



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS

DANIELBA ALMEIDA DA SILVA

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO NITRÓXIDO TEMPOL
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE REDOX
INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE
CIGARRO**

Vitória da Conquista, BA
2019

DANIELBA ALMEIDA DA SILVA

**EFEITOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DO NITRÓXIDO TEMPOL
SOBRE A INFLAMAÇÃO E O ESTRESSE REDOX
INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMAÇA DE
CIGARRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Coorientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA
2019

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – UFBA

Silva, Danielba Almeida da
Efeitos *in vitro* e *in vivo* do nitróxido tempol sobre a inflamação e o estresse redox induzidos pela exposição aguda à fumaça de cigarro / Danielba Almeida da Silva - 2019.
107 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz
Coorientador: Prof. Dr. Robson Amaro Augusto da Silva

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2019.

1. Antioxidantes. 2. Estresse Oxidativo. 3. Cigarros. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Queiroz, Raphael Ferreira. III. Silva, Robson Amaro Augusto da. IV. Título.

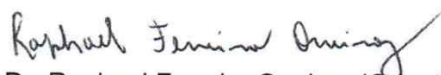
CDU 678.048-043.2

Elaborado por Marcos Aurélio Ribeiro da Silva CRB5/1858

DANIELBA ALMEIDA DA SILVA

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 05/07/2019.



Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz (Orientador)
(Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia)



Prof^a Dr^a. Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão (examinadora)
(Universidade Federal da Bahia)



Dr^a Flávia Viana Santa Cecília (examinadora)
(Instituto Butantan)

À minha mãe, pelo infinito amor e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos, e ao meu grande parceiro de pesquisa, Thiago, por todo companheirismo e por ter se dedicado a este trabalho com se fosse seu.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus pela vida, por me dar força e coragem para enfrentar os momentos de dificuldades possibilitando concluir mais uma etapa.

Aos meus pais, meus exemplos, por todo o apoio, sermões, orações, amor incondicional, respeitarem as minhas escolhas mesmo que essas não fossem as suas e por abdicarem seus sonhos com o intuito de realizar os meus. Aprendi com vocês a ter coragem, humildade, honestidade e persistência. A vocês expresso meu maior agradecimento. Obrigada por existirem!

Ao meu namorado por toda paciência, cuidado, compreensão, carinho, abraço, conselhos, por compartilhar todos os momentos de tristeza e alegria sempre ao meu lado.

À minha irmã e meu cunhado, que sempre se fizeram presentes em minha vida e estiveram ao meu lado prontos a me ajudar, e me presentearam com dois pacotinhos de amor, Lis e Enzo, que tornam os meus dias mais fáceis.

A toda minha família (Almeida e Silva) tios, primos, avó, padrinhos pelo incentivo de sempre.

Ao professor Raphael Ferreira Queiroz, pela orientação, confiança, empenho na obtenção dos materiais para o desenvolvimento dessa pesquisa e por todos os conhecimentos passados ao longo desses anos, meu muito obrigada.

Estendo meus agradecimentos a todos os mestres do IMS/CAT-UFBA, em especial aos professores Lucas Marques, Regiane Yatsuda, Robson Amaro, Amélia Gusmão, Telma de Jesus, pelo apoio e por disponibilizarem seus laboratórios para realização dos experimentos.

Do mesmo modo agradeço aos técnicos dos laboratórios, em especial a Robson, por toda paciência para sanar as dúvidas laboratoriais que apareciam ao longo dos experimentos e por todo apoio técnico cedido.

À Lina, secretária do programa de Biociências, por ser tão solícita e prestativa.

À Dr^a Cláudia Macedo, do Laboratório Micro, pela ajuda na triagem histológica inicial.

À técnica do Laboratório Micro, Ana Paula, pela realização dos cortes histológicos.

À professora Ohara Augusto e a Edlaine Linares por me receberem tão bem em seu laboratório no IQ/USP.

Aos amigos conquistados no mestrado. Muito obrigada por todos os momentos compartilhados juntos. Levarei cada um de vocês comigo!

Ao grande parceiro de pesquisa do grupo “Danielba e Thiago”. Thi, não tenho palavras para te agradecer por todo companheirismo, dedicação, empenho, apoio e paciência para suportar minhas lamentações e desespero durante esses anos juntos. Você conduziu este trabalho como se fosse seu, auxiliando-me de todas as formas possíveis. Com você aprendi muito. Muito obrigada por ter compartilhado comigo tamanha sabedoria, transmitindo mais do que conhecimento acadêmico, mas também sabedoria de vida!

À Lore Lobo, por todo suporte dado durante os experimentos envolvendo o modelo animal.

Aos demais amigos, Amanda, Leo e Ramon, pela disponibilidade, esforço e cooperação na realização dos experimentos, agradeço imensamente a ajuda de vocês.

À Keila Campos (*in memoriam*), que mesmo não a conhecendo pessoalmente, me auxiliou de forma brilhante no início dos experimentos.

À Universidade Federal da Bahia e ao Programa de pós-graduação em Biociências pela oportunidade de realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos animais usados nos experimentos que involuntariamente “doaram” suas vidas, mas que certamente não serão em vão.

Agradeço ainda a todos os amigos e familiares não citados aqui diretamente. Todos contribuíram com suas parcelas de amizade, conhecimento e construção ao longo da minha vida. Muitíssimo obrigada!

RESUMO

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa composta por mais de 6000 substâncias químicas diferentes. No pulmão, esses componentes podem direta ou indiretamente desencadear a inflamação e o estresse redox, característicos de algumas doenças pulmonares, incluindo a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) e outros nitróxidos cíclicos são reconhecidamente eficientes na redução da injúria tecidual associada à inflamação *in vitro* e *in vivo* por mecanismos ainda pouco compreendidos. Na literatura não há relato sobre os efeitos do tempol sobre a lesão pulmonar causada pela fumaça de cigarro bem como seu envolvimento na ativação da via do Nrf2. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar o efeito do tempol sobre a inflamação e o estresse redox induzidos pela exposição aguda à fumaça de cigarro *in vitro* e *in vivo*. Camundongos C57BL/6 machos (n=32) foram divididos em 4 grupos (n=8, cada): 1) controle exposto ao ar ambiente (GC), 2) animais expostos à fumaça de cigarro por 5 dias (GFC), camundongos tratados 3) preventivamente ou 4) concomitantemente com tempol (50 mg/kg/dia) e expostos à fumaça do cigarro por 5 dias (TP+FC e TC+FC, respectivamente). Os animais foram eutanasiados após 24 h da última exposição à fumaça de cigarro, e o lavado broncoalveolar e os pulmões foram coletados para as análises posteriores. O número de leucócitos totais e neutrófilos, e a concentração e atividade da mieloperoxidase aumentaram no trato respiratório e no parênquima pulmonar dos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Como consequência, peroxidação de lipídeos, e nitração e carbonilação de proteínas do pulmão também se elevaram. A administração de tempol antes ou durante à exposição à fumaça de cigarro inibiu todos os parâmetros acima. Tempol também reduziu a expressão pulmonar das citocinas inflamatórias *Il-6*, *Il-1 β* e *Il-17* para níveis basais e de *Tnf- α* em aproximadamente 50%. Por outro lado, o nitróxido restaurou as transcrições de *Il-10*, *Tgf- β* , e aumentou os níveis gênicos dos marcadores de ativação da via do Nrf2, hemeoxigenase 1 (*Ho-1*) e *Gpx2*. Em paralelo, a atividade da glutathiona peroxidase também foi maior no homogenato do pulmão. Em seguida, os efeitos do tempol foram avaliados sobre o estado redox intracelular, atividade da óxido nítrico sintase e expressão da HO-1 em macrófagos murinos RAW 264.7. Quando as células RAW 264.7 foram pré-incubadas com tempol (25, 50 e 100 μ M) por 24 h e estimuladas com extrato da fumaça do cigarro, a oxidação intracelular da diclorofluoresceína foi reduzida de maneira concentração dependente, embora as concentrações de nitrito e nitrato, marcadores indiretos da atividade da óxido nítrico sintase, permaneceram iguais. As análises de SDS-PAGE/Western Blotting demonstraram

que a concentração de HO-1 foi maior nos macrófagos pré-tratados com tempol (50 e 100 μM). Em conclusão, esses dados indicam que tempol protege macrófagos RAW 264.7 e pulmões de camundongos contra o dano oxidativo e inflamação na exposição à fumaça de cigarro provavelmente através da ativação da via do Nrf2 e redução da migração de leucócitos para o sítio inflamatório.

Palavras-chave: Tempol, fumaça de cigarro, Nrf2, inflamação aguda, estresse redox, quimiotaxia

ABSTRACT

Cigarette smoke is a complex mixture of more than 6000 different substances. These components can directly or indirectly trigger inflammation and redox stress in the lung, which characterize some pulmonary diseases, including Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Tempol (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl piperidine-1-oxyl) and other cyclic nitroxides are well known in reducing *in vitro* and *in vivo* inflammation-associated tissue injury by mechanisms not fully understood. There is no report on the effects of tempol on cigarette smoke-induced lung lesion and its role on Nrf2 pathway activation. In this context, this study aimed to evaluate the effect of tempol on inflammation and redox stress caused by acute exposure to cigarette smoke *in vitro* and *in vivo*. C57BL/6 (n=32) were assigned to four groups (n = 8 each): 1) animals exposed to ambient air (CG), 2) mice exposed to cigarette smoke for 5 days (CSG), mice treated 3) preventively or 4) concomitantly with tempol (50 mg/kg/day) and exposed to cigarette smoke for 5 days (PT+CS and CT+CS, respectively). All animals were euthanized 24 h after the last cigarette smoke exposure, and bronchoalveolar lavage and lungs were collected for further analysis. The number of total leukocytes and neutrophils, and myeloperoxidase level and activity increased in the respiratory tract and lung parenchyma of cigarette smoke-exposed mice. As consequence, lipid peroxidation, and nitration and carbonylation of lung proteins also increased. Tempol administration before or during cigarette smoke exposure diminished all the above parameters. The expression of inflammatory cytokines *Il-6*, *Il-1 β* , *Il-17* and *Tnf- α* in the lungs were lower in mice treated with tempol. On the other hand, the nitroxide restored *Il-10* and *Tgf- β* expression, and increased the transcription of Nrf2-regulated genes, heme oxygenase 1 (*Ho-1*) and *Gpx2*. In accordance, the glutathione peroxidase activity in these lung homogenates was higher. The effects of tempol were further evaluated on intracellular redox state, nitric oxide synthase activity and HO-1 expression in RAW 264.7 murine macrophages. The preincubation of RAW 264.7 cells with tempol (25, 50 and 100 μ M) for 24 h reduced the oxidation of the intracellular dichlorofluorescein by cigarette smoke extract. However, nitrite and nitrate concentrations, indirect marker of nitric oxide synthase activity, did not change in presence of increasing concentrations of tempol. The pretreatment of RAW 264.7 cells with tempol (50 and 100 μ M) increased HO-1 protein expression. In conclusion, tempol attenuates cigarette smoke-induced stress redox and inflammation mainly by likely activating the Nrf2 signaling pathway and reducing neutrophil migration into inflammatory site.

Keywords: Tempol, cigarette smoke, Nrf2, acute inflammation, redox stress, chemotaxis.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1 Tabagismo e fumaça de cigarro | 19 |
| 2.2 Inflamação Pulmonar | 22 |
| 2.3 Radicais livres, oxidantes e estresse redox | 26 |
| 2.4 Antioxidantes e a via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) | 27 |
| 2.5 Tempol e nitróxidos cíclicos | 31 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1 Objetivo geral | 34 |
| 3.2 Objetivos específicos | 34 |
| 3.2.1 Estudos <i>in vivo</i> | 34 |
| 3.2.2 Estudos com modelo celular | 34 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 35 |
| 4.1 Materiais | 35 |
| 4.2 Métodos | 36 |
| 4.2.1 Estudos <i>in vivo</i> | 36 |
| 4.2.1.1 Animais | 36 |
| 4.2.1.1.1 Grupos e tratamentos experimentais | 37 |
| 4.2.1.2 Exposição à fumaça de cigarro | 38 |
| 4.2.1.3 Coleta e análise do lavado broncoalveolar | 40 |
| 4.2.1.4 Determinação dos níveis de nitrito no LBA | 40 |
| 4.2.1.5 Obtenção dos tecidos | 40 |
| 4.2.1.6 Análise histológica pulmonar | 41 |
| 4.2.1.7 Análise imuno-histoquímica | 41 |
| 4.2.1.8 Marcadores redox e inflamatórios no parênquima pulmonar | 42 |
| 4.2.1.8.1 Atividade peroxidásica da MPO | 42 |
| 4.2.1.8.2 Atividade da enzima glutathione peroxidase (GPx) | 43 |
| 4.2.1.8.3 Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico | 43 |
| 4.2.1.8.4 Determinação da concentração de proteínas totais nos pulmões | 44 |
| 4.2.1.8.5 Expressão de genes inflamatórios, anti-inflamatórios e citoprotetores | 44 |
| 4.2.2 Estudos com modelo celular | 46 |
| 4.2.2.1 Cultivo celular | 46 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.2.2 Preparo do extrato da fumaça de cigarro | 46 |
| 4.2.2.3 Atividade metabólica dos macrófagos | 48 |
| 4.2.2.4 Oxidação intracelular da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) | 48 |
| 4.2.2.5 Atividade da óxido nítrico sintase | 49 |
| 4.2.2.6 Determinação dos produtos do óxido nítrico por quimioluminescência | 49 |
| 4.2.2.7 Expressão da HO-1 | 50 |
| 4.2.2.8 Western Blotting | 50 |
| 4.2.2.9 Determinação da concentração de proteínas totais | 51 |
| 4.3 Análise estatística | 51 |
| REFERÊNCIAS | 52 |
| CAPÍTULO 1 | 66 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 106 |
| ANEXO 1 | 107 |

LISTA DE FIGURAS

Dissertação

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estrutura química de nitróxidos cíclicos | 32 |
| Figura 2. Principais reações redox de nitróxidos | 33 |
| Figura 3. Delineamento experimental <i>in vivo</i> | 38 |
| Figura 4. Esquema da câmara de inalação | 39 |
| Figura 5. Imagem representativa do aparato utilizado no preparo do EFC | 47 |

Capítulo I

| | |
|--|----|
| Figura 1. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro | 81 |
| Figura 2. Quantificação de neutrófilos e mieloperoxidase no parênquima pulmonar | 83 |
| Figura 3. Determinação de proteínas carboniladas, nitradas e peroxidação lipídica no parênquima pulmonar | 84 |
| Figura 4. Expressão gênica de genes inflamatórios, anti-inflamatórios e citoprotetores | 86 |
| Figura 5. Determinação da expressão da GPx2 e atividade da GPx no tecido pulmonar de camundongos C57/BL6 | 87 |
| Figura 6. Atividade metabólica dos macrófagos RAW 264.7 na presença do tempol ou extrato da fumaça de cigarro (EFC) | 88 |
| Figura 7. Avaliação do estado redox intracelular e quantificação dos produtos do óxido nítrico | 90 |
| Figura 8. Expressão da HO-1 em macrófagos RAW 264.7 | 91 |

LISTA DE TABELAS

Dissertação

Tabela 1. Principais efeitos inflamatórios e oxidativos da exposição à fumaça de cigarro em modelos murinos 24

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados na qPCR 45

Capítulo I

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na qPCR 76

Tabela 2. Concentração de nitrito no lavado broncoalveolar 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABAH – Ácido 4-aminobenzóico hidrazida (do inglês, *4-aminobenzoic acid hydrazide*);
- ACTB – Beta-actina
- ANOVA – Análise de variância (do inglês, *analysis of variance*);
- BSA – Albumina de soro bovino (do inglês, *bovine serum albumin*);
- CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio (do inglês, *cetyltrimethylammonium bromide*);
- DAB – 3,3-diaminobenzidina;
- DFCH-DA – Diclorofluoresceína diacetato;
- DMEM – Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco;
- DMSO – Dimetilsufóxido;
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*);
- DNP – Proteína carbonilada;
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica;
- EFC – Extrato da fumaça de cigarro
- GC – Grupo controle;
- GFC – Grupo exposto à fumaça de cigarro;
- GPx – Glutaciona peroxidase;
- GR – Glutaciona redutase;
- GSH – Glutaciona reduzida;
- GSSG – Glutaciona oxidada;
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio;
- HO[•] – Radical hidroxila;
- HO-1 – Heme oxigenase -1;
- HOCl – Ácido hipocloroso;
- IL-10 – Interleucina-10;
- IL-17 – Interleucina-17;
- IL-1 β – Interleucina-1 β ;
- IL-6 – Interleucina-6;
- IL-6 – Interleucina-6;
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, *inducible nitric oxide synthase*);
- LBA – Lavado broncoalveolar;
- MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócitos-1 (do inglês, *monocyte chemoattractant protein-1*);

MMP – metaloproteinase da matriz (do inglês, do inglês *matrix metalloproteinase*);

MPO – Mieloperoxidase;

NADPH oxidase – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase;

NO[•] – Óxido nítrico;

NO₂⁻ – Nitrito;

Nrf2 – Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (do inglês, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*);

O₂^{•-} – Ânion radical superóxido;

ONOO⁻ – Peroxinitrito;

PBS – Tampão fosfato salino (do inglês, *phosphate saline buffer*);

qPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*);

RNA – Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*);

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*);

SOD – Superóxido dismutase;

TBARs – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*);

TGF-β – Fator de transformação do crescimento (do inglês, *transforming growth factor beta*);

TMB – 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina;

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa (do inglês, *tumoral necrosis factor alpha*);

TP+FC – Grupo tratado preventivamente com tempol 50 mg/kg/dia e expostos à fumaça de cigarro;

TC+FC – Grupo tratado concomitantemente com tempol 50 mg/kg/dia e expostos à fumaça de cigarro;

1. INTRODUÇÃO

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade na atualidade, com prevalência de 251 milhões de pessoas no mundo e cerca de 7,5 milhões no Brasil (WHO, 2019a). É um distúrbio passível de ser prevenido e tratado, que se caracteriza pela limitação progressiva do fluxo aéreo e geralmente associado a uma resposta inflamatória anormal dos pulmões em decorrência da presença de partículas e gases nocivos, especialmente aqueles contidos na fumaça de cigarro (GOLD, 2018).

