



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
E QUÍMICA MEDICINAL**

**Diferentes efeitos de atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e
sinvastatina no pulmão de camundongos expostos à fumaça de
cigarro**

Thiago dos Santos Ferreira

Rio de Janeiro

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
E QUÍMICA MEDICINAL

**Diferentes efeitos de atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e
sinvastatina no pulmão de camundongos expostos à fumaça de
cigarro**

Thiago dos Santos Ferreira

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação e Farmacologia e Química Medicinal, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (farmacologia e química medicinal).

Orientadores: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Profª Drª Claudia Farias Benjamim

Rio de Janeiro

Abril/2013

Diferentes efeitos de atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarro

Thiago dos Santos Ferreira

Orientadores: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Profª Drª Claudia Farias Benjamim

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação e Farmacologia e Química Medicinal, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (farmacologia e química medicinal).

Aprovada por:

Prof Dr Samuel Dos Santos Valença
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof Dr Newton Gonçalves de Castro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof Dr Bruno Lourenço Diaz
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profª Drª Marília Zaluar Passos Guimarães
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof Dr Paulo de Assis Melo
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof Dr Leandro Alves Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
Abril/2013

Ferreira, Thiago dos Santos.

Diferentes efeitos de atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarros – Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2013.

Orientadores: Samuel dos Santos Valença e Claudia Farias Benjamim.

Dissertação (mestrado): UFRJ/ICB/Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (farmacologia e química medicinal), 2012.

Referências Bibliográficas:

1. Pulmão.
 2. Estresse oxidativo.
 3. Estatinas.
 4. Oxidantes.
 5. Fumaça de cigarro.
- I. Valença, Samuel Santos.
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Ciências Biológicas.
III. Título.

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela minha saúde, força de vontade, paciência e pela realização deste sonho.

Agradeço em segundo lugar à família Ferreira, em especial a minha mãe, Julia Nascimento dos Santos Filha, e meu pai, Luiz Orlando Ferreira que me dão forças a cada dia, me acolhendo nos momentos difíceis e me estimulando sempre. Agradeço à minha irmã Larissa dos Santos Ferreira por todo amor dedicado a mim.

Agradeço ao amigo Alan de Aguiar Lopes pelo companheirismo incondicional, experimentos sem hora, palavras... “faz parte de toda a minha história acadêmica até aqui”.

Agradeço aos amigos, Luiz Otávio Felgueiras e Taline Anne do Amaral, por me escutarem e aconselharem em diversos momentos desse período de pós-graduação.

Agradeço a oportunidade do convívio com os amigos e companheiros Marco Aurélio dos Santos Silva, Jackson Nogueira Alves, Manuela Lanzetti Daher de Deus, Karla Maria Pereira Pires, Eduardo Lima Trajano, Denise Moura Cardoso, Marina Valente e Renata Tiscoski Nesi ... fomos um “Dream Team”...

Agradeço à minha orientadora, professora Claudia Farias Benjamim pelos conselhos e orientações, fundamentais para a realização desse trabalho.

Agradeço à professora Joseane Sabadinni Neves por aceitar nesse momento final representar meus orientadores no dia de minha defesa de dissertação de mestrado.

Agradeço ao meu orientador, professor Samuel dos Santos Valença, que foi a pessoa responsável por tudo, desde o planejamento a realização desse presente estudo e de outros estudos nos quais tenho citações. Sou muito grato por tudo !

“Quando a gente acha que tem todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas...”

(Luís Fernando Veríssimo)

Resumo

Diferentes efeitos de atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina e sinvastatina no pulmão de camundongos expostos à fumaça de cigarros

Thiago dos Santos Ferreira

Orientadores: Prof. Dr. Samuel dos Santos Valença

Profª Drª Claudia Farias Benjamim

Resumo da dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação e Farmacologia e Química Medicinal, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (farmacologia e química medicinal).

Estatinas são mundialmente utilizadas como drogas que reduzem o colesterol. Contudo, alguns efeitos pleiotrópicos podem prover benefícios contra doenças pulmonares. Aqui, nós investigamos o efeito de quatro diferentes estatinas na inflamação pulmonar aguda (IPA) induzida por fumaça de cigarro (FC). Camundongos C57BL/6 foram divididos em grupo controle (ar ambiente) e camundongos expostos a FC 12 cigarros/dia por 5 dias (grupo FC). Camundongos expostos à FC foram agrupados e tratados com veículo (i.p.), atorvastatina (10 mg/kg/dia; grupo IFC+A), pravastatina (10 mg/kg/dia; grupo IFC+P), rosuvastatina (5 mg/kg/dia; grupo IFC+R) ou sinvastatina (20 mg/kg/dia; grupo IFC+S). Após o sacrifício foi realizado lavado broncoalveolar (LBA), e em seguida os pulmões esquerdos foram removidos para análises histológicas e os direitos foram homogeneizados para análises bioquímicas. O grupo IFC+A demonstrou redução na quimiocina derivada de keratinócitos (KC) (46%), mieloperoxidase (MPO) (62%), superóxido dismutase (SOD) (73%), e níveis de hidroperóxidos (FOX) (48%) e um correspondente aumento na razão glutatona reduzida/glutaciona oxidada (razão GSH/GSSG) (173%) e capacidade antioxidante total (DPPH) (53%) quando comparado ao grupo FC. O grupo IFC+P demonstrou redução em KC (45%), nitrito (80%) e SOD (88%) e um aumento na razão GSH/GSSG (197%). O grupo IFC+R demonstrou redução na proteína quimiotática de monócito-1 (MCP-1) (61%), KC (56%), MPO (48%), nitrito (46%), espécies reativas de oxigênio (ROS), (38%), SOD (44%) e FOX (43%) e aumento na razão GSH/GSSG (200%) e DPPH (34%). Finalmente, o grupo IFC+S demonstrou redução em MCP-1 (60%), nitrito (46%), ROS (32%), SOD (63%), catalase (CAT) (56%) e FOX (45%) e um aumento da razão GSH/GSSG (333%) e DPPH (40%). Os dados apresentados sugerem que nesse modelo, rosuvastatina apresentou melhor efeito anti-inflamatório, enquanto sinvastatina apresentou melhor efeito antioxidante.

Palavras chave: Fumaça de cigarro, inflamação pulmonar aguda, estatinas, estresse oxidativo, camundongos

Abstract

Statins are widely used to lower cholesterol. However, some pleiotropic effects may provide benefits for lung diseases. Here, we investigated the effects of four different statins on acute lung inflammation (ALI) induced by cigarette smoke (CS). C57BL/6 mice were divided into a control group (sham-smoked) and mice exposed to CS from 12 cigarettes/day for 5 days (CS group). Mice exposed to CS were grouped and treated with vehicle (i.p.), atorvastatin (10 mg/kg/day; CS+A group), pravastatin (10mg/kg/day; CS+P group), rosuvastatin (5 mg/kg/day; CS+R group) or simvastatin (20 mg/kg/day; CS+S group). At sacrifice, bronchoalveolar lavage (BAL) was performed, left lungs were removed for histological analysis and right lungs were homogenized for biochemical analyses. The CS+A group demonstrated reduced keratinocyte derived protein chemokine (KC) (46%), myeloperoxidase (MPO) (62%), superoxide dismutase (SOD) (73%) and hydroperoxide (FOX) (48%) levels with a corresponding increase in the reduced glutathione/oxidized glutathione GSH/GSSG ratio (173%) and total antioxidant capacity DPPH value (53%) when compared to the CS. The CS+P group demonstrated reduced KC (45%), nitrite (80%) and SOD (88%) levels and an increased GSH/GSSG ratio (197%). The CS+R group demonstrated reduced monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (61%), KC (56%), MPO (48%), nitrite (46%), reactive oxygen species ROS (38%), SOD (44%), and FOX (43%) levels and an increased GSH/GSSG ratio (200%) and DPPH value (34%). Finally, the CS+S group demonstrated reduced MCP-1 (60%), nitrite (46%), ROS (32%), SOD (63%), catalase (CAT) (56%), and FOX (45%) levels and an increased GSH/GSSG ratio(333%) and DPPH value (40%). These data suggest that in this model, rosuvastatin demonstrated the best anti-inflammatory effect, whereas simvastatin demonstrated the best antioxidant response.

Keywords: cigarette smoke, acute lung inflammation, statins, oxidative stress, mice

Lista de ilustrações

Figura – 1	Representação esquemática dos mecanismos de inflamação pulmonar induzida por espécies reativas de oxigênio	6
Figura – 2	Ação das defesas enzimáticas e não-enzimáticas	10
Figura – 3	Estruturas químicas das estatinas naturais e sintéticas	12
Figura – 4	Esquema do desenho experimental de inflamação pulmonar aguda pela exposição à FC e tratamento concomitante com diferentes estatinas, indicando as análises realizadas em cada amostra coletada.....	18
Figura – 5	Fotomicrografias de pulmão após coloração com hematoxilina-eosina.....	25
Figura – 6	Morfometria do número total de leucócitos alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.....	26
Figura – 7	Morfometria do número total de macrófagos alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.....	27
Figura – 8	Morfometria do número de polimorfonucleares alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina.	28
Figura – 9	Análise dos níveis de MCP-1 (pg/mL) em homogeneizado de pulmão.....	29
Figura – 10	Análise dos níveis de KC (pg/mL) em homogeneizado de pulmão.....	30
Figura – 11	Análise dos níveis de Nitrito ($\mu\text{Mol}/\text{mg}$ proteína) em homogeneizado de pulmão.....	31
Figura – 12	Análise dos níveis de ROS (μg formazan/ 10^6 leucócitos) em lavado broncoalveolar de pulmão.....	32
Figura – 13	Análise da atividade da SOD (U/mg proteína) em homogeneizado de pulmão..	33
Figura – 14	Análise da atividade da CAT (U/mg proteína) em homogeneizado de pulmão..	34
Figura – 15	Análise dos níveis de hidroperóxidos (nMol/ mg proteínas) em homogeneizado de pulmão.....	35
Figura – 16	Análise da razão GSH/GSSG em homogeneizado de pulmão.....	36

Figura – 17	Análise da capacidade total antioxidante pelo radical DPPH em homogeneizado de pulmão.....	37
Tabela - 1	Tabela comparativa entre os grupos tratados com estatinas X grupo FC.....	38

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	3
	2.1 – Tabagismo.....	3
	2.2 - Inflamação pulmonar aguda e a fumaça de cigarro.....	4
	2.3 - Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio.....	6
	2.4 – Antioxidantes.....	8
	2.5 – As estatinas.....	11
3.	OBJETIVOS.....	15
	3.1 Objetivo geral.....	15
	3.2 Objetivos específicos.....	15
4.	MATERIAL E MÉTODOS	16
	4.1 Animais.....	16
	4.2 Exposição à fumaça de cigarros e procedimentos.....	16
	4.2.1 Tratamento com as estatinas.....	16
	4.2.2 Lavado broncoalveolar.....	18
	4.2.3 Processamento tecidual.....	18
	4.2.4 Homogeneizado tecidual.....	19
	4.2.5 Morfometria.....	19
	4.2.6 Dosagem de proteínas.....	19
	4.2.7 Níveis de MCP-1 e KC por Enzyme like-immunosorbent assay	20

	(ELISA)	
	4.2.8 Análise dos níveis de nitrito.....	20
	4.2.9 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)..	21
	4.2.10 Ensaio da atividade superóxido dismutase.....	21
	4.2.11 Ensaio da atividade da catalase.....	22
	4.2.12 Análise da lipoperoxidação (LPO).....	22
	4.2.13 Razão glutatona reduzida/ glutatona oxidada (GSH/ GSSG)..	23
	4.2.14 Ensaio da capacidade total antioxidante por DPPH (2,2 difenil 1 picrihidrazil).....	23
	4.2.16 Análises estatísticas.....	24
5.	RESULTADOS	25
	5.1 Efeitos das estatinas no influxo celular do pulmão.....	25
	5.2 Morfometria.....	25
	5.3 Efeitos das estatinas nos marcadores pró-inflamatórios.....	28
	5.4 Efeitos das estatinas nos marcadores Redox.....	31
	5.5 Efeitos das estatinas nos marcadores antioxidantes.....	35
6.	DISCUSSÃO	40
7.	CONCLUSÃO	44
8.	REFERÊNCIAS	45
9.	APÊNDICES	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C. – Antes de Cristo

BAL – Lavado broncoalveolar

CAT – Catalase;

CO₂ – Dióxido de carbono;

d.C. – Depois de Cristo;

DNA – Ácido Desoxirribonucléico;

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica;

DPPH – 2,2 difenil 1 picrilhidrazil;

eNOS ou NOS III – Óxido nítrico sintase endotelial;

ERNS – Espécies reativas de nitrogênio;

EROs – Espécies reativas de oxigênio;

FC – Fumaça de cigarro;

FOX - “ferrus oxidation in xilenol orange”

G-CSF – Granulócito – fatores estimuladores de colônias

GM-CSF – Granulócito-Macrófago – fatores estimuladores de colônias

GMPc – 3', 5' guanosina monofosfato cíclico;

GPx – Glutathione peroxidase;

GR – Glutathione reductase;

GSH – Glutathione reduzida;

GSSG – Glutathione oxidada;

GST - Glutathione s-transferase;

H₂O – Água;

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio;

HO₂[·] – Radical hidroperoxila;

IL1-β – Interleucina-1-beta;

IL-6 – Interleucina-6;

IFC – Inalação da fumaça de cigarro;

iNOS ou NOS II – Óxido nítrico sintase indutível;

IPA – Inflamação pulmonar aguda;

KC – Quimiocina derivada de queratinócito murino;

L[·] – Radical lipídico;

LH – Ácido graxo poliinsaturado;

LO[·] – Radical alcoxila;

LOO[·] – Radical peroxila;

LOOH – Hidroperóxidos lipídicos;

LPS – Lipopolissacarídeo constituinte da parede de bactérias gram-negativas;

LTB₄ – Leucotrieno 4;

MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos;

MDA – Malondialdeído;

MN - Células mononucleares;

MPO – Mieloperoxidase;

NADH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo;

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;

nNOS ou NOS I – Óxido nítrico sintase neuronal;

NO[·] – Óxido nítrico;

NOS – Óxido nítrico sintase;

¹O₂ - Oxigênio Singleto;

O_2 – Oxigênio molecular;

$O_2^{\cdot -}$ – Ânion superóxido;

OH^{\cdot} – Radical hidroxil;

$ONOO^-$ - Peroxinitrito;

OMS – Organização mundial de saúde;

PMN – Células polimorfonucleares;

Ras – Rat Sarcoma vírus

ROOH - Hidroperóxidos orgânicos;

SOD – Superóxido dismutase;

TNF- α – Fator de necrose tumoral α ;

1. INTRODUÇÃO

O cigarro é um dos maiores fatores de risco para morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (BERGEN; CAPORASO, 1999). A fumaça produzida pelo cigarro é um potente indutor da inflamação pulmonar, uma vez que possui grande quantidade de oxidantes, os quais se tem sugerido causar dano oxidativo às substâncias biológicas (DWYER, 2003) ao mesmo tempo que ativam macrófagos e neutrófilos que aumentam ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Por outro lado, mecanismos de ação antioxidante são estabelecidos com o fim de evitar o dano oxidativo nas células parenquimatosas e no tecido pulmonar (VAN DER VAART, 2004).

Os agentes oxidantes presentes na fumaça de cigarro, entre os quais ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN), induzem o estresse oxidativo por perturbar o equilíbrio existente entre as substâncias oxidantes e antioxidantes, podendo então levar ao dano celular no pulmão (RAHMAN, 2006).

O estresse oxidativo é um forte contribuinte na patogênese da inflamação pulmonar aguda (IPA) que pode ter em sua progressão a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Nesse contexto, a matriz extracelular pulmonar sofre ação de ERO/ERN presentes na fumaça ou liberados por células inflamatórias ativadas (PERLSTEIN; LEE, 2006) bem como a intensa degradação causada pelas metaloproteinases. As células do parênquima acionam, por sua vez, seus mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos com superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) e não enzimático com glutathione reduzida (MOURA, 2012), a fim de impedir alterações inflamatórias e oxidativas aos componentes do pulmão que contribuirão em curto prazo para a IPA, a qual poderá levar ao dano irreversível do parênquima e das vias aéreas que estão relacionados à DPOC (BALASUBRAMANIAN, 2006).

Até o momento, não há um fármaco capaz de impedir a instalação da IPA causada por fumaça de cigarro (FC) ou curar a DPOC, apesar de numerosas tentativas nesse sentido. Dessa forma, os objetivos da atual farmacoterapia na DPOC limitam-se a reduzir as exacerbações, melhorar o estado de saúde e prolongar a sobrevida (JANSSON, 2005). Nesse sentido, é consenso a utilização de

N-acetilcisteína (NAC), um composto tiólico capaz de reduzir espécies reativas de oxigênio, por pacientes com DPOC (RUBIO, 2000).

