cinco décadas, pelo fato de diferentes estudos terem reportado resultados muitas vezes divergentes. Segundo o autor: o consumo severo de álcool exacerba os fatores de risco relacionados ao tabaco, no desenvolvimento da DPOC. Já o consumo moderado do álcool pode reduzir o risco de morte e o desenvolvimento de disfunção pulmonar severa relacionado à DPOC.

Pratt e Vollmer (1984) realizaram o primeiro estudo que levantou a hipótese de que o consumo de álcool poderia agir como um fator protetor para o enfisema pulmonar. Estes autores realizaram uma análise morfométrica de 204 autópsias pulmonares de indivíduos normais, de pacientes com enfisema pulmonar confirmado e pacientes com história de outras doenças e com consumo de álcool. Os autores observaram que o consumo do álcool se correlacionou com redução do enfisema centrilobular, após ajuste de idade e do hábito de tabagismo. Outros três estudos reportaram resultados semelhantes (RIMM et al., 1991; TABAK et al., 2001; MURRAY et al., 2002;).

Um recente estudo (SISSON et al., 2005) pesquisou a prevalência de obstrução de vias aéreas através da espirometria em consumidores de álcool. Participaram do estudo 15294 adultos, representando a população dos EUA dos anos de 1988 a 1994. Os autores relatam que o consumo moderado de álcool não representou um fator protetor e que o consumo severo de álcool aumentou a incidência de distúrbio obstrutivo. Os autores ainda relataram que tais evidências foram independentes de idade, sexo, nível educacional ou sócio-econômico e do tabagismo.

Saric et al. (1977) observaram que trabalhadores consumidores severos de álcool apresentaram hipersecretividade, bronquite, sibilância e distúrbio ventilatório obstrutivo, verificado através da espirometria. Neste estudo a associação dos sinais e sintomas de obstrução crônica das vias aéreas com o etilismo persistiu mesmo no grupo de etilistas não-tabagistas, o que segundo os autores, comprova que o tabagismo não poderia, de forma isolada, explicar os sintomas evidenciados nos etilistas. Vale ressaltar que na população estudada a associação de tabagismo e etilismo foi bastante elevada. Sendo assim, de acordo com Saric et al. (1977) pode haver um sinergismo entre tabagismo, etilismo e o desenvolvimento da DPOC.

Emergil e Sobol (1977) avaliaram a prova de função pulmonar em 44 ex-etilistas e observaram que 64% apresentaram distúrbio ventilatório obstrutivo e 16% apresentaram hiperinsuflação e/ou comprometimento da capacidade de difusão pulmonar de monóxido de carbono. Lyons et al. (1986) realizaram testes de função pulmonar e pesquisa de sintomas respiratórios em 27 etilistas comparado a um grupo controle. Como resultados, Lyons et al. (1986) reportaram que não houve diferenças entre os dois grupos estudados.

O primeiro grande estudo populacional que pesquisou a correlação entre o álcool e a obstrução das vias aéreas foi de Cohen et al. (1980). Tal pesquisa incluiu uma amostra populacional de 2.539 indivíduos em que foram correlacionados o consumo de álcool, consumo de tabaco, alimentação, VEF1 (volume expiratório no primeiro segundo) e outros fatores de saúde. A princípio os autores descreveram menores valores de VEF1 entre os que relataram consumo severo de álcool, em relação aqueles com baixo consumo. No entanto, esta diferença desapareceu quando o ajuste foi realizado por consumo de tabaco, estado sócio-econômico, sexo masculino e idade. Desta forma, os autores concluíram que não houve evidência de que houve associação entre o consumo de álcool e obstrução das vias aéreas. Sparrow et al. (1983) também relatam resultados semelhantes ao realizarem prova de função pulmonar em 1067 veteranos de guerra.

Outro grande estudo foi realizado por Lebowitz (1981). O autor pesquisou sinais e sintomas de tosse, sibilância e dispnéia, espirometria e diagnóstico clínico de doenças respiratórias em 3800 indivíduos do Arizona (EUA). Contrariamente ao estudo de Cohen et al. (1980), Lebowitz (1981)

descreveu que existiu uma correlação entre o consumo de álcool e aumento dos sinais e sintomas respiratórios pesquisados e redução das variáveis espirométricas, independentemente do tabagismo, principalmente entre os homens. Lange et al. (1988) pesquisaram a influência do álcool na prova de função pulmonar em 8765 indivíduos por um período de cinco anos. Como resultados, os autores descreveram que o consumo de álcool esteve relacionado com maior redução de VEF1 e da CVF (capacidade vital forçada).

5.7 Alterações Imunohistoquímicas Pulmonares

Entre os animais com tempo de exposição de 260 dias as alterações imunohistoquímicas do tecido pulmonar foram mais marcantes, destacando-se principalmente os efeitos da exposição à fumaça do cigarro, já que tais animais apresentaram maior índice de apoptose bronquiolar associado a uma redução da proliferação celular visto pelos valores de PCNA inferiores ao grupo controle. Tais mecanismos estão intimamente relacionados com a fisiopatologia do desenvolvimento do enfisema. As expressões negativas da P53 e da survivina no parênquima pulmonar podem indicar que apesar das agressões associadas à exposição à fumaça do cigarro (bronquiolite, apoptose e redução do PCNA) estarem em desenvolvimento, a carcinogênese ainda não ocorreu.

5.7.1 Efeito do tabaco na reação inflamatória e apoptose:

A doença pulmonar obstrutiva crônica é uma desordem relacionada com o tabagismo caracterizada por inflamação crônica das vias aéreas e destruição progressiva do parênquima pulmonar, resultando em remodelação pulmonar e enfisema. Muitos mecanismos fisiopatológicos envolvidos com o enfisema têm sido propostos, incluindo um desequilíbrio entre proteases/anti-proteases, estresse oxidativo e a apoptose das células das paredes alveolares (células epiteliais e endoteliais). Uma vez que tal mecanismo não seja contrabalanceado por um aumento da proliferação de tais células, o resultado

é uma perda das unidades alveolares, resultando em enfisema. Estudos experimentais sugerem o envolvimento das caspases, deficiência do fator de crescimento vascular endotelial, oxidantes, ceramida, linfócitos T CD8⁺, elastases e interferon gama na indução da apoptose das células das paredes alveolares. Além do mais, um defeito no clearance das células apoptóticas nos pulmões de pacientes com enfisema pode promover reação inflamatória (AOSHIBA, 2007; PARK, RYTER e CHOI, 2007).

A remoção de células apoptóticas ocorre através de uma única forma de fagocitose (conhecida como eferocitose) (DeCATHÉLINEAU e HENSON, 2003; GARDAL et al., 2005), que pode ser realizada pela ação de células da estrutura tissular, tais como: fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, assim como pelos fagócitos especializados, tais como: macrófagos e células dendríticas. No entanto, foi demonstrado que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos estava reduzida em portadores de DPOC (VANDIVIER et al., 2002) e *in vitro* (HODGE et al., 2003), da redução da fagocitose de microorganismos também (FERRARA et al., 1996). Em circunstâncias normais, as células apoptóticas são rapidamente removidas *in situ* com mínima resposta tissular local, como um componente da homeostase celular. Desta forma, a presença consistente de células apoptóticas pode representar uma indução constante da apoptose ou um defeito do clearance de tais células (HENSON, BRATTON e FADOK, 2001; TUDER et al., 2003).