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa composta por mais de 6000 substâncias químicas diferentes, das quais 72 são potencialmente carcinogênicas (HECHT, 2012; DALRYMPLE et al., 2015). Essa mistura quando inalada pode ativar macrófagos de superfície e células epiteliais das vias aéreas para liberar múltiplos mediadores quimiotáticos, particularmente quimiocinas, que atraem neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes para os pulmões, resultando na inflamação bem como processos mutagênicos e tumorais no aparelho respiratório (BARNES, 2016).

A inflamação persistente das vias aéreas em pacientes com DPOC caracteriza-se pelo aumento no número de neutrófilos e pela presença de macrófagos ativados e linfócitos T. Os neutrófilos inicialmente liberam elastase, responsável pela hipersecreção de muco, enquanto os macrófagos ativados secretam uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo proteína quimioatática de monócitos-1 (MCP-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) (KENNEDY-FEITOSA et al., 2016; PINHO-RIBEIRO et al., 2017; DI STEFANO et al., 2018). Os linfócitos T por sua vez podem promover inflamação celular adicional pelo recrutamento de mais macrófagos e neutrófilos, morte celular induzida por perforina e eventualmente destruição e remodelação tecidual observada na DPOC (MAJO; GHEZZO; COSIO, 2001).

A ativação dos neutrófilos e macrófagos desencadeia a formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), principalmente ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO⁻), respectivamente (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015; RAMOS et al., 2018). Desse modo, os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do hospedeiro são fundamentais para limitar o dano oxidativo além de contribuir com a homeostase e a sobrevivência do parênquima pulmonar. Todavia, quando a concentração dessas espécies excede a capacidade antioxidante, estabelece-se o estresse redox

e, conseqüentemente, ocorre a oxidação irreversível de biomoléculas do hospedeiro, dano tecidual e sustentação da resposta inflamatória (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015).

Dentre os sistemas antioxidantes, destacam-se aqueles dependentes da via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) (TAN et al., 2014). Esse fator de transcrição controla a expressão basal e indutível de uma série de enzimas antioxidantes e proteínas citoprotetoras (ZHANG; DAVIES; FORMAN, 2015). As proteínas e enzimas transcritas sob controle do Nrf2 exercem papel central na manutenção da homeostase pulmonar em doenças inflamatórias com base redox. Os estudos com humanos e modelos animais concluíram que a ativação da via do Nrf2 reduz a injúria não apenas nos pulmões como também em tecidos extrapulmonares em decorrência à exposição à fumaça do cigarro (RANGASAMY et al., 2004; SUZUKI et al., 2008; AHMED et al., 2017).

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) é um nitróxido cíclico sintético, atóxico, hidrossolúvel e de baixo peso molecular que pode facilmente permear membranas biológicas. Esse composto catalisa o metabolismo de uma variedade de espécies reativas e reduz o estresse redox celular, o que o caracteriza como um potente antioxidante (SOULE et al., 2007; AUGUSTO et al., 2008; WILCOX e PEARLMAN, 2008). Os efeitos protetores dos nitróxidos foram inicialmente atribuídos a sua ação como miméticos da superóxido dismutase (SAMUNI et al., 1991), sequestrantes de radicais (PATTISON et al., 2012) e redutores de hemeoproteínas (SOULE et al., 2007). Recentemente, essas moléculas também se mostraram como inibidores da mieloperoxidase (MPO) (REES et al., 2009; QUEIROZ; VAZ; AUGUSTO, 2011), da migração de neutrófilos *in vitro* e na inflamação aguda (CUZZOCREA et al., 2004; QUEIROZ et al., 2012), da expressão do óxido nítrico sintase indutível na infecção cutânea por *Leishmania* (LINARES; GIORGIO; AUGUSTO, 2008), e imunomoduladores em modelo de encefalomielite viral murina (TSUHAKO et al., 2010). Estudos recentes sugerem ainda que o tempol e outros nitróxidos podem ativar a via do Nrf2 por mecanismos ainda não completamente entendidos, mas que parecem envolver os respectivos cátions oxamônio (GREENWALD et al., 2014, 2015)

Embora o potencial farmacológico *in vivo* do tempol seja conhecido há muito tempo, os efeitos dessa molécula sobre a inflamação causada pela exposição à fumaça de cigarro são desconhecidos. Apesar da DPOC não se instalar em pacientes sob exposição aguda à fumaça de cigarro, os modelos propostos podem auxiliar a compreender como moléculas que modulam o processo inflamatório e o estresse redox incipientes podem contribuir com a descoberta das vias relacionadas com lesão pulmonar e, conseqüentemente, instalação da DPOC (LOPES et al., 2013; KENNEDY-FEITOSA et al., 2016). Dessa forma, este trabalho

objetivou elucidar parte dos mecanismos moleculares e bioquímicos decorrente à administração do tempol em camundongos e macrófagos (RAW 264.7) expostos agudamente à fumaça de cigarro, com foco nos genes controlados pela via do Nrf2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tabagismo e fumaça de cigarro

A história do cultivo do tabaco data desde 5000 a 3000 a.C., com origem nos continentes americanos, principalmente entre os indivíduos residentes nas regiões dos Andes, Peru e Equador. Inicialmente, o tabaco foi consumido por inalação, defumação, mastigação, deglutição e na forma de chá com fins terapêuticos e recreativos. Ele foi também empregado em cerimônias religiosas bem como medicinalmente devido às propriedades analgésica, anti-inflamatória e anti-séptica. Cristóvão Colombo foi responsável por difundir o tabaco na Europa oriundo da América do Norte, em 1492. O tabaco recebeu ainda maior notoriedade em 1500 após retorno de Pedro Alvarez Cabral do Brasil, pois se difundiu a crença dos nativos de que o tabaco fosse sagrado. Após esse período, o tabaco para fumar se espalhou rapidamente pelo velho continente, principalmente entre os indivíduos de classes média e alta (MUSK e DE KLERK, 2003; VALENÇA et al., 2011).

O tabagismo é uma das maiores ameaças à saúde pública ao causar morte de mais de 7 milhões de pessoas ao ano em decorrência às doenças associadas. Dentre esses óbitos, mais de 6 milhões são decorrentes do uso direto do tabaco, enquanto cerca de 890.000 resultam da exposição passiva à fumaça de cigarro por indivíduos não-fumantes (LU; GOTTLIEB; ROUNDS, 2018; WHO, 2019b). No Brasil, cerca de 200.000 pessoas morrem anualmente em decorrência das doenças relacionadas diretamente ao cigarro. São atribuíveis ao tabagismo 90% dos casos de câncer do pulmão, 30% de todos os outros cânceres, 85% das doenças pulmonares obstrutivas crônicas e 50% das doenças cardiovasculares. Em decorrência do custo do tratamento dessas doenças relacionadas ao tabaco, da perda de produtividade dos fumantes e das mortes prematuras, o cigarro gerou uma perda econômica de 57 bilhões de reais em 2015 (INCA, 2018).

A exposição ativa e passiva ao cigarro está associada ao desenvolvimento e progressão de uma variedade de doenças respiratórias, incluindo DPOC que compreende o enfisema pulmonar e a bronquite crônica (WESTRA et al., 2013). As células do epitélio alveolar,

componente da defesa inata do pulmão contra o ambiente externo, são consideradas os alvos primários da exposição à fumaça de cigarro e, por isso, as primeiras doenças associadas ao cigarro se iniciam nos pulmões (DALRYMPLE et al., 2015). Todavia, os componentes do cigarro podem se distribuir através da corrente sanguínea e acometer tecidos extra-pulmonares, caracterizando-se como um fator de risco para doenças cardiovasculares, principalmente doença cardíaca coronariana, acidente vascular encefálico e doença vascular periférica (ASANO et al., 2012; WEST, 2017).

Na combustão do cigarro dois tipos de fumaça são liberados: a principal (10 a 20%) e a lateral (80 a 90%), sendo a principal aquela inalada diretamente pelo fumante e a lateral liberada pelo cigarro quando aceso. Dessa forma, o tabagismo pode ser categorizado em ativo, quando a fumaça é aspirada durante o ato de fumar, e passivo, quando a fumaça é inalada não apenas pelo fumante, mas também por indivíduos não fumantes (ALAM, 2018). Embora a inalação direta da fumaça de cigarro pelo fumante ativo seja prejudicial, a fumaça lateral possui maior toxicidade devido ao alto teor de nicotina e outras substâncias carcinogênicas liberadas na combustão (PINHO-RIBEIRO et al., 2017). Dentre as diferentes substâncias químicas presentes na fumaça de cigarro encontram-se compostos carcinogênicos, diversos oxidantes e espécies radicalares ou moléculas como quinonas e fenóis, que quando metabolizadas endogenamente podem produzir ROS e desencadear reações redox diversas (PRYOR; STONE, 1993).

De acordo com a sua composição química, a fumaça de cigarro pode ser dividida em fase particulada (também conhecida como fase de alcatrão) e fase gasosa. A fase particulada caracteriza-se predominantemente por partículas semilíquidas, eletricamente carregadas, com diâmetro de 0,1 a 1 μm (média = 0,2 μm). Essas partículas, quando inaladas, não transpõem as membranas alveolares e, portanto, exercem toxicidade apenas no aparelho respiratório. Devido ao tamanho reduzido ($< 0,1 \mu\text{m}$) (HOFFMANN; HOFFMANN; EL-BAYOUMY, 2001), os componentes da fase gasosa podem atravessar as membranas e distribuir-se através da corrente sanguínea para órgãos extra-pulmonares, o que ocasionará efeitos sistêmicos agudos e/ou crônicos (HORINOUCI et al., 2016).

A fase de partículas é composta por alcatrão (~7% da fumaça total), nicotina (0,2 – 0,6%) e algumas moléculas como quinonas e hidroquinonas ($< 0,1\%$) (HOFFMANN; HOFFMANN; EL-BAYOUMY, 2001). As quinonas e hidroquinonas por se encontrarem em equilíbrio com os respectivos radicais semiquinona podem gerar 10^{17} radicais livres por grama de alcatrão, de acordo com estudos usando ressonância paramagnética eletrônica. (ZANG; STONE; PRYOR, 1995; BARTALIS et al., 2009; CANTIN; RICHTER, 2012). Os

radicais semiquinona reduzem o oxigênio molecular a ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que, por sua vez, pode se dismutar espontaneamente ou catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 pode reagir com vestígios de metais, como ferro reduzido, para formar o radical hidroxila (HO^{\cdot}), na chamada reação de Fenton. Tanto o superóxido quanto o radical semiquinona favorecem a redução do ferro no estado férrico para o estado ferroso, o que perpetua o ciclo. HO^{\cdot} é um oxidante potente ($E^{\circ} = 2310$ mV) (BUETTNER, 1993), que amplifica o potencial redox do H_2O_2 e modifica irreversivelmente e indistintamente biomoléculas no local onde é produzido (CANTIN e RICHTER, 2012; VERGEL et al., 2018).

A fase gasosa é responsável por 90-96% da fumaça total e constituiu-se principalmente por nitrogênio (~60%), oxigênio (~13%), dióxido de carbono (~13%), monóxido de carbono (~3,5%), água (~2%), argônio (~1%), hidrogênio (0,1-0,2%), acetona (~1%), óxidos de nitrogênio (<0,1%) e compostos de enxofre volátil (<0,1%) (HOFFMANN; HOFFMANN; EL-BAYOUMY, 2001). A quantidade de radicais livres produzida por essa fase é relativamente menor que da fase particulada, totalizando 10^{15} radicais livres a cada sopro exalado da fumaça de cigarro (ZANG; STONE; PRYOR, 1995; BARTALIS et al., 2009; CANTIN; RICHTER, 2012).

Os aldeídos, incluindo acetaldeído, acroleína e crotonaldeído, presentes nessa fase são capazes de ligar-se covalentemente a vários grupos funcionais de proteínas, fosfolipídios e ácidos nucleicos, e contribuir com o estresse redox, dano molecular e inflamação (SEEMAN; DIXON; HAUSSMANN, 2002). Além disso, por serem relativamente estáveis e hidrofílicas, essas moléculas podem atravessar as membranas biológicas, distribuir-se para tecidos distantes, o que contribui com a instalação de doenças crônicas associadas, incluindo câncer, doenças coronarianas e cerebrovasculares (HORINOUCI et al., 2016).

Os componentes da fumaça de cigarro também podem induzir diretamente inflamação pulmonar e, conseqüentemente, estimular a produção de uma série de mediadores inflamatórios e recrutamento celular. Os macrófagos residentes nos alvéolos são as primeiras células a manterem contato com a fumaça e, quando ativados, liberam fatores quimiotáticos especialmente para neutrófilos na resposta aguda. Essas células secretam enzimas proteolíticas e produzem altas concentrações de ROS, fatores que em conjunto contribuem com a injúria tecidual (LEE et al., 2014).

2.2 Inflamação Pulmonar

A inflamação é uma resposta fisiológica do organismo ao dano tecidual causado por microrganismos, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual e/ou reações imunológicas. A reação inflamatória caracteriza-se por uma série de eventos inter-relacionados, entre os quais se destacam aumento no fluxo sanguíneo e na permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual (ABBAS e JANEWAY, 2000).

A inflamação pulmonar pode ocorrer não apenas pela presença de agentes patológicos como também por fatores ambientais, incluindo a fumaça de cigarro (PENA et al., 2016). Após estimulação direta pela fumaça de cigarro, as células epiteliais pulmonares e leucócitos produzem quimiocinas e citocinas inflamatórias, que desempenham papel crucial na iniciação e progressão da inflamação pulmonar. Os componentes da fumaça de cigarro nos pulmões podem aumentar os níveis intracelulares de ROS através do efluxo de elétrons da mitocôndria, pela ativação da xantina oxidase, óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e NADPH oxidase. O aumento transiente de ROS estimula várias vias de sinalização redox sensíveis, incluindo proteínas-quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) e fator nuclear-kB (NF-kB), e promove a expressão gênica de mediadores inflamatórios, incluindo MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (WU et al., 2014; KENNEDY-FEITOSA et al., 2016), os quais promovem vasodilatação pulmonar, aumento da permeabilidade vascular e consequente diapedese de leucócitos para o sítio inflamatório (PENA et al., 2016).

Os macrófagos, neutrófilos e linfócitos são os principais leucócitos na inflamação pulmonar, sendo que a predominância de cada um dos subtipos varia de acordo com a resposta e grau de dano ocasionado (HIRAIWA; VAN EEDEN, 2013; PARIKH; SHAH; TANDON, 2016) que dependem principalmente do tempo de exposição e número de cigarros inalados (BEZERRA et al., 2006; VALENÇA et al., 2011; PENA et al., 2016; CAMPOS et al., 2017). Nesse sentido, a resposta inflamatória diverge basicamente entre as fases aguda e crônica.

Na fase aguda da inflamação, os neutrófilos, células polimorfonucleares, migram rapidamente para o pulmão, sendo os primeiros e mais abundantes tipos celulares naquele sítio (WONG; MAGUN; WOOD, 2016). Os neutrófilos podem então atuar como fagócitos, secretar proteínas granulares com atividade microbicida e/ou produzir radicais livres e

oxidantes como $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , HOCl e dióxido de nitrogênio ($\cdot NO_2$) durante o processo chamado de *burst* oxidativo (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1989; MEIJER; RIJKERS; VAN OVERVELD, 2013). Mais recentemente, descobriu-se ainda que os neutrófilos secretam DNA, lisozima e mieloperoxidase para formar as armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês *neutrophil extracellular traps*, NETs), que imobilizam e destroem o patógeno. Essas estruturas também estão envolvidas com o dano tecidual do hospedeiro (BRINKMANN e ZYCHLINSKY, 2012).

A inflamação crônica ocorre após exposição prolongada e persistente a um agente potencialmente tóxico, no qual o componente celular principal são as células mononucleares na inflamação ativa (WONG; MAGUN; WOOD, 2016). Os macrófagos são células residentes do epitélio respiratório, que quando ativados, secretam fatores quimiotáticos, incluindo a quimiocina ligante 2 (CCL2, do inglês *Chemokine (C-C motif) ligand 2*), e a quimiocina ligante CXC-1 (CXCL1, do inglês *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*) que atraem monócitos e neutrófilos para os pulmões, respectivamente. Essas células inflamatórias especialmente os macrófagos liberam proteases, como a metaloproteinase da matriz (MMP, do inglês *matrix metalloproteinase*) das quais destacam-se a MMP-2, MMP-9 e MMP-12, responsáveis pela destruição do parênquima pulmonar (VLAHOS; BOZINOVSKI, 2014).