Na busca de novos fármacos para o tratamento de pacientes com DPOC as estatinas vêm sendo estudadas como uma recente opção (LEFER, 2002; YAO, 2008), e nenhum estudo até o momento relata as estatinas como a proposta de impedir ou reduzir a IPA causada pela FC. As estatinas são fármacos hipolipemiantes, inibidores seletivos e competitivos da 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima-A redutase (HMG-CoA redutase), que é responsável pela conversão da HMG-CoA a mevalonato, um precursor do colesterol. Além dos efeitos relativos à diminuição do colesterol os inibidores da HMG-CoA redutase apresentam efeitos pleiotrópicos incluindo efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes (MCKAY, 2004; CHARTOUMPEKIS, 2010). Estudos vêm demonstrando o potencial das estatinas em impedir o desenvolvimento da IPA em diferentes condições pulmonares como asma, sepse e lesão pulmonar induzida por ventilação mecânica o que as credencia como possível fármaco antioxidante e anti-inflamatório com potencial para impedir ou reduzir a IPA induzida por FC.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Tabagismo

O tabaco foi primeiramente cultivado e utilizado pelos povos indígenas das Américas com fins medicinais, religiosos e sociais, antes da chegada das colônias europeias (GATELY, 2002). Os registros mais antigos de atividades com o tabaco surgiram com a descoberta de artefatos da população Maia (2000 a.c. à 900 d.C.), mas além dessa sabe-se que também a civilização Asteca utilizava o tabaco (ROUTH, 2003; MUSK, 2003).

A maior parte de todo tabaco consumido pelo homem é proveniente do cultivo da espécie *Nicotiniana tabacum*. Com o surgimento do tabaco enrolado em forma de cigarro em meados do século XIX e o aumento de sua produção de maneira industrial, em 1881(GATELY, 2002) surge um cenário econômico para o tabaco. As guerras mundiais apresentam-se como outro grande marco para o consumo de cigarros, visto o uso pelos soldados nas trincheiras (MUSK, 2003), uma das justificativas para o aumento exagerado do consumo entre o início e meado do século XX.

As tentativas de combate ao tabagismo são antigas, desde a proibição do uso pela igreja católica em 1642 (NARDI, 1996), passando pelo reconhecimento pela comunidade científica em 1988 como causador de dependência química até os dias atuais onde está incluído na classificação internacional de doenças (CID) com a sigla F19.2 (ROVER, 2001). Ainda assim, o uso de tabaco é apontado como segundo maior fator de risco para a mortalidade no mundo (WHO, 2009).

Inúmeras doenças são causadas pelo hábito de fumar, principalmente as relacionadas ao sistema respiratório. Dados mostram que aproximadamente 1,1 bilhão de pessoas no mundo são fumantes, levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar esse hábito uma epidemia (HURT, 1999).

Outros dados estatísticos relacionados ao consumo de cigarros mostram que em 2000, doenças cardiovasculares, câncer de pulmão e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) foram responsáveis por cerca de 4,8 milhões de mortes no mundo. Além disso, as expectativas da OMS para 2030 são de 8 milhões de mortes por ano, com cerca de 80% ocorrendo em países em desenvolvimento (EZZATI, 2004; WHO, 2008).

No Brasil, cerca de 16,7 milhões de homens e 11,2 milhões de mulheres são fumantes, que representa um terço da população adulta. Dados do Instituto Nacional Câncer (INCA) apontam que cerca de 200.000 morrem prematuramente por ano por causas relacionadas ao fumo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

2.2 Inflamação pulmonar aguda e a fumaça de cigarro

Os pulmões são órgãos de extrema importância para a vida dos seres humanos, uma vez que são responsáveis pela oxigenação do sangue e, conseqüentemente, de todo o corpo. Sua principal função é a realizar trocas gasosas, removendo o dióxido de carbono presente no sangue, à medida que leva oxigênio que será útil aos tecidos.

Esse processo, também conhecido como hematose pulmonar, é realizado nos alvéolos pulmonares, mais precisamente na barreira hemato gasosa, por difusão. Contudo, em situações nas quais a histoarquitetura dos pulmões esteja alterada, sua função pode sofrer prejuízos ocorrendo comprometimento das trocas gasosas (BALASUBRAMANIAN, 2006). Logo, o individuo pode desenvolver problemas relacionados ao seu fluxo respiratório que, em consequência, levará a uma pior qualidade de vida.

Diversos agentes nocivos às vias aéreas podem desencadear uma resposta inflamatória tanto a nível brônquico (nas vias superiores) quanto a nível alveolar (nas vias aéreas inferiores). Além disso, a intensidade da agressão proporcionada por determinados agentes é fundamental para que o estímulo inflamatório pulmonar chegue a sua fase de resolução ou para que haja a progressão da fase inflamatória com a liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios tais como citocinas, proteases, interleucinas e ativação de fatores nucleares, alterando assim a histoarquitetura pulmonar e as fases de reparo tecidual (BRUSSELLE, 2006)

Entre os estímulos desencadeadores da resposta inflamatória pulmonar podemos mencionar as infecções respiratórias como tuberculose e outras pneumonias, a fibrose pulmonar idiopática, a asma, herança genética (que pode ser a causa da susceptibilidade de algumas pessoas em comparação com outras) e, principalmente, fatores ambientais. Dentro desse último grupo, o fumo de cigarro aparece como o principal fator de risco para as doenças inflamatórias pulmonares.

Sua significância está na grande parcela da população mundial atingida e/ou usuária (BRUSSELLE, 2006).

O cigarro é um dos maiores fatores de risco para morbidade e mortalidade em países desenvolvidos e subdesenvolvidos (BERGEN; CAPORASO, 1999). Sua fumaça é uma complexa mistura com cerca de 4800 compostos químicos e oxidantes (HOFFMANN, 2001) e contém cerca de 10^{14} a 10^{16} radicais livres por tragada, que incluem aldeídos reativos, quinonas e benzopirenos (CHURCH; PRYROR, 1984). Muitos desses são relativamente duráveis, como a semiquinona, a qual pode também gerar radicais hidroxil (OH) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela reação de Fenton, quando em presença de ferro. Além disso, outros radicais livres como o ânion superóxido podem reagir rapidamente com o óxido nítrico presente na fumaça de cigarro (SHINAGAWA, 1998; TOKIMOTO; SHIRANE, 1998) para formar o peroxinitrito (SELEMIDIS, 2008), outro radical pró-oxidante.

Existem diversas evidências de que a fumaça de cigarro possui um papel importante no desenvolvimento da inflamação pulmonar aguda que é caracterizada pelo aumento do número de leucócitos, como neutrófilos e macrófagos, no parênquima pulmonar, aumentando o dano oxidativo (principalmente às membranas celulares com peroxidação de lipídios) e estresse oxidativo pulmonar (MOURA, 2012; VALENCA, 2009; CHURG, 2003). Adicionalmente, o aumento de células inflamatórias ativadas leva à secreção de vários mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas (IL-1, MCP-1 e TNF- α , eicosanóides (LTB₄, PGE₂ e TXB₂), fatores hematopoiéticos (GM-CSF, G-CSF, M-CSF), moléculas efetoras microbidas (H₂O₂ e NO) (SILVA BEZERRA, 2006; NAKAMURA, 2003), além de estimular a atividade da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), uma importante enzima biológica capaz de sintetizar o radical ânion superóxido o qual reage rapidamente com membranas biológicas levando ao dano celular (BABIOR, 2004; RAHMAN E MACNEE, 1996).

Se por um lado, no contexto da IPA, a FC aumenta os níveis de moléculas pró-oxidantes levando à peroxidação lipídica e à ativação de mediadores intracelulares (fatores de transcrição como NF κ B) que desencadeiam a transcrição e subsequente tradução de citocinas no processo de inflamação, por outro lado, mecanismos enzimáticos antioxidantes são ativados pelas células agredidas, buscando-se manter o equilíbrio entre oxidantes/antioxidantes com intuito de impedir

o dano celular, estresse oxidativo e inflamação (RAHMAN; ADOCOCK, 2006). Nesse contexto de defesa celular, enzimas antioxidantes com superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como defesas não enzimáticas possuidoras de grupamentos sulfidríla como a glutatona reduzida (GSH), desempenham papel fundamental em impedir os efeitos danosos das espécies reativas de oxigênio (ERO) e outros radicais livres formados a partir da FC ou de células inflamatórias (RAHMAN; MACNEE, 2012). No entanto, a permanência da produção de moléculas pró-oxidantes provenientes da FC em longo prazo leva à depleção das defesas antioxidantes (enzimáticas e não enzimáticas), um importante passo para a progressão da IPA e o desenvolvimento de DPOC/enfisema (LANZETTI, 2011).

O mecanismo de inflamação pulmonar induzido pela ação de espécies reativas de oxigênio pode ser visualizado na figura 1.

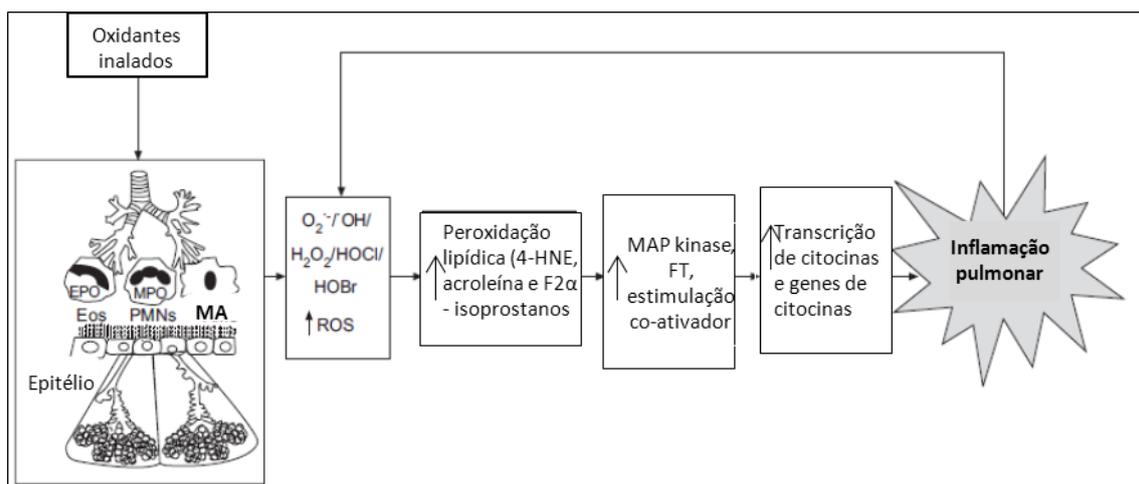


Figura 1: Representação esquemática dos mecanismos de inflamação pulmonar induzida por espécies reativas de oxigênio. EPO: peroxidase eosinofílica; MPO: mieloperoxidase; PMNs: polimorfonucleares; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; HOCl: ácido hipocloroso; HOBr: ácido bromoso; O₂^{-·}: anion superóxido; OH·: radical lhidroxil; 4-HNE: 4-hidroxinonal; MAP: proteína de atividade mitogênica; TF: fator de transcrição. (Adaptado de: RAHMAN;MACNEE, 2006).

2.3 Estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio

O oxigênio é uma molécula considerada indispensável para a produção de energia, tanto em seres eucariotos, por atuar de maneira fundamental na cadeia de transferência de elétrons mitocondrial, quanto em seres procaríotos, atuando em importantes vias metabólicas de diversas bactérias. O mesmo é relativamente não reativo, mas seus derivados mais propensos a participar de reações químicas são formados durante o metabolismo aeróbico (transporte de elétrons), reações

enzimáticas, vias de sinalização, fagocitose e ação de algumas heme-proteínas, sendo conhecidos como espécies reativas de oxigênio (BARTOSZ, 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Algumas dessas ERO são radicais livres (RLOs) os quais se apresentam como átomos ou moléculas com um ou mais elétrons desemparelhados na sua órbita externa, capazes de reagir com qualquer biomolécula, retirando elétrons dessas substâncias e modificando-as estruturalmente (YU, 1994). Dentre elas podemos mencionar o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxil (OH). Já o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é conhecido como uma ERO não radical, mas que apresenta ações similares às dos RLOs (ANDRADE Jr., 2005).

No processo de respiração celular o oxigênio é reduzido à água na etapa final da cadeia transportadora de elétrons. Contudo, estima-se que cerca de 3% do oxigênio utilizado nesse processo gere ânion superóxido por não sofrer redução completa (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Durante o processo inflamatório, esse ânion é produzido pelos fagócitos, linfócitos e fibroblastos, por ação da NADPH oxidase para o combate a corpos estranhos. Além disso, essa ERO participa de etapas importantes de sinalização no contexto biológico sendo também formada pela auto-oxidação das catecolaminas, hemoglobina e mioglobina. Não menos importante é o fato de ser precursora da formação de H_2O_2 , OH e ácido hipocloroso (HOCl), moléculas também causadoras de dano celular (BARREIROS, 2006; OGA, 2003).

O H_2O_2 é conhecidamente formado *in vivo* a partir da dismutação do ânion superóxido pela enzima SOD, ou na matriz mitocondrial durante o processo de redução do oxigênio, sendo parcialmente eliminado pela ação de enzimas como CAT, glutathione peroxidase e tioredoxina. Contudo, por apresentar meia vida longa e ser capaz de se difundir pelas membranas celulares, pode reagir com o ferro (Fe^{++}) em presença ou não de O_2^- gerando OH que possui um caráter altamente agressor às células (BARREIROS, 2006; SCOTT, 1991).

O OH é considerado a espécie mais reativa nos sistemas biológicos causando dano ao ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA), inativando proteínas e oxidando lipídios de membrana. Sua reação é extremamente rápida, acontecendo no sítio de sua formação logo após ser produzido, o que o torna um RLO perigoso para seus alvos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

O oxigênio singlete é uma forma excitada (altamente reativa) do oxigênio molecular, e apesar de não possuir elétrons desemparelhados em uma de suas camadas apresenta-se muito mais oxidante do que o O₂ no estado fundamental (RONSEN, 2006). A geração de ¹O₂ tem sido evidenciada por reações que envolvem enzimas lactoperoxidase, mieloperoxidase e cloroperoxidase, bem como, em processos como a fagocitose e a lipoperoxidação. Além disso, muitos estudos *in vitro* têm demonstrado que o ¹O₂ tem capacidade de oxidar biomoléculas tais como lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e grupamentos tiol (MYAMOTO, 2006; RONSENG, 2006).

Assim, as EROs presentes em diversas reações biológicas são indispensáveis à vida, mas sua formação excessiva ou a ineficiência da ação das defesas antioxidantes, conduz ao estado de estresse oxidativo que pode levar à morte celular. Em outras palavras, moléculas pró-oxidantes podem ser capazes de provocar injúria às células quando favorecidas por um desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes levando à peroxidação de lipídios, danos ao DNA, proteínas e carboidratos, sendo essa condição denominada estresse oxidativo (SIES, 1993).

O distúrbio entre a formação e remoção de ERO está ligado a inúmeros quadros patológicos como diabetes, câncer, aterosclerose, enfisema pulmonar, asma entre outras doenças (RAHMAN; ADOCOCK , 2006; WO, 2012; TRAND, 2012).

2.4 Antioxidantes

O sistema de defesas antioxidantes do organismo é composto tanto por enzimas que atuam impedindo a ação de espécies reativas, quanto por substâncias endógenas não-enzimáticas que as neutralizam. Um conteúdo de substâncias não-enzimáticas exógenas dependentes da dieta também é relevante, representando alvo de numerosos estudos (SIES, 1993).

As defesas antioxidantes enzimáticas são representadas pela atividade da SOD, CAT e glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR), e as enzimas que catalisam reações geradoras de equivalentes redutores nos compartimentos citosólico e mitocondrial, sendo necessário um equilíbrio entre a atuação dessas enzimas e as espécies reativas a fim de minimizar os efeitos tóxicos (BONNEFOY, 2002; RIBEIRO, 2005).

A enzima SOD é a responsável por dismutar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio H_2O_2 e oxigênio fundamental, como mostrado na reação abaixo:



Em mamíferos, há três isoformas de SOD produzidas por genes distintos, mas que catalisam a mesma reação. As três isoformas de SOD são: SOD citosólica ou cobre-zinco (CuZn-SOD ou SOD-1); SOD-manganês (Mn-SOD ou SOD-2), localizada na mitocôndria; e a forma extracelular da CuZn-SOD (EC-SOD ou SOD-3). Entre essas formas, a SOD extracelular é abundante no tecido pulmonar protegendo o pulmão do estresse oxidativo (ANDRADE JR, 2005).

A catalase é uma enzima antioxidante intracelular, encontrada principalmente no citosol e nos peroxissomos (SCOTT, 1991). A catalase atua na catálise da decomposição de H_2O_2 em água e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1998). Como mostrado na reação abaixo:



A catalase é mais efetiva em concentrações altas de H_2O_2 como, por exemplo, nas condições de estresse oxidativo induzidas pela fumaça de cigarro. Além da CAT outra enzima participa da decomposição do H_2O_2 , a GPX.