A deficiência no clearance das células apoptóticas está associada com aumento da inflamação. Em parte, isto é resultado de necrose secundária e da presença de proteases e outros componentes pró-inflamatórios. Apesar do reconhecimento das células apoptóticas diretamente induzir os fagócitos especializados ou não a produzir mediadores anti-inflamatórios, tais como fator transformador de crescimento, interleucina-10, prostaglandina E2 e prostaglandinas I2 (FADOK et al., 1998), este mecanismo pode estar comprometido e resultar no aumento da liberação de moléculas pró-inflamatórias, tais como: fator de necrose tumoral, interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-8. Isso poderia explicar os resultados obtidos nos animais de 260 dias expostos ao tabaco referentes à reação inflamatória e apoptose, já que coincidentemente os bronquíolos foram predominantemente envolvidos nos dois eventos patológicos: bronquiolite e maior índice apoptótico bronquiolar.

Sendo assim, a presente pesquisa reforça quatro dos principais fatores envolvidos na geração do enfisema, ou seja, os animais expostos ao tabaco apresentaram maior reação inflamatória bronquiolar, maior índice apoptótico associado à deficiência de reposição celular visto pelo PCNA abaixo dos valores do grupo controle, maior estimativa de perda tecidual: entre os que foram expostos tanto ao álcool + tabaco, em ambos os momentos experimentais e maior expressão do biomarcador de estresse oxidativo; TBARS: no grupo somente tabaco: 260 dias. Somente o desbalanço entre proteases e anti-proteases não pode ser evidenciado, já que tal variável não foi avaliada na presente pesquisa.

5.7.2 Efeito do tabaco na apoptose e nos níveis de PCNA:

Como já citado, na presente pesquisa o índice apoptótico ao nível dos bronquíolos foi maior nos animais de 260 dias expostos ao tabaco. Tais resultados concordam com o estudo de Wu et al. (2006). Tais autores pesquisaram os efeitos do tabagismo passivo, em diferentes doses, por um mês nos bronquíolos terminais de ratos, em relação à ativação de algumas proteínas envolvidas na apoptose. Após os sacrifícios dos animais, os autores observaram moderada à severa inflamação nos bronquíolos terminais (análise histopatológica) e marcada peroxidação lipídica, infiltração linfocitária, congestão e enfisema epitelial nos espaços alveolares, todos proporcionalmente ao aumento da dose da exposição à fumaça do cigarro. Através do uso de um Kit de detecção de morte celular *in situ*, observaram uma correlação positiva entre apoptose e a dose da fumaça do cigarro ofertada.

Para a manutenção da arquitetura pulmonar, a perda de células da parede alveolar resultante da apoptose deve ser compensada pela proliferação das células alveolares remanescentes. Um estudo em humanos mostrou que o nível de proliferação das células da parede vascular é elevado em pulmões de pacientes com enfisema pulmonar (TAO, ZHANG E XU, 1998). Yokohori, Aoshiba e Nagai (2004) e Imai et al. (2006) observaram níveis elevados de apoptose e de proliferação celular (PCNA) nas células epiteliais alveolares de enfisematosos. Em um estudo experimental foi demonstrado que as células

epiteliais e endoteliais alveolares iniciaram proliferação em resposta a uma injúria induzida pela administração de elastina nas vias aéreas de hamsters (WEINBERG e HAYES, 1982). Outro estudo, também, mostrou que a exposição ao cigarro induziu a proliferação celular em pequenas vias aéreas e nas artérias em ratos (SEKHON, 1994). Outros estudos também descreveram aumento da apoptose das células da parede alveolar em humanos ou ratos com enfisema, sem terem pesquisado os níveis de proliferação celular (KASAHARA et al., 2001; SEGURA-VALDES et al., 2000).

Além do índice apoptótico elevado ao nível dos bronquíolos, a presente pesquisa evidenciou que em todos os três grupos experimentais, em ambos os momentos estudados, a proliferação celular estava reduzida pelos baixos níveis de PCNA, em relação aos grupos controles. Apesar da literatura relatar que tanto a apoptose quanto a proliferação celular estão elevadas em animais e/ou humanos expostos cronicamente ao tabaco, há um desequilíbrio entre os mesmos, com predomínio do primeiro evento descrito, resultando em perda de unidades alveolares, o que contribui para o desenvolvimento do enfisema pulmonar. Em comparação com os resultados obtidos nos animais do presente estudo, tal mecanismo pode estar ainda mais exacerbado, uma vez que os níveis de PCNA dos grupos experimentais estavam abaixo dos obtidos pelos grupos controle, marcando de forma mais efetiva ainda o desbalanço entre apoptose e resposta de reparo do tecido frente à exposição à fumaça do cigarro, o que poderia ter contribuído de forma marcante para o desenvolvimento de enfisema nos animais estudados.

5.7.3 Efeito do tabaco na proteína P53:

Como já citado, a expressão de tal proteína foi negativa nos tecidos traqueal e pulmonar para todos os animais estudados em ambos os tempos experimentais. Duas hipóteses podem ser levantadas a partir de tais resultados: a ausência de displasia epitelial nas amostras estudadas, ou que nos animais estudados não se pôde evidenciar a participação da P53 no mecanismo da apoptose, contrariando os estudos de Wu et al. (2006) e Morissette et al. (2008).

A expressão imunohistoquímica da proteína P53, em geral ocorre por seu acúmulo decorrente da mutação do gene *p53*, havendo conseqüente

perda da sua função tumor-supressora (SHAW, 1996). O mecanismo de mutação é controverso e estudos indicam que a proteína P53 participa da apoptose, agindo em oposição ao Bcl-2 (YONISH-ROUACH et al., 1991). Mutações no gene *p53* são as alterações genéticas mais freqüentes no câncer de pulmão (NATHAN, 1993). Mais de 50% dos tumores malignos apresentam mutação pontual em um dos alelos do *p53* e perda do outro. Estas mutações podem ser devidas a fatores ambientais (como dieta, poluição, fumo) ou genéticos.

Morissette et al. (2008) pesquisaram os efeitos do estresse oxidativo (H_2O_2) e da citocina pró-inflamatória (TNF) na expressão da P53, da razão Bax/Bcl-x e dos níveis de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) relacionados com a indução da apoptose (TRAIL) em pulmões de humanos portadores de enfisema. Foram estudados indivíduos normais, fumantes sem enfisema, fumantes com enfisema e ex-fumantes com enfisema. Como resultados, os autores observaram que os níveis de P53, da razão Bax/Bcl-xL e os receptores TRAIL 1, 2 e 3 estavam significativamente maiores nos portadores de enfisema, e que *in vitro* aumentaram ainda mais após a administração de H_2O_2 e de TNF. Desta forma, os autores sugerem que o estresse oxidativo e as citocinas pró-inflamatórias podem estar envolvidas na elevação dos níveis de P53, da razão Bax/Bcl-xL e nos níveis dos receptores TRAIL, um novo mecanismo que pode implicar no aumento da apoptose das células alveolares que ocorre no enfisema.