Os macrófagos apresentam função de reconhecimento e fagocitose de patógenos e células apoptóticas, participam da apresentação de antígenos aos linfócitos e produzem mediadores de fase aguda (HIRAIWA; VAN EEDEN, 2013). Embora os neutrófilos sejam as células mais importantes no *burst* oxidativo, os macrófagos ativados também produzem oxidantes, principalmente o ONOO \cdot . Esse oxidante é formado pela reação do $O_2^{\cdot-}$ e óxido nítrico (NO \cdot) gerados pela NADPH oxidase e iNOS, respectivamente (RADI, 2013), e pode atuar tanto como oxidante quanto nucleófilo *in vivo* (FERRER-SUETA e RADI, 2009). Como oxidante, pode promover oxidações de um e dois elétrons por reações diretas com alvos biomoleculares (BUETTNER, 1993); como nucleófilo, pode adicionar-se ao dióxido de carbono (CO_2) para produzir um aduto nitrosoperoxocarboxilato (ONOO $CO_2^{\cdot-}$) que, por sua vez, decai aos radicais $\cdot NO_2$ e carbonato ($CO_3^{\cdot-}$) (AUGUSTO et al., 2002; GOLDSTEIN e MERÉNYI, 2008).

Na exposição à fumaça de cigarro, o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e as interleucinas (IL-1 β e IL-6) são importantes mediadores de fase aguda secretados por macrófagos e células epiteliais. Essas citocinas atuam como iniciadoras induzindo sua própria produção bem como de outras citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, atraindo e ativando células imunes no sítio da inflamação (WONG; MAGUN; WOOD, 2016). TNF- α é

inicialmente sintetizado como um precursor ligado à membrana e liberado proteoliticamente das superfícies celulares. Essa citocina quando se liga ao seu receptor ativa NF- κ B e MAPKs. A ativação do NF- κ B e MAPKs por sua vez estimula a expressão de outras citocinas, como IL-1, e proteínas imuno-reguladoras (LIU, 2005). A IL-1 β também é inicialmente sintetizada como pró-IL-1 β , que é então clivado dentro da célula por um complexo protéico chamado inflamassoma. A IL-1 β ativada é segregada e liga-se ao receptor da IL-1, que agora se complexa com três proteínas, proteína de diferenciação mielóide 88 (MyD88), quinase do tipo I associada ao receptor de IL-1 e fator-6 associado ao receptor de TNF, para assim ativar a cascata da MAPK e consequentemente, a via de NF- κ B (MUROI; TANAMOTO, 2007; WONG; MAGUN; WOOD, 2016).

Evidências demonstraram que IL-1 β inicia a inflamação pulmonar ao aumentar os níveis de outras moléculas pró-inflamatórias como também promove dilatação dos espaços aéreos distais, espessamento e fibrose das vias aéreas em camundongos (LAPPALAINEN et al., 2005). A superexpressão tanto constitutiva quanto induzível de TNF- α foi também responsável pelo enfisema em camundongos (VUILLEMENOT; RODRIGUEZ; HOYLE, 2004), desde que camundongos *knockout* para o receptor de TNF- α apresentaram menos sinais de enfisema que os animais selvagens (CHURG et al., 2003). Os principais efeitos da exposição de camundongos ao cigarro estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Principais efeitos inflamatórios e oxidativos da exposição à fumaça de cigarro em modelos murinos.

| Modelo de Exposição | Desfecho | Referência |
|---|--|--------------------------|
| Aguda - 12 dias/20 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, TNF- α , IL-6, KC, espaços alveolares, | (LEE et al., 2014) |
| Aguda - 3 dias/25 cigarros por dia | ↑ neutrófilos, macrófagos, linfócitos e DCs, IL-6, IL-8, TNF- α , MCP-1, IL-1 β IFN- γ , expressão de TLR4 e MyD88, ativação NF- κ B. | (WANG et al., 2016) |
| Aguda - 4 dias/7, 7, 9, 11 cigarros /dia* | ↑ leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos, TNF- α , IL-1 β , CXCL-1, MCP-1, MPO, Nrf2, MMP-9. ↓SOD, GSH | (BAO et al., 2013) |
| Aguda - 4 dias/9 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, neutrófilos e macrófagos, TNF- α , IL-6, IL-1 β , MCP-1, Nrf2, HO-1. ↓ GSH | (ZHANG; ZHANG; LI, 2015) |
| Aguda - 5 dias/10 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, MCP-1, IL-1 β , IP-10, KC, 8-isoprostano, 8-OHdG, 3-nitrotirosina, TNF- α , MIP-2, iNOS, MMP-12, TIMP-1, CAT ↓GR | (GUAN et al., 2013) |

| | | |
|---|---|--------------------------------|
| Aguda - 5 dias/12 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, MDA, dano ao DNA, translocação do Nrf2, CAT, TNF- α , IFN- γ e IL-10. ↓ SOD, razão GSH/GSSG | (CAMPOS et al., 2017) |
| Aguda - 5 dias/12 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, macrófagos, SOD, TNF- α , IL-17, IL-22. | (RAMOS et al., 2018) |
| Aguda - 5 dias/12 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais e macrófagos, MPO, IL-6, IL-1 β , KC, TNF- α , NF-kappa B, ROS, SOD, CAT, MDA. ↓ GSH | (KENNEDY-FEITOSA et al., 2016) |
| Aguda - 5 dias/12 cigarros por dia. | ↑ neutrófilos e macrófagos, nitrito, MPO, SOD, CAT, GPx, MDA, razão e TNF- α . ↓ razão GSH/GSSG | (LOPES et al., 2013) |
| Aguda - 5 dias/6 cigarros por dia | ↑ neutrófilos e macrófagos, MPO, SOD, CAT, GPx, TNF- α , nitrito. ↓ razão GSH/GSSG | (DE MOURA et al., 2012) |
| Aguda - 5 dias/6 cigarros por dia | ↑ neutrófilos e macrófagos, MDA, SOD, CAT, GPx. ↓ nitrito | (VALENÇA et al., 2009) |
| Crônica - 120 dias/12 cigarros por dia | ↑ espaços aéreos e ruptura dos septos alveolares, macrófagos, ROS, 8-isoprostano, GPx, MCP-1, TNF- α . ↓ TIMP-1. | (TOLEDO et al., 2012) |
| Crônica - 60 dias/12 cigarros por dia | ↑ septos alveolares, MPO, TNF- α , IL-1 β , IL-6, KC, TGF- β 1, MDA, TIMP-1, NE. ↓ SOD | (KENNEDY-FEITOSA et al., 2018) |
| Crônica - 60 dias/12 cigarros por dia | ↑ espaços alveolares, macrófagos, hidroxiprolina, superóxido, SOD, CAT, MDA, proteínas carboniladas. | (NESI et al., 2016) |
| Enfisema - 60 dias/12 cigarros por dia | ↑ destruição do septo alveolar, leucócitos totais, neutrófilos e monócitos, MPO, KC, TNF- α , IL-6 e IL-1 β , ROS, SOD, CAT, MDA, expressão de MMP-12, Keap-1, 4-HNE e 8-OHdG. ↓ razão GSH/GSSG | (PINHO-RIBEIRO et al., 2017) |
| Subcrônica - 30 dias/3 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, MDA, KC, MIP-12, MCP-1. | (LIU et al., 2014) |
| Subcrônica - 30 dias/3 cigarros por dia | ↑ leucócitos totais, neutrófilos, macrófagos e linfócitos, proteínas totais, IL-1 β , KC, MCP-1, MIP-2, atividade de NF- κ B. | (YU et al., 2012) |

4-HNE, 4-hidroxinoneal; 8-OHdG, 8-oxo-2'-desoxiguanosina; AMPK, proteína quinase ativada por mitógenos; CAT, catalase; CXCL-1, quimiocina ligante CXC-1; DCs, células dendríticas; GSH, glutationa reduzida; GSSG, glutationa oxidada; HO-1, Heme-oxigenase - 1; IFN- γ , interferon gama; IL-10, interleucina-10; IL-17, interleucina-17; IL-1 β , interleucina-1 β ; IL-22, interleucina 22; IL-6, interleucina-6; KC, queratinócitos quimioatraentes; L-NAME, ω -nitro-L-arginina 4 metil ester; MCP-1, proteína quimioatraente de macrófagos 1; MDA, malondialdeído; MIP-2, proteína inflamatória de macrófagos 2; MMP-12, metaloproteinase de matriz 12; MMP-9, metaloproteinase de matriz 9; MPO, mieloperoxidase; MyD88 proteína de diferenciação mielóide 88; NE, elastase de neutrófilos; Nrf2, fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2; ROS, espécies reativas de oxigênio; SOD, superóxido dismutase; TAK-242, inibidor da transdução de sinal TLR4; TBARs, peroxidação lipídica analisada pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e expressa como malondialdeído; TIMP-1, inibidor tecidual da metaloproteinase de matriz 1; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa. * Os camundongos foram expostos à fumaça de cigarro por 4 dias com aumento do número de cigarro a cada dia de exposição.

2.3 Radicais livres, oxidantes e estresse redox

Estresse redox é definido pelo aumento relativo de ROS em detrimento aos antioxidantes, o que pode causar alteração de vias de sinalização redox sensíveis, induzir respostas homeostáticas e/ou dano molecular (JONES, 2006; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). O termo ROS compreende uma nomenclatura genérica na qual estão agrupados todos oxidantes e radicais livres, independentemente das propriedades físico-químicas. Radicais livres são espécies normalmente reativas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada eletrônica de valência e, portanto, podem atuar como oxidantes ou redutores. As formas não radicalares, por sua vez, não possuem elétrons desemparelhados, mas são potencialmente capazes de abstrair elétrons de outras biomoléculas, oxidando-as (WINTERBOURN, 2008; BIRBEN et al., 2012).

O $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} são alguns dos principais ROS existentes no sistema biológico. O $O_2^{\cdot-}$ é considerado o ROS "primário". Este pode interagir com outras moléculas (ex. centros de ferro, enxofre e NO^{\cdot}) para gerar outras espécies, e pode atuar tanto como redutor quanto oxidante. Nas reações de redução O_2 é produzido, enquanto que na oxidação forma-se H_2O_2 . O H_2O_2 apesar de ser um oxidante, apresenta reatividade moderada e pode oxidar apenas alguns alvos diretamente. No entanto, na presença de metais de transição ele é convertido ao HO^{\cdot} pela chamada reação de Fenton (WINTERBOURN, 1995). HO^{\cdot} tem alto poder oxidante que o torna um radical muito reativo e, conseqüentemente, possui um tempo de meia-vida *in vivo* muito curto ($\sim 10^{-9}$ s). Assim, quando produzido, HO^{\cdot} reage no sítio de formação (BUONOCORE; PERRONE; TATARANNO, 2010).

ROS são primariamente produzidos em sistemas biológicos como resultado do metabolismo do O_2 (BIRBEN et al., 2012). Nas mitocôndrias os elétrons são transferidos através da cadeia respiratória para redução de O_2 em H_2O , todavia, cerca de 1-2% dos elétrons escapam da cadeia e podem reduzir O_2 e gerar $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HO^{\cdot} ao invés de H_2O (KOWALTOWSKI e VERCESI, 1999). H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ também podem ser gerados pela enzima xantina oxidase (XO), crucial para o metabolismo de bases nitrogenadas (MAIUOLO et al., 2016). Fagócitos sintetizam $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 no processo chamado de *burst* oxidativo devido ativação do complexo NADPH oxidase em resposta a estímulos inflamatórios (BABIOR; LAMBETH; NAUSEEF, 2002). Neutrófilos em especial podem amplificar o potencial oxidativo do H_2O_2 devido à presença da MPO, que catalisa a formação de ácidos de halogênio e radicais livres, através dos ciclos clorinante e peroxidásico, respectivamente (PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000; WINTERBOURN, 2008). Nitrito pode ser oxidado ao $\cdot NO_2$ pela MPO na presença do H_2O_2 (BURNER et al., 2000; PODREZ; ABU-SOUD; HAZEN, 2000). Quando há a participação de iNOS dos macrófagos ou neutrófilos, NO^{\cdot} é produzido, o qual reage rapidamente com $O_2^{\cdot-}$ para formar o potente $ONOO^-$ (PATEL; KRUPKA; ANDERSON, 2006; RADI, 2013). Tanto $\cdot NO_2$ quanto $ONOO^-$ estão envolvidos com a nitração de resíduos de tirosina e triptofano em proteínas (VAN DER VLIET et al., 1997)

Em geral, a fumaça de cigarro pode aumentar a concentração de diferentes espécies oxidantes e radicalares nos pulmões, seja pela sua composição ou pela ativação de células inflamatórias. Quando os níveis de ROS estão altos suficientes para superar a atividade antioxidante endógena, biomoléculas do organismo são modificadas, o que pode estar relacionado com lesão e apoptose celular (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015; RAMOS et al., 2018). A fumaça de cigarro induz ainda a migração de células epiteliais, células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, principalmente. Esses leucócitos são diretamente relacionadas com o estresse redox subjacente à inflamação (YAO et al., 2008).

2.4 Antioxidantes e a via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2)

Antioxidante é definido como qualquer substância, que em baixas concentrações em relação ao substrato oxidável, retarda, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula-alvo. Também se inclui nesse conceito moléculas que promovem adaptação fisiológica de modo a mitigar os eventuais danos às biomoléculas (WINTERBOURN, 2008). Os organismos dispõem de mecanismos antioxidantes endógenos que podem ser enzimáticos ou

não enzimáticos, bem como aqueles obtidos através da dieta (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes não enzimáticos incluem ácido ascórbico (vitamina C), α -Tocoferol e β -Caroteno, precursores de vitamina E e A, respectivamente, e flavonoides (KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006). A vitamina C remove $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} antes que oxidem os lipídeos e iniciem a peroxidação. Eles são responsáveis também por regenerar a vitamina E oxidada (JIALAL e FULLER, 1995). A vitamina E previne a peroxidação lipídica em membranas biológicas e lipoproteínas como LDL (do inglês *low density lipoprotein*), reduz a agregação plaquetária e inibe os fatores de coagulação dependentes da vitamina K (ESTERBAUER et al., 1991). O β -Caroteno é um potente sequestrador do oxigênio singlete (1O_2), que apesar de não ser um radical livre, apresenta alta reatividade com DNA, RNA, lipídeos, e proteínas (BURTON e INGOLD, 1984; WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1995). A ação antioxidante dos flavonoides da dieta é atribuída a remoção de $O_2^{\cdot-}$, 1O_2 e peróxidos lipídicos, inibição da oxidação da LDL (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987), quelantes de metais de transição, além dos mecanismos antioxidantes não clássicos, tais como, modulação de vias de sinalização, expressão gênica e inibidores enzimáticos (TUNON et al., 2009).

Os antioxidantes enzimáticos incluem principalmente as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e peroxirredoxinas (Prx). A SOD é uma metaloenzima que pode ser dividida, de acordo com o tipo de íon metálico, em Cu/Zn-SOD encontrada no citosol (SOD1), Mn-SOD (SOD2) presente na matriz mitocondrial e Cu/Zn-SOD (SOD3) encontrada na matriz extracelular. Essa enzima catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O_2 na ordem de $10^9 M^{-1} s^{-1}$ (FORMAN e FRIDOVICH, 1973; MCCORD e FRIDOVICH, 1969; IGHODARO e AKINLOYE, 2018). A SOD1 também apresenta atividade peroxidásica e consome grandes quantidades de H_2O_2 na presença de bicarbonato, produzindo o potente $CO_3^{\cdot-}$ (ZHANG et al., 2003; MEDINAS et al., 2007). Mutações no gene da SOD1, oriundas da substituição de um aminoácido ou inserções e deleções de aminoácidos, podem aumentar a atividade peroxidásica, e estão associadas com a esclerose lateral amiotrófica, uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda seletiva dos neurônios motores, levando à atrofia muscular, paralisia e morte (VALENTINE; DOUCETTE; ZITTIN POTTER, 2005)

CAT, Prx e GPx são todas peroxidases, que utilizam hidroperóxidos como moléculas aceptoras de elétrons. As peroxidases são divididas em hemeperoxidases ou tiol-peroxidases de acordo com a presença do grupo heme ou tiois no sítio ativo, respectivamente. CAT é uma

enzima presente quase em todos os tecidos vivos que utilizam o oxigênio, sendo encontrada em todos os órgãos, especialmente no fígado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; DAVIES et al., 2008). A enzima usa ferro ou manganês como cofator e catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 em altas constantes de velocidade de segunda ordem ($k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (DEISSEROTH e DOUNCE, 1970). Todavia, catalase apresenta constante de Michaelis-Menten (K_M) alta (1,1 M) (JONES e SUGGETT, 1968) e, portanto, consome o H_2O_2 apenas quando as concentrações são relativamente altas.

GPx realiza a conversão do H_2O_2 e outros hidroperóxidos em H_2O e respectivos alcoóis em altas constantes de velocidade ($k \sim 10^6 - 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (FLOHÉ et al., 1972; STONE, 2004). Atualmente se conhece ao menos oito isoformas da GPx em humanos, GPx1 a GPx8 (MORÓN e CASTILLA-CORTÁZAR, 2012), que se diferenciam pela localização nos organismos bem como a presença do resíduo de cisteína (GPx5, 7 e 8) ou selenocisteína (GPx1, 2, 3, 4 e 6) no sítio ativo. Outra característica importante dessas enzimas é que todas elas utilizam a glutatona reduzida (GSH) como doador de elétrons, oxidando-a a glutatona oxidada (GSSG). GSSG é reciclada pela glutatona redutase (GR) num processo dependente de NADPH (BRIGELIUS-FLOHÉ e MAIORINO, 2013).