A GPX faz parte de uma família de enzimas selênio dependentes e independentes que pode ser divididas em dois grupos, celular e extracelular. Elas desempenham um importante papel ao catalisar a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos alifáticos e aromáticos à água e álcoois lípidicos. Nessa reação se faz necessária a presença de glutathiona reduzida (GSH) como fornecedora de equivalentes redutores. A reação simplificada está colocada abaixo:



Por apresentar alta afinidade pelo $2\text{H}_2\text{O}_2$ a GPX é importante em baixos níveis de estresse oxidativo (PARAVICINI; TOUYZ, 2008).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas descritas acima, as células contam com um sistema de defesa não-enzimático muito conhecido, a glutatona. A glutatona reduzida é um tripeptídeo formado por glicina, ácido glutâmico e cisteína, apresentando um grupamento sulfidril (-SH) cisteína ligado, a qual a confere capacidade redutora. Seus níveis são mantidos por ação da enzima glutatona redutase (GR) através da utilização de equivalentes redutores de NADPH matendo a glutatona reduzida, como substrato para GPX, permitindo a integridade do sistema de defesa celular (REMACLE, 1992). Essa capacidade de ciclar a GSH é essencial para os mecanismos de defesas antioxidantes das células (RAHMAN; ADOCOCK, 2006). Abaixo a figura representa a ação das defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas:

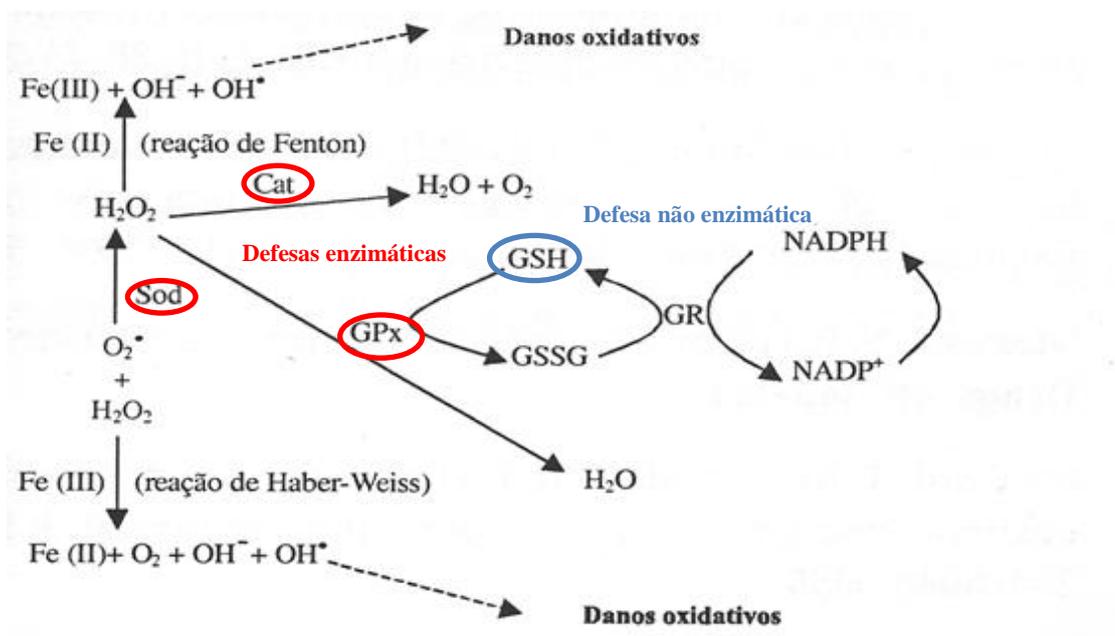


Figura 2: Ação das defesas enzimáticas e não-enzimáticas. (adaptado de SALVADOR e HENRIQUES, 2004). Círculo em vermelho envolvendo enzimas antioxidantes (defesa enzimática); círculo em azul envolvendo glutatona reduzida (defesa não-enzimática).

Os antioxidantes não enzimáticos exógenos podem ser obtidos através da dieta alimentar, como α -tocoferol, ascorbato e compostos fenólicos. Enquanto o ascorbato elimina radicais livres de compartimentos aquosos, o α -tocoferol atua nas membranas lipídicas protegendo-as contra a ação de oxidantes (HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, 1999). Bezerra e colaboradores (2006) mostrou redução da inflamação pulmonar aguda induzida pela fumaça de cigarro em animais

suplementados com ascorbato e α -tocoferol. Em modelos animais similares Lanzetti e colaboradores (2008) e Moura e colaboradores (2012) observaram redução da IPA induzida por FC quando camundongos foram suplementados com chá mate e extrato de caroço de açaí, respectivamente, sendo os efeitos benéficos atribuídos aos compostos fenólicos presentes em suas composições.

Atualmente não existem alternativas farmacológicas para impedir a instalação e progressão da IPA induzida pela FC. Contudo, diversas substâncias antioxidantes tiols como a N-acetilcisteína, erdosteína, carbosteína além de ativadores do fator nuclear eritróide 2 (Nrf2), inibidores de lipoperoxidação e miméticos de enzimas antioxidantes fazem parte das futuras possibilidades terapêuticas para impedir a IPA/DPOC (RAHMAN; MACNEE, 2012).

2.5 As estatinas

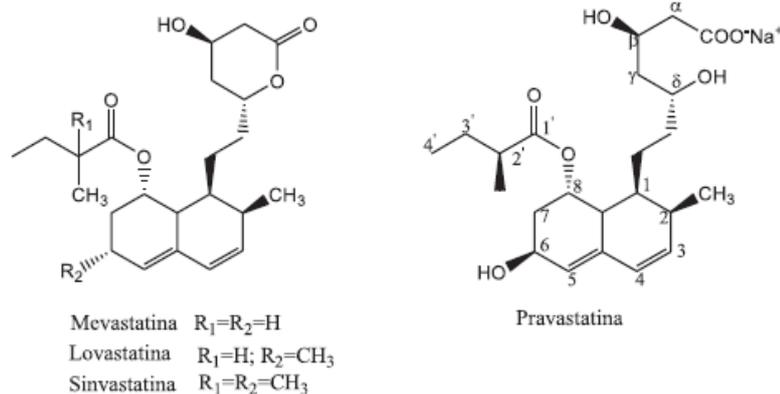
Desde a década de 50 os riscos representados pelas altas taxas de colesterol no desenvolvimento de doenças coronarianas eram conhecidos, o que despertou interesse de diversas indústrias farmacêuticas em relação à descoberta de novos fármacos para o controle plasmático das taxas de colesterol. O conhecimento, nos anos posteriores de que a 3-hidroxi3-metil-3-glutaril CoA redutase era a enzima que limitava cineticamente a síntese do colesterol tendo como alvo natural o substrato hidroxil-metil-glutril CoA (HMG CoA redutase) , credenciou-a como alvo terapêutico para redução do colesterol (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Nos anos 70, Akira Endo, um pesquisador japonês isolou a partir do fungo *Penicillium brevecompactum*, a compactina (mevastatina). Essa molécula apresenta em sua composição estrutural uma função δ -lactona- β -hidroxilada o que possibilita que a enzima HMG CoA redutase possa reconhecer esta substância (análoga) como seu substrato natural. Não bastasse isso, mais tarde foi descoberto que a enzima apresentava afinidade cerca de 10.000 maior pelo análogo do que pelo seu alvo natural, a HMG Coa (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). A partir desse momento, diversos laboratórios iniciaram pesquisas para a descoberta de substâncias com a similaridade que pudessem inibir a enzima.

Ainda na década de 70, foram descobertas a lovastatina e a sinvastatina em estudos com *Monascus ruber* e *Aspergillus terreos*, respectivamente (PATCHETT, 2002). Já em 1987, a partir de um metabólito ativo da compactina, foi descoberta a

pravastatina. Essas três substâncias apresentam uma região lipofílica de decalina, característico das estatinas de primeira geração (naturais), porém, enquanto a lovastatina apresenta um grupo éster 2-(S) metilbutírico, a sinvastatina aparece com uma pequena modificação na posição alfa, a adição de um grupo metil - essa modificação na estrutura da sinvastatina permitiu uma atividade 2,5 maior do que lovastatina (CAMPO; CARVALHO, 2007). A pravastatina por sua vez, além de ser mais hidrossolúvel do que as duas anteriores apresenta maior seletividade para inibir a enzima. Ela foi a primeira estatina com função lactona aberta empregada na terapêutica e muito provavelmente estudos com seu metabólito inspiram a síntese de novos inibidores da HMG CoA redutase (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Naturais



Sintéticos

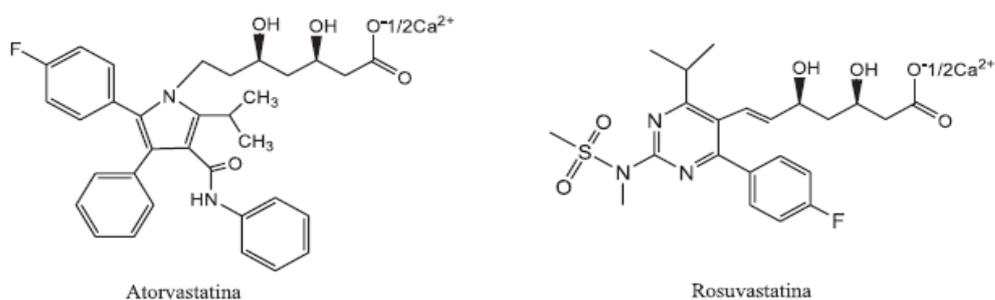


Figura 3: Estruturas químicas das estatinas naturais e sintéticas (Adaptado de CAMPO; CARVALHO, 2007).

No início dos anos 90, após a criação de novos padrões estruturais (sintéticos) para os inibidores da HMG CoA redutase surge no mercado a atorvastatina e em 2003 “Food and Drug Administration” (FDA) libera a rosuvastatina para uso terapêutico contra a hipercolesterolemia. Essas estatinas sintéticas não-

decalínicas possuem um grupo 4-fluorfenil que participa de interações adicionais através do anel aromático e do átomo de flúor com o grupo guanidínico da Arg 590. Além disso, a cadeia lateral contendo grupo carbonila (atorvastatina) ou sulfonamida (rosuvastatina) realiza mais uma interação com o resíduo Ser 565 (CAMPO; CARVALHO, 2007). As estatinas descritas acima estão entre as mais utilizadas clinicamente no mundo (ANVISA, 2011). Na figura 3, é possível observar as estruturas químicas das estatinas naturais e sintéticas utilizadas nesse estudo.

As estatinas são conhecidas há várias décadas como fármacos inibidores competitivos da HMG CoA redutase, uma vez que atuando no sítio catalítico dessa enzima impedem a conversão do HMG CoA em ácido mevalônico e as reações subsequentes até a formação do colesterol não podem acontecer, permitindo assim o uso desses fármacos como agentes hipocolesterolêmicos. Entretanto, estudos recentes têm mostrado propriedades farmacológicas pleiotrópicas desses agentes, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antitrombogênicos (MCKAY, 2004; YILMAZ, 2004; LEUNG, 2003).

Apesar de existirem alguns estudos mostrando os efeitos benéficos das estatinas em modelos experimentais de IPA, como por exemplo, na asma (CHARTOUMPEKIS, 2010; BRAGANZA, 2011), na IPA induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (GROMMES, 2012) e na IPA induzida por ventilação mecânica (MÜLLER, 2010), até o momento poucos estudos têm sido realizados para a avaliação dos mecanismos relacionados à atividade antiinflamatória e antioxidante das estatinas em modelos de IPA causada pela fumaça de cigarro.

Algumas evidências moleculares credenciam as estatinas como uma interessante substância a ser estudada na intervenção do processo inflamatório e oxidante agudo causado pela FC. Nesse sentido, foi observada a redução da expressão e produção de citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α , interleucina-1 β e interleucina-8) por macrófagos alveolares após pré-tratamento com atorvastatina (SAKAMOTO, 2009), bem como pravastatina foi capaz de reduzir o número de leucócitos totais, neutrófilos, os níveis de mieloperoxidase e do fator de necrose tumoral- α em modelo agudo de inflamação pulmonar por lipopolissacarídeo e sinvastatina reduziu o número de leucócitos totais, macrófagos, neutrófilos, a expressão da molécula de adesão à célula vascular - 1 (VCAM) e a produção de interleucina-8 em modelos de asma além de reduzir a expressão da molécula de

adesão intracelular - 1 (ICAM) e o infiltrado inflamatório em modelo de lesão pulmonar aguda induzida por endotoxina (GOMMES, 2012; KIM, 2007; YAO, 2006; MACKY, 2004). Em consonância com esses resultados, em estudo recente rosuvastatina reduziu o número total de leucócitos, macrófagos, neutrófilos e níveis do fator de necrose tumoral- α em um modelo de asma (ZHU, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos antioxidantes da atorvastatina, pravastatina, rosuvastatina, e sinvastatina no dano pulmonar induzido pela fumaça de cigarro em camundongos através da avaliação de marcadores de estresse oxidativo.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o infiltrado inflamatório no parênquima pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarros através da contagem total e diferencial de leucócitos;
- Avaliar as quimiocinas pró-inflamatórias proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1) e quimiocina derivada de queratinócito murino (KC);
- Quantificar o total de espécies reativas de oxigênio no lavado broncoalveolar;
- Avaliar os marcadores oxidativos de inflamação como mieloperoxidase e nitrito;
- Avaliar a bioquímica do equilíbrio redox através da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase;
- Avaliar o dano oxidativo através do ensaio alaranjado de xilenol (FOX);
- Avaliar o estresse oxidativo através da razão entre glutatona reduzida/glutatona oxidada e do ensaio da capacidade total antioxidante por DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil);

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

No experimento realizado foram utilizados 50 camundongos C57BL/6 machos, oito semanas, acondicionados, em grupos de dez animais por caixa, no biotério da pós-graduação em Farmacologia/UFRJ com temperatura e umidade controladas ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$, $50\pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 min/h. Durante o período do experimento os animais receberam ração padrão balanceada e água *ad libitum*. Os protocolos de manuseio e experimentação seguiram a “Lei 11.794 de oito de outubro de 2008 que trata dos procedimentos para o uso científico de animais” publicado no Diário Oficial da União (publicação nº 196, seção 1, página 96). O projeto desse trabalho foi submetido à Comissão de Ética com Uso de Animais (CEUA) em experimentação científica do Centro de Ciências da Saúde/UFRJ (número de protocolo DFBCICB 046).

4.2 Exposição à fumaça de cigarro e procedimentos

Durante cinco dias, através da utilização de uma câmara de inalação de fumaça de cigarro, os animais foram expostos a um total de 12 cigarros comerciais por dia, divididos em três vezes ao dia (quatro cigarros por período, manhã, tarde e noite). Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de vidro de 60 mL com a qual se injetou fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa terminou com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Um cigarro gerou aproximadamente 1 L de fumaça que foi diluído em 30 L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% após a queima de um cigarro por seis minutos. Após este período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça e, por um minuto, os animais tinham contato com o ar ambiente, quando então o procedimento se repetia com os demais cigarros. Todo o protocolo de exposição à fumaça de cigarro foi realizado conforme o modelo já estabelecido pelo grupo (VALENCA, 2004). Os animais expostos ao ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle.

4.2.1 Tratamento com as estatinas

Os animais foram divididos em seis grupos (n= 10 animais por grupo):

- Grupo controle (Controle) – Camundongos expostos ao ar ambiente;
- Grupo Inalação da fumaça de cigarro (IFC) - camundongos expostos a fumaça de 12 cigarros ao dia e que receberam o veículo;
- Grupo Inalação da fumaça de cigarro + Atorvastatina (IFC+A) - camundongos expostos a fumaça de 12 cigarros ao dia e tratados com atorvastatina (10 mg/kg);
- Grupo Inalação da fumaça de cigarro + Pravastatina (IFC+P) - camundongos expostos a fumaça de 12 cigarros ao dia e tratados com Pravastatina (5 mg/kg);
- Grupo Inalação da fumaça de cigarro + Rosuvastatina (IFC+R) - camundongos expostos a fumaça de 12 cigarros ao dia e tratados com Rosuvastatina (10 mg/kg);
- Grupo Inalação da fumaça de cigarro + Sinvastatina (IFC+S) - camundongos expostos a fumaça de 12 cigarros ao dia e tratados com Sinvastatina (20 mg/kg).

Todos os fármacos foram administrados após a última inalação de cada dia por via intraperitoneal (200 μ L), diluídos em 9 partes de soro fisiológico e uma parte de Dimetilsulfóxido (DMSO). As doses utilizadas aqui foram baseadas em experimentos recentes (YAO, 2006; GROMMES, 2012; RAKOTONIAINA, 2006; ZHU, 2012).

Os animais foram sacrificados um dia após o término do experimento, sendo anestesiados com Ketamina-Xilazina (75/10 mg/kg) intraperitoneal e posteriormente realizando-se deslocamento cervical. O desenho experimental seguiu o modelo a seguir.