O acúmulo de células imunológicas (neutrófilos, macrófagos, linfócitos CD8-T) e o aumento de citocinas, por exemplo: o TNF em pulmões de enfisematosos, revela que tal doença envolve uma complexa reação inflamatória (BARNES, 2004). Associada a esta inflamação, tem sido relatado um aumento da apoptose alveolar (SEGURA-VALDEZ et al., 2000; YOKOHORI, AOSHIBA e NAGAI (2004). No entanto, a principal causa, os mecanismos e o envolvimento da apoptose na perda de unidades alveolares observada no enfisema ainda permanecem não totalmente esclarecidas. O estresse oxidativo causado pelo cigarro e a intensa reação inflamatória têm sido bem estabelecidas no pulmão enfisematoso (RAHMAN, 2005). O estresse oxidativo pode causar dano ao DNA (RYTER et al., 2007) e contribuir para a ativação de fatores de transcrição tais como a P53 (MARTINDALE e

HOLBROOK, 2002), que influencia na sobrevivência celular. A P53 está fortemente ligada ao dano do DNA pela regulação de fatores pró-apoptóticos tais como: Bax, Puma, Noxa e Fas (ROOS e KAINA, 2006). Receptores de TNF relacionados à apoptose também são alvos transcricionais da P53 (KIMBERLEY e SCREATON, 2004). O acúmulo de P53 no parênquima pulmonar de enfisematosos é extremamente relevante para a fisiopatologia da doença porque a P53 está fortemente associada com muitos mecanismos, principalmente aqueles relacionados com a via mitocondrial de apoptose (ROOS e KAINA, 2006). Os componentes do cigarro têm resultado na ativação da P53 em fibroblastos de pulmão em humanos (NYUNOYA et al., 2006) e ratos expostos ao cigarro apresentaram níveis de ativação mais elevados para P53 e Bax no tecido alveolar (WU et al., 2006).

Apesar dos animais estudados na presente pesquisa terem apresentado alterações marcantes envolvidas na fisiopatologia do enfisema, a expressão da P53 não foi evidenciada, talvez por ainda não terem desenvolvido displasia epitelial ou porque o mecanismo apoptótico desenvolvido não tenha sido centralizado na P53.

5.7.4 Efeito do tabaco na expressão da survivina:

Em relação à literatura, estudos que envolvam a survivina e os pulmões referem-se principalmente a cânceres já instalados. Alguns pesquisaram a correlação entre suas expressões positivas com prognóstico/estadiamento (KREPELA et al., 2009; HE et al., 2009) ou resultados do tratamento de tais doenças (THOMPSON, 1995).

Apesar da não expressão da survivina no tecido pulmonar dos animais estudados na presente pesquisa, foi encontrado na literatura dois estudos que evidenciaram a expressão da mesma em indivíduos fumantes saudáveis (CARPAGNANO et al., 2009, JIN et al., 2008). Recentemente tem sido descrita uma hipótese para a carcinogênese pulmonar que enfatiza a participação da inflamação como um possível fator gatilho para a transição epitelial-mesenquimal e o desenvolvimento do câncer (PEEBLES et al., 2007), tendo como principal fator envolvido a nicotina contida nos cigarros (SHIN et al., 2004; MARTEY et al., 2004). A ciclooxygenase e a survivina, um fator de resistência à apoptose dependente da COX-2, parecem exercer um ponto

chave nesta hipótese. Estudos recentes têm demonstrado que a COX-2 promove a sobrevivência da célula pela modulação da survivina (SHENG et al., 1998; KRYSAN et al., 2004), que bloqueia a ação das caspases, impedindo a apoptose (LI et al., 1998). A superexpressão da survivina é comum em diferentes tipos de tumores e exibe níveis elevados no plasma (DERIN et al., 2008), biópsia transbronquial (CHEN et al., 2005), líquido pleural (DONG et al., 2006) e escarro (CHEN et al., 2005) de portadores de câncer de pulmão de não-pequenas células (AMBROSINI, ADIDA e ALTIERI, 1997).

Carpagnano et al. (2009) pesquisaram os níveis de COX-2 e da survivina nas vias aéreas (ar exalado condensado) de pacientes com câncer pulmonar e em um grupo de fumantes, com o objetivo de estudar a ligação entre tabagismo, inflamação das vias aéreas e câncer pulmonar. Como resultados os autores descreveram que níveis elevados de COX-2 e survivina foram encontrados nos pacientes com câncer pulmonar de não-pequenas células comparados aos indivíduos saudáveis fumantes ou não. Tais níveis, também, estavam significativamente elevados nos fumantes (com câncer ou saudáveis) e ex-fumantes comparados aos não-fumantes e exibiu correlação positiva com a carga tabágica. Também houve correlação entre COX-2 e survivina com a progressão do câncer.

As alterações imunohistoquímicas na traqueia também foram mais marcantes nos animais expostos ao tabaco: grupos: tabaco e álcool + tabaco por 260 dias, os quais apresentaram expressão positiva para survivina, apesar do PCNA estar reduzido em comparação ao grupo controle e P53 estar negativa. Como já exposto no estudo de Carpagnano et al. (2009), tal expressão da survivina está intimamente relacionada à exposição ao tabaco que promove reação inflamatória e pode estar envolvida com uma evolução para um processo carcinogênico. De acordo com Jin et al. (2008) a expressão da survivina no epitélio brônquico é um evento precoce e determinante na tumorigênese induzida pelo tabaco. Desta forma, pode-se sugerir que nos animais estudados na presente pesquisa, a exposição à fumaça do cigarro pode ter causado danos mais agressivos na traqueia, em comparação ao tecido pulmonar, já que a survivina se expressou na primeira e não no tecido pulmonar e que o índice de apoptose não estava elevado nas traqueias. Tal resultado torna-se muito relevante uma vez que pesquisas atuais têm

concentrado esforços na identificação de expressão positiva da survivina como ponto chave de evolução para carcinogênese, desta forma sua identificação precoce poderia auxiliar na prevenção de um futuro evento irreversível (JIN et al., 2008; CARPAGNANO et al., 2009).

5.7.5 Efeitos do álcool nas alterações imunohistoquímicas

Como já exposto, o principal fator determinante nas alterações imunohistoquímicas nos animais estudados foi a exposição à fumaça do cigarro. Em relação à associação do consumo de álcool e os mecanismos envolvidos na apoptose, a maioria dos estudos encontrados na literatura relaciona o consumo crônico de álcool com estresse oxidativo e lesões apoptóticas dos hepatócitos (HU et al., 2009; COHEN et al., 2009; ZHOU et al., 2008). Os estudos que associam o álcool, apoptose e tecido pulmonar são relativos ao mecanismo fisiopatológico ou tratamento da síndrome da angústia respiratória aguda (MOSS et al., 1996; MOSS et al., 2003; GUIDOT e HART, 2005; WAKABAYASHI e KATO, 2006). Em pacientes sépticos, o consumo crônico e intenso de álcool aumenta a incidência de síndrome da angústia respiratória aguda, uma síndrome que requer a proliferação e diferenciação das células alveolares tipo II para reparar a lesão epitelial alveolar (MOSS et al., 1996; MOSS et al., 2003; GUIDOT e HART, 2005; WAKABAYASHI e KATO, 2006). Previamente, Brown et al. (2001a) demonstraram em um modelo animal que a ingesta crônica do etanol diminui os níveis de glutathione nos pneumócitos tipo II e exacerba a lesão pulmonar aguda mediada por endotoxinas. Em um segundo estudo, Brown et al. (2001b) observaram que ratos machos adultos expostos de 6 a 16 semanas ao etanol apresentaram depleção da GSH, particularmente a mitocondrial associado a um aumento da apoptose dos pneumócitos tipo II mediado pelo mediador inflamatório TNF- α . De acordo com Brown et al. (2004), a ingesta crônica de etanol altera as funções celulares (redução da produção de surfactante, perda da integridade da membrana alvéolo-capilar e aumento da sensibilidade à apoptose induzida por citocinas *in vitro* e *in vivo*) dos pneumócitos do tipo II. Experimentalmente, a ingesta crônica de álcool aumenta marcadamente a expressão relativa dos receptores de angiotensina-2 no epitélio pulmonar e paralelamente torna estas