Prx também reduz H_2O_2 e peróxidos orgânicos com alta eficiência ($10^7 - 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), estando presente ubiquamente nas células na ordem de micromolar e em diferentes compartimentos. Em mamíferos foram descritos seis isoformas (PrxI a PrxVI), que são classificadas de acordo com a estrutura e mecanismo de ação em três subgrupos: 1-Cys, contém apenas uma cisteína conservada em N-terminal envolvida na catálise; 2-Cys, contém duas cisteínas conservadas em N- e C-terminal e requer ambas para a função catalítica; 2-Cys atípica, contém apenas uma cisteína em N-terminal, mas requer um resíduo de cisteína adicional, não conservado, para função catalítica (RHEE; CHAE; KIM, 2005). Diferentemente da catalase, essas enzimas possuem K_M de 0,7 μM para H_2O_2 (MANTA et al., 2009), o que favorece a reação com H_2O_2 quando em baixas concentrações e, portanto, mais relevantes do ponto de vista de sinalização celular. As cisteínas do sítio ativo das Prx são oxidadas na presença de peróxidos, sendo normalmente regeneradas pela tiorredoxina que, por sua vez, é reduzida pela tiorredoxina redutase e NADPH (RHEE e KIL, 2017).

Dentre os sistemas relacionados com a homeostase redox e citoproteção, a via do Nrf2 tem recebido destaque nos últimos anos. Nrf2 é um fator de transcrição que regula a expressão de diversas proteínas citoprotetoras e antioxidantes (ISHII et al., 2005; SAKURAI et al., 2018). Sob condições homeostáticas, Nrf2 é mantido inativo no citoplasma, ligado ao seu inibidor endógeno, a proteína ubiquitinadora Keap1. Após determinados tipos de estresse,

Nrf2 se desliga do Keap1 e transloca-se para o núcleo. Os mecanismos descritos para a dissociação e ativação da via do Nrf2/Keap1 são: (1) modificação do resíduo de cisteína da proteína Keap1 por ROS ou eletrófilos, (2) fosforilação do Nrf2 por quinases, incluindo MAPKs, proteína quinase C, fosfatidilinositol 3-quinase e (3) importação/exportação nuclear do Nrf2 através do complexo importina ou exportina (MCMAHON et al., 2006; JAIN e JAISWAL, 2007; BOUTTEN et al., 2011). No núcleo, Nrf2 se heterodimeriza com a proteína Maf (fibrossarcoma musculoaponeurótico) para formar o heterodímero Nrf2-Maf. Esses heterodímeros reconhecem os elementos de resposta antioxidantes (ARE, do inglês *antioxidant response element*), que se tratam de sequências potencializadoras localizadas nas regiões reguladoras dos genes alvo do Nrf2, essenciais para o recrutamento de outros fatores de transcrição (BOUTTEN et al., 2011; BELLEZZA et al., 2018).

Atualmente sabe-se que o fator de transcrição Nrf2 regula a expressão de enzimas desintoxicantes de fase II, incluindo NAD(P)H quinona oxidoreductase 1, ferritina, heme oxigenase-1 (HO-1), e genes antioxidantes, como a GPx (AHMED et al., 2017). Os genes ativados por Nrf2 podem ainda inibir indiretamente a via do NF- κ B e, conseqüentemente, controlar a cascata inflamatória dependente do NF- κ B. Nrf2 controla a transcrição de genes antioxidantes que protegem as células contra o acúmulo de ROS controlando desse modo a inflamação associada ao reparo, enquanto o Nf- κ B ativa a reação imune inata, proliferação e migração de células, modula a expressão de metaloproteinases de matriz, e secreção e estabilidade de citocinas (AMBROZOVA; ULRICHOVA; GALANDAKOVA, 2017). A HO-1, uma das proteínas expressas sob controle do Nrf2, bloqueia a translocação do NF- κ B para o núcleo por reduzir a degradação da proteína I κ B, que oculta a sequência de localização nuclear ou o domínio de ligação do DNA de NF- κ B (WAKABAYASHI et al., 2010).

A HO-1 é a enzima limitante na degradação microsomal de heme. O grupo heme é oriundo do catabolismo de proteínas hêmicas, como a hemoglobina e citocromo C. Trata-se de uma molécula pró-oxidante, capaz de catalisar a reação de Fenton em sistemas biológicos. Sob ação da HO-1, heme é convertido à biliverdina, CO e ferro. Biliverdina por sua vez é convertida em bilirrubina pela biliverdina redutase (MOTTERLINI e FORESTI, 2014; CHOI, 2016). Diversos trabalhos mostraram que CO possui propriedades vasorelaxantes (SAMMUT et al., 1998; FORESTI et al., 2004; DULAK et al., 2008), previne a hipertensão sistêmica e pulmonar (MOTTERLINI et al., 1998) e exibe efeitos anti-inflamatórios (OTTERBEIN et al., 2000). A biliverdina e bilirrubina também possuem propriedades antioxidantes notáveis participando da proteção de células e tecidos contra o estresse redox (STOCKER et al., 1987; CLARK et al., 2000a, 2000b; FORESTI et al., 2001)

Estudos com ativadores/inibidores da via do Nrf2 e o uso de camundongos geneticamente modificados na proteína concluíram que essa via é importante na instalação e progressão de doenças inflamatórias, incluindo hepatite (GU et al., 2014), encefalite (INNAMORATO et al., 2008), aterosclerose (FREIGANG et al., 2011), artrite (MAICAS et al., 2011), colite (STACHEL et al., 2014) septicemia (THIMMULAPPA et al., 2006), lesão da retina (WEI et al., 2011) e enfisema pulmonar (RANGASAMY et al., 2004). Em todos os casos, modelos deficientes ou suprimidos na via do Nrf2 apresentaram dano tissular e sintomatologia mais graves que os animais selvagens (AHMED et al., 2017).

Nos pulmões, Nrf2 pode regular a expressão de genes antioxidantes e citoprotetores sob estresse redox, o que deve prevenir o aparecimento de doenças pulmonares. Camundongos deficientes no Nrf2 mostraram maior suscetibilidade ao enfisema induzido pela fumaça de cigarro, confirmado através da inflamação pulmonar neutrofílica, aumento da atividade da elastase de neutrófilos, destruição alveolar (IIZUKA et al., 2005) e marcadores redox e inflamatórios elevados (RANGASAMY et al., 2004). Um estudo envolvendo a análise transcriptômica de camundongos deficientes no Nrf2 e expostos à fumaça de cigarro demonstrou que a transcrição de diversos genes antioxidantes e desintoxicantes de fases II foi reprimida, a exemplo da GPx2 (GEBE et al., 2010). Dentre as várias isoformas da Gpx, a GPx2, apresentou máxima indução nos pulmões de camundongos *wild type* em resposta à fumaça de cigarro (SINGH et al., 2006).

2.5 Tempol e nitróxidos cíclicos

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidinyloxy) e outros nitróxidos cíclicos são radicais livres estáveis sintéticos e particularmente eficazes na redução da lesão oxidativa em modelos celulares e animais (KAGAN et al., 2007; SOULE et al., 2007; AUGUSTO et al., 2008). Os representantes desse grupo possuem em sua estrutura um anel com cinco (pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina) ou seis átomos (piperidina), sendo que um desses é de nitrogênio e os demais de carbono (SOULE et al., 2007). Ao nitrogênio liga-se um átomo de oxigênio o qual possui elétron livre, fornecendo natureza radicalar aos compostos. No anel existem grupamentos alquil que previnem dismutação na molécula e limita o acesso de outras substâncias que poderiam quelar o grupo nitróxido, aumentando a estabilidade da molécula (Figura 1). O tamanho, as cargas e a lipofilicidade variam de acordo com os demais grupos

substituintes que podem estar presentes no anel (LEWANDOWSKI e GWOZDZINSKI, 2017).

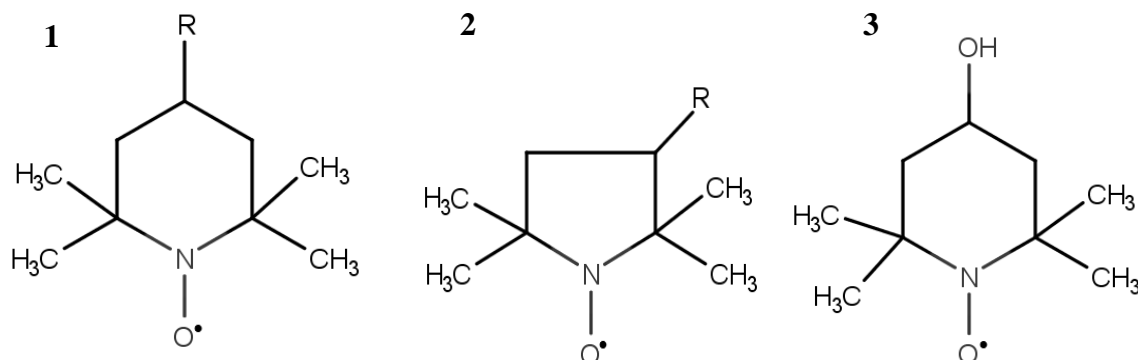


Figura 1. Estrutura química de nitróxidos cíclicos. O composto 1 pertence ao grupo dos nitróxidos piperidina, cujo anel possui seis membros. A estrutura 2 integra o grupo de nitróxidos pirrolidina, pirrolina ou oxazolidina, cujo anel é formado por cinco membros. O composto 3 refere-se a estrutura química do tempol (adaptado de SOULE et al., 2007).

O tempol é um dos nitróxidos mais estudados, primeiro por ser relativamente atóxico (MITCHELL et al., 1990; WILCOX e PEARLMAN, 2008b) e segundo, por ser hidrossolúvel e ter baixo peso molecular, pode facilmente permear membranas biológicas e se distribuir para todos os tecidos. Esse composto favorece o metabolismo de uma ampla variedade de ROS e reduz o estresse redox celular em diversos modelos celulares e animais, o que o caracteriza como um potente antioxidante (KAGAN et al., 2007; AUGUSTO et al., 2008; NEIL et al., 2017).

Os nitróxidos podem atuar tanto em compartimentos hidrofílicos como lipofílicos, reagem com HO•, CO₃^{•-}, NO•, ONOO⁻ e impedem o início e a propagação da cadeia oxidativa (SAMUNI et al., 2002; GOLDSTEIN; SAMUNI; MERENYI, 2004). Uma vantagem dessas moléculas é a capacidade de serem recicladas através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e da hidroxilamina (TPNOH) (Figura 2). TPNO⁺ é altamente oxidante ($E^\circ = 740$ mV) e é associado com as atividades pró-oxidantes dos nitróxidos. TPNOH por outro lado, é envolvido com a ação redutora dos nitróxidos (ISRAELI et al., 2005; SOULE et al., 2007; KIM et al., 2015a; OBROSOV et al., 2017)

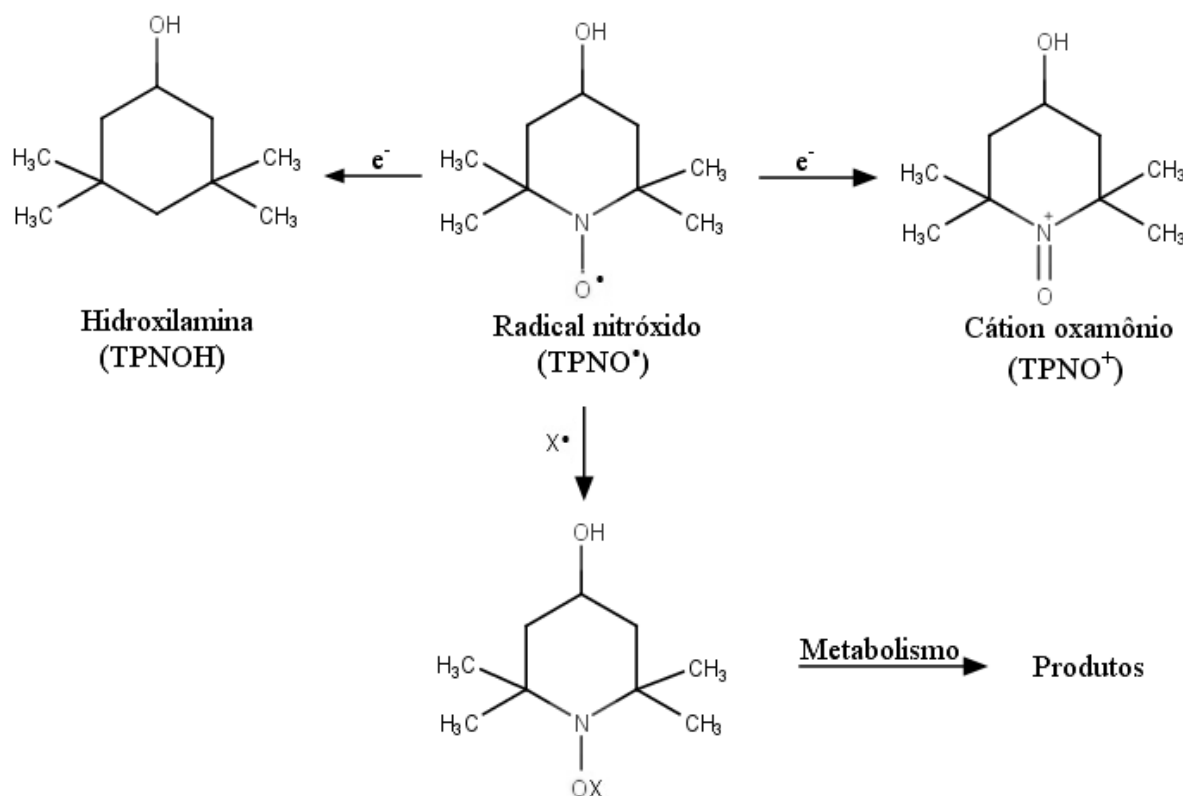


Figura 2. Principais reações redox de nitróxidos. Os nitróxidos podem reagir com diversos oxidantes e redutores biológicos e, reciclados através do cátion oxamônio (TPNO⁺) e do derivado hidroxilamina (TPNOH), podem atuar cataliticamente. Além das reações redox reversíveis, o tempol é consumido por recombinação com radicais alquila, alcoxila, tirosila e tiíla (X^\bullet) (adaptado de BORISENKO et al., 2004).

Os mecanismos pelos quais os nitróxidos protegem sistemas biológicos são diversos. Eles foram inicialmente descritos como miméticos da superóxido dismutase (SAMUNI et al., 1991), sequestrantes de radicais (PATTISON et al., 2012), redutores de proteínas heme oxidadas e oxidantes de metais de transição (SOULE et al., 2007). Contudo, as propriedades de antioxidantes clássicos não justificam completamente a miríade de efeitos dos nitróxidos *in vivo*, considerando seu baixo tempo de meia vida, aproximadamente 5 min quando administrado por via subcutânea e 1 min por via intravenosa (KUPPUSAMY et al., 1998). Recentemente, demonstrou-se ainda que o tempol e derivados inibem a enzima inflamatória de neutrófilos, mieloperoxidase (MPO) (REES et al., 2009; QUEIROZ; VAZ; AUGUSTO, 2011), diminuem a migração de neutrófilos para sítios inflamatórios *in vitro* e *in vivo* (QUEIROZ et al., 2012), inibem a ativação da via do Nf- κ B (CUZZOCREA et al., 2004), a expressão de iNOS (LINARES; GIORGIO; AUGUSTO, 2008) e a produção de citocinas inflamatórias em modelos murinos de esclerose múltipla (TSUHAKO et al., 2010). Há

evidências ainda que os nitróxidos, através do TPNO⁺ possam induzir a ativação da via Nrf2/Keap1/ARE (BOUTTEN et al., 2011; GREENWALD et al., 2014, 2015).