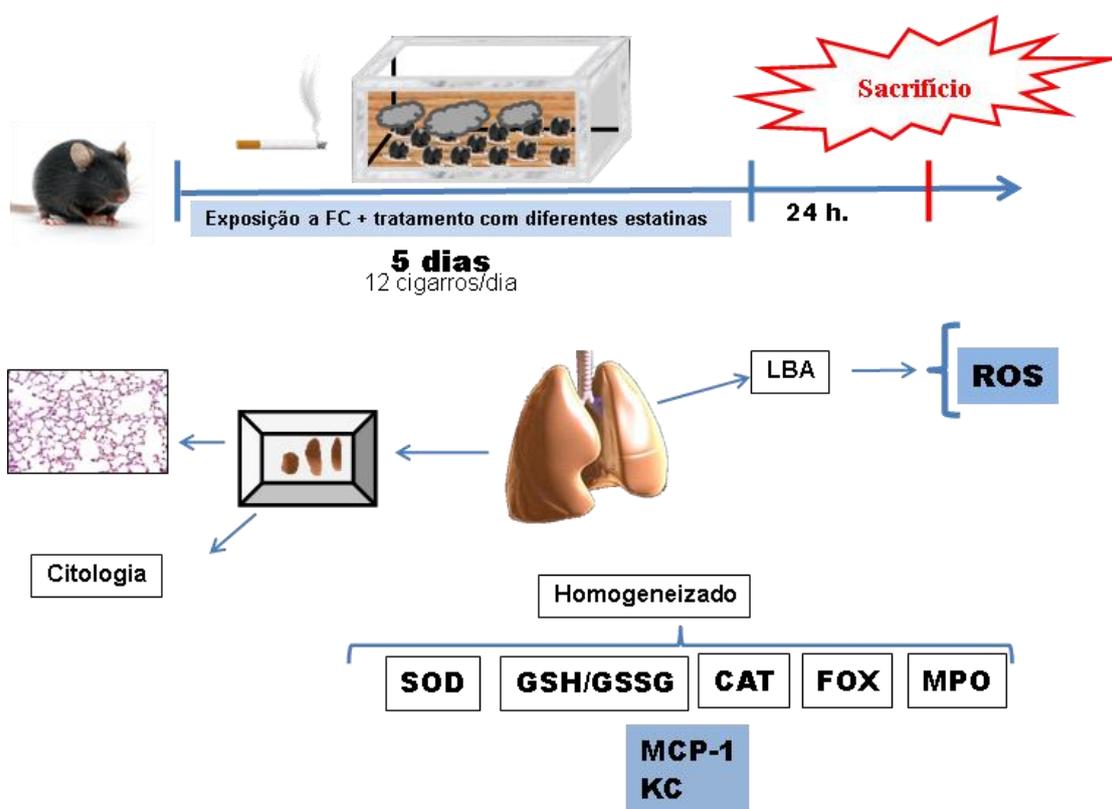


Figura 4: Esquema do desenho experimental de inflamação pulmonar aguda pela exposição à FC e tratamento concomitante com diferentes estatinas, indicando as análises realizadas em cada amostra coletada. LBA - lavado bronco alveolar; ROS – análise para níveis de espécies reativas de oxigênio, SOD – análise para atividade da superóxido dismutase; GSH/GSSG – análise da razão glutaciona reduzida/ glutaciona oxidada; CAT - análise para atividade da catase; FOX – análise dos níveis de hidroperóxidos; MPO – análise da atividade da mieloperoxidase; MCP – 1 análise dos níveis de proteína quimiotática de monócitos; KC - análise dos níveis de proteína de derivada de queratinócito murino.

4.2.2 Lavado broncoalveolar

Imediatamente após o sacrifício, foi realizado o lavado broncoalveolar. O pulmão direito foi clampeado, a traquéia canulada e o pulmão esquerdo foi lavado com 1,5 mL de solução salina (3 x 500 µL). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Após o término de todos os grupos, as amostras foram centrifugadas (Centrifuga Micro FANEM mod. 243M, São Paulo, Brasil) a 2000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante coletado e estocado em freezer – 20 °C.

4.2.3 Processamento tecidual

Após a realização do lavado broncoalveolar, o tórax do animal foi aberto e o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. O pulmão esquerdo foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão direito, via traquéia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cm de H₂O por 2 minutos. O pulmão direito então foi removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Após processamento de rotina e inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados a quatro micrômetros de espessura, os quais foram corados em hematoxilina-eosina (H&E) para a análise histopatológica.

4.2.4 Homogeneizado tecidual

Em seguida à retirada do pulmão direito para histologia, o pulmão esquerdo foi imediatamente removido e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Depois, o órgão foi homogeneizado (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 7.000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e o volume final de todas as amostras ajustado para 1,5 mL com tampão fosfato. Essas amostras foram armazenadas em freezer – 80 °C para posterior análise bioquímica.

4.2.5 Morfometria

O número total de leucócitos, células mononucleares (MN) e células polimorfonucleares (PMN) no alvéolo foram estimados contando-se dez campos aleatórios em dez lâminas não identificadas a partir de cortes histológicos de pulmão (5 µm) corados por Hematoxilina e Eosina. Os campos foram observados com a objetiva de 100x através do microscópio óptico (Carl Zeiss mod. Axiolab, Oberkochen, Alemanha) com área total de 24.640 µm². Células PMN e MN foram contadas e representadas por número de células por campo.

4.2.6 Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras de lavado broncoalveolar e homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga às proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Uma curva padrão foi produzida através de concentrações crescentes da proteína albumina bovina (0,5-10 µL) em triplicata.

Para dosagem de proteínas do homogeneizado de pulmão foi utilizado 1 µL de amostra.

4.2.7 Níveis de MCP-1 e KC por Enzyme-Like-Immunesorbent assay (ELISA)

Para a dosagem dos níveis das quimiocinas proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1) e quimiocina derivada de queratinócito murino (KC), foram utilizados os homogeneizados de pulmão dos diferentes grupos experimentais. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 µL de anticorpo monoclonal anti-MCP-1 e anti-KC (anticorpo de captura) e incubados *overnight* em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados por três vezes com tampão para lavagem (0.05 % Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Em seguida, a placa foi bloqueada com 300 µL de solução de bloqueio (1% de BSA em PBS pH 7,2 – 7,4) e incubada 1 hora a temperatura ambiente, a fim de serem evitadas reações inespecíficas. Após, os poços foram lavados como já descrito.

Realizado o bloqueio, foram adicionados 100 µL por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em reagentes de diluição (1% de BSA em PBS pH 7,2 – 7,4), e cobertos com papel laminado. Três poços foram utilizados como branco, sendo neles colocado somente o reagente de diluição. A placa permaneceu incubando por 2 h. a temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados com tampão de lavagem (0.05 % Tween® 20 em PBS, pH 7,2 – 7,4). Após as lavagens, foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção (anticorpo anti-rato para MCP-1 ou KC Biotinilado) diluídos em reagente de diluição (1% de BSA em PBS pH 7,2 – 7,4) na concentração estabelecida, cobertos com papel laminado e mantidos por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados como anteriormente descrito e foram adicionados 100 µL de Streptoavidina-HRP (1:250) por poço, cobertos novamente com papel laminado e permanecendo em incubação por 2 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados como descrito. Posteriormente, foi adicionada a solução do substrato (mistura dos reagentes cores A – H₂O₂ e b – Tetrametilbenzidina), na diluição de 1:1, por poço e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram lidas a 450 nm, no espectrofotômetro de microplacas Benchmark plus (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.2.8 Análise dos níveis de nitrito

O óxido nítrico (NO) é um radical que possui tempo de meia vida curto, sendo rapidamente oxidado a nitrito e/ ou nitrato. A determinação da produção deste radical pode ser mensurada de forma indireta pela formação de nitrito (NO₂), um produto de degradação estável e não volátil. Assim, a dosagem de nitrito é realizada pelo método de Griess o qual tem como princípio de reação a formação de um azo composto. Neste método, o nitrito primeiramente reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal diazônio. Em seguida este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, com comprimento de onda de 540 nm (GREEN, 1982).

Para a reação, foram utilizados 100 µL de homogeneizado de pulmão em 50 µL de solução 1 (sulfanilamida 1 % em solução de ácido fosfórico 2,5 %). Após 10 min. adicionou-se 50 µL da solução 2 (N-naftil-etilenodiamina 0,1 % em solução de ácido fosfórico a 2,5 %). Em seguida, realizou-se homogeneização e leitura a 540 nm em espectrofotômetro de microplacas Benchmark plus (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA). O resultado foi expresso em µM/mg de proteína.

4.2.9 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A produção de espécies reativas de oxigênio induzido pela fumaça de cigarro foi estimada por um ensaio colorimétrico baseada na reação entre as ERO presentes nas células no lavado broncoalveolar e o azul de nitrotetrazolio (NBT) como descrito por Kerkweg e colaboradores (2007). Para a realização do ensaio, o LBA foi centrifugado e 100 µL de células foram ressuspensos em 100 µL de NBT, posteriormente sendo incubados em estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, foram realizadas duas centrifugações a 600 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O centrifugado foi então ressuspensado em 400 µL de solução de KOH-DMSO e colocado em microplacas de 96 poços. Três réplicas de cada amostra foram lidas a 530 nm, no espectrofotômetro de microplacas Benchmark plus (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.2.10 Ensaio da atividade Superóxido dismutase (SOD)

A SOD constitui a primeira linha de defesa enzimática contra a produção intracelular de radicais livres, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática da SOD foi estimada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente. A adrenalina

quando oxidada pelo ânion superóxido forma um produto róseo adenocromo. Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram utilizadas no ensaio cinético para mensuração de atividade enzimática da SOD, de acordo com o método proposto por Bannister e Calabrese (1987). Assim, alíquotas de pulmão foram utilizadas em três diferentes volumes por amostra, 10 μL , 20 μL e 30 μL . Para a reação, foram colocados em cada cubeta três diferentes volumes 10 μL , 20 μL ou 30 μL de homogeneizado, 1.920 μL de tampão glicina, 40 μL de adrenalina (epinefrina) e 20 μL de catalase. Em seguida, foi realizada a homogeneização com auxílio de pipeta semiautomática e a absorbância foi mensurada a 480 nm em um intervalo de 180 segundos. A atividade enzimática foi expressa em U/mg de proteína.

4.2.11 Ensaio da atividade da Catalase

A Catalase é uma enzima antioxidante que catalisa a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Na reação, a molécula de peróxido de hidrogênio é oxidada a oxigênio molecular (formação de O_2) e também é reduzida à água. Esse método mede a atividade da enzima produzida pelas células em resposta a quantidade determinada de H_2O_2 . Para a reação, foram utilizadas alíquotas de 60 μL de homogeneizado de pulmão em cubetas de quartzo. Em cada cubeta foi adicionado 1940 μL de tampão PBS 1x com peróxido de hidrogênio (25 μL de tampão para 40 μL de H_2O_2). Esses componentes foram homogeneizados com auxílio de pipeta semiautomática e a leitura foi realizada a 240 nm nos tempos 0, 30 e 60 segundos (AEBI, 1984). A atividade enzimática foi expressa em U/ mg de proteína.

4.2.12 Análise da Lipoperoxidação (LPO)

A produção de hidroperóxidos lipídicos foi avaliada realizando-se o método FOX (Ferrus Oxidation / Xilenol Orange Method) o qual utiliza o princípio da oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos em condições ácidas com formação de um complexo Fe^{+3} – laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilato (BHT) (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992). Para tanto, o sobrenadante obtido a partir da centrifugação do homogeneizado de pulmão foi ressuspenso em metanol PA na proporção 1:2 (volume/volume), sonificado durante 1 minuto, e centrifugado por 10 minutos a 10.000 x g a 4°C. Posteriormente, 30 μL do sobrenadante resultante foi pipetado em microplacas de 96 poços e incubado por

aproximadamente 30 minutos com solução de reação (metanol grau HPLC 90% do volume final, ácido sulfúrico 25 mM, hidroxitolueno butilado 4 mM, sulfato ferroso amoniacal 250 µM, e laranja de xilenol 1 mM). Três replicas de cada amostra foram lidas a 570 nm, no espectrofotômetro de microplacas Benchmark plus (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.2.13 Razão glutaciona reduzida/glutaciona oxidada (GSH/GSSG)

A razão GSH/GSSG é considerada um marcador de estresse oxidativo (JONES, 2006). Esse ensaio é baseado na reação da GSH ou GSSG com 5,5'-ditiobis-(2- ácido nitrobenzóico) (DTNB) que produz o 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB) (RAHMAN; KODE; BISWAS, 2006). Para determinar GSSG, amostras de homogeneizados de pulmão foram tratadas previamente com 2-vinilpiridina, que reage covalentemente com GSH (mas não com GSSG). O excesso de 2-vinilpiridina é neutralizado com trietanolamina. A taxa de formação de TNB, mensurada espectrofotometricamente, é proporcional à concentração de GSH ou GSSG na amostra. A concentração de uma amostra conhecida é determinada pelo cálculo de uma regressão linear gerada a partir de uma curva padrão de GSH ou GSSG. Alíquotas de homogeneizado de pulmão foram tratadas com ácido sulfossalicílico na proporção de 1:1, e centrifugadas a 2000 RPM por 10 min. Os ensaios foram realizados separadamente e utilizaram 200 µL do sobrenadante para leitura da GSH e 200 µL para leitura de GSSG. Em seguida, as amostras para a GSSG foram incubadas por 60 min com 4 µL de 2-vinilpiridina e em seguida tratadas com 65 µL de trietanolamina, afim de ajustar o pH entre 6,0-7,0. Após o preparo das amostras, as leituras foram realizadas adicionando-se 1.400 µL tampão fosfato de potássio (KPE), 200 µL de amostra, 120 µL de DTNB, 120 µL de glutaciona redutase (GR) e 120 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo-fosfato (NADPH). A mistura foi homogeneizada e a absorbância mensurada em espectrofotômetro (Amersham - Biosciences mod Ultrospec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer, Inglaterra) a 412 nm, em um tempo de 120 seg, com intervalos de 30 seg.

4.2.14 Ensaio da capacidade total antioxidante por DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil)

O DPPH é um radical livre que pode ser obtido dissolvendo-se o reagente em meio orgânico. Esse método consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil –1 – picril – hidrazila - DPPH, possuindo coloração púrpura

que absorve em 517 nm. Quando há ação de um antioxidante (AH) o DPPH radical é reduzido obtendo-se o composto difenil-picril-hidrazila, de cor amarela, o que se traduz em decréscimo da absorbância. A capacidade antioxidante foi determinada através da redução do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) pela atuação antioxidante dos compostos do homegeneizado, método proposto por BRAND-WILLIAMS e colaboradores (1995) com modificações. Para tanto, foi preparada uma solução metanólica de DPPH (0,05 nM) acrescentando-se 250 μ L em cada cavidade utilizada de uma microplaca de poliestireno com 96 poços (Costar, Cambridge, MA). Foram adicionados 50 μ L de trolox para curva-padrão e o mesmo volume para o homogeneizado obtido da amostra. As leituras foram realizadas em absorbância de 517 nm no tempo zero e após 20 minutos utilizando-se espectrofotômetro de microplacas Benchmark plus (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA).

4.2.15 Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. As análises dos dados paramétricos (leucócitos totais, polimorfonucleares, mononucleares, MCP-1, KC, ROS, FOX, SOD, CAT, MPO, razão GSH/ GSSG, nitrito e DPPH foram realizadas pelo teste de variância one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). O software *Graphpad Prism* foi utilizado para realizar as análises estatísticas (*GraphPad Prism* versão 5.0, São Diego, CA, EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos das estatinas na histologia do pulmão

Cortes histológicos de pulmão corados com Hematoxilina e Eosina foram observados em microscopia de ótica para determinar a ação das quatro diferentes estatinas contra a fumaça de cigarros no pulmão. Os cortes histológicos foram feitos utilizando-se o pulmão esquerdo (n= 10 por grupo). O grupo controle, exposto ao ar ambiente, apresentou características de pulmão normal com raros macrófagos alveolares ocasionais e septos finos (figura a). Cinco dias após exposição à fumaça de cigarros, o grupo IFC apresentou maior influxo celular no parênquima pulmonar, mas com septos alveolares finos e sem destruição (figura b). Já os grupos que receberam atorvastatina e pravastatina e foram expostos à fumaça de cigarros por 5 dias apresentaram-se semelhantes ao grupo IFC (figuras c e d). Enquanto os grupos que receberam pravastatina e simvastatina apresentaram características de um pulmão normal com pouco influxo celular e septos alveolares finos não destruídos, semelhantes ao controle (figuras e e f).