células susceptíveis à apoptose quando expostas ao estresse oxidativo ou a citocinas pró-inflamatórias. A inibição seletiva de tais receptores resultou na inibição da apoptose estimulada pelo TNF- α em células epiteliais alveolares isoladas de ratos alimentados com álcool (BECHARA et al., 2003). Em relação ao mecanismo fisiopatológico envolvido ainda não há um total esclarecimento, mas há indícios de que a angiotensina II ativa a expressão da NADH oxidase, o que resulta em produção de superóxido no parênquima pulmonar (POLIKANDRIOTIS et al., 2006).

Uma provável explicação fisiológica para a não ocorrência marcante de alterações imunohistoquímicas nos animais expostos ao álcool pode ser o fato de que em nosso estudo a participação do mesmo em relação aos: biomarcadores de estresse oxidativo, na apoptose e na reação inflamatória pulmonar não foi significativa. Mais uma vez pode-se questionar se uma exposição mais agressiva ao álcool fosse necessária para resultar no sinergismo entre as drogas estudadas.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos na presente pesquisa pode-se concluir que:

1 - os efeitos deletérios impostos pelo álcool e pela exposição à fumaça do cigarro são dependentes do período de exposição, já que os animais dos grupos experimentais de 260 dias apresentaram alterações mais marcantes nas variáveis estudadas.

2 - Tanto o tabaco quanto o álcool interferiram negativamente no crescimento corpóreo e a associação das duas drogas aumentou a estimativa de enfisema pulmonar.

3 - Em relação às outras variáveis estudadas pode-se observar uma maior influência negativa da exposição à fumaça do cigarro que do uso do álcool.

4 - Um resultado de relevância para a aplicação clínica foi que a traqueia dos ratos expostos ao tabaco apresentaram expressão positiva para a proteína antiapoptótica survivina.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta. 2001; 306(1-2): 1-17.

Akkus I, Gültekin F, Aköz M, Çağlayan O, Bahçeçi S, CanÜG, et al. Effect of moderate alcohol intake on lipid peroxidation in plasma, erythrocyte and leukocyte and on some antioxidant enzymes. Clin Chim Acta. 1997;266(4):141-7.

Albanes D, Jones DY, Micozzi MS, Mattson ME. Associations between smoking and body weight in the US population: analysis of NHANES II. Am J Public Health. 1987;77(4):439-44.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med. 1997;3(8):917-21.

Anandatheerthavarada HK, Shankar SK, Bhamre S, Boyd MR, Song BJ, Ravindranath V. Induction of brain cytochrome P-450IIE1 by chronic ethanol treatment. *Brain Res.* 1993;601(1-2):279-85.

Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhal Toxicol.* 2003;15(10):1029–38.

Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Alveolar wall apoptosis induces lung destruction and emphysematous changes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(5):555-62.

Banner AS. Pulmonary function in chronic alcoholism. *Am Rev Respir Dis.* 1973;108:851-57.

Barnes PJ. Small airways in COPD. *N Engl J Med.* 2004;350(56):2635-7.

Bechara RI, Brown LAS, Eaton DC, Roman J, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion increases expression of the angiotensin II type 2 (AT₂) receptor and enhances tumor necrosis factor α and angiotensin II-induced cytotoxicity via AT₂ signaling in rat alveolar epithelial cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2003;27(6):1006-14.

Benowitz NL, Gourly SG. Cardiovascular toxicity of nicotine: implications for nicotine replacement therapy. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29(7):1422-31.

Bevilacqua M, Pagan V, Zotti S. Respiratory function in liver cirrhosis. Spirometry, blood gas analysis and radioisotope study with Xenon 133. *Minerva Med.* 1975;66(2):72-85.

Bien TH, Burge R. Smoking and drinking: a review of the literature. *Int J Addict.* 1990;25(12):1429-54.

Bingol NK, Kacmaz M, Cimen YB. Acute and chronic effects of smoking on blood antioxidant status. *J Nutr Environ Med.* 1999;9:193-7.

- Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 1992;52(Suppl7):S2119-S23.
- Borgerding M, Klus H. Analysis of complex mixtures—cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 2005;57(Suppl1):43-73.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H . Cyclin/PCNA is the auxiliary proyein of polimerase-d. *Nature.*1987; 326(6112):515-7.
- Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki- 67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990;17:489-03.
- Brown LA, Harris FL, Ping XD, Gauthier TW. Chronic ethanol ingestion and the risk of acute lung injury: a role for glutathione availability? *Alcohol.* 2004; 33(3):191-7.
- Brown LAS, Harris FL, Bechara R, Guidot DM. Effect of chronic ethanol ingestion on alveolar type II cell glutathione and inflammatory mediator-induced apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001;25(7):1078-85.
- Brown LAS, Harris FL, Guidot DM. Chronic ethanol ingestion potentiates TNF-mediated oxidative stress and apoptosis in rat alveolar type II cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;281(2):377-86.
- Burch GE, DePasquale N. Alcoholic lung disease: an hypothesis. *Am Heart J.* 1966;73:147-48.
- Cantin AM, North SL, Hubbard RC, Crystal RG. Normal alveolar epithelial lining fluid contains high levels of glutathione. *J Appl Physiol.* 1987;63(1): 152-57.
- Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo SA. I levantamento domiciliar sobre o uso de drogas psicotrópicas no brasil – 2001 – centro brasileiro de informações sobre drogas psicotrópicas (CEBRID) – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2001.

Carpagnano GE, Spanevello A, Palladino GP, Gramiccia C, Ruggieri C, Carpagnano F, et al. Cigarette smoke and increased COX-2 and survivin levels in exhaled breath condensate of lung cancer patients: How hot is the link? *Lung Cancer*. 2009;5 (Epub ahead of print).

Carvalho JT. O tabagismo visto sob vários aspectos. São Paulo: Medsi; 2000.

Casier H. Accumulation of alcohol metabolites in the form of total lipids and fatty acids in the organism. *Q J Stud Alcohol*. 1962;23:529-48.

Celis JE, Celis A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of nuclear cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: Subdivision of S phase. *Proc Natl Acad Sci*. 1985;82(10):3262-66.

Chen H, Vlahos R, Bozinovski S, Jones J, Anderson GP, Morris MJ. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology*. 2005;30(4):713-9.