É inquestionável que os nitróxidos não apenas auxiliam na compreensão da sinalização redox da célula como também servem de protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. Na literatura não há relato sobre os efeitos do tempol e outros nitróxidos sobre a lesão pulmonar causada pela fumaça de cigarro e os envolvimento de nitróxidos na ativação da via do Nrf2 ainda são incipientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do tempol sobre a inflamação e estresse redox induzidos pela exposição aguda à fumaça de cigarro *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estudos *in vivo*

- Analisar o efeito do tempol sobre a migração leucocitária no lavado broncoalveolar e no tecido pulmonar em camundongos expostos agudamente à fumaça de cigarro;
- Determinar a exsudação leucocitária e estresse redox no parênquima pulmonar por métodos histológicos e imunohistoquímicos.
- Determinar a concentração de biomarcadores redox e inflamatórios no homogenato pulmonar por métodos bioquímicos;
- Avaliar a expressão de citocinas inflamatórias e de alguns dos genes controlados pelo fator de transcrição Nrf2 no pulmão;

3.2.2 Estudos com modelo celular

- Determinar a viabilidade de macrófagos murinos RAW 264.7 tratados com diferentes concentrações de tempol e com diferentes concentrações do extrato de fumaça de cigarro (EFC);
- Analisar o efeito do tempol sobre o estado redox intracelular e formação de óxido nítrico em RAW 264.7 expostos ao EFC;
- Avaliar a capacidade do tempol em estimular a expressão da HO-1 em RAW 264.7.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Albumina sérica bovina (BSA), 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-piperidiniloxil (tempol), glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG), glutathiona redutase (GR), ácido aminobenzóico hidrazida (ABAH), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), tween 20, soro de cabra, glicose anidra, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), hidroxitolueno butilado (BHT), sulfanilamida, naftiletilenodiamina, soro fetal bovino, reagente de Bradford, diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco *high-glucose* (DMEM), brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), inibidores de proteases, anti-proteína carbonilada (anti-DNP) e anti-glutathiona peroxidase 2 (anti-GPx2), produzidos em coelho foram obtidos da Sigma-Aldrich (EUA). Anticorpo secundário biotinilado anti-imunoglobulina de coelho foi obtido da Dako (EUA). Anti-heme oxigenase 1 (anti-HO-1) foi obtido da Abcam (EUA). Anti-mieloperoxidase (anti-MPO) foi obtido da Upstate (EUA). Anti-3-nitrotirosina produzido em coelho e filtros de 0,22 μm foram obtidos da Millipore (EUA). Os cigarros utilizados foram comerciais da marca Marlboro Red®. Ração padrão comercial foi obtida da Pragsoluções (Brasil). Metanol, clorofórmio, xilol, ácido acético, etanol, citrato de sódio, dimetilsulfóxido (DMSO), cloreto de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, ácido tiobarbitúrico, ácido tricloroacético, ácido fosfórico, glicerol foram obtidos da Merck (EUA). Malondialdeído foi obtido da Cayman Chemical (EUA). Nitrito de sódio foi adquirido da Dinâmica (Brasil). Soro fetal bovino foi adquirido da Cultilab (Brasil). Solução de Turk, kit

panótico rápido e hematoxilina de Harris foram obtidos da NewProv (Brasil). Eosina foi obtida da Procito (Brasil). Complexo avidina-biotina-peroxidase foi obtido da Vector (EUA). Câmara de Neubauer foi obtida da L-Optik (Alemanha). RNAlater, trizol, TURBO DNA-free™, Stable DAB (3,3-diaminobenzidina) foram obtidos da Invitrogen (EUA). O kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™ e o PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix foram obtidos da AppliedBiosystem (EUA). Dodecilssulfato de sódio (SDS) foi obtido da Gibco (Brasil). Azul de bromofenol foi obtido da Acros (EUA). O kit quimioluminescente para revelação de Western Blot e o comercial BCA Protein Assay foram obtidos da Pierce (EUA). A concentração de tempol foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{242} = 2,05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (HOFFMAN e EAMES, 1969). As soluções de H₂O₂ foram preparadas antes do uso e as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (COULTER; KURTZ, 2001). O tampão fosfato salino (PBS) consistia de tampão fosfato (10 mM), pH 7,4, contendo NaCl (0,14 mM). Nos experimentos envolvendo macrófagos, CaCl₂ (1 mM) e MgCl₂ (0,5 mM) foram adicionados ao PBS. A água utilizada em todos os experimentos foi purificada em sistema Milli-Q da Millipore.

4.2 Métodos

4.2.1 Estudos *in vivo*

4.2.1.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 machos (n=32), com 8 semanas de idade (20 – 25 g), foram adquiridos do Centro de Animais de Laboratório Criação e Comércio LTDA (Anilab, Paulínia, Brasil). Os animais foram acondicionados no Biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia por 2 semanas para ambientação, mantidos em caixas de polipropileno, com oito animais por caixa, ambiente com condições de temperatura ($23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade (50 – 70%) controladas, ciclo claro-escuro de 12 h, e com acesso *ad libitum* à água e ração padrão comercial. Os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de

Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA/UESB), sob o parecer de número 168/2017, que consta no Anexo I deste trabalho.

4.2.1.1.1 Grupos e tratamentos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n = 8 por grupo), conforme descrito a seguir (Figura 3):

1. **Grupo controle (GC)** – Os animais foram expostos ao ar ambiente, 3 vezes ao dia, por 5 dias consecutivos e receberam diariamente, por 8 dias sucessivos, 100 µL de salina estéril por via intraperitoneal (i.p.), uma vez ao dia (07:30 h), 30 min antes do horário estipulado para a primeira exposição diária.
2. **Grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC)** – Os animais, durante 5 dias consecutivos, foram expostos à fumaça de cigarro, 3 vezes ao dia, totalizando 15 cigarros por dia, e receberam o tratamento com salina estéril sob condições iguais ao grupo controle.
3. **Grupo tratado preventivamente com tempol (50 mg/kg/dia) e expostos à fumaça de cigarro (TP+FC)** – Os camundongos, durante os dias 0, 1 e 2 do protocolo experimental, receberam às 07:30 h 100 µL de tempol via i.p., em uma concentração de 50 mg/kg/dia diluído em salina estéril (veículo). O veículo foi administrado via i.p. nos demais dias, enquanto os animais foram expostos por 5 dias consecutivos à fumaça de cigarro sob as mesmas condições do grupo GFC.
4. **Grupo tratado concomitantemente com tempol (50 mg/kg/dia) e expostos à fumaça de cigarro (TC+FC)** – Nas mesmas condições dos grupos GFC e TP+FC, os animais foram expostos à fumaça de cigarro e os mesmos receberam o veículo via i.p. nos dias 0 e 1 do protocolo, e o tempol 50 mg/kg/dia via i.p., no dia que antecedia e durante 5 dias consecutivos concomitante com à exposição à fumaça de cigarro.

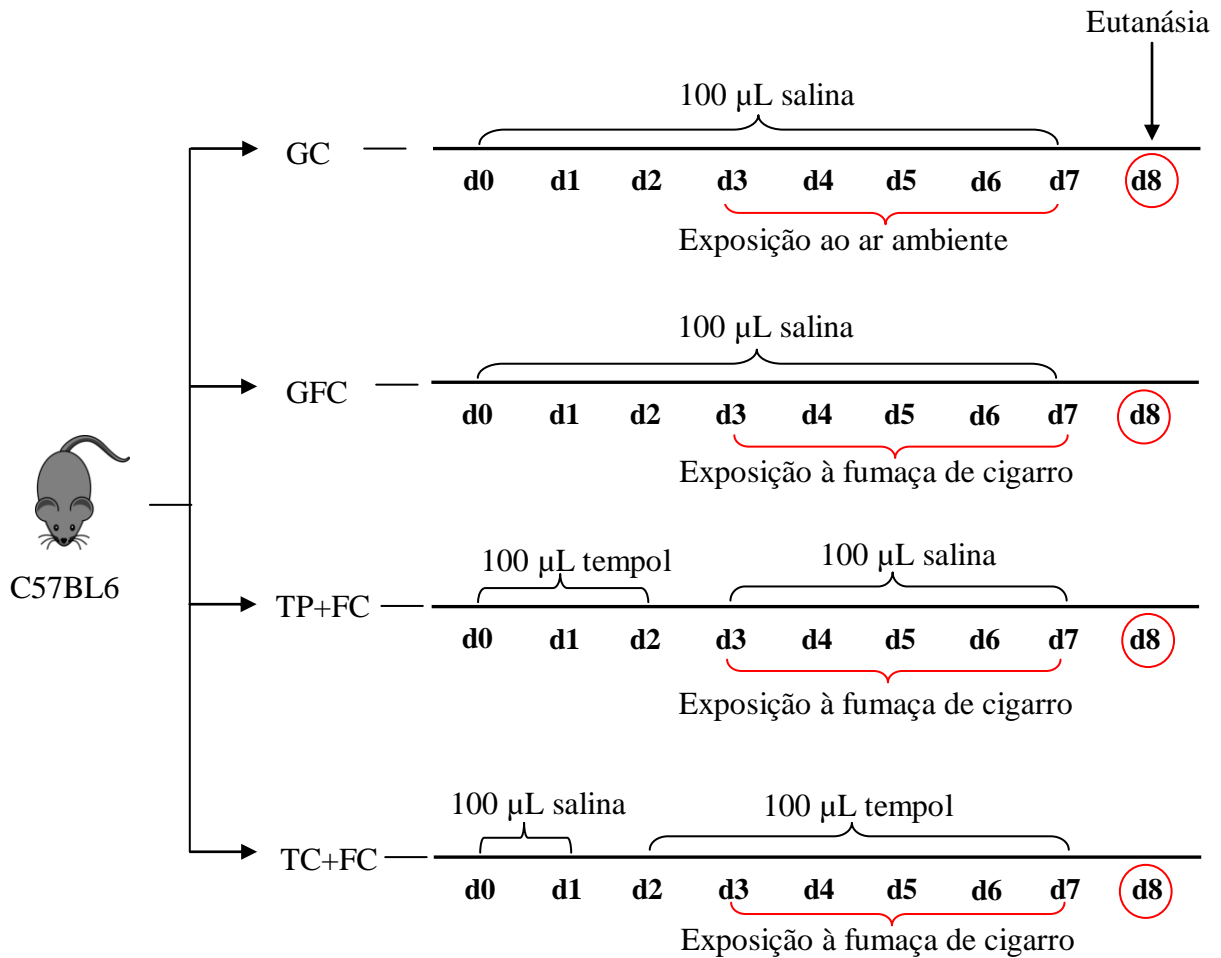


Figura 3. Delineamento experimental *in vivo*. Trinta e dois animais foram divididos em quatro grupos, grupo exposto ao ar ambiente (GC), grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC), e grupos que receberam preventivamente ou concomitantemente tempol 50 mg/kg/dia mais a fumaça de cigarro (TP+FC e TC+FC). FC = Fumaça de cigarro.

4.2.1.2 Exposição à fumaça de cigarro

Os camundongos (n=24) foram expostos a 15 cigarros comerciais da marca Marlboro Red® (composição de acordo com fabricante: 10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono) por dia, durante 5 dias consecutivos, utilizando uma câmara de inalação conforme descrito anteriormente (CAMPOS et al., 2017; KENNEDY-FEITOSA et al., 2018) A câmara de inalação foi disposta numa capela de exustão desligada e continha a seguinte configuração: 40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura; segmentada internamente por 24 baias construídas de telas metálicas hexagonais com 6,5 cm

de comprimento, 7,5 cm de largura e 25 cm de altura. Cada animal foi alojado separadamente em uma das baias da câmara de inalação antes da exposição de todos simultaneamente à fumaça de cigarro. Um cigarro foi acoplado a uma seringa plástica de 60 mL, com a qual obteve-se 50 mL de fumaça que foram injetados no interior da câmara de inalação (Figura 4). O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa foi realizado 20 vezes até completa combustão do cigarro, que ocorreu em aproximadamente 3 min. Cada cigarro gerou aproximadamente 1 L de fumaça, que foi diluída nos 30 L totais da câmara e, portanto, a concentração de fumaça no interior da câmara foi cerca de 3% por cada cigarro. Após 6 min de exposição à fumaça de cigarro, a tampa da câmara foi aberta, o exaustor foi ligado para total eliminação da fumaça e os animais mantiveram contato com o ar ambiente por 1 min. Em seguida, o procedimento foi repetido com os demais cigarros. Os camundongos foram expostos à fumaça 3 vezes ao dia: 5 cigarros no turno matutino (08:00h), 5 cigarros ao meio-dia e finalmente 5 cigarros no turno vespertino (16:00h), o que resultou em 15 cigarros por dia. O tempo de exposição total à fumaça de cigarro foi de 90 min ao dia. Após 24 h da última exposição, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg) via i.p.

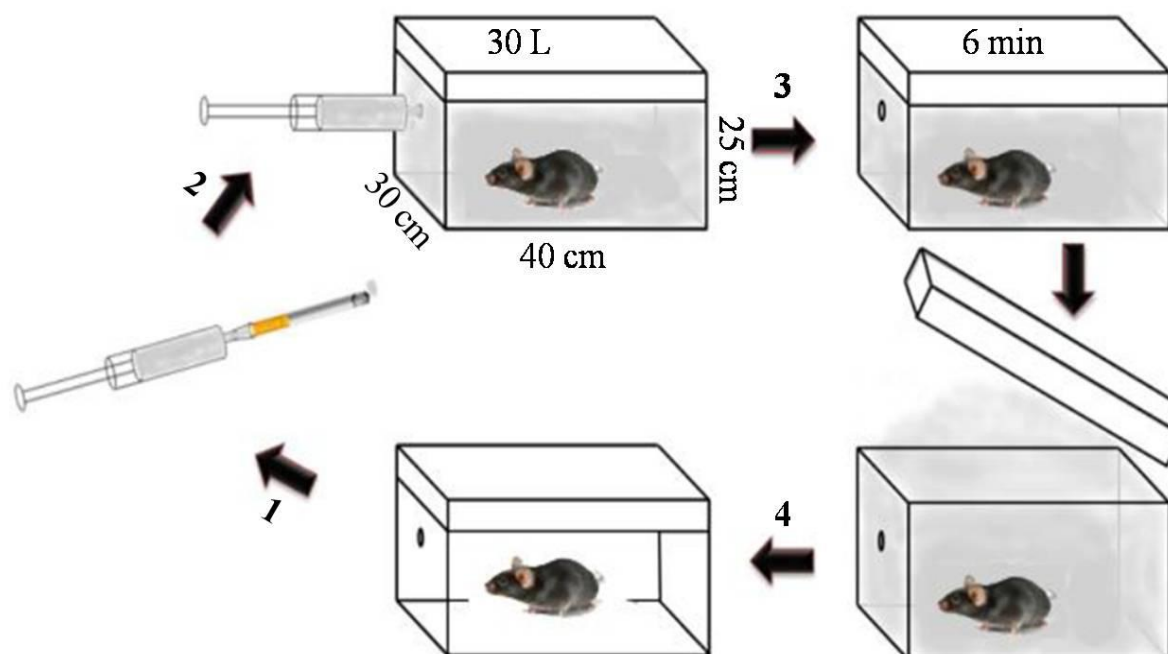


Figura 4. Esquema da câmara de inalação. Vinte e quatro camundongos foram dispostos individualmente em uma das baias da câmara. Um cigarro foi acoplado a uma seringa plástica de 60 mL (1), com a qual obteve-se 50 mL de fumaça que foram injetadas no interior da

câmara de inalação (2), após 6 min de exposição à fumaça de cigarro (3), a tampa da câmara foi aberta, para total eliminação da fumaça e os animais mantiveram contato com o ar ambiente por 1 min (4). Em seguida, o procedimento foi repetido para os demais cigarros. Os camundongos foram expostos a 15 cigarros por dia, durante 5 dias consecutivos.

4.2.1.3 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, os animais foram submetidos à traqueostomia para canulação da traqueia com cateter de infusão (G22), e os pulmões lavados com 0,5 mL de solução PBS glicose por três vezes para a coleta do LBA. As amostras de LBA foram mantidas em gelo até o final do procedimento a fim de evitar morte celular. As células foram então diluídas em solução de Turk para lise total das hemácias e a contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Na contagem diferencial das células, 50 µL da amostra do LBA foram citocentrifugadas a 4500g (Presvac CT-12, Brasil) por 7 min a 25 °C. As lâminas foram então coradas com kit Panótico rápido, através de um banho de imersão em três soluções distintas: metanol (10 s), eosina (10 s) e azul de metileno (20 s). Um total de 100 células por lâmina foram contadas em triplo-cego usando os critérios morfológicos padrões (GUEIRARD et al., 1998), e a contagem absoluta diferencial foi calculada multiplicando a concentração relativa pelo número total de leucócitos obtido na câmara de Neubauer.

4.2.1.4 Determinação dos níveis de nitrito no LBA

O nitrito do LBA foi dosado pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). O sobrenadante do lavado (50 µL) foi incubado com 50 µL de solução de naftiletlenodiamina (0.1%) e 50 µL de solução de sulfanilamida (1%) por 10 min a 25°C, a absorbância foi determinada a 540 nm e interpolada numa curva padrão de nitrito (1,65 a 100 µM).

4.2.1.5 Obtenção dos tecidos

Os animais foram submetidos à toracotomia mediana para extração dos pulmões após coleta do LBA. O pulmão direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C para as análises bioquímicas. O pulmão esquerdo foi dividido longitudinalmente, no qual: 1) uma metade do tecido foi imediatamente imersa em 300 µL de

RNA later, congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C, para posterior extração de RNA para o PCR em tempo real (qPCR); 2) a outra metade do pulmão foi imerso numa solução fixadora de Methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante um período de 24 h, seguido pela substituição do fixador por álcool etílico (70%), para uso nas análises histológicas e imuno-histoquímicas. A carcaça foi armazenada à -20 °C para posterior incineração.