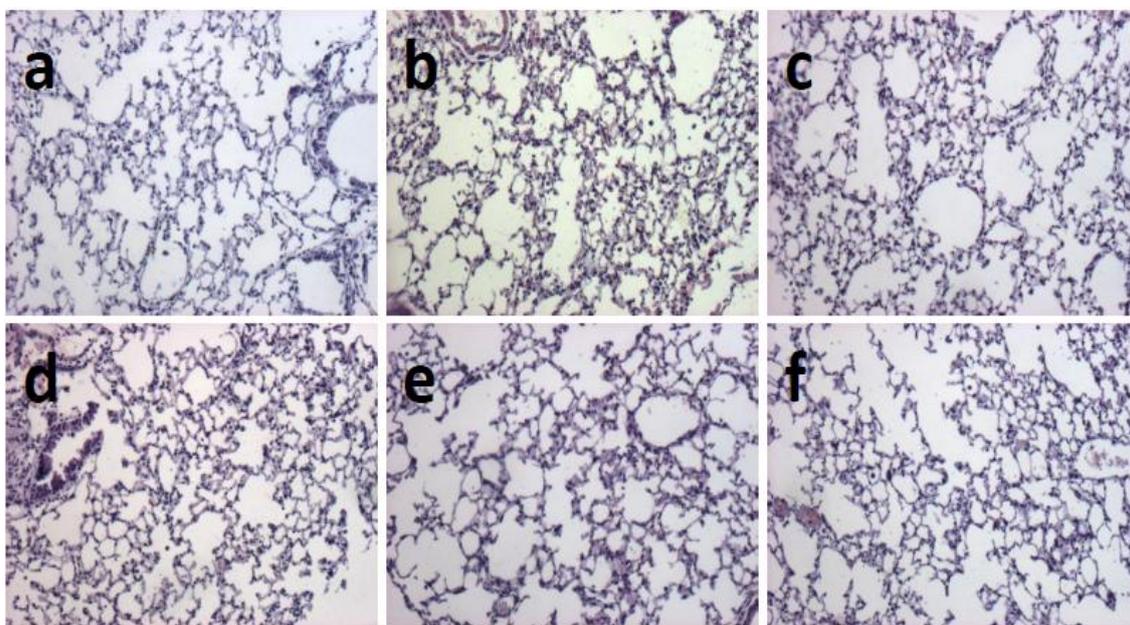


Figura 5: Fotomicrografias de pulmão após coloração com hematoxilina-eosina. a) grupo Controle: alvéolos com áreas uniformes e septos finos. b) Grupo inalação de fumaça de cigarro (IFC): parênquima pulmonar com grande influxo celular; septos finos e sem destruição. c e d) Grupos IFC + A, IFC + P parênquima pulmonar semelhante ao grupo IFC. e e f) IFC + R, IFC+ S respectivamente: alvéolos com áreas uniformes; baixo influxo celular e septos finos não destruídos (semelhante ao grupo controle).

5.2 Morfometria

O número de leucócitos totais alveolares, células mononucleares e polimorfonucleares foi contado em 10 diferentes campos por corte histológico de tecido pulmonar corado com hematoxilina-eosina sob aumento de 1000 x (Figura 6). A quantificação do número total de leucócitos revelou aumento de 78 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle. Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução de 27 % em IFC + A, 30 % em IFC + P, 37 % em IFC + R e 30 % em IFC + S quando comparados com o grupo IFC.

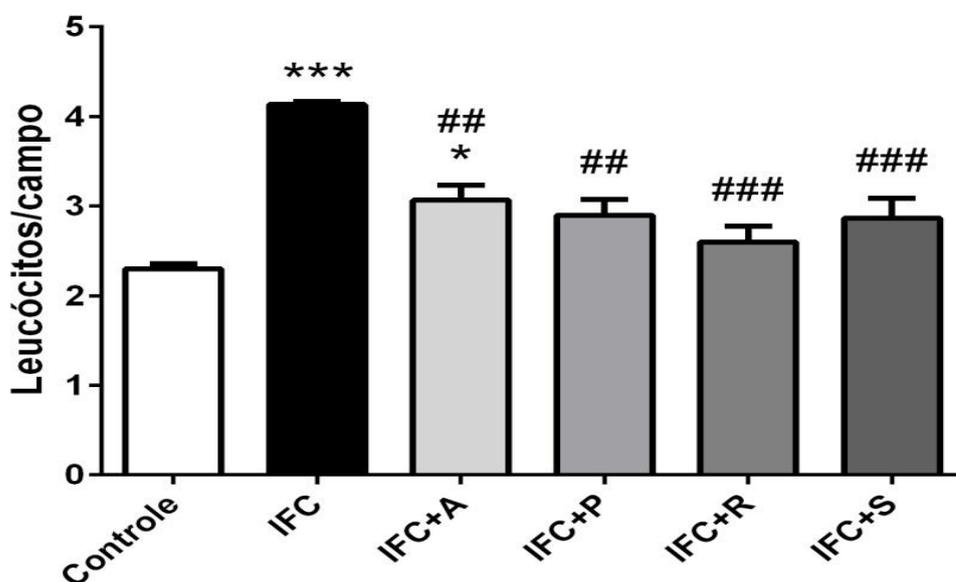


Figura 6: Morfometria do número total de leucócitos alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A quantificação do número total de células mononucleares revelou aumento de 78 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 7). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução de 34 % em IFC + A, 38 % em IFC + P, 29 % em IFC + R e 34 % em IFC + S quando comparados com o grupo IFC.

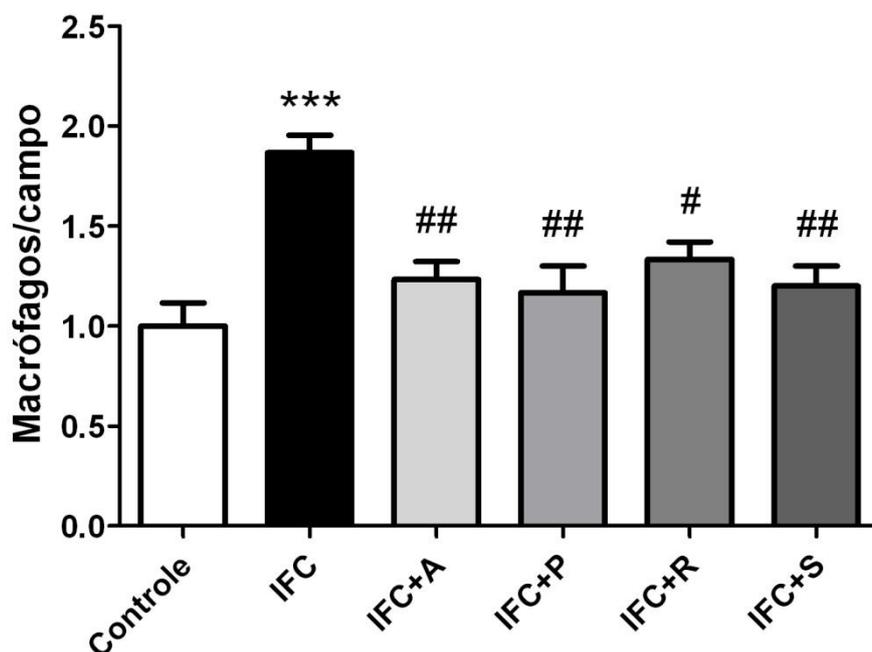


Figura 7: Morfometria do número total de macrófagos alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A quantificação do número total de células polimorfonucleares revelou aumento de 173 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 8). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução de 24 % em IFC + P, 45 % em IFC + R e 27 % em IFC + S quando comparados com o grupo IFC.

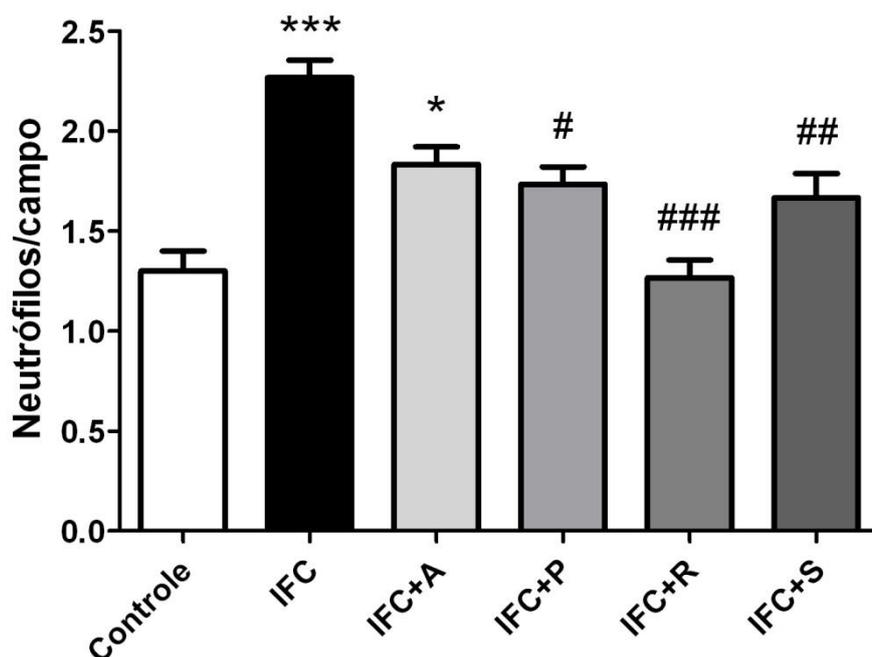


Figura 8: Morfometria do número de polimorfonucleares alveolares em lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$.

5.3 Efeitos das estatinas nos marcadores pró-inflamatórios

Os níveis dos marcadores pró-inflamatórios proteína quimiotática de monócitos – 1 (MCP-1) e quimiocina derivada de queratinócito murino (KC) foram analisados pelo método de ELISA e os níveis de nitrito e de mieloperoxidase por técnicas já citadas anteriormente. A análise dos níveis de MCP-1 revelou aumento de 5 vezes no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 9). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução somente nos grupos IFC + R (60 %) e IFC + S (61 %) quando comparados com o grupo IFC. Interessantemente os grupos IFC + A e IFC + P apresentaram níveis de MCP-1 maiores do que o grupo CS, 2 vezes e 1,5 vezes, respectivamente.

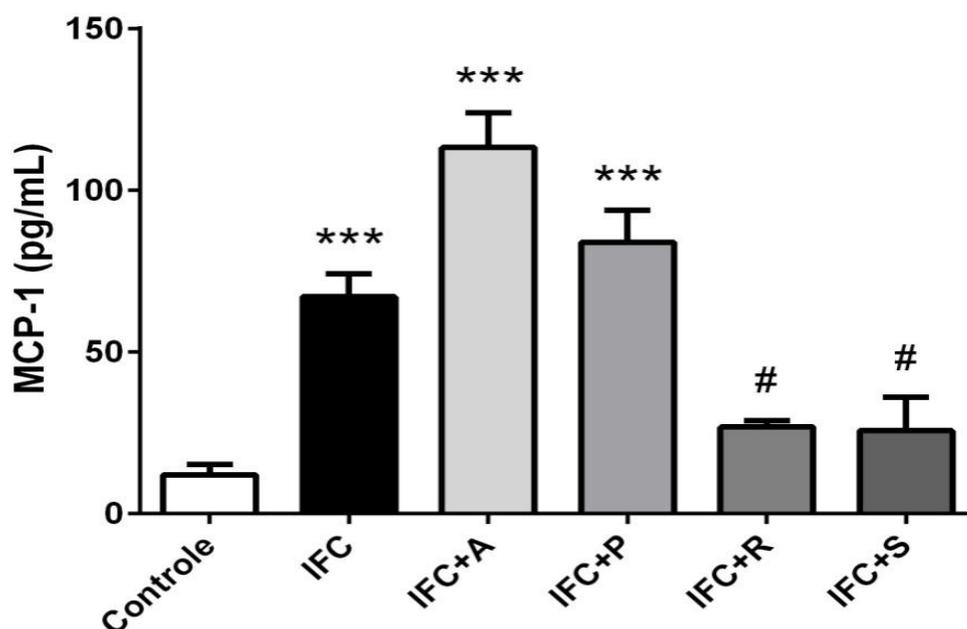


Figura 9: Análise dos níveis de MCP-1 (pg/mL) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A análise dos níveis de KC revelou aumento de 163 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 10). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução de 46 % em IFC + A, 45 % em IFC + P, 56 % e em IFC + R quando comparados com o grupo IFC. Interessantemente, os níveis de KC no grupo IFC + S foram aproximadamente 2 vezes maior quando comparados ao controle.

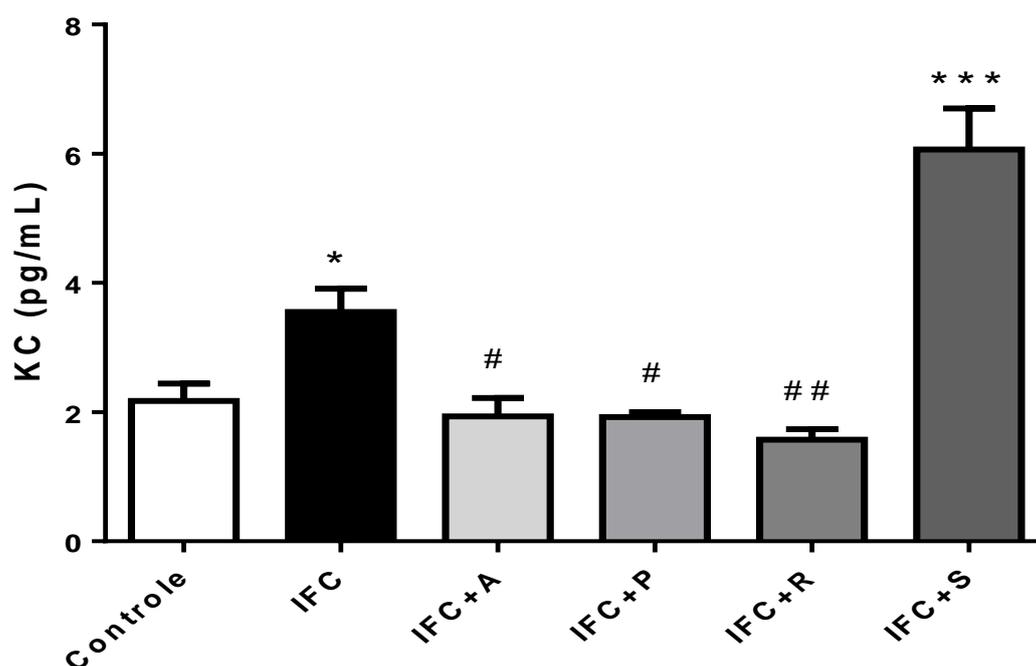


Figura 10: Análise dos níveis de KC (pg/mL) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A análise dos níveis de nitrito revelou aumento de 187 % no grupo IFC quando comparado com o grupo controle (Figura 12). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução somente nos grupos IFC + P (80 %), IFC + R (46 %) e IFC + S (46 %) quando comparados com o grupo IFC. O grupo IFC + A revelou níveis de nitrito similares ao grupo IFC.

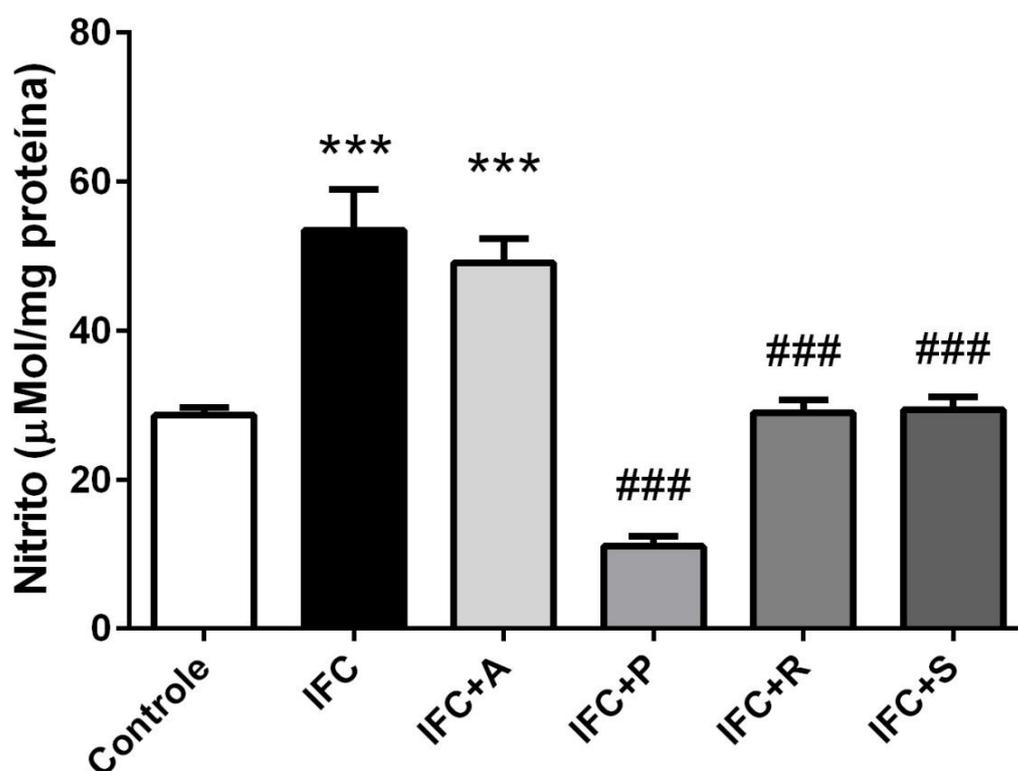


Figura 11: Análise dos níveis de Nitrito ($\mu\text{Mol/mg}$ proteína) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. ## $p < 0,01$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

5.4 Efeitos das estatinas nos marcadores Redox

Os níveis dos marcadores ERO e hidroperóxidos foram avaliados colorimetricamente em microplacas de 96 poços, enquanto a atividade das enzimas SOD e CAT em espectrofotômetro (Figura 13). A análise dos níveis de ROS revelou aumento de 203 % no grupo IFC quando comparado com o grupo controle. Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução somente nos grupos, IFC + R (38 %) e IFC + S (32 %) quando comparados com o grupo IFC. Os grupos IFC + A e IFC + P revelaram níveis de ROS similares ao grupo IFC.