Chen YQ, Li DM, Cai YY, Liu C, Xia XM, Hu JF et al. The expression of survivin messenger RNA in sputum and cancerous tissue in human lung cancer, *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 2005;28(4):225-29.

Cohen BH, Celentano DD, Chase GA, Diamond EL, Graves CG, Levy DA, et al. Alcohol consumption and airway obstruction. *Am Rev Respir Dis*. 1980;121(2):205–15.

Cohen JL, Roychowdhury S, DiBello PM, Jacobsen DW, Nagy LE. Exogenous thioredoxin prevents ethanol-induced oxidative damage and apoptosis in mouse liver. *Hepatology*. 2009;49(5):1709-17.

Colditz GA, Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, et al. Alcohol intake in relation to diet and obesity in women and men. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:49-55.

Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Rev Cancer*. 2002;2(9):647.

Daga MK, Chhabra R, Sharma B, Mishra TK. Effects of exogenous vitamin E supplementation on the levels of oxidants and antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *J Biosci*. 2003;28(1):7-11.

Dale LC, Schroeder DR, Wolter TD, Croghan IT, Hurt RD, Offord KP. Weight change after smoking cessation using variable doses of transdermal nicotine replacement. *J Gen Intern Med*. 1998;13(1):9-15.

deCathelineau AM, Henson PM. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. *Essays Biochem*. 2003;39:105-117.

Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, et al. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 1990;81(2):127-35.

Derin D, sodinç HO, Guney N, Tas F, CamlicaH, Duranyildiz D et al. Serum levels of apoptosis biomarkers, survivin and TNF-alpha in nonsmall cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2008;59(2):240-5.

Doherty K, Militello FS, Kinnunen T, Garvey AJ. Nicotine gum dose and weight gain after smoking cessation. *J Consult Clin Psychol*. 1996;64(4):799-07.

Dong DQ, Yang YH, Xue DY, Feng XJ. Expression of survivin mRNA of sputum and pleural effusions in human lung cancer. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2006;31(6):848-52.

Droge W. Free radicals on physiological control of cell function. *Physiol Review*. 2002; 82(1):47-95.

Emirgil C, Sobol BJ, Heymann B, Shibutani K. Pulmonary function in alcoholics. *Am J Med.* 1974;57(1):69–77.

Emirgil C, Sobol BJ. Pulmonary function in former alcoholics. *Chest* 1977;72(1):45-51.

Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2 and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101(4):890-98.

Fels AO, Cohn ZA. The alveolar macrophage. *J Appl Physiol.* 1986;60(2):353-69.

Ferrara CM, Kumar M, Nicklas B, McCrone S, Goldberg AP. Weight gain and adipose tissue metabolism after smoking cessation in women. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(9):1322-6.

Ferrara F, D'Adda D, Falchi. The macrophagic activity of patients affected by pneumonia or chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Tissue React.* 1996;18(4-6):109-114.

Ferreira ALA, Machado PEA, Matsubara LS. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes and glutathione levels in human erythrocytes exposed to colloidal iron hydroxide in vitro. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(6):689-94.

Filozof C, Fernandez Pinilla MC, Fernandez-Cruz A. Smoking cessation and weight gain. *Obes Rev.* 2004;5(2):95-103.

Finklea JF, Hasselblad V, Sandifer SH, Hammer DI, Lowrimore GR. Cigarette smoking and acute non-influenzal respiratory disease in military cadets. *Am J Epidemiol.* 1971;93(6):457-62.

Finlay GA, O'Driscoll LR, Russell KJ, D'Arcy EM, Masterson JB, Fitz Gerald MX, et al. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am J Resp Crit Care Med*. 1997;156(1):240-7.

Forget MA, Sisson JH, Spurzem JR, Wyatt TA. Ethanol increases phosphodiesterase 4 activity in bovine bronchial epithelial cells. *Alcohol*. 2003;31(1):31-8.

Fortes JRA, Cardo WN. Alcoolismo: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier, 1991.

Fridovich I. Superoxide dismutase. *Rev Biochem*. 1975; 44:147-159.

Froom P, Melamed S, Benbassat J. Smoking cessation and weight gain. *J Fam Pract*. 1998;46(6):460-4.

Fusco LB, Fonseca MH, Pêgo-Fernandes PM, Pazetti R, Capelozzi V, Jatene FB, Oliveira SA. Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos. *J Bras Pneumol*. 2004;31(1):34-40.

Galduróz JCF, Noto AR, Fonseca AM, Carlini EA. V levantamento nacional sobre o consumo de drogas psicotrópicas entre estudantes do ensino fundamental e médio da rede pública de ensino nas 27 capitais brasileiras – 2004 – centro brasileiro de informações sobre drogas psicotrópicas (CEBRID), Departamento de Psicobiologia – Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 2004.

Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch C, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE et al. Cell surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321-34.

Gentry-Nielsen MJ, Top EV, Snitily MU, Casey CA, Preheim LC. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28(7):1120-28.

Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol*. 2001;32:119-25.

Gökkusu C, Ademoglu E, Tamer S, Alkan G. Oxidant-antioxidant profiles of platelet rich plasma in smokers. *Addict Biol*. 200;16(4):325-30.

Gonthier B, Jeunet A, Barret L. (1991). Electron spin resonance study of free radicals produced from ethanol and acetaldehyde after exposure to Fenton system or to brain and liver microsomes. *Alcohol*. 1991;8(5):369-75.

Green G, Kass E. Factors influencing the clearance of bacteria by the lung. *J Clin Invest*. 1964;43:769-78.

Grossman HB. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis, in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Urol Oncol*. 2004; 22(3):265.

Guemouri L; Lecmt E; Herbeth B; Pirollet P; Paille F; Siest G; Artur Y. Blood activities of antioxidant enzymes in alcoholics before and after withdrawal. *J Stud Alcohol*. 1993;54(5):626-29.

Guidot DM, Hart CM. Alcohol abuse and acute lung injury: epidemiology and pathophysiology of a recently recognized association. *J Investig Med*. 2005; 53(5):235-45.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS*. 1988;96:379-94.

Gvozdjakova A, Kucharska J, Gvozdjak J. Effects of smoking on the oxidative process of cardiomyocytes. *Cardiology*. 1992;81(2-3):81-4.

Hall PA, Levinson DA. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *J Clin Pathol*. 1990;43(2):184-92.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989.

Halliwell, B. Antioxidants in human health and disease. *Ann Rev Nutr*. 1996;16:33-50.

He L, Hou M, Zhang J, Xu N, Chen P. Subcellular localization of surviving in non-small cell lung cancer. *Ai Zheng*. 2009;28(9):955-60.

Heffner J A, Repine JE. State of the art: pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(2):531-54.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(10):1456-62.

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001;11(19):R795-805.

Henson PM, Cosgrove GP e Vandivier W. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(6):512-8.

Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN. Increased airway epithelial and T-cell apoptosis in COPD remains despite smoking cessation. *Eur Respir J*. 2005; 25(3):447-54.

Hodge S, Hodge G, Scicchitano R, Reynolds PN, Holmes M. Alveolar macrophages from subjects with chronic obstructive pulmonary disease are deficient in their ability to phagocytose apoptotic airway epithelial cells. *Immunol Cell Biol*. 2003;81(4):289-96.