4.2.1.6 Análise histológica pulmonar

O pulmão fixado e desidratado foi parafinado e cortado longitudinalmente em secções de 4 µm de espessura em micrótomo (Leica RM2125RTS, China). Todos os cortes foram realizados no Laboratório Micro, Vitória da Conquista. As secções foram desparafinizadas em xilol 3 vezes, por 5 min cada, hidratadas em etanol 100, 95 e 75% por 5, 4 e 1 min, respectivamente, e coradas com hematoxilina e eosina (HE). O infiltrado neutrofílico foi avaliado em 30 campos aleatórios (10 campos aleatórios de 3 secções diferentes) dos tecidos corados, e fotografados com uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Echting, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão), sob aumento de 400 x (DE MOURA et al., 2012). A quantificação do número de neutrófilos e macrófagos por campo foi realizada com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

4.2.1.7 Análise imuno-histoquímica

Os antígenos das secções histológicas do tecido pulmonar esquerdo foram ativados pelo tratamento com tampão citrato após desparafinização e hidratação (SHI et al., 1993). Resumidamente, as secções imersas em tampão citrato (10 mM), pH 6,0, foram aquecidas em microondas (Consul, Erva Doce, Brasil) na potência máxima (900 W) por 1 min. Em seguida, elas foram mantidas por mais 4 min sob potência média (450 W), e resfriadas em banho de gelo por 20 min. As peroxidases endógenas foram inibidas mediante a incubação das secções com azida sódica (0,1%) e H₂O₂ (0,3%) por 10 min a 25 °C em cuba úmida. As lâminas foram lavadas duas vezes, 5 min cada, com PBST (PBS acrescido de Tween® 20 0,1%) e a ligação inespecífica de imunoglobulinas foi bloqueada pela incubação com solução de soro de cabra

(20%) em cuba úmida por 30 min. As seções foram novamente incubadas em cuba úmida com os anticorpos policlonais produzidos em coelho, anti-proteína carbonilada (anti-DNP) (Sigma D9656, diluição 1:100) e anti-mieloperoxidase (anti-MPO) (Upstate 0796, diluição 1:50), por 1 h a 25 °C, e anti-3-nitrotirosina (Millipore 06-284, diluição 1:200) e anti-Glutationa peroxidase 2 (anti-GPx2) (Sigma GT39428, diluição 1:50), por 14 h a aproximadamente 4 °C. O excesso do anticorpo primário foi removido pela lavagem duas vezes, 5 min cada, com PBST. As lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho (Dako E0432, diluição 1:300) por 1 h a 25 °C. Após duas lavagens, 5 min cada, com PBST, o produto da reação foi detectado pela incubação por 30 min com o complexo avidina-biotina-peroxidase e a cor desenvolvida com *Stable DAB* (Invitrogen, reagente completo com 3,3-diaminobenzidina e H₂O₂) em aproximadamente 2,5 min. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris (KIM et al., 2015b). Ao final, 10 campos aleatórios das seções pulmonares foram fotografados com auxílio de uma câmera digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão) sob aumento de 400 x. As imunomarcações para DNP (SATO et al., 2006), nitrotirosina (OYAGBEMI et al., 2018) e GPx2 (LEE et al., 2017) foram expressas como porcentagem de área marcada/ μm^2 , em relação a área total da imagem, enquanto os níveis de MPO foram expressos pela contagem de células positivas (SAKAI et al., 2011). Os resultados foram analisados com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

4.2.1.8 Marcadores redox e inflamatórios no parênquima pulmonar

4.2.1.8.1 Atividade peroxidásica da MPO

O ensaio da atividade peroxidásica com o 3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) foi realizado como descrito anteriormente (SUZUKI et al., 1983; PULLI et al., 2013). Resumidamente, o tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 6,0, com o auxílio do sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA) e em seguida centrifugado a 10.000g por 10 min a 4 °C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha). Brometo de Cetil Trimetilamonio (CTAB, 0,5%) foi adicionado ao sobrenadante para evitar adesão da MPO nas paredes do tubo durante armazenagem. Em seguida, o homogenato (10 μL) foi misturado com 110 μL da solução trabalho contendo TMB (2,9 mM

dissolvido em dimetilsulfóxido 14%, preparado em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 5,4) e 80 µL de H₂O₂ (0,75 mM) foi adicionado para iniciar a reação. A oxidação do TMB foi acompanhada a cada 30 s em 450 nm (Thermoplate, Tp-reader, EUA) por 5 min a 25 °C ($\epsilon_{450\text{ nm}} = 5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade peroxidásica da MPO foi confirmada pela adição do ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH) (50 µM), conhecido inibidor da MPO (Kettle, Gedye e Winterbourn, 1997; Queiroz et al., 2012), ao meio reacional contendo os homogenatos dos camundongos GFC, 5 min antes da adição da solução de TMB. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína), onde uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 µmol de TMB oxidado por min a 25 °C.

4.2.1.8.2 Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada conforme o método proposto por Paglia e Valentine (1967). O método se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela GPx, acoplada à reciclagem da glutathiona oxidada (GSSG) pela glutathiona redutase (GR), que utiliza o NADPH como doador de elétrons. O tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 7,0, com o auxílio do sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA). Após centrifugação a 10.000g por 10 min a 4 °C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), o sobrenadante foi coletado. Em cubeta de quartzo, misturou-se 300 µL do tampão Tris HCl, 250 µL do homogenato (1:10 em tampão Tris HCl) e 400 µL do mix reacional contendo NADPH (0,25 mM), GSH (2,1 mM), GR (0,5 U/mL) e azida sódica (1 mM) (ZHANG et al., 2016). A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de H₂O₂ (0,2 mM), e a decomposição do NADPH foi monitorada a 340 nm a cada 15 s por 6 min a 25 °C (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que causou a oxidação de 1 µmol de NADPH por min a 25 °C. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de proteína (U/g de proteína).

4.2.1.8.3 Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica no homogenato do tecido pulmonar foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances*

- TBARS) (DRAPER et al., 1993). Com o auxílio do sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA), o tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 8,0 e de hidroxitolueno butilado (BHT, 0,02 %) para evitar oxidações espúrias. Em seguida, o homogenato foi centrifugado (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1600g por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. Posteriormente, o sobrenadante foi diluído (1:2) em tampão Tris HCl num volume final de 100 µL, adicionado de 100 µL de ácido tricloroacético (10%) e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (0,53%, dissolvido em ácido acético a 20%). A mistura reacional foi incubada por 1 h a 95 °C, seguido do resfriamento em gelo por 10 min a fim de cessar a reação. As amostras foram novamente centrifugadas a 1600g por 10 min a 4 °C, e a absorbância foi lida a 535 nm (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (0 a 50 µM), normalizada pela concentração de proteínas e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína.

4.2.1.8.4 Determinação da concentração de proteínas totais nos pulmões

A concentração de proteína total das amostras do homogenato pulmonar foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976) a 595 nm conforme recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich, EUA). Albumina de soro bovino (0 a 1,4 mg/mL) foi utilizada na curva de calibração.

4.2.1.8.5 Expressão de genes inflamatórios, anti-inflamatórios e citoprotetores

O ácido ribonucléico (RNA) total das amostras dos tecidos pulmonares (50 mg) foi extraído utilizando 1 mL do reagente de lise TRIzolTM de acordo com as instruções do fabricante, e o sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA) foi utilizado para homogeneização do tecido pulmonar. As amostras de tecido foram mantidas em gelo até o final do procedimento a fim de manter a integridade do RNA. Durante a purificação, o RNA foi tratado com TURBO DNA-freeTM para digestão do ácido desoxirribonucléico (DNA) contaminante, de acordo as orientações do fabricante. A concentração (ng/µL) e pureza (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) do RNA total foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDropTM 2000, Thermo Fisher Scientific,

EUA) e as amostras foram acondicionadas à -80 °C até a transcrição reversa. As amostras foram utilizadas apenas se a razão A_{260}/A_{280} fosse de 1,8-2,1.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNA™, segundo as instruções do fabricante. Esse material foi armazenado à -80 °C até a realização da qPCR.

Os níveis de expressão dos genes-alvo, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17) e interleucina 1 β (IL-1 β), que são envolvidos no processo inflamatório; interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β), que são relacionados com processos anti-inflamatórios; heme-oxigenase 1 (HO-1) e glutathione peroxidase 2 (GPx2), relacionados com o fator de transcrição Nrf2; e beta-actina (ACTB), gene de referência, foram quantificados por PCR em tempo real utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix a partir das amostras de cDNA na concentração de 100 ng/µL. Todos os procedimentos foram realizados em duplicata, conduzidos de acordo com as instruções do fabricante, sendo que sistema StepOne Plus (AppliedBiosystem, EUA) foi utilizado para termociclagem, conforme descrito: um ciclo de 50°C por 2 min, um ciclo de 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s, 40 ciclos de 60 °C por 1 min e a curva de *melting* (15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, 15 s a 95 °C) (BUSTIN et al., 2009). As sequências específicas dos primers para os genes alvos na análise do PCR em tempo real foram obtidas na literatura e os anelamentos testados pela ferramenta BLAST do NCBI (Tabela 1).

A partir da obtenção dos resultados de Ct (*cycle threshold*) fornecidos pelo termociclador, calculou-se a expressão relativa (*fold-change*) por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Sequência dos primers utilizados na qPCR

| Gene | Sequência | Referência |
|--------------------------------|---|-----------------------|
| <i>Tnf-α</i> | <i>Forward:</i> CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA <i>Reverse:</i> TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | (SUN; LI; LI, 2016) |
| <i>Il-6</i> | <i>Forward:</i> TGATGCTGGTGACAACCACG <i>Reverse:</i> CAGAATTGCCATTGCACAACCTC | (SUN; LI; LI, 2016) |
| <i>Il-17</i> | <i>Forward:</i> ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC <i>Reverse:</i> GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG | (HUI et al., 2019) |
| <i>Il-1β</i> | <i>Forward:</i> AGAAGAGCCATCCTCTGTGACTCATG <i>Reverse:</i> CACACACCAGCAGGTTATCATCA | (MARKÓ et al., 2016) |
| <i>Il-10</i> | <i>Forward:</i> TGAATTCCCTGGGTGAGAAG <i>Reverse:</i> TGGCCTTGTAGACACCTTGG | (KOSAKA et al., 2011) |
| <i>Tgf-β</i> | <i>Forward:</i> CCCGAAGCGGACTACTATGC | (SUN; LI; LI, |

| | | |
|-------------|--|---------------|
| | <i>Reverse:</i> TAGATGGCGTTGTTGCGGT | 2016) |
| <i>Ho-1</i> | <i>Forward:</i> AACAAAGCAGAACCCAGTCTATGC | (SUN; LI; LI, |
| | <i>Reverse:</i> AGGTAGCGGGTATATGCGTGGGCC | 2016) |
| <i>Gpx2</i> | <i>Forward:</i> GTGGCGTCACTCTGAGGAACA | (NEWSOME |
| | <i>Reverse:</i> CAGTTCTCCTGATGTCCGAACTG | et al., 2014) |
| <i>Actb</i> | <i>Forward:</i> TGTCCACCTTCCAGCAGATGT | (NEWSOME |
| | <i>Reverse:</i> GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA | et al., 2014) |

4.2.2 Estudos com modelo celular

4.2.2.1 Cultivo celular

Os macrófagos murinos RAW 264.7 foram adquiridos no Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e mantidos no Laboratório de Bioquímica de Oxidantes e Radicais, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP). Os macrófagos foram cultivados em garrafas estéreis de 75 cm² (Sigma-Aldrich, MA, EUA) contendo meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco high glucose (DMEM) adicionado de soro fetal bovino (10%) e penicilina (1%), denominado aqui como DMEM-suplementado. As garrafas foram incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera úmida de 5% de dióxido de carbono (CO₂). As células foram cultivadas até atingirem 80% de confluência, sendo removidas por raspagem com *cell scraper*, para subcultivo ou uso nos experimentos. A suspensão contendo as células foi coletada e centrifugada a 1600g a 25 °C (Sorvall RT6000B, EUA). Após 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 mL de DMEM-suplementado. A suspensão resultante foi diluída na proporção de 1:100 (v/v) em meio DMEM-suplementado e a contagem total de células foi realizada no contador MuseTM Cell Analyzer (Merck Millipore, EUA). Todos os experimentos do modelo celular foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Oxidantes e Radicais da Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Química, São Paulo, Brasil.

4.2.2.2 Preparo do extrato da fumaça de cigarro

O extrato da fumaça de cigarro (EFC) foi preparado a partir do cigarro filtrado Marlboro Red® como previamente descrito (GUAN et al., 2013; CAMPOS et al., 2017). Resumidamente, o cigarro foi acoplado a uma seringa de 60 mL, com a qual dentro de uma

capela de exaustão borbulhou a fumaça de um cigarro em 10 mL de DMEM adicionado de soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%), o qual estava presente em um tubo falcon totalmente fechado (Figura 5). O extrato obtido foi mantido em repouso por 10 min. Em seguida, o pH foi ajustado para 7,4, e filtrado com filtro Millipore de 0,22 μ m. Esse extrato, considerado como extrato bruto, foi diluído 10 vezes (EFC 10%) e padronizado através da determinação da densidade óptica ($0,80 \pm 0,05$) a 320 nm (Shimadzu UV-2550, EUA) (LI et al., 2017). O EFC foi preparado imediatamente antes dos experimentos e diluído com meio de cultura contendo soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%). O meio controle continha soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%), sendo borbulhado com ar. O pH foi também ajustado para 7,4 e filtrado em condições estéreis, conforme descrito acima.

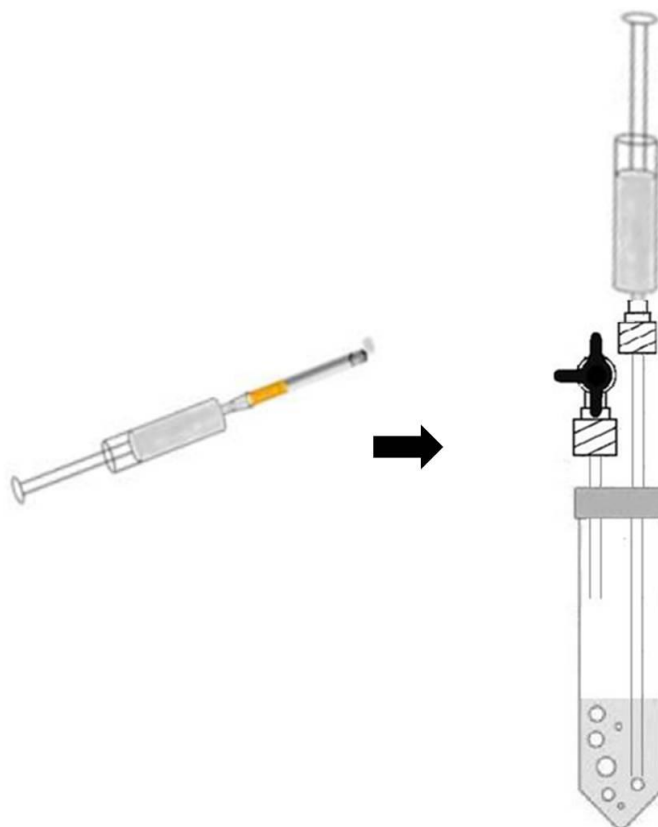


Figura 5. Imagem representativa do aparato utilizado no preparo do EFC. O cigarro foi acoplado a uma seringa de 60 mL, com a qual borbulhou a fumaça de um cigarro em 10 mL de DMEM. A solução resultante foi mantida em repouso por 10 min antes do ajuste do pH para 7,4 e esterilização com filtro 0,22 μ m (Millipore) (Adaptado de (GELLNER; REYNAGA; LESLIE, 2017)).

4.2.2.3 Atividade metabólica dos macrófagos

As células (2×10^5 por poço) foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 200 μL de DMEM-suplementado. As placas foram incubadas em estufa por 6 h a 37°C sob atmosfera de CO_2 (5%) para aderência. Após isso, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 200 μL de DMEM com soro fetal bovino (1%), penicilina (0,1 %) e tempol (10, 50, 100 e 500 μM) ou EFC (0,5, 1,0, 2,5, 5,0,7,5 e 10%). As microplacas foram então incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera de CO_2 (5%) por 24 h. O sobrenadante foi descartado, os poços lavados com 300 μL de PBS, adicionados de 200 μL de DMEM sem soro fetal bovino contendo brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (0,5 mg/mL). As microplacas foram incubadas por aproximadamente 1 h a 37°C . O sobrenadante foi removido e 200 μL de dimetilsufóxido (DMSO) foram adicionados a cada poço para dissolução do precipitado azul de formazan. A absorbância foi determinada a 570 nm em leitor de microplacas (Tecan, Infinite 200PRO, EUA). A atividade metabólica celular, definida aqui como viabilidade celular, foi calculada conforme a seguir:

$$\frac{\text{Absorbância das células tratadas}}{\text{Absorbância do controle}} \times 100$$

As células incubadas apenas com o meio foram consideradas como 100% viáveis. Triton 1% foi utilizado para a morte total das células (MOSMANN, 1983).

4.2.2.4 Oxidação intracelular da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

A DFCH-DA foi usada para medir o estado redox intracelular geral por reagir inespecificamente com diversas espécies oxidantes (WANG e JOSEPH, 1999). A suspensão de macrófagos (2×10^5 por poço) em um volume final de 200 μL de DMEM-suplementado foi transferida para microplacas de 96 poços para aderência das células à microplaca. Após 14 h, o sobrenadante foi removido e as células foram pré-tratadas com tempol (25, 50 e 100 μM) diluído em DMEM sem corante vermelho de fenol, contendo soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%), por 24 h em estufa a 37°C sob atmosfera de CO_2 (5%). O sobrenadante foi então removido, as células foram lavadas com 300 μL PBS. Em seguida, adicionou-se 200 μL do meio DMEM sem corante contendo DCFH-DA (20 μM). As placas foram novamente incubadas por 30 min em estufa a 37°C sob atmosfera de CO_2 (5%). Os poços foram então lavados com 300 μL de PBS e as células expostas ao EFC 0,5%, o qual também foi diluído

em DMEM sem corante, adicionado de soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%). A oxidação da DCFH foi acompanhada por 1 h em leitor de microplacas sob excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (Tecan, infinite 200 PRO, EUA). A concentração do EFC foi escolhida mediante experimentos-controle preliminares.

4.2.2.5 Ativação da óxido nítrico sintase

Os macrófagos (5×10^6 células por poço) foram transferidos para placas de cultura contendo 2 mL de DMEM-suplementado para aderência celular. Após 14 h, o meio foi removido e as células pré-tratadas com 2 mL de DMEM contendo soro fetal bovino (1%), penicilina (0,1 %) e tempol (25, 50 ou 100 μ M) por 24 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%). O sobrenadante foi removido e as células lavadas com 3 mL de PBS. Então, adicionou-se 2 mL do EFC (2,5%) em DMEM contendo soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%). As placas foram novamente incubadas por 24 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%). Interferon-gama (200 U/mL) e lipopolissacarídeo (2 μ g/mL) foram utilizados como controle positivo da ativação do óxido nítrico sintase. O sobrenadante foi retirado, centrifugado a 5000g (Eppendorf™ 5452000018) por 5 min a 25 °C e o sobrenadante obtido foi congelado no gelo seco e armazenado à -80 °C para posterior quantificação de NO₂⁻ e NO₃⁻ por quimioluminescência (FEELISCH et al., 2002). A concentração do EFC foi escolhida mediante experimentos preliminares para identificar a ativação da via da óxido nítrico sintase.