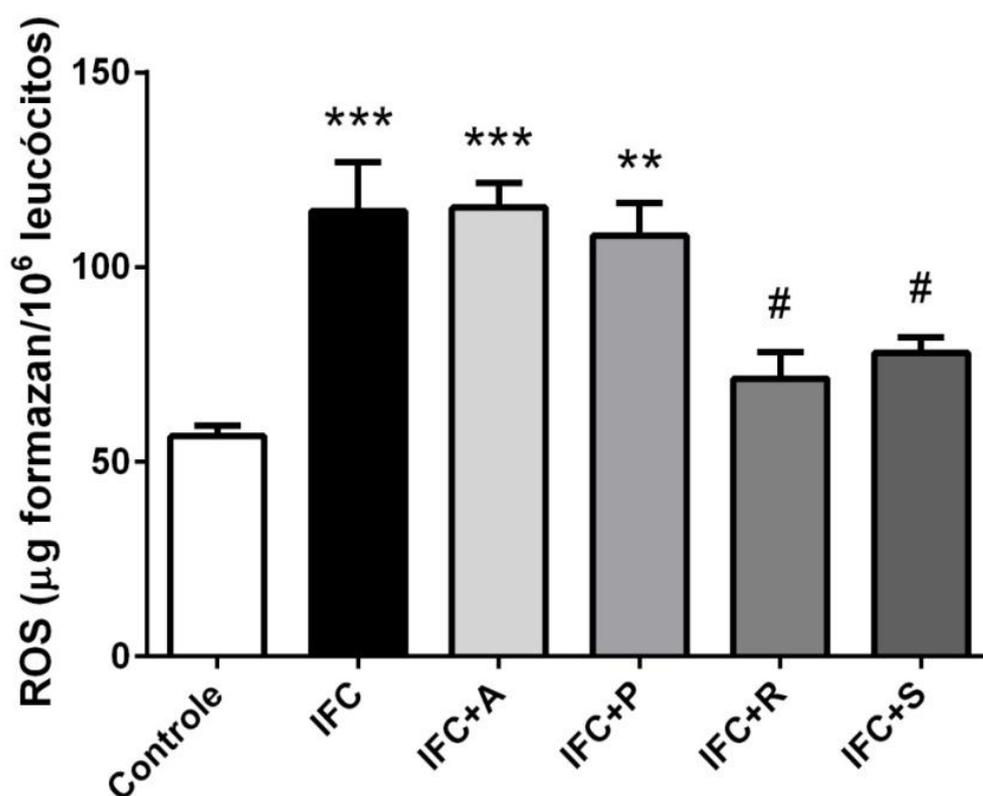


Figura 12: Análise dos níveis de ROS ($\mu\text{g formazan}/10^6$ leucócitos) em lavado broncoalveolar de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado ao controle. # $p < 0,05$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A análise da atividade da enzima SOD revelou aumento de 310 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 14). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução de 73 % em IFC + A, 88 % em IFC + P, 44 % em IFC + R e 63 % em IFC + S quando comparados com o grupo IFC.

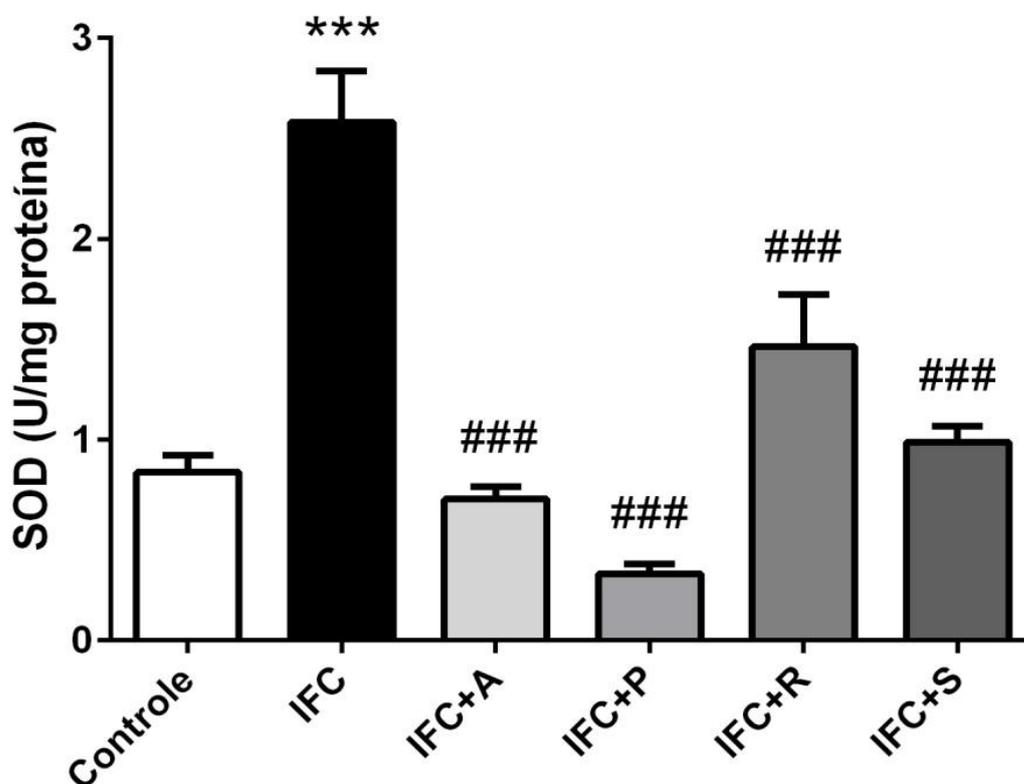


Figura 13: Análise da atividade da SOD (U/mg proteína) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$ comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

Apesar disso, a análise da atividade a enzima CAT revelou aumento de 207 % no grupo IFC quando comparado ao grupo controle (Figura 15). A atividade da CAT foi reduzida somente no grupo IFC + S (56 %) quando comparado com o grupo IFC. Interessantemente, a atividade da CAT revelou aumento de 117 % no grupo IFC + P e 113 % no grupo IFC + R quando comparado ao grupo IFC.

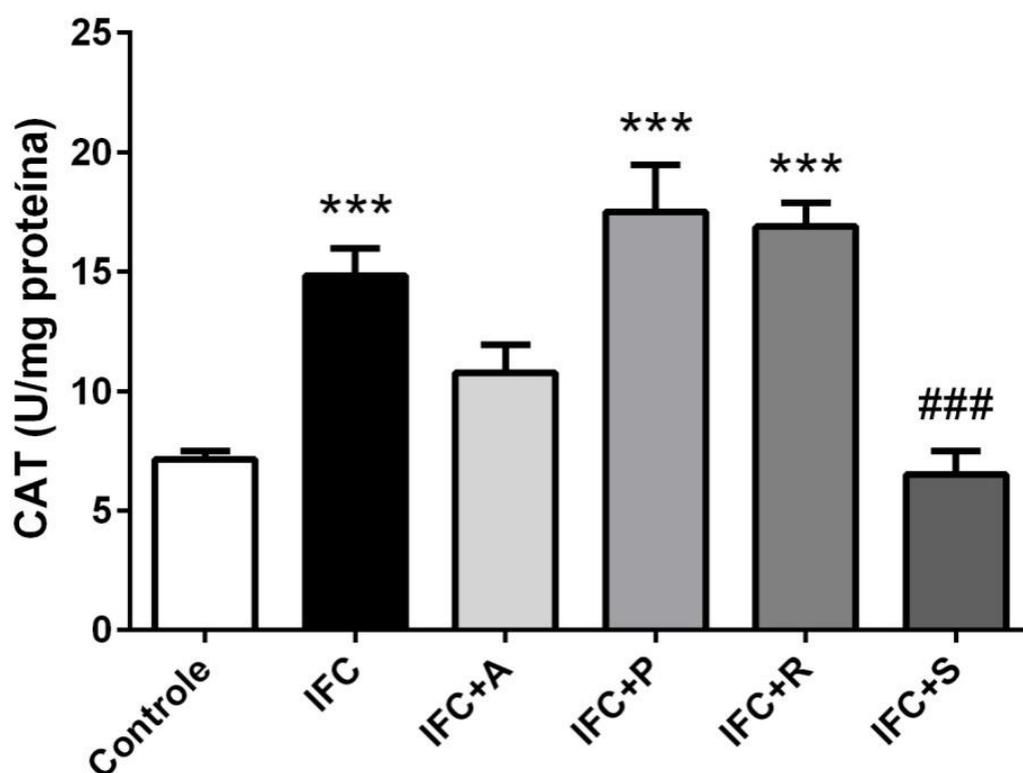


Figura 14: Análise da atividade da CAT (U/mg proteína) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam: *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle ### $p < 0,001$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A análise dos níveis hidroperóxidos revelou aumento de 155 % no grupo IFC quando comparado com o grupo controle (Figura 16). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se redução nos grupos, IFC + A (48 %), IFC + R (43 %) e IFC + S (45 %) quando comparados com o grupo IFC. O grupo IFC + P revelou níveis de hidroperóxidos similares ao grupo IFC.

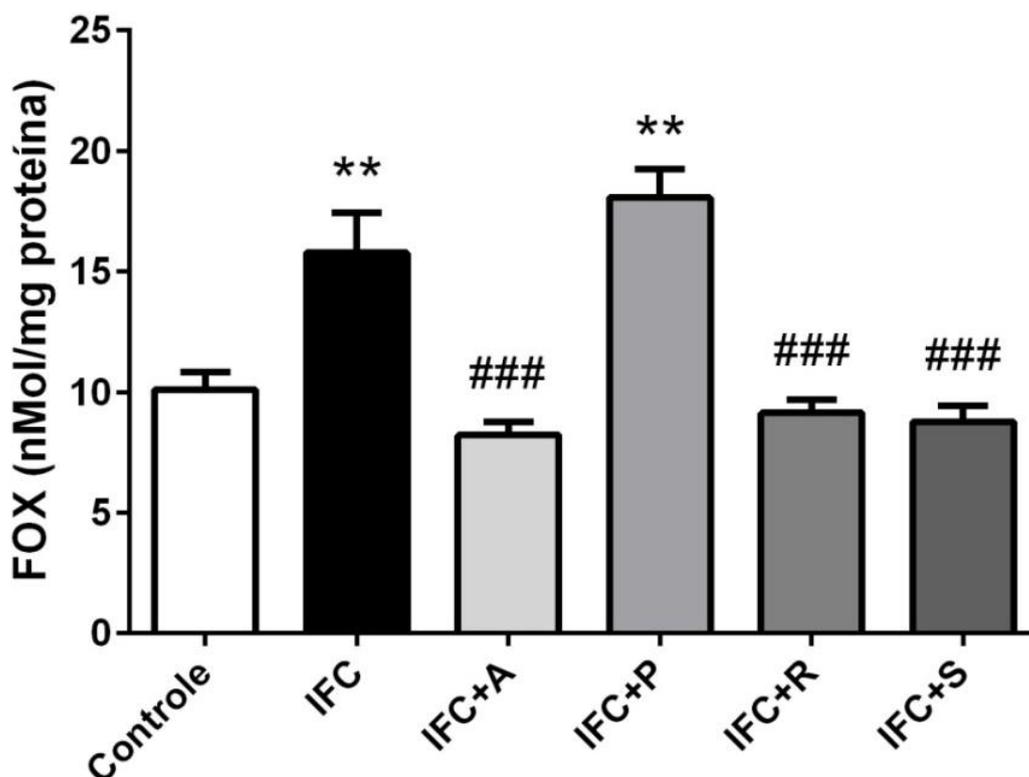


Figura 15: Análise dos níveis de hidroperóxidos (nMol/ mg proteínas) em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam: ** $p < 0,01$, comparado ao grupo controle. ### $p < 0,001$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

5.5 Efeitos das estatinas nos marcadores antioxidantes

Os níveis de GSH e GSSG foram avaliados por análise em espectrofotômetro, enquanto os níveis de DPPH foram avaliados por leitura em placa de 96 poços (Figura 17). A análise da razão GSH/ GSSG revelou redução de 51 % no grupo IFC quando comparado com o grupo controle. Já nos grupos que receberam tratamento com as estatinas observou-se aumento de 173 % em IFC + A, 197 % em IFC + P, 200 em IFC + R e 333 % em IFC + S quando comparados ao grupo IFC.

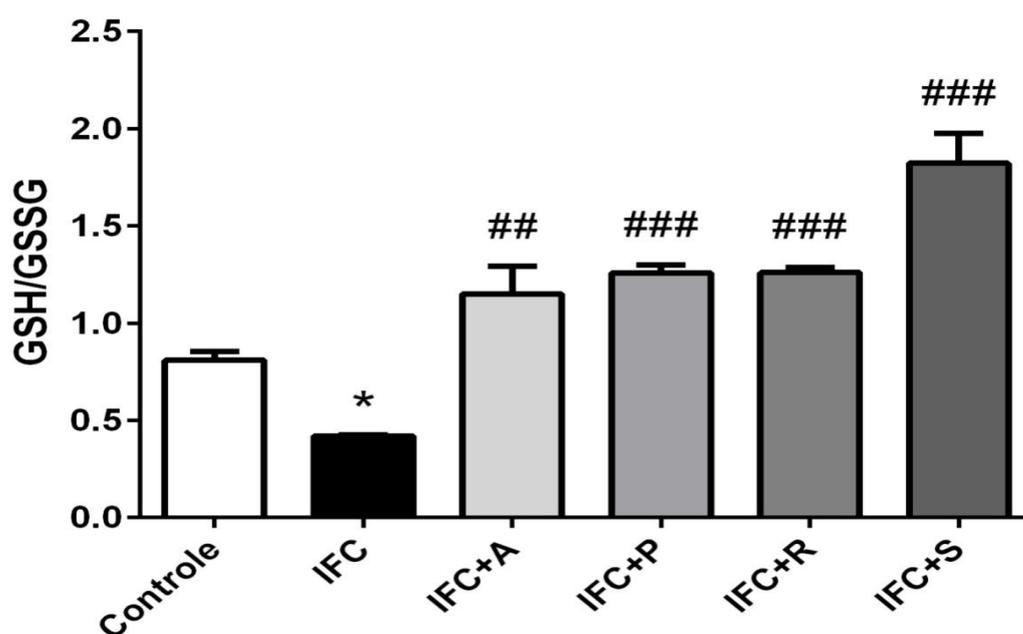


Figura 16: Análise da razão GSH/GSSG em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam : * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle. ### $p < 0,001$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A análise da capacidade total antioxidante medida pela reação com o radical DPPH revelou redução de 78 % no grupo IFC quando comparado com o grupo controle (Figura 18). Já nos grupos que receberam tratamento com estatinas observou-se aumento de 53 % em IFC + A, 34 % em IFC + R e 45 % em IFC + S quando comparado com o grupo IFC. O grupo IFC + P revelou valores similares ao grupo IFC.

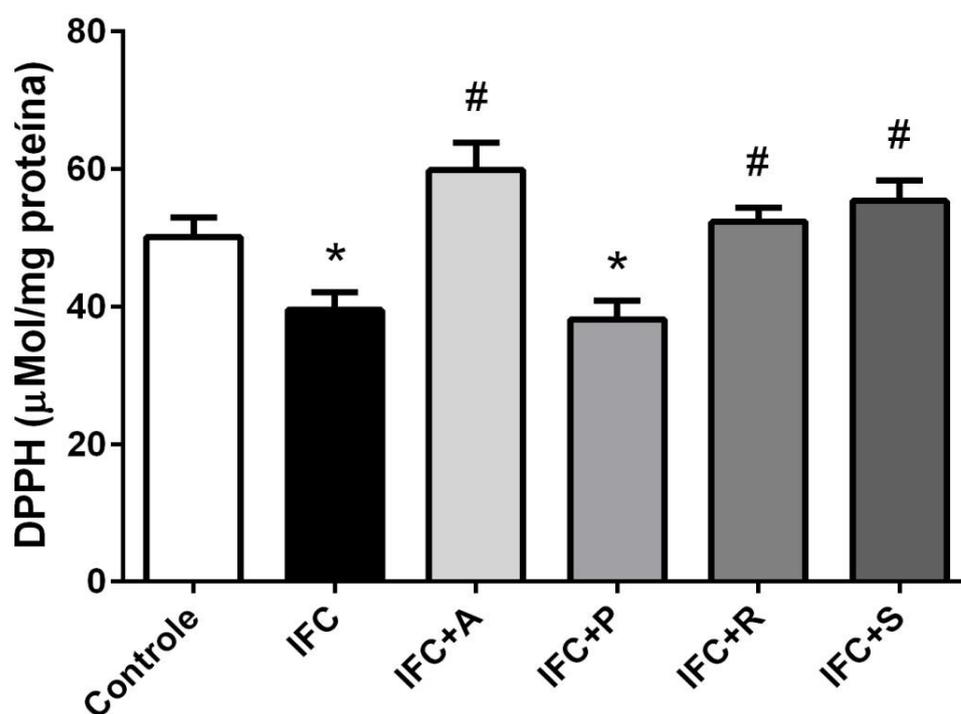


Figura 17: Análise da capacidade total antioxidante pelo radical DPPH em homogeneizado de pulmão. Apresentação de seis grupos experimentais: Controle, IFC, IFC + A, IFC + P, IFC + R e IFC + S. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam: * $p < 0,05$, comparado ao grupo controle. # $p < 0,05$, comparado ao grupo IFC (inalação da fumaça de cigarro).