Holguin F, Moss I, Brown L, et al. Chronic ethanol ingestion impairs alveolar type II cell glutathione homeostasis and function and predisposes to endotoxin-mediated acute edematous lung injury in rats. *J Clin Invest.* 1998;101(4):761–68.

Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in peroxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29(4): 577-80.

Hu S, Yin S, Jiang, Huang D, Shen G. Melatonin protects against alcoholic liver injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2009;616(1-3):287-92.

Hughes JR. Treatment of smoking cessation in smokers with past alcohol/drug problems. *J Subst Abuse Treat.* 1993;10:181-87.

Husain K, Scott BR, Reddy SK, Somani SM. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol.* 2001;25(2):89-97.

Imai K, Mercer BA, Schulman LL, Sonett JR, D'Armiento JM. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema. *Eur Respir J.* 2005; 25(2):250-58.

Isaacson PG, Norton AJ. Malignant lymphoma of the gastrointestinal tract. Extranodal lymphomas. Churchill Livingstone, 1998.

Jeffery PK. Inflammation in chronic obstructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999(5);160:S3-S4.

Joseph H, Sisson MD. Alcohol and airways function in health and disease. *Alcohol.* 2007;41(5):293-07.

Kanazawa H, Asai K, Hirata K, Yoshikawa J. Possible effects of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Med.* 2003;114(5):354-58.

Kasahara Y, Tudor RM, Cool CD, Lynch DA, Flores SC, Voelkel NF. Endothelial cell death and decreased expression of vascular growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Crit Care Med*. 2001;163(3):737-44.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239.

Kimberley FC, Screaton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its Five receptors. *Cell Res*. 2004;14(5):359-72.

Klein LC, Corwin EJ, Ceballos RM. Leptin, hunger, and body weight: Influence of gender, tobacco smoking, and smoking abstinence. *Addict Behav*. 2004;29(5):921-7.

Klesges RC, Ward KD, Ray JW, Cutter G, Jacobs DR Jr, Wagenknecht LE. The prospective relationships between smoking and weight in a young, biracial cohort: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults Study. *J Consult Clin Psychol*. 1998;66(6):987-93.

Knutsen A, Adell G, Sun XF. Survivin expression is an independent prognostic factor in rectal cancer patients with and without preoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60(1):149-55.

Kocyigit A, Erel O, Gur S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clin Biochem*. 2001;34(8):629-33.

Krepela E, Dankova P, Moraycikova E, Krepelova A, Prochazka J, Cermak et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol*. 2009;35(6):1449-62.

Krysan K, Dalwadi H, Sharma S, Pòld M, Dubinett S. Cyclooxygenase 2-dependent expression of survivin is critical for apoptosis resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2004;64(15):6359-62.

Lands WEM, Zakhari S. The case of missing calories. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(1):47-8.

Lands WEM. A summary of the workshop "Alcohol and calories: a matter of balance". *J Nutr.* 1993;123:1338-41.

Lange P, Groth S, Mortensen J, Appleyard M, Nyboe J, Jensen G, Schnohr P. Pulmonary function is influenced by heavy alcohol consumption. *Am Rev Respir Dis.* 1988;137(5):1119-23.

Laure-Achagiotis C, Poussard AM, Loui-Sylvestre J. Alcohol drinking, food and fluid intakes and body weight gain in rats. *Physiol Behav.* 1990;47:545-48.

Laurenzi G, Guardneri J, Carey J. Bacterial clearance from the lungs of mice. *Fed Proc.* 1963;22:255.

Leanderson P, Tagesson C. Cigarette smoke-induced DNA damage in cultured human lung cells: role of hydroxyl radicals on endonuclease activation. *Chem Biol Interact.* 1992;81(1-2):197-208.

Lebowitz MD. Respiratory symptoms and disease related to alcohol consumption. *Am Rev Respir Dis.* 1981;123(1):16-19.

Leitch GJ, Frid LH, Phoenix D. The effects of ethanol on mucociliary clearance. *Alcohol Clin Exp Res.* 1985;9:277-80.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC et al. Healthy smokers of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving. *Nature.* 1998;396(6711):580-84.

Lieber CS. Metabolic effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans.* 1998; 16:241–47.

Lieber CS. Perspectives: do alcohol calories count? *American Journal of Clinical Nutrition.* 1991;54:976-82.

Lin LJ, Zheng CQ, Jin Y, Ma Y, Jiang WG, Ma T. Expression of survivin protein in human colorectal carcinogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003;9(5):974-7.

Lois M, Brown LAS, Moss M, Roman J, Guidot DM. Ethanol ingestion increases activation of matrix metalloproteinases in rat lungs during acute endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4):1354–60.

Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP et al. Nuclear survivin as a biomarker for non small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2004;91(3):537-40.

Lyons DJ, Howard SV, Milledge JS, Peters TJ. Contribution of ethanol and cigarette smoking to pulmonary dysfunction in chronic alcoholics. *Thorax* 1986;41(3):197–202.

Macieira MS, Almeida WG, Silva EA, Schenberg LC, Nakamura- Palacios EM. Alcohol dependence induced in rats by semivoluntary intermittent intake. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30:1107-11.

Mak JCW. Pathogenesis of COPD. Part II. Oxidative-antioxidative imbalance. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;12(4):368-74.

Martey CA, Pollack SJ, Turner CK, O' Reilly KM, Baglole CJ, Phipps RP et al. Cigarette smoke induce cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E2 synthase in Human lung fibroblasts:implications for lung inflammation and cancer, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;287(5):L981-91.

Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.

Maser E. (1997). Stress, hormonal changes, alcohol, food constituents and drugs: factors that advance the incidence of tobacco smoke-related cancer? *Trends Pharmacol Sci.* 1997;18(8):270-75.

Mason RP, Walter MF, Mason PE. Effect of oxidative stress on membrane structure: small-angle X-ray diffraction analysis. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(3):419-25.

May P, May E. p53 et cancer. *Pathol Biol.* 1995;43(3):165-73.

McCusker K, Hoidal J. Selective increase of antioxidant enzyme activity in the alveolar macrophage from cigarette smokers and smoke-exposed hamsters. *Am Rev Respir Dis.* 1990;141(3):678-82.

McGinnis JM, Foege WH. Actual causes of death in the United States. *JAMA.* 1993;270(18):2207-12.

McMormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology.* 1992;21(6):591-4.

Medeiros MHG, Carvalho VB, Farias LP, Loureiro APM. DNA damage induced by secondary lipid oxidant products. *Ciênc Cultura,* 1995; 47:336-339.

Mehta MC, Jain AC, Billie M. Combined effects of alcohol and nicotine on cardiovascular performance in a canine model. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; 31(6):930-36.

Mighell A. PCNA and p53. *Oral Oncol Eur J Cancer.* 1995;31B(6):403-4.

Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF. (1995). Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318:53-8.

Miyachi K, Fritzler M J, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J. Immunol*. 1978;121(6):2228-34.

Monzo M, Rosell R, Felip E, Astudillo J, Sanchez JJ, Maestre J et al. A novel anti apoptosis gene: Re expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non small cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(7):2100-04.

Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, Chakir J, Milot J. Increased p53 level, Bax/Bcll-xl ratio, and trail receptor expression in human emphysema. *Am J Crit Care Med*. 2008;178(3):240-7.

Morrison D, Rahman I, Lannan S, MacNee W. Epithelial permeability, inflammation, and oxidant status in the air spaces of chronic smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(2):473-9.

Moss M, Bucher B, Moore FA, Moore EE, Parsons PE. The role of chronic alcohol abuse in the development of Acute Respiratory Distress Syndrome in adults. *JAMA*. 1996;275(1):50-4.

Moss M, Parsons PE, Steinberg KP, Hudson LD, Guidot DM, Burnham EL, et al. Chronic alcohol abuse is associated with an increased incidence of acute respiratory distress syndrome and severity of multiple organ dysfunction in patients with septic shock. *Crit Care Med*. 2003;31(3):869-77.

Murray RP, Connett JE, Tyas SL, Bond R, Ekuma O, Silversides CK, et al. Alcohol volume, drinking pattern, and cardiovascular disease morbidity and mortality: is there a U-shaped function? *Am J Epidemiol*. 2002;155(3):242-48.

Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo*. 1999;13(3):295–309.

Nadeem A, Raj HG, Chhabra SK. Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation*. 2005;29(1):23-32.

Nathan F. The biology of lung câncer. *Semin Oncol*. 1993;20(2):105-27.

Nicklas BJ, Tomoyasu N, Muir J, Goldberg AP. Effects of cigarette smoking and its cessation on body weight and plasma leptin levels. *Metabolism*. 1999;48(6):804-8.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*. 1989;342:705-8.

Nishiyama Y, Ikeda H, Haramaki N, Yoshida N, Imaizumi T. Oxidative stress is related to exercise intolerance in patients with heart failure. *Am Heart J*. 1998;135(1):115-20.

Nuorti JP, Butler JC, Farley MM, Harrison LH, McGeer A, Kolczak MS, Breiman RF. The active bacterial core surveillance team: cigarette smoking and invasive pneumococcal disease. *N Engl J Med*. 2000;342(10):681-89.

Nyunoya T, Monick MM, Klingelutz A, Yarovsky TO, Cagley JR, Hunninghake GW. Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2006;35(6):681-88.

Ozguner F, Koyu A, Cesur G. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicol Ind Health*. 2005;21(1-2):21-6.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, et al. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81(3): 221-24.

Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*. 1996;31Suppl:S77-S82.

Peebles KA, Lee JT, Hazra S, Reckamp KL, Krysan K Dohadwala M et al. Inflammation and lung carcinogenesis: applying findings in prevention and treatment, *Expert Rev Anticancer Ther*. 2007;7(10):1405-21.

Percario S, Feuz AC. A avaliação laboratorial dos radicais livres. *Rev Soc Braz Méd Biomol Rad Livres*. 1995;1:11-14.

Perkins KA, Fonte C. Effects of smoking status and smoking cessation on leptin levels. *Nicotine Tob Res*. 2002;4(4):459-66.

Pinho MSL, Ghislandi LR, Fronza JR. H, Wengerkiewicz A, Pereira Filho A, Ferreira LC, et al. Valor Prognóstico da Expressão da Proteína Survivina em Pacientes Submetidos a Tratamento Cirúrgico no Câncer Colorretal. *Rev bras Coloproct*. 2005;25(2):121-27.

Pirola RC, Lieber CS. Hypothesis: energy wastage in alcoholism and drug abuse: possible role of hepatic microsomal enzymes. *Am J Clin Nutr*. 1976; 29(1):90-3.

Pisinger C, Jorgensen T. Waist circumference and weight following smoking cessation in a general population: the Inter99 study. *Prev Med*. 2007;44(4):290-5.

Pizem J, Cor A, Gale N. Survivin expression is a negative prognostic marker in laryngeal squamous cell carcinoma and is associated with p53 accumulation. *Histopathology*. 2004;45(2):180-86.

Polikandriotis JA, Rupnow HL, Elms SC, Clempus RE, Campbell DJ, Sutliff RL, Brown LS, Guidot DM, Hart CM. Chronic ethanol ingestion increases superoxide production and NADPH oxidase expression in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34(3):314-19.

Pratt PC, Vollmer RT. The beneficial effect of alcohol consumption on the prevalence and extent of centrilobular emphysema. A retrospective autopsy analysis. *Chest* 1984;85(3):372-77.

Pryor WA, Stone K, Zang LY, Bermudez E. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: Fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol.*1998;11(5): 441-48.

Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke: Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann NY Acad Sci.* 1993;686:12-28. I.

Queiroz LMG. Expressão do PCNA, Ki-67, c-erbB-2 e p53 no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimórfico de baixo grau de malignidade de glândula salivar menor [dissertação doutorado em patologia bucal]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 1997.

Rahman I, Bel A, Mulier B, Donaldson K, MacNee W. Differential regulation of glutathione by oxidants and dexamethasone in alveolar epithelial cells.*Am. J. Physiol.* 1998;275(1):L80-6.

Rahman I, Lawson MF, Smith CAD, Harrison DJ, MacNee W. Induction of γ -glutamylcysteine synthetase by cigarette smoke is associated with AP-1 in human alveolar epithelial cells. *FEBS Lett.* 1996;396(1):21-5.

Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999;277(6):1067-88.

Rahman I. Oxidative stress in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: cellular and molecular mechanisms. *Cell Biochem Biophys.* 2005;43(1):167-88.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol.* 2002;192:131.

Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest*. 2001;108(7):965-9.

Reibel J. Tobacco and oral diseases. Update on the evidence, with recommendations. *Med. Princ. Pract.* 2003;12(suppl1):22–32.

Reinke LA, Moore DR, Hague CM, McCay PB. Metabolism of ethanol to 1-hydroxyethyl radicals in rat liver microsomes: comparative studies with three spin trapping agents. *Free Radic Res*. 1994;21(4):213-22.

Repine JE. Interleukin-1-mediated acute lung injury and tolerance to oxidative injury. *Environ Health Perspect*. 1994;102(Suppl10):75-8.

Rimm EB, Giovannucci EL, Willett WC, Colditz GA, Ascherio A, Rosner B, et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of coronary disease in men. *Lancet*. 1991;338(8765):464-68.

Robbins, SL e Cotran, RS. *Patologia: bases patológicas das doenças*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Romberger DJ, Grant K. Alcohol consumption and smoking status: the role of smoking cessation. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(2):77–83.

Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*. 2006;12(9):440-50.

Rostu U M, Kodavanti PRS, Mehendale HM. Glutathione metabolism and utilization of external thiols by cigarette smoke-challenged, isolated rat and rabbit lungs. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1988;96:324-335.

Rubin E. The chemical pathogenesis of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Health Res World*. 1993;17:272-78.

Ryter SW, Kim HP, Hoetzel A, Park JW, Nakahira K, Wang X, et al. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(1):49-89.

Saetta M, Ghezzi H, Kim WD, King K, Angus GE, Wang NS, et al. Loss of alveolar attachments in smokers. A morphometric correlate of lung function impairment. *Am Rev Respir Dis*. 1985;132(4):894-900.