4.2.2.6 Determinação dos produtos do óxido nítrico por quimioluminescência

A determinação de óxido nítrico nos macrófagos expostos ao EFC foi realizada por quantificação de seus produtos de oxidação, nitrito e nitrato, pela técnica de quimioluminescência, através de um analisador de óxido nítrico (NOA²⁸⁰; SieversInstruments) seguindo o procedimento otimizado por Feelisch et al (2002).

O sobrenadante da coleta descrita no item 4.2.2.5 foi dividido em 2 alíquotas. A primeira alíquota foi injetada diretamente na cela contendo uma solução de iodeto de potássio (45 mM) e iodo (10 mM) em ácido acético glacial que foi mantida à 60 °C e com fluxo de nitrogênio como gás de arraste. Sob estas condições, o nitrito é reduzido à óxido nítrico, que é carregado via corrente do nitrogênio até a cela de reação com ozônio onde forma dióxido de nitrogênio excitado eletronicamente, que ao decair para o estado fundamental emite

quimioluminescência. A segunda alíquota foi injetada diretamente na cela contendo uma solução saturada de cloreto de vanadium (III) em HCl (1 M) mantida a 90 °C. Nestas condições, nitrato e nitrito são reduzidos a óxido nítrico que é carregado pelo gás de arraste e detectado por quimioluminescência, conforme descrito acima. As áreas dos picos das amostras foram obtidas por integração com o software do aparelho e as concentrações (μM) de nitrito e de nitrato foram calculadas utilizando-se curva padrão. Curva padrão de nitrito e curva padrão de nitrato foram obtidas injetando-se concentrações conhecidas de padrão de nitrito e de padrão de nitrato sob as mesmas condições de análise das amostras.

4.2.2.7 Expressão da HO-1

As células (2×10^6 por poço) em um volume final de 2 mL de DMEM-suplementado foram transferidas para placas de cultura de 6 poços para aderência celular. Após 14 h, o meio foi descartado e as células foram pré-tratadas com 2 mL de DMEM com soro fetal bovino (1%), penicilina (0,1 %), contendo tempol (25, 50 e 100 μM) ou hemina (5 μM) durante 24 h em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%). A hemina foi preparada inicialmente em NaOH (0,15 M), seguida pela diluição por 10 vezes em Tris HCl (0,15 M), pH 7,0 (SHEFTEL; KIM; PONKA, 2007). Após esse período, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com 3 mL de PBS, e 300 μL do tampão RIPA (tampão Tris 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, Nonidet 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, inibidores de proteases, sem EDTA) foi adicionado em cada poço. As células foram removidas com *cell scraper* e a suspensão celular foi homogeneizada em vortex. Após 20 min em gelo, o lisado total foi centrifugado a 1000g por 5 min (Eppendorf™ 5452000018) a 25 °C para separar *debris* e material genético do homogenato. O sobrenadante foi coletado, congelado em gelo seco e armazenado à -80 °C para SDS-PAGE/Western Blotting.

4.2.2.8 Western Blotting

As proteínas (17 μg) foram diluídas em tampão de amostra (tampão Tris HCl 62,5 mM, pH 6,8, contendo SDS 2%, azul de bromofenol 0,01%, glicerol 10% e β -mercaptoetanol 5%), fervidas por 5 min e submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (5% gel de empacotamento; 12% gel de resolução) a 200 V fixos por 50 min (fonte Bio-Rad, Power Pac200). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para

membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em transferidor semi-seco a 350 mA fixos por 1 h (Trans-Blot®SD, Bio-Rad) utilizando o tampão Towbin (Tris 25 mM, glicina 192 mM e etanol 20%). A membrana foi cortada em aproximadamente 35 kDa e bloqueada por 2 h com leite desnatado (5%) em tampão TBS (do inglês, *Tris Buffered Saline* – Tris HCl 50 mM, NaCl 150mM, pH 7,5). Após o bloqueio, a membrana foi lavada em TBS por três vezes, 10 min cada. A parte inferior foi incubada com o anticorpo primário anti-HO-1 (ab13243, diluição 1:2000, 14 h), enquanto que a parte superior com o anticorpo primário anti-actina (Sigma A2103, diluição 1:1000, 14 h), produzidos em coelho, e diluídos em TBST (TBS adicionado de Tween® 20 0,05%) contendo leite desnatado (1%). As membranas foram lavadas três vezes, 10 min cada, com TBST, e incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de coelho marcado com peroxidase (KPL 04-15-06, diluição 1:10000, 2 h) diluído em TBST contendo leite desnatado. Após lavagem por três vezes com TBST, 10 min cada ciclo, as membranas foram reveladas com o kit SuperSignal™ West Pico Plus – *Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, EUA), no fotodocumentador UVITEC CAMBRIDGE. A análise da densitometria foi realizada usando o programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

4.2.2.9 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteína total das amostras dos extratos celulares foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), conforme kit comercial da Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA). Albumina de soro bovino (0 a 2,0 mg/mL) foi utilizada como padrão.

4.3 Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão. A significância estatística foi calculada com ANOVA one-way e Newman-Keuls como pós-teste, quando apropriado. Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad-Prism 5.0.3 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; JANEWAY, C. A. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129–38, 7 jan. 2000.
- AHMED, S. M. U. et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1863, n. 2, p. 585–597, 2017.
- ALAM, S. M. Second-hand Tobacco Smoke (ETS) – Findings of an Australian Case Study and How Dhaka can reap the Benefit from the Research Outcome. **The International Journal of Social Sciences and Humanities Invention**, v. 5, n. 9, p. 4959–4968, 2018.
- AMBROZOVA, N.; ULRICHOVA, J.; GALANDAKOVA, A. Models for the study of skin wound healing. The role of Nrf2 and NF- κ B. **Biomedical Papers**, v. 161, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ASANO, H. et al. Nicotine- and Tar-Free Cigarette Smoke Induces Cell Damage Through Reactive Oxygen Species Newly Generated by PKC-Dependent Activation of NADPH Oxidase. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 118, n. 2, p. 275–287, 2012.
- AUGUSTO, O. et al. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: Two emerging radicals in biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 9, p. 841–859, 2002.
- AUGUSTO, O. et al. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: Mechanisms and implications. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 80, n. 1, p. 179–189, 2008.
- BABIOR, B. .; LAMBETH, J. .; NAUSEEF, W. The neutrophil NADPH oxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 342–344, 2002.
- BAO, M. J. et al. Apple polyphenol protects against cigarette smoke-induced acute lung injury. **Nutrition**, v. 29, n. 1, p. 235–243, 2013.
- BARNES, P. J. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 138, n. 1, p. 16–27, 2016.
- BARTALIS, J. et al. Carbon-centered radicals in cigarette smoke: Acyl and alkylaminocarbonyl radicals. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 631–641, 2009.
- BELLEZZA, I. et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1865, n. 5, p. 721–733, 2018.
- BEZERRA, F. S. et al. α -Tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11–12, p. 1192–1201, 2006.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BOUTTEN, A. et al. NRF2 targeting: A promising therapeutic strategy in chronic obstructive

pulmonary disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 363–371, 2011.

BORISENKO, G. G. et al. Nitroxides Scavenge Myeloperoxidase-Catalyzed Thiyl Radicals in Model Systems and in Cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 30, p. 9221–9232, 2004.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; MAIORINO, M. Glutathione Peroxidases. **Comprehensive Toxicology: Third Edition**, v. 1830, n. 5, p. 3289–3303, 2013.

BRINKMANN, V.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? **Journal of Cell Biology**, v. 198, n. 5, p. 773–783, 2012.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 300, n. 2, p. 535–543, 1993.

BUONOCORE, G.; PERRONE, S.; TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 15, n. 4, p. 186–190, 2010.

BURNER, U. et al. Mechanism of reaction of myeloperoxidase with nitrite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 27, p. 20597–20601, 2000.

BURTON, G. W.; INGOLD, K. U. β -Carotene: An unusual type of lipid antioxidant. **Science**, v. 224, n. 4649, p. 569–573, 1984.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments SUMMARY: **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CAMPOS, K. K. D. et al. The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 48, p. 9–20, 2017.

CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette Smoke-Induced Proteostasis Imbalance in Obstructive Lung Diseases. **Current Molecular Medicine**, v. 12, p. 836–849, 2012.

CHOI, Y. H. The cytoprotective effect of isorhamnetin against oxidative stress is mediated by the upregulation of the Nrf2-dependent HO-1 expression in C2C12 myoblasts through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation. **General Physiology and Biophysics**, v. 35, p. 145–154, 2016.

CHURG, A. et al. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 8, p. 1083–1089, 2003.

CLARK, J. E. et al. Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress. **The Biochemical Journal**, v. 348, p. 615–9, 2000.

COULTER, E. D.; KURTZ, J. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: Catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 394, n. 1, p. 76–86, 2001.

CUZZOCREA, S. et al. Tempol reduces the activation of nuclear factor- κ B in acute inflammation. **Free Radical Research**, v. 38, n. 8, p. 813–819, ago. 2004.

DALRYMPLE, A. et al. An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells: Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 72, n. 1, p. 141–149, 2015.

DAVIES, M. J. et al. Mammalian Heme Peroxidases: From Molecular Mechanisms to Health Implications. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, n. 7, p. 1199–1234, 2008.

DE MOURA, R. S. et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3–4, p. 262–269, 2012.

DEISSEROTH, A.; DOUNCE, A. L. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. **Physiological Reviews**, v. 50, n. 3, p. 319–375, 1970.

DI STEFANO, A. et al. International Journal of COPD Dovepress Blood MCP-1 levels are increased in chronic obstructive pulmonary disease patients with prevalent emphysema. **International Journal of COPD**, v. 13, p. 1691–1700, 2018.

DRAPER, H. H. et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 15, n. 4, p. 353–63, out. 1993.

DULAK, J. et al. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: Focus on angiogenesis. **Circulation**, v. 117, n. 2, p. 231–241, 2008.

ESTERBAUER, H. et al. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 53, p. 314S-321S, 1991.

FEELISCH, M. et al. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **The FASEB Journal**, v. 16, n. 13, p. 1775–1785, 2002.

FERRER-SUETA, G.; RADI, R. Chemical biology of peroxynitrite: Kinetics, diffusion, and radicals. **ACS Chemical Biology**, v. 4, n. 3, p. 161–177, 2009.

FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; GHIO, A. J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. **International Journal of COPD**, v. 10, p. 261–76, 2015.

FLOHÉ, L. et al. Glutathione Peroxidase, V. The kinetic mechanism. **Hoppe-Seyler's**

Zeitschrift für physiologische Chemie, v. 353, n. 1, p. 987–999, 1972.

FORESTI, R. et al. Role of heme oxygenase-1 in hypoxia-reoxygenation: requirement of substrate heme to promote cardioprotection. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 5, p. H1976–H1984, 2001.

FORESTI, R. et al. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 3, p. 453–460, 2004.

FORMAN, H. J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: A comparison of rate constants. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 158, p. 396–400, 1973.

FREIGANG, S. et al. Nrf2 is essential for cholesterol crystal-induced inflammasome activation and exacerbation of atherosclerosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 7, p. 2040–2051, 2011.

GEBE, S. et al. The transcriptome of Nrf2^{-/-} mice provides evidence for impaired cell cycle progression in the development of cigarette smoke-induced emphysematous changes. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 1, p. 238–252, 2010.

GELLNER, C.; REYNAGA, D. D.; LESLIE, F. M. Cigarette Smoke Extract: A preclinical model of tobacco dependence. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 77, n. 9, p. 1–17, 2017.

GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - POCKET GUIDE TO COPD DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION, A Guide for Health Care Professionals. p. 1–44, 2018.

GOLDSTEIN, S.; MERÉNYI, G. The Chemistry of Peroxynitrite: Implications for Biological Activity. **Methods in Enzymology**, v. 436, n. 08, p. 49–61, 2008.

GOLDSTEIN, S.; SAMUNI, A.; MERENYI, G. Reactions of Nitric Oxide, Peroxynitrite and Carbonate Radicals with Nitroxides and their Corresponding Oxoammonium Cations Volume 17, Number 2, February 2004, pp 250–257. **Chemical Research in Toxicology**, v. 17, n. 11, p. 1549–1549, 2004.

GREEN, LC. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982

GREENWALD, M. B. Y. et al. Can nitroxides evoke the Keap1 – Nrf2 – ARE pathway in skin ? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 77, p. 258–269, 2014.

GREENWALD, M. B. Y. et al. Nitroxide delivery system for Nrf2 activation and skin protection. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 94, p. 123–134, 2015.

GU, L. et al. Ellagic acid protects Lipopolysaccharide/d-galactosamine-induced acute hepatic injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 341–345, 2014.

GUAN, S. P. et al. Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. **British Journal of Pharmacology**, v. 168, n. 7, p. 1707–1718, 2013.

GUEIRARD, P. et al. Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin in Alveolar Macrophage Apoptosis during Bordetella pertussis Infection in Vivo. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1718–1725, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. [s.l.] Oxford: Clarendon, 2007.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. BLOOD, The Journal of the American Society of Hematology. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 74, n. 4, p. 1181–1195, 1989.

HECHT, S. S. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the family smoking prevention and tobacco control act. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 14, n. 1, p. 18–28, 2012.

HIRAIWA, K.; VAN EEDEN, S. F. Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–10, 2013.

HOFFMAN, B. M.; EAMES, T. B. Protonated Nitroxide Free Radical. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2169–2170, 1969.

HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: A controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 7, p. 767–790, 2001.

HORINOUCI, T. et al. Carbonyl Compounds in the Gas Phase of Cigarette Mainstream Smoke and Their Pharmacological Properties. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 909–914, 2016.

HUI, W. et al. Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. **International Immunopharmacology**, v. 68, p. 226–233, 2019.

HUSAIN, R. S.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489–2491, 1987.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2018.

IIZUKA, T. et al. Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. **Genes to Cells**, v. 10, n. 12, p. 1113–1125, 2005.

INCA. **Mortalidade no Brasil - Observatório da Política Nacional de Controle do Tabaco**, INCA - Instituto Nacional de Câncer.

INNAMORATO, N. G. et al. The Transcription Factor Nrf2 Is a Therapeutic Target against Brain Inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 1, p. 680–689, 2008.

ISHII, Y. et al. Transcription Factor Nrf2 Plays a Pivotal Role in Protection against Elastase-Induced Pulmonary Inflammation and Emphysema. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 10, p. 6968–6975, 2005.

ISRAELI, A. et al. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and hydroxylamine derived from cyclic nitroxides. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, p. 317–324, 2005.

JAIN, A. K.; JAISWAL, A. K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 22, p. 16502–16510, 2007.

JIALAL, I.; FULLER, C. J. Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. **The Canadian Journal of Cardiology**, v. 11 Suppl G, p. 97G–103G, out. 1995.

JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9–10, p. 1865–1879, 20 set. 2006.

JONES, P.; SUGGETT, A. The catalase–hydrogen peroxide system. Kinetics of catalatic action at high substrate concentrations. **Biochemical Journal**, v. 110, n. 4, p. 617–620, 1968.

KAGAN, V. E. et al. Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration. Highlight Commentary on “Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: Role of mitochondrial superoxide”. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 348–350, 2007.

KALIORA, A. C.; DEDOISSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1–17, 2006.

KENNEDY-FEITOSA, E. et al. Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 41, p. 11–18, 2016.

KENNEDY-FEITOSA, E. et al. Eucalyptol promotes lung repair in mice following cigarette smoke-induced emphysema. **Phytomedicine**, 2018.

KETTLE, A. J.; GEDYE, C. A.; WINTERBOURN, C. C. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. **Biochemical Journal**, v. 321, p. 503–508, 1997.

KIM, C. H. J. et al. The nitroxide radical TEMPOL prevents obesity, hyperlipidaemia, elevation of inflammatory cytokines, and modulates atherosclerotic plaque composition in apoE^{-/-} mice. **Atherosclerosis**, v. 240, n. 1, p. 234–241, 2015a.

KIM, J. W. et al. Schisandrae fructus supplementation ameliorates sciatic neurectomy-

induced muscle atrophy in mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015b.

KOSAKA, S. et al. Il-10 controls th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. **Immunobiology**, v. 216, n. 7, p. 811–820, 2011.

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. MITOCHONDRIAL DAMAGE INDUCED BY CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 98, p. 463–471, 1999.

KUPPUSAMY, P. et al. In vivo topical EPR spectroscopy and imaging of nitroxide free radicals and polynitroxyl-albumin. **Magnetic Resonance in Medicine**, v. 40, n. 6, p. 806–811, 1998.

LAPPALAINEN, U. et al. Interleukin-1 β Causes Pulmonary Inflammation, Emphysema, and Airway Remodeling in the Adult Murine Lung. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 311–318, 2005.

LEE, C. et al. Recovery of renal function after administration of adipose-tissue-derived stromal vascular fraction in rat model of acute kidney injury induced by ischemia/reperfusion injury. **Cell and Tissue Research**, v. 368, n. 3, p. 603–613, 2017.

LEE, H. et al. Inhibitory effects of *Stemona tuberosa* on lung inflammation in a subacute cigarette smoke-induced mouse model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

LEWANDOWSKI, M.; GWOZDZINSKI, K. Nitroxides as antioxidants and anticancer drugs. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

LI, L. et al. Klotho Regulates Cigarette Smoke-Induced Autophagy: Implication in Pathogenesis of COPD. **Lung**, v. 195, n. 3, p. 295–301, 2017.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; AUGUSTO, O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 8, p. 1668–1676, 2008.

LIU, M.-H. et al. Eicosapentaenoic acid attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. **Frontiers in Physiology**, v. 5, p. 1–9, 2014.

LIU, Z. G. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 24–27, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOPES, A. A. et al. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 24, p. 7570–7577, 2013.

LU, Q.; GOTTLIEB, E.; ROUNDS, S. Effects of Cigarette Smoke on Pulmonary Endothelial Cells. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 2, n. 82, 2018.

MAICAS, N. et al. Deficiency of Nrf2 Accelerates the Effector Phase of Arthritis and Aggravates Joint Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 4, p. 889–901, 2011.

MAIUOLO, J. et al. Regulation of uric acid metabolism and excretion. **International Journal of Cardiology**, v. 213, p. 8–14, 2016.

MAJO, J.; GHEZZO, H.; COSIO, M. G. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. **European Respiratory Journal**, v. 17, p. 946–53, 2001.

MANTA, B. et al. The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 484, n. 2, p. 146–154, 2009.

MARKÓ, L. et al. Role of Cystathionine Gamma-Lyase in Immediate Renal Impairment and Inflammatory Response in Acute Ischemic Kidney Injury. **Scientific Reports**, v. 6, n. May, p. 1–10, 2016.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 25, p. 6049–1969, 1969.

MCMAHON, M. et al. Dimerization of substrate adaptors can facilitate Cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a “tethering” mechanism: A two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 34, p. 24756–24768, 2006.

MEIJER, M.; RIJKERS, G. T.; VAN OVERVELD, F. J. . Neutrophils and emerging targets for treatment in chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1055–1068, 2013.

MITCHELL, J. B. et al. Biologically Active Metal-Independent Superoxide Dismutase Mimics. **Biochemistry**, v. 29, n. 11, p. 2802–2807, 1990.

MORÓN, Ú. M.; CASTILLA-CORTÁZAR, I. Protection Against Oxidative Stress and “IGF-I Deficiency Conditions”. **Antioxidant Enzyme**, 2012.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOTTERLINI, R. et al. Heme Oxygenase-1–Derived Carbon Monoxide Contributes to the Suppression of Acute Hypertensive Responses In Vivo. **Circulation Research**, v. 83, n. 5, p. 568–577, 1998.

MOTTERLINI, R.; FORESTI, R. Heme Oxygenase-1 As a Target for Drug Discovery. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, p. 1–57, 2014.

MUROI, M.; TANAMOTO, K. TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF- κ B. **The Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 3, p. 702–707, 2007.

MUSK, A. W.; DE KLERK, N. H. History of tobacco and health. **Respirology**, v. 8, n. 3, p. 286–290, 2003.

NEIL, S. et al. Oral administration of the nitroxide radical TEMPOL exhibits immunomodulatory and therapeutic properties in multiple sclerosis models. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 62, p. 332–343, 2017.

NESI, R. T. et al. Physical exercise is effective in preventing cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response in mice. **International Journal of COPD**, v. 11, n. 1, p. 603–610, 2016.

NEWSOME, B. J. et al. Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 126–135, 2014.

OBROSOV, A. et al. Effect of tempol on peripheral neuropathy in diet-induced obese and high-fat fed/low-dose streptozotocin-treated C57Bl6/J mice. **Free Radical Research**, v. 51, n. 4, p. 360–367, 2017.

OTTERBEIN, L. E. et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. **Nature America**, v. 6, n. 4, p. 422–428, 2000.

OYAGBEMI, A. A. et al. Polyphenol-Rich Fraction of *Parquetina nigrescens* Mitigates Dichlorvos-Induced Cardiorenal Dysfunction Through Reduction in Cardiac Nitrotyrosine and Renal p38 Expressions in Wistar Rats. **Journal of Dietary Supplements**, v. 15, n. 3, p. 269–284, 2018.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158–69, jul. 1967.

PARIKH, R.; SHAH, T. G.; TANDON, R. COPd exacerbation care bundle improves standard of care. **International Journal of COPD**, v. 17, n. 11, p. 577–583, 2016.

PATEL, J. D.; KRUPKA, T.; ANDERSON, J. M. iNOS-mediated generation of reactive oxygen and nitrogen species by biomaterial-adherent neutrophils. **Journal of Biomedical Materials Research**, p. 381–390, 2006.

PATTISON, D. I. et al. The nitroxide TEMPO is an efficient scavenger of protein radicals: Cellular and kinetic studies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 9, p. 1664–1674, 1 nov. 2012.

PENA, K. B. et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **International Journal of COPD**, v. 11, n. 1, p. 3207–3217, 2016.

PINHO-RIBEIRO, V. et al. Atorvastatin and Simvastatin Promoted Mouse Lung Repair After Cigarette Smoke-Induced Emphysema. **Inflammation**, v. 40, n. 3, 2017.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 12, p. 1717–1725, 2000.

PRYOR, W. A.; STONE, K. Oxidants in Cigarette Smoke Radicals, Hydrogen Peroxide, Peroxynitrate, and Peroxynitrite. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 686, p. 12–27, 1 maio 1993.

PULLI, B. et al. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2013.

QUEIROZ, R. F. et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, p. 1942–1953, 2012.

QUEIROZ, R. F.; VAZ, S. M.; AUGUSTO, O. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: revisiting the kinetics and mechanisms. **Biochemical Journal**, v. 431, p. 423–431, 2011.

RADI, R. Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 37, p. 26464–26472, 2013.

RAMOS, C. DE O. et al. Taurine treatment decreases inflammation and oxidative stress in lungs of adult mice exposed to cigarette smoke. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 98, p. 50–57, 2018.

RANGASAMY, T. et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke – induced emphysema in mice Find the latest version: Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke – induced emphysema in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 9, p. 1248–1259, 2004.

REES, M. D. et al. Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. **The Biochemical journal**, v. 421, n. 1, p. 79–86, 12 jun. 2009.

RHEE, S. G.; CHAE, H. Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 12, p. 1543–1552, 2005.

RHEE, S. G.; KIL, I. S. Multiple Functions and Regulation of Mammalian Peroxiredoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 749–775, 2017.

SAKAI, T. et al. Activated inflammatory cells participate in thrombus size through tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in acute coronary syndrome: Immunohistochemical analysis. **Thrombosis Research**, v. 127, n. 5, p. 443–449, 2011.

SAKURAI, H. et al. Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 129, p. 473–485, 2018.

SAMMUT, I. A. et al. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 7, p. 1437–1444, 1998.

SAMUNI, A. et al. Nitroxide SOD-mimics: modes of action. **Free Radical Research Communications**, v. 12- 13 Pt 1, p. 187–94, 1991.

SAMUNI, A. et al. Kinetics and mechanism of hydroxyl radical and OH-adduct radical reactions with nitroxides and with their hydroxylamines. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 29, p. 8719–8724, 2002.

SATO, T. et al. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 174, n. 5, p. 530–537, 2006.

SEEMAN, J. I.; DIXON, M.; HAUSSMANN, H. J. Acetaldehyde in mainstream tobacco smoke: Formation and occurrence in smoke and bioavailability in the smoker. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, n. 11, p. 1331–1350, 2002.

SHEFTEL, A. D.; KIM, S. F.; PONKA, P. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 14, p. 10480–10486, 2007.

SHI, S. R. et al. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 41, n. 11, p. 1599–1604, 1993.

SINGH, A. et al. Glutathione peroxidase 2, the major cigarette smoke-inducible isoform of GPX in lungs, is regulated by Nrf2. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 35, n. 6, p. 639–650, 2006.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1632–1650, 2007.

STACHEL, I. et al. Modulation of nuclear factor E2-related factor-2 (Nrf2) activation by the stress response gene immediate early response-3 (IER3) in colonic epithelial cells: A novel mechanism of cellular adaption to inflammatory stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 4, p. 1917–1929, 2014.

STOCKER, R. et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. **Science**, v. 235, p. 1043–1046, 1987.

STONE, J. R. An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 422, n. 2, p. 119–124, 2004.

SUN, C.; LI, S.; LI, D. Sulforaphane mitigates muscle fibrosis in *mdx* mice via Nrf2-mediated inhibition of TGF- β /Smad signaling. **Journal of Applied Physiology**, v. 120, n. 4, p. 377–390, 2016.

SUZUKI, K. et al. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, p. 345–352, 1983.

SUZUKI, M. et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 39, n. 6, p. 673–682, 2008.

TAN, X. et al. Protective effect of luteolin on cigarette smoke extract-induced cellular toxicity and apoptosis in normal human bronchial epithelial cells via the Nrf2 pathway. **Oncology Reports**, v. 31, n. 4, p. 1855–1862, 2014.

THIMMULAPPA, R. K. et al. Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 4, p. 985–995, 2006.

TOLEDO, A. C. et al. Aerobic exercise attenuates pulmonary injury induced by exposure to cigarette smoke. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 2, p. 254–264, 2012.

TSUHAKO, M. H. et al. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 5, p. 704–712, 2010.

TUNON, M. et al. Potential of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: Modulation of Pro-Inflammatory Gene Expression and Signal Transduction Pathways. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 3, p. 256–271, 2009.

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

VALENÇA, S. S. et al. L-NAME and l-arginine differentially ameliorate cigarette smoke-induced emphysema in mice. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 587–594, 2011.

VALENTINE, J. S.; DOUCETTE, P. A.; ZITTIN POTTER, S. Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Amyotrophic Lateral Sclerosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 563–593, 2005.

VAN DER VLIET, A. et al. Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 12, p. 7617–7625, 1997.

VERGEL, S. et al. International Immunopharmacology AT-RVD1 repairs mouse lung after cigarette smoke-induced emphysema via downregulation of oxidative stress by NRF2 / KEAP1 pathway. **International Immunopharmacology**, v. 56, p. 330–338, 2018.

VLAHOS, R.; BOZINOVSKI, S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. SEP, p. 1–8, 2014.

VUILLEMENOT, B. R.; RODRIGUEZ, J. F.; HOYLE, G. W. Lymphoid tissue and emphysema in the lungs of transgenic mice inducibly expressing tumor necrosis factor- α . **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 30, n. 4, p. 438–448, 2004.

WAKABAYASHI, N. et al. When NRF2 Talks, Who's Listening? **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 13, n. 11, p. 1649–1663, 2010.

WANG, D. et al. TAK-242 attenuates acute cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mouse via the TLR4/NF- κ B signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 472, n. 3, p. 508–515, 2016.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 5–6, p. 612–616, 1999.

WEI, Y. et al. Nrf2 has a protective role against neuronal and capillary degeneration in retinal ischemia-reperfusion injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 1, p. 216–224, 2011.

WEST, R. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. **Psychology and Health**, v. 32, n. 8, p. 1018–1036, 2017.

WESTRA, J. W. et al. A modular cell-type focused inflammatory process network model for non-diseased pulmonary tissue. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 7, p. 167–192, 2013.

WHO. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) - Facts sheets. 2019a.

WHO. **Tobacco - Facts sheets**. 2019b.

WILCOX, C. S.; PEARLMAN, A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. **Pharmacological reviews**, v. 60, n. 4, p. 418–69, 2008.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 24, n. 2, p. 663–677, 1995.

WINTERBOURN, C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. **Toxicology Letters**, v. 82–83, p. 969–974, 1995.

WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 278–286, 2008.

WONG, J.; MAGUN, B. E.; WOOD, L. J. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: A review. **International Journal of COPD**, v. 11, n. 1, p. 1391–1401, 2016.

WU, Y. et al. Glucosamine attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 69, p. 208–218, 2014.

YAO, H. et al. Genetic ablation of NADPH oxidase enhances susceptibility to cigarette smoke-induced lung inflammation and emphysema in mice. **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 5, p. 1222–1237, 2008.

YU, Y. B. et al. Prior exercise training alleviates the lung inflammation induced by subsequent exposure to environmental cigarette smoke. **Acta Physiologica**, v. 205, n. 4, p. 532–540, 2012.

ZANG, L. Y.; STONE, K.; PRYOR, W. A. Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 19, n. 2, p. 161–167, 1995.

ZHANG, D. et al. A simple excited-state intramolecular proton transfer probe based on a new strategy of thiol-azide reaction for the selective sensing of cysteine and glutathione. **Chemical Communications**, v. 52, n. 4, p. 749–752, 2016.

ZHANG, D. F.; ZHANG, J.; LI, R. Salvianolic acid B attenuates lung inflammation induced by cigarette smoke in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 761, p. 174–179, 2015.

ZHANG, H. et al. Bicarbonate-dependent Peroxidase Activity of Human Cu,Zn-Superoxide Dismutase Induces Covalent Aggregation of Protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 24078–24089, 2003.

ZHANG, H.; DAVIES, K. J. A.; FORMAN, H. J. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 88, n. Part B, p. 314–336, 2015.

CAPÍTULO 1

Tempol reduz a inflamação e o estresse redox em camundongos expostos à fumaça de cigarro: regulação da infiltração neutrofílica e da via do Nrf2

Danielba Almeida da Silva^a, Thiago Macêdo Lopes Correia^b, Rafael Pereira de Paula^{b,c}, Robson Amaro Augusto da Silva^b, Edlaine Linares^d, Ohara Augusto^d, Raphael Ferreira Queiroz^{a,c,e*}

^aPrograma de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Brasil; ^bPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Vitória da Conquista, Brasil; ^cPrograma Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil; ^dDepartamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; ^eDepartamento de Ciências Naturais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Brasil.

*Autor correspondente: Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz, Departamento de Ciências Naturais, Estrada do Bem Querer, km 4, Caixa Postal 95, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, CEP 45031-900, Vitória da Conquista, Brasil. E-mail: rfqueiroz@uesb.edu.br

Resumo:

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa capaz de desencadear a inflamação e estresse redox pulmonar e sistêmico. Tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) e outros nitroxídicos cíclicos são reconhecidos por reduzir a injúria tecidual associada à inflamação *in vitro* e *in vivo* por mecanismos ainda pouco compreendidos. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar o efeito do tempol sobre a inflamação e estresse redox induzidos pela exposição aguda à fumaça de cigarro *in vitro* e *in vivo*. Camundongos C57BL/6 machos (n=32) foram divididos em 4 grupos (n=8, cada): 1) controle exposto ao ar ambiente (GC), 2) animais expostos à fumaça de cigarro por 5 dias (GFC), camundongos tratados 3) preventivamente ou 4) concomitantemente com tempol (50 mg/kg/dia) e expostos à fumaça do cigarro por 5 dias (TP+FC e TC+FC, respectivamente). O número de leucócitos totais e neutrófilos bem como concentração e atividade da mieloperoxidase aumentaram no trato respiratório e no parênquima pulmonar dos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Como consequência, peroxidação de lipídeos, e nitração e carbonilação de proteínas do pulmão também se elevaram. A administração de tempol antes ou durante à exposição à

fumaça de cigarro inibiu todos os parâmetros acima. Tempol também reduziu a expressão pulmonar das citocinas inflamatórias *Il-6*, *Il-1 β* e *Il-17* para níveis basais e de *Tnf- α* em aproximadamente 50%. Por outro lado, o nitróxido restaurou as transcrições de *Il-10*, *Tgf- β* , e aumentou os níveis dos genes associados ao Nrf2, *Ho-1* e *Gpx2*, nos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Em paralelo, a atividade da glutathiona peroxidase também foi maior no homogenato do tecido. Quando macrófagos murinos (RAW 264.7) foram pré-incubados com tempol (25, 50 e 100 μ M) e estimulados com extrato da fumaça do cigarro, a oxidação intracelular da diclorofluoresceína reduziu de maneira concentração dependente, embora as concentrações de nitrito e nitrato não se alteraram. As análises de SDS-PAGE/Western Blotting demonstraram que a concentração de HO-1 foi maior nos macrófagos pré-tratados com tempol (50 e 100 μ M). Em conjunto, esses dados indicam que tempol protege macrófagos RAW 264.7 e o pulmão de camundongos contra o dano oxidativo e inflamação decorrente exposição à fumaça de cigarro provavelmente através da ativação de alguns dos genes controlados pela via do Nrf2 e redução da infiltração leucocitária.

Palavras-chave: Tempol, Fumaça de cigarro, Nrf2; Inflamação aguda, Estresse redox, Quimiotaxia.

Introdução

A doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) é a terceira causa de morbidade e mortalidade na atualidade [1], depois da doença cardíaca isquêmica e do acidente vascular encefálico [2]. É um distúrbio passível de ser prevenido e tratado, que se caracteriza pela limitação progressiva do fluxo aéreo e geralmente se associa a resposta inflamatória anormal dos pulmões em decorrência da presença de partículas e gases nocivos, especialmente aqueles contidos na fumaça de cigarro [3].

A fumaça de cigarro é uma mistura complexa composta por mais de 6000 substâncias químicas diferentes, das quais 72 são potencialmente carcinogênicas [4,5]. Essa mistura quando inalada pode ativar macrófagos de superfície e células epiteliais das vias aéreas para liberar múltiplos mediadores quimiotáticos, particularmente quimiocinas, que atraem neutrófilos, monócitos e linfócitos circulantes para os pulmões, resultando na inflamação bem como processos mutagênicos e tumorais no sistema respiratório [6].

A inflamação persistente das vias aéreas em pacientes com DPOC caracteriza-se pelo aumento no número de neutrófilos e pela presença de macrófagos ativados e linfócitos T. Os neutrófilos inicialmente liberam elastase, responsável pela hipersecreção de muco, enquanto

os macrófagos ativados