A tabela abaixo mostra um resumo das análises bioquímicas entre o grupo IFC comparado com os grupos IFC tratados com as diferentes estatinas e suas respectivas diferenças estatísticas.

Tabela 1. Tabela de análises bioquímicas

Ensaio	Objetivo	IFC	IFC+A	IFC+P	IFC+R	IFC+S
MCP-1	Recrutamento de monócitos	↑	↑↑		↓	↓
KC	Recrutamento de neutrófilos	↑	↓	↓	↓↓	
Nitrite	Óxido nítrico	↑↑↑		↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
ROS	Espécies reativas de oxigênio (principalmente ânion superóxido)	↑↑↑			↓	↓
SOD	Defesa antioxidante, principalmente contra anion superóxido	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓
CAT	Defesa antioxidante, principalmente contra peróxido de hidrogênio	↑↑↑				↓↓↓
GSH/GSSG	Indicativo de estresse oxidativo	↓	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
DPPH	Estado antioxidante potencial	↓	↑		↑	↑
FOX	Peroxidação lipídica (dano oxidativo)	↑↑	↓↓↓		↓↓↓	↓↓↓

Tabela 1: Tabela comparativa entre os grupos tratados com estatinas X grupo FC. MCP-1, proteína quiniotática de monócitos; KC, proteína derivada de queratinócito murino quimiocina (homologia funcional de IL-8); ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; DPPH, radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; e FOX, hidroperóxidos. Os dados foram expressos como média ± SEM e foram analisadas pelo teste one-way ANOVA seguido pelo pos teste de bonferroni, com nível de significância de 5%. ↓ Redução em relação ao controle. ↑ Aumento em relação ao controle. ↓ Redução em relação ao IFC. ↑ Aumento em relação ao IFC. ↑ p<0.05, ↑↑ p<0.01 e ↑↑↑ p<0.001 quando

comparado com o grupo controle. \uparrow $p < 0.05$, $\uparrow\uparrow$ $p < 0.01$ e $p < 0.001$ quando comparado com o grupo IFC. Todas as análises, exceto ROS, foram realizadas a partir de tecido pulmonar. N = 10 para todas as análises.

6. DISCUSSÃO

Esse estudo mostrou pela primeira vez que as estatinas exercem alguns efeitos benéficos contra a inflamação e o estresse oxidativo causado pela FC em camundongos. Analisando-se os dados, pode-se perceber que o tratamento com rosuvastatina foi a melhor opção entre as estatinas utilizadas no tratamento da IPA induzida pela FC, pois reduziu significativamente os marcadores pró-inflamatórios e de estresse oxidativo, sendo sua única exceção atividade da enzima CAT, que estava aumentada em relação ao grupo controle. Estudos anteriores mostraram um potencial antiinflamatório e antioxidante do uso de estatinas (WANG, 2008; ZHU, 2012, KIM, 2007; HEEBA, 2009), mas o papel das estatinas na IPA induzida pela FC ainda não estava bem esclarecido. Os resultados encontrados estão de acordo com outros estudos do nosso grupo nos quais a curta exposição à FC causa um aumento do número de células inflamatórias pulmonares com um aumento correspondente da peroxidação lipídica (que provavelmente resultou da ação de ERO) e o aumento de marcadores redox (LANZETTI, 2008; VALENCA, 2009; MOURA, 2012).

O recrutamento de leucócitos no pulmão é um processo que leva em consideração algumas etapas como ativação celular, adesão firme ao endotélio, seguida de migração transendotelial e transepitelial (Reutersan, 2005). Esse processo pode ser desencadeado pela ação de ROS presentes na fumaça de cigarros ou produzidos por células MN e PMN com ativação de fatores de transcrição como NFkB e AP-1 que estimulam a produção de quimiocinas. Essas uma vez ligadas a receptores específicos atraem células como macrófagos e neutrófilos para os pulmões além de promoverem a expressão de moléculas de adesão possibilitando a migração das células para o sitio lesado (RAHMAN e ADCOCK, 2006; BHALLA, 2009). Nós observamos que em comparação com o grupo FC, o grupo FC+A reduziu o número de leucócitos totais, MN e os níveis de KC, mas não reduziu o número de PMN e de MCP-1. O surpreendente aumento de MCP-1 seguido da redução do número de MN se deve provavelmente à ação sistêmica da Atorvastatina em reduzir a expressão de receptores como CCR2 e moléculas de adesão como ICAM e VCAM pelos monócitos e macrófagos impedindo a ativação e a migração para o sitio inflamatório (FILDES, 2008; TEUPSER, 2001; MONTECUCCO, 2009). Essa hipótese pode ser corroborada pelo fato de atorvastatina atuar impedindo a formação do mevalonato, fundamental na via de

prenilação que ativa farnesilfosfato e geranylgeranyl fosfato, que uma vez ausentes, reduzem a expressão de CCR2 bem como a expressão de moléculas de adesão (VEILLARD, 2006). Já o aumento do número de neutrófilos e a diminuição de KC observados podem ser explicados pelo fato dessa ou outras quimiocinas não serem o único tipo de moléculas quimioatrativos para neutrófilos. Nesse contexto, eicosanóides como o LTB₄ são produzidos precocemente em relação às quimiocinas e possuem um tempo de meia-vida curto, apresentando um importante papel de quimioatração para neutrófilos (MCDONALD, 1992; SADICK, 2011). Além disso, altas doses de atorvastatina não foram capazes de impedir a formação de LTB₄ de neutrófilos (LYSGAARD, 2012). Adicionalmente, foram avaliados os níveis de NO que se estima ser produzido em reações inflamatórias de injúria pulmonar pela iNOS através de ativação celular apresentou-se aumentado (CHEN, 2001; ZHAO, 2009). Estudos anteriores sugerem que o aumento de NO pode ter acontecido pela ação de LTB₄ que aumenta os níveis de NO provavelmente pela ativação de iNOS observado em trabalhos com animais CXCL1^{-/-} (BATRA, 2012).

Para investigar os efeitos das estatinas no estresse oxidativo pulmonar induzido pela fumaça de cigarro, foram determinados os níveis de ROS nos leucócitos do LBA. Observou-se aumento dos níveis de ROS no grupo FC e somente os grupos rosuvastatina e simvastatina apresentaram redução dos níveis de ROS. Macrófagos e neutrófilos ativados pela FC geram ROS pela ação da NADPH oxidase (DODD; PEARSE, 2000; XIANG, 2010), contudo, tem sido demonstrado que as estatinas reduzem a ativação de NADPH oxidase em macrófagos e em endotélio (TERBLANCHE, 2007; CHEN, 2008). Ainda nesse contexto, as estatinas preveniram a ação de Rac-1, a qual se liga ao p67phox e conduz a ativação do sistema NADPH oxidase para aumentar a geração de ROS (WANG, 2008). Adicionalmente, por aumentar os níveis de ROS no grupo FC, a resposta natural das células é aumentar a atividade das enzimas antioxidantes para equilibrar o estado redox. Por isso, foi observado um aumento na atividade da SOD e da CAT no grupo FC. Já nos grupos estatinas, todos apresentaram redução da atividade da SOD, mas somente o grupo tratado com simvastatina apresentou redução da atividade da CAT.

Assim, em relação à redução observada da SOD nos grupos especulou-se que as estatinas pudessem talvez ter reduzido a atividade da enzima NADPH oxidase diminuindo conseqüentemente as concentrações de ânion superóxido. Ao

reduzi-lo não haveria o excessivo estímulo gerado pela FC e necessário à superprodução de SOD como defesa antioxidante. Já em relação ao aumento da atividade de CAT observada, especulou-se que o dano oxidativo causado pelo peróxido de hidrogênio pode ser mais prejudicial às estruturas biológicas do que ânion superóxido. Essa hipótese tem sido sugerida por outros autores (BARGAGLI, 2009; WARD, 2010) que concordam com a ideia de que o ânion superóxido é rapidamente reduzido, enquanto peróxido de hidrogênio é mais estável e pode cruzar as membranas celulares. Nessa perspectiva, a capacidade das estatinas prevenirem a produção de peróxido de hidrogênio é mais importante do que a capacidade de prevenir a produção de ânion superóxido. Assim, considerando os resultados a respeito de SOD e CAT, o uso sinvastatina aponta para o combate à ação tanto de ânion superóxido quanto de peróxido de hidrogênio.

O dano oxidativo pode ser avaliado pela peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e oxidação do DNA (CHOW, 1993; Paz-Elizur, 2005). Para investigar o dano oxidativo e o potencial impedimento dessa injúria pelas estatinas, os hidroperóxidos totais foram analisados pelo método de FOX. A escolha dessa análise se deve ao fato das membranas celulares serem a primeira barreira contra o estresse oxidativo gerado pela FC ou pelas células inflamatórias (PRYOR, 1993; Kovala-Demertzi, 2009; KIM, 2007; CHOW, 1993). Assim, foi observado aumento dos níveis de FOX no grupo FC pela ação de moléculas e substâncias pró-oxidantes. Logo, todos os grupos tratados com estatinas (exceto pravastatina) foram capazes de reduzir os níveis de hidroperóxidos (FOX) em camundongos expostos a FC. Assim, especulou-se que as estatinas atuaram impedindo a ação de agentes pró-oxidantes da FC nas membranas de células pulmonares. Nesse sentido, outros estudos mostraram dados de redução da peroxidação lipídica pelo tratamento também com estatinas (Al-Shabrawey, 2008; RAID, 2009). Em relação ao dado encontrado no grupo FC + P, talvez o uso de uma dose diferente pudesse trazer o efeito observado nos outros grupos.

Finalmente, para investigar o efeito das estatinas na capacidade antioxidante total, foi avaliada tanto a razão GSH/GSSG em amostras de pulmão quanto a capacidade antioxidante total das amostras de pulmão utilizando DPPH. Como a GSH é o mais importante antioxidante não enzimático nos pulmões pode ser usada como um indicador de estresse oxidativo (RAHMAN; ADCOCK, 2006; RAHMAN;

KODE; BISWAS, 2006). Todos os tratamentos com estatinas aumentaram a razão GSH/GSSG em camundongos quando comparados com o grupo FC. Esses resultados sugerem que as estatinas preservam a redução GSH ou a produção de GSSG, possivelmente por impedirem a ação de agentes oxidantes da FC que reagiriam com GSH levando ao estado GSSG. Adicionalmente, os valores de DPPH analisados nos pulmões de camundongos foram restaurados em todos os grupos tratados, exceto pravastatina. Esse dado sugere ótima ação das estatinas contra o radical DPPH e dá indícios de que a redução da produção de hidroperóxidos vista anteriormente se deve à reação de substâncias oxidantes com as estatinas.

Nesse estudo, utilizaram-se quatro diferentes estatinas: atorvastatina que é lipofílica e sintética; pravastatina que é hidrofílica e derivada de fermentação; rosuvastatina que é hidrofílica e sintética e sinvastatina que é lipofílica e derivada de fermentação (WANG, 2008; MARON, 2000; TERBLANCHE, 2007). Como pode ser observado na tabela 1, todas as estatinas reduziram pelo menos dois dos marcadores pró-inflamatórios testados e dois dos marcadores de estresse oxidativo testados. Contudo, enquanto sinvastatina apresentou os melhores resultados antioxidantes, rosuvastatina apresentou a melhor ação contra o estresse oxidativo e a inflamação pulmonar aguda induzida pela fumaça de cigarro.

7. CONCLUSÃO

Assim, esse estudo mostrou pela primeira vez que na comparação de quatro diferentes estatinas rosuvastatina foi a melhor escolha entre as testadas por conter a inflamação pulmonar causada pela exposição à FC em camundongos, enquanto a sinvastatina foi a melhor escolha por conter o estresse oxidativo pulmonar nas mesmas condições. Contudo, não se pode dissociar inflamação de estresse oxidativo nesse modelo experimental de IPA causada pela FC, pois esses efeitos são complementares. Logo, nós sugerimos, observando-se todos os resultados, que rosuvastatina foi o melhor fármaco para nosso modelo experimental, pois conseguiu atenuar ambos os parâmetros de inflamação e estresse oxidativo. Nesse sentido, os efeitos terapêuticos de Rosuvastatina devem ser testados em um estudo em longo prazo com fumaça de cigarro para que sejam avaliados no enfisema pulmonar. Infelizmente, na atualidade, ainda não existe fármaco para o tratamento dessa doença. No entanto, a ação de rosuvastatina observada em nosso trabalho a credencia como uma possível nova alternativa ao combate das doenças inflamatórias causadas pela FC. Nessa perspectiva, Rosuvastatina poderá no futuro ser utilizada não somente como um fármaco hipocolesterolêmico, mas também no combate às doenças inflamatórias e ligadas o estresse oxidativo relacionadas a fumaça de cigarros.

8. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods enzymology*, v.105, p. 121 – 126, 1984.

AL-SHABRAWAY, M. *et al.* Role of NADPH oxidase and Stat3 in statin-mediated protection against diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* v. 49, p. 3231-3238; 2008.

ANDRADE JR, D. R. *et al.* Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Journal of Brazilian Pneumology*, v.31, p.60-68. 2005.

ANVISA, Dislipidemia. *Saúde e economia*, Ano III, n 6, p. 1 – 4, 2011.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol*, v. 16, n. 1, p. 42-7, 2004.

BATRA, S, *et al.* Intrapulmonary administration of leukotriene B(4) augments neutrophil accumulation and responses in the lung to Klebsiella infection in CXCL1 knockout mice. *J Immunol*;188(7):3458-68, 2012.

BHALLA DK, *et al.* Cigarette smoke, inflammation, and lung injury: a mechanistic perspective *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.*;12(1):45-64 2009.

BALASUBRAMANIAN, V. P. e VARKEY, B.. Chronic obstructive pulmonary disease: effects beyond the lungs. *Curr Opin Pulm Med*, v.12, n.2, Mar, p.106-12. 2006.

BANNISTER, J.; CALABRESE, L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal*, v. 32, p. 279 – 312, 1987.

BARGAGLI, E. Oxidative stress in the pathogenesis of diffuse lung diseases: a review. *Respir Med* v. 103, p. 1245-1256; 2009.

BARTOSZ G., Reactive oxygen species: destroyers or messengers?, *Biochem Pharmacol*, v. 77, n 8, p. 1303 – 15, 2009.

BARREIROS, A. L. B. S. D., J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v.29, n.1, p.113-123. 2006.

BERGEN, A.W.; CAPORASO, N. Cigarette smoking. *J Natl Cancer Inst*, v. 91, n. 16, p. 1365-75, 1999.

BEZERRA, F. *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse, *Nutrition* v. 22, n.11, p. 1192–1201, 2006.

BONNEFOY, M. *et al.* Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. *Presse Medicale*, v. 31, n. 25, p. 1174-1184, 2002.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, n., p. 248-54, 1976.

BRAGANZA, G. *et al.* Effects of short-term treatment with atorvastatin in smokers with asthma – a randomized controlled trial, *BMC Pulm Med* 11: 16, 2011. visita on line em 15/12/2012 . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3087704/>.

CAMPO, V., CARVALHO, I. Estatinas hipolipêmicas e novas tendências terapêuticas, *Quim Nova*, v. 30, n 2, 425 – 430, 2007.

CHARTOUMPEKIS, D. *et al.* Simvastatin lowers reactive oxygen species level by Nrf2 activation via PI3K/Akt pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* V. 28, n°396, p. 463-46, 2010

CHEN, L. W. *et. al* Inhibition of inducible nitric oxide synthase (iNOS) prevents lung neutrophil deposition and damage in burned rats. *Shock* v.15, n 2, p. 151-156; 2001.

CHEN, W. *et al* Endothelial cell barrier protection by simvastatin: GTPase regulation and NADPH oxidase inhibition. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* v. 295, n 4, p. 575-583; 2008.

CHOW, C. K. Cigarette smoking and oxidative damage in the lung. *Ann N Y Acad Sci* 686, p. 289-298,1993.

CHURG, A. *et al.* Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* v 167, n 8, 1083–1089, 2003.

DAVIGNON J.; JACOB R.; MANSON R. The antioxidante effects of statins *Coron Artery Dis*, v 15, n 5, 511 – 516, 2004.

DODD, O. J.; PEARSE, D. B. Effect of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on ischemia-reperfusion lung injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* v. 279, n 1, p. 303-312; 2000.

DWYER, T. M. Cigarette smoke-induced airway inflammation as sampled by the expired breath condensate. *Am J Med Sci*, v. 326, n. 4, p. 174-8, 2003.

EZZATI, M. e LOPEZ, A. D. Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000. *Tob Control*, v.13, n.4, p.388-95. 2004.

FILDES JE *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors deplete circulating classical and non-classical monocytes following human heart transplantation *Transp Immunol*. 19, 2, 152 – 157, 2008.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 1203-1209, 1998

GATELY, I. *Tabacco: a cultural history of how an exotic plant seduced civilization.* New York, Grove Press edition. 2001.

GROMMES, J. *et al.* Simvastatin reduces endotoxin-induced acute lung injury by decreasing neutrophil recruitment and radical formation, *PLoS One*, v.7, n 6, 1-10, 2012.

GILL, L. *et al.* Lipitor goes generic: business as usual or more big business? *Ann Intern Med* v. 156, n 12, 892-893, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, v.186, p.1-85. 1990.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE. J. *Free radicals in biology and medicine:* Oxford: Oxford University Press. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, v.1, p. 851, 2007.

HEEBA, G. *et al.* Anti-atherogenic effect of statins: role of nitric oxide, peroxynitrite and haem oxygenase-1. *Br J Pharmacol* v. 156, n 8, p.1256-1266; 2009.

HOFFMANN, D., I. HOFFMANN, *et al.* The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol*, v.14, n.7, p.767-90. 2001.

HURT, R. D. Treat tobacco dependence and "bend the trend". *Bull World Health Organ*, v.77, n.5, p.367. 1999.

KERKWEG, U. *et al.* Disruption of skeletal myocytes initiates superoxide release: contribution of NADPH oxidase. *Shock* v. 27, n 5, 552-558; 2007.

KIM, D. *et al.* Anti-inflammatory mechanism of simvastatin in mouse allergic asthma model, *Eur J Pharmacol* 557, n1, p 76- 86, 2007.

KODE, A.; YANG, S.R.; RAHMAN, I. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Respir Res*, v. 7, n., p. 132, 2006.

KONRAD, F. M.; REUTERSHAN, J. CXCR2 in acute lung injury. *Mediators Inflamm* 740987, 2012.

KOVALA-DEMERTZI, D. *et al.* Anti-inflammatory, antiproliferative, and radicals scavenging activities of tolfenamic acid and its metal complexes. *Chem Biodivers* 6: p. 948-960, 2009.

LANZETTI, M. *et al.* Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition* 24, 375–381, 2008.

LANZETTI, M. *et al.*, Mate tea ameliorates emphysema in cigarettes smoke-exposed mice. *Exp Lung Res* v. 37,n. 4 , 246 – 57, 2011.

LEE, D. *et al.* Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 172, n 8, 987–993, 2005.

LEFER, D. Statins as potent antiinflammatory drugs. *Circulation* 106: 2041-42, 2002.

LEUNG, B. *et al.* A novel anti-inflammatory role for simvastatin in inflammatory arthritis *J Immunol* v. 170, n 3, 1524-1530, 2003.

LYSGAARD C *et al.* No effect of high-dose atorvastatin on leukotriene B₄ formation from neutrophils in patients treated with coronary bypass surgery: a randomized placebo-controlled double-blinded trial with a crossover design *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*; 87(6):185-8, 2012.

JACOBSON, J. *et al.* Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* v. 288, n 6, p. 1026-1032; 2005.

JANSSON, A. H.; ERIKSSON, C.; WANG, X. Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. *Vascular Pharmacology*. V. 43, n 2, 101–111, 2005.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*. v.202, n 2, p. 384-389, 1992.

MCDONALD, PP *et al.* Activation of the human neutrophil 5-lipoxygenase by leukotriene B4. *Br. J. Pharmacol.* 107, 226–232, 1992.

MCKAY, A. *et al.* A novel anti-inflammatory role of simvastatin in a murine model of allergic asthma. *J Immunol* v. 172, n 5, 2903–2908, 2004.

MYAMOTO, S. *et al.* Singlet molecular oxygen generated from lipid hydroperoxides by the russell mechanism: studies using 18(O)-labeled linoleic acid hydroperoxide and monomol light emission measurements. *J Am Chem Soc* ,v. 125, n 20, 6172-6179. 2003.

MONTECUCCO F *et al.* Statins inhibit C-reactive protein-induced chemokine secretion, ICAM-1 upregulation and chemotaxis in adherent human monocytes *Rheumatology* 48(3):233-42, 2009.

MOURA, R. *et al.* Effects of Euterpe oleracea Mart. (ACAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse *Phytomedicine*. v. 19, n 3, 262-9, 2012.

MÜLLER, H. *et al.* Sinvsatatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care*, v.14, n 4, 2010. visita on line em 15/12/2012.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2945124/>

MUSK, A.; KLERK, N. History of tobacco and health. *Respirology*, v.8, n.3, p.286-90, 2003

NARDI, J. *O fumo brasileiro no período colonial*. Lavoura, comércio e administração. São Paulo: Brasiliense, 1996.

OGA, Z. Fundamentos de toxicologia. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo, p. 39-44, 2003.

PATCHETT, A. Natural products and design: interrelated approaches in drug discovery. *J Med Chem*, v. 45, p.5609-5616, 2002.

PARAVICINI, T. M.; TOUYZ, R. M. NADPH Oxidases, Reactive Oxygen Species, and Hypertension - Clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*; v 31, n 2, p. 170-180, 2008.

PAZ-ELIZUR, T. *et al.* Repair of the oxidative DNA damage 8-oxoguanine as a biomarker for lung cancer risk. *Câncer Biomark* v. 1, n 2-3, p. 201-205, 2005.

PRYOR, W. A.; DOOLEY, M. M.; CHURCH, D. F. Inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by gas-phase cigarette smoke. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 122, n. 2, p. 676-81, 1984.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyrate, and peroxytrite. *Ann N Y Acad Sci* v. 686, p. 12-27, 1993.

PERLSTEIN, T. S.; LEE, R. T. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.26, n.2, p.250-6, 2006.

OWEN, C. A. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* v.2, n 4,373-385, 2005.

RAHMAN, I.; ADCOCK, I. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD, *Eur Resp J*, v. 28, n 1, p. 219 – 242, 2006.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc*, v. 1, n. 6, p. 3159-65, 2006.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med*, v. 21, n. 5, p. 669-81, 1996.

RAHMAN, I.; MACNEE, W. Antioxidant Pharmacological Therapies for COPD. *Curr Opin Pharmacol* v.12,n 3, p. 256-65, 2012.

RIAD, A. *et al.* Pretreatment with statin attenuates the cardiotoxicity of Doxorubicin in mice. *Cancer Res* v.69, n 2, p.695-699; 2009.

RAKOTONIAINA *et al.* The protective effect of HMG-CoA reductase inhibitors against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in the rat might not be a class effect: comparison of pravastatin and atorvastatin. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Vol. 374, n 3, p. 195-206, 2006.

REMACLE, J. *et al.* Importance of various antioxidant enzymes for cell stability - Confrontation between theoretical and experimental data. *Biochem. J.*; 286: p. 41-46, 1992.

RONSEN, G. *et al.* Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Quím Nov* V. 29, n 3, 563 – 568, 2006.

ROSE, C. E *et al.* Significant involvement of CCL2 (MCP- 1) in inflammatory disorders of the lung. *Microcirculation* v. 10, p. 273-288, 2003.

RIBEIRO, R. *et al.* A formação e os efeitos da espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *BioSc J*, v.21, n 3, 133 - 149, 2005.

RUBIO, M. L. *et al.* N-acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airways alterations in rats. *Eur Respir J*, v.15, n.3, p.505- 11. 2000.

ROUTH, H. B. *et al.* Historical aspects of tobacco use and smoking. *Clin Dermatol*, v.16, n.5, p.539-544. 1998.

ROVER, J. L. *et al.* Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. *Quím Nova*; v. 24, n 1, 112-119, 2001.

SADIK CD, KIM ND, LUSTER AD Neutrophils cascading their way to inflammation *Trends Immunol.* ;32(10):452-60, 2011.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. 1a Ed. Editora da ULBRA, Canoas, p. 200, 2004.

SAKAMOTO, N. *et al.*, Effect of atorvastatin on PM(10)- induced cytokine production by human alveolar macrophages and bronchial epithelial cells. *Int J Toxicol* , v. 28, n1, p. 17- 23, 2009.

SCHMEKEL, B. *et al.* Myeloperoxidase in human lung lavage. I. A marker of local neutrophil activity. *Inflammation*, v. 14, n. 4, p. 447-54, 1990.

SCOTT, M. D. *et al.* Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J Lab Clin Med*, v.118, n.1, p.7-16. 1991.

SELEMIDIS, S. Suppressing NADPH oxidase-dependent oxidative stress in the vasculature with nitric oxide donors. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 35, n. 11, p. 1395-401, 2008.

SHINAGAWA, K.; TOKIMOTO, T.; SHIRANE, K. Spin trapping of nitric oxide in aqueous solutions of cigarette smoke. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 253, n. 1, p. 99-103, 1998.

SHISHEBOR MH *et al.* Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways *Circulation* 108: 426 – 431, 2003.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v. 215, p. 213-219, 1993

SILVA BEZERRA, F. *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. *Nutrition*, v. 22, n. 11-12, p. 1192-201, 2006.

SUZUKI, K. *et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal Biochem* v. 132, p. 345-352, 1983.

TERBLANCHE, M. *et al.* Statins and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Lancet Infect Dis* v.7, p. 358-368; 2007.

TEUPSER D *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells *Biochem Biophys Res Commun* v. 298, 4, 838-844, 2001.

TRAND, B. *et al.* Aspects of inflammation and oxidative stress in pediatric obesity and type 1 diabetes: an overview of ten years of studies. *Exp Diabetes Res*, in press, 2012.

TOGBE, D. *et al.* Toll-like receptor and tumor necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Exp Pathol* v. 88, p. 387-391; 2007.

WANG, C. Y.; LIU, P. Y.; LIAO, J. K. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* v.14, n 1, p. 37-44; 2008.

WO, W. *et al.*, Anti-malarial drug artesunate ameliorates oxidative lung damage in experimental allergic asthma. *Free Radic Biol Med*, v 53,n 3, p 498 – 507, 2012.

World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic. The MPOWER package. 2008.
(http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf)

YAO, H. *et al.* Protective effects of pravastatin in murine lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Clin Ex Pharmacol Physiol*, v. 33, n 9, p 793- 797, 2006.

YAO, H. *et al.* Cigarette smoke-mediated inflammatory and oxidative responses are strain-dependent in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* ;294: p1174-86, 2008.

YILMAZ *et al.* HMG CoA reductase inhibitors suppress maturation of human dendritic cells: new implications for atherosclerosis. *Atherosclerosis* v 172, n 1: 85 93, 2004.

YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, v.74, n.1, p.139-62. 1994.

VAN DER VAART, H. *et al.* Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*, v.59, n.8, p.713-21. 2004.

VALENCA, S. *et al.* Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol*, v. 32, n. 3, p. 351-6, 2004.

VALENCA, S. *et al.* Involvement of nitric oxide in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Nitric Oxide*, v. 20, n 3, p 175 – 181, 2009.

VEILLARD, NR *et al.* Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages *Atherosclerosis* 188(1):51- 58, 2006.

VIEGAS, JR.; BOLZANI, V.; BARREIRO, E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Quím Nov*, v 29, n 2, p. 326 – 333, 2006.

WARD, P. A. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. *Ann N Y Acad Sci* v.1203, p. 53-59, 2010.

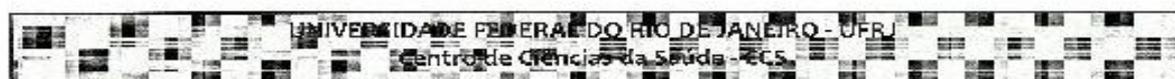
XIANG, M. *et al.* Hemorrhagic shock activates lung endothelial reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase via neutrophil NADPH oxidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* v.44, n 3, p. 333-340, 2010.

ZHAO, H. *et al.* Reactive oxygen species- and nitric oxide mediated lung inflammation and mitochondrial dysfunction in wild-type and iNOS deficient mice

exposed to diesel exhaust particles. *J Toxicol Environ Health A* v.72, p. 560-570, 2009.

ZHU, T. *et al.* Rosuvastatin attenuates mucus secretion in a murine model of chronic asthma by inhibiting the gamma-aminobutyric acid type a receptor. *Chin Med J*, v 125, n8, 1457- 1464, 2012.

9. APÊNDICES



Rio de Janeiro, 29 de Novembro de 2011

Prezado Professor Samuel dos Santos Valença

A Comissão de Ética com uso de animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado: **"Participação de Estatinas na Prevenção e Tratamento do Dano Pulmonar Induzido pela Fumaça de Cigarros em Pulmão de Camundongos"**, onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência **DFBCICB046**.

Atenciosamente;

Prof. Paulo Assis Melo
Presidente da Comissão de Ética com Animais - CCS

ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Phytomedicine 19 (2012) 262–269



ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.de/phyomed



Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse

Roberto Soares de Moura^{a,1}, Thiago Santos Ferreira^{c,1}, Alan Aguiar Lopes^b, Karla Maria Pereira Pires^b, Renata Tiscoski Nesi^c, Angela Castro Resende^a, Pergentino Jose Cunha Souza^d, Antônio Jorge Ribeiro da Silva^e, Ricardo Moreira Borges^e, Luis Cristóvão Porto^b, Samuel Santos Valença^{c,*}

^a Departamento de Farmacologia e Psicobiologia – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^c Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^d Escola de Farmácia – Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

^e Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Inflammation
Oxidative stress
Euterpe oleracea
Cigarette smoke
Lung

ABSTRACT

Short term inhalation of cigarette smoke (CS) induces significant lung inflammation due to an imbalance of oxidant/antioxidant mechanisms. Açai fruit (*Euterpe oleracea*) has significant antioxidant and anti-inflammatory actions. The present study aimed to determine whether oral administration of an açai stone extract (ASE) could reduce lung inflammation induced by CS. Thirty C57BL/6 mice were assigned to three groups (n = 10 each): the Control + A group was exposed to ambient air and treated orally with ASE 300 mg/kg/day; the CS group was exposed to smoke from 6 cigarettes per day for 5 days; and the CS + A group was exposed to smoke from 6 cigarettes per day for 5 days and treated orally with ASE (300 mg/kg/day). On day 6, all mice were sacrificed. After bronchoalveolar lavage, the lungs were removed for histological and biochemical analyses. The CS group exhibited increases in alveolar macrophage (AMs) and neutrophil numbers (PMNs), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase activities (GPx), TNF- α expression, and nitrites levels in lung tissue when compared with the control ones ($p < 0.001$ for all parameters). The AMs, PMNs, MPO, SOD, CAT, GPx and nitrite were significantly reduced by oral administration of ASE when compared with CS group ($p < 0.001$ for all parameters, with exception of AMs $p < 0.01$). The present results suggested that systemic administration of an ASE extract could reduce the inflammatory and oxidant actions of CS. Thus, the results of this study in mice should stimulate future studies on ASE as a potential agent to protect against CS-induced inflammation in humans.

© 2011 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the leading causes of worldwide morbidity and mortality. It is predicted that COPD will rank the third most common cause of death by 2020 (O'Donnell and Parker 2006; Sapey and Stockley 2006). COPD is characterized by a slow, progressive, and largely irreversible limitation in airflow. This condition arises due to chronic bronchitis and/or emphysema and is associated with an abnormal

inflammatory response of the lungs. Cigarette smoke (CS) is a complex admixture of more than 4700 chemical compounds and oxidants (Pryor and Stone 1993). CS is the major etiologic factor in the pathogenesis of COPD (Menezes et al. 2005). Although acute lung inflammation (ALI) caused by CS exposure does not model all aspects of COPD pathogenesis, the two processes do share certain hallmarks, including accumulation of inflammatory cells such as alveolar macrophages and neutrophils, and lung oxidative stress (Silva Bezerra et al. 2006).

The presence of CS in lung tissue is responsible for an increase in the amount of oxidants in alveolar pockets from two sources; first, CS contains an impressive number of free radicals that are deposited in alveoli; second, CS increases the number of inflammatory cells in alveoli, and these spontaneously release oxidants (MacNee 2005). CS contains oxidants and free radicals both in the gas phase (alkyl, peroxyl, nitric oxide, and superoxide anion) and

* Corresponding author at: LIBC/ICB/CCS/UFRJ, Avenida Carlos Chagas Filho 373, Bloco J/sala25, Ilha do Fundão, CEP 21.941-902, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
Tel.: +55 21 2562 6733; fax: +55 21 2562 6734.

E-mail address: samuelv@ufrj.br (S.S. Valença).

¹ These authors contributed equally to this paper.