Sandhir R, Subramanian S, Koul A. Long-term smoking and ethanol exposure accentuates oxidative stress in hearts of mice Long-term smoking and ethanol exposure accentuates oxidative stress in hearts of mice. *Cardiovasc Toxicol*. 2003;3(2):135-40.

Sarela AI, Scott N, Ramsdale J, Markham AF, Guillou PJ: Immunohistochemical detection of the anti-apoptosis protein, survivin, predicts survival after curative resection of stage II colorectal carcinomas. *Ann Surg Oncol*. 2000;8(4):305-10.

Saric M, Lucic-Palaic S, Horton RJ. Chronic nonspecific lung disease and alcohol consumption. *Environ Res*. 1977;14(1):14-21.

Savill J, Fadok V: Corpse clearing defines the meaning of cell death. *Nature*. 2000;407(6805):784-788.

Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;304(3):437-44.

Scott RB, Reddy KS, Husain K, Somani SM. Timecourse response to ethanol of hepatic antioxidant system and cytochrome P-450 II E1 in rat. *Environ Nutr Interac*. 1999;3:217-31.

Segura-Valdes L, Pardo A, Gaxiola M Uhal BD, Becerril C, Selman M. Upregulation of gelatinase A and B, collagenase 1 and 2, and increased parenchymal cell death in COPD. *Chest*. 2000;117(3):684-93.

Sekhon HS, Wright JL, Churg A. Cigarette smoke causes rapid cell proliferation in small airways and associated pulmonary arteries. *Am J Physiol.* 1994;267:557-63.

Sezer M, Fidan F, Ünlü M, Şahin O, Esme H, Köken T. Effects of n-acetylcysteine on the lung histopathology and oxidant-antioxidant status in rabbits exposed to cigarette smoke. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi.* 2006;54(2): 144-51.

Shapiro SD. Elastolytic metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Potencial roles in destructive lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994;150(6):160-4.

Shaw PH. The role of P53 in cell cycle regulation. *Path Res Pract.* 1996;192:669-675.

Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN. Modulation of apoptosis and Bel-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res.* 1998;58(2):362-66.

Shin VY, Liu ES, Ye YN, Koo MW, Chu KM, Chu CH et al. A mechanistic study of cigarette smoke and cyclooxygenase-2 on proliferation of gastric cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;195(1):103-12.

Sisson JH, Stoner JA, Romberger DJ, Spurzem JR, Wyatt TA, Owens-Ream J, Mannino DM. Alcohol intake is associated with altered pulmonary function. *Alcohol* 2005;36(1):19-30.

Sisson JH. Alcohol and airways function in health and disease. *Alcohol.* 2007;41(5):293-307.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1) PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.* 1999;5(6):583-9.

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

Sobell LC, Sobell MB, Kozlowski LT, Toneatto T. Alcohol or tobacco research versus alcohol and tobacco research. *Br J Addict.* 1990;85(2):263-269.

Sohal RS, Ku H, Agarwal S, Forster MJ, Lal H. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. *Mech Ag Develop.* 1994;74:121-33.

Sparrow D, Rosner B, Cohen M, Weiss ST. Alcohol consumption and pulmonary function. A crosssectional and longitudinal study. *Am Rev Respir Dis.* 1983;127(6):735-38.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Ver Biochem.* 2000;69(2):217.

Sudheer AR, Muthukumaran S, Devipriya N, Devaraj H, Menon VP. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology.* 2008;243:317-29.

Tabak C, Smit HA, Heederik D, Ocke MC, Kromhout D. Diet and chronic obstructive pulmonary disease: independent beneficial effects of fruits, whole grains, and alcohol (the MORGEN study). *Clin Exp Allergy.* 2001;31(5):747-55.

Takahashi T, D' Amico D, Chiba I, Buchhagen DL, Minna JD. Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *J. Clin. Invest.* 1990;86:363-9.

Tang K, Rossiter HB, Wagner PD, Breen EC. Lung-targeted VEGF inactivation leads to an emphysema phenotype in mice. *J Appl Physiol.* 2004, 97(4):1559-66.

Tao Q, Zhang Z, Xu Y. Apoptosis versus proliferation activities and relative mechanism in chronic obstructive pulmonary disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 1998;78:574-77.

Therriault MJ, Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 2003;132:232-8.

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

Tuder RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, Henson PM. Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Resp Cell Mol Biol.* 2003;28(5):551-4.

Unlu M, Ozguner MF, Sahin U, et al. Lipid peroxidation and changes of superoxide dismutase activity in the lung and blood induced by cigarette smoke exposure in rabbits. *Biomed. Res.* 2000;11:271–5.

Valença SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004;32(3):351-6.

Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *J Bras Pneumol.* 2008;34(10):787-95.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44–84.

Vandivier RW, Fadok VA, Hoffman PR, Bratton DL, Penvari C, Brown KK, et al. Elastase-mediate phosphatidylserine receptor cleavage impairs apoptotic cell clearance in cystic fibrosis and bronchiectasis. *J Clin Invest.* 2002;109(5):661-70.

Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(6):2239-44.

Verdecia A M, Huang HK, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti apoptotic protein surviving reveals a dimeric arrangement. *Nature.* 2000;7(7):602-8.

Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev.* 2000;52(3):349-74.

Wakabayashi I, Kato H. Alcohol abuse as a risk factor for ARDS. *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi.* 2006;41(5):400-6.

Watson WP, Little HJ. Prolonged effects of chronic ethanol treatment on responses to repeated nicotine administration: interactions with environmental cues. *Neuropharmacology.* 1999;38(4):587-95.

Weinberg KS, Hayes JA. Elastase-induced emphysema: asynchronous bronchial, alveolar and endothelial cell proliferation during the acute response to injury. *J Pathol.* 1982;136(3):253-64.

Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, Perdakis G, Hinder PR, Glaser K, et al. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue. *Free Rad Biol Med.* 1995;18(5):877-82.

World Health Organization. Tobacco Control Research. Confronting the epidemic: a global agenda for Tobacco Control Research [text on the Internet]. [cited 2001 Oct 16]. Geneva; WHO; 1999. Available from: <http://tobacco.who.int/em/research/index.html>. Accessed in 2006 (Ago 11).

Wu CH, Lin HH, Yan FP, Wu CH, Wang CJ. Immunohistochemical detection of apoptotic proteins, p53/Bax and JNK/FasL cascade, in the lung of rats exposed to cigarette smoke. *Arch Toxicol*. 2006;80(6):328-36.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53(3):451-65.

Yamazaki H, Inoue K, Hashimoto M, Shimada T. Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol*. 1999;73(2):65-70.

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family. *Blood*. 1996;88(2):386-01.

Yeh MY, Burnham EL, Moss M, Brown LA. Chronic alcoholism alters systemic and pulmonary glutathione redox status. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(3):270-6.

Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema. *Chest*. 2004; 125(2):626-32.

Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature*. 1991;352(6333):345-7.

Zhang T, Otevrel T, Gao Z, Ehrlich SM, Fields JZ. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer Res*. 2001; 61(24): 8664-7. Erratum in: *Cancer Res* 2002; 62(8): 7379.

Zhou Z, Liu J, Song Z, McClain CJ, Kang YJ. Zinc supplementation inhibits hepatic apoptosis in mice subjected to a long-term ethanol exposure. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008;233(5):540-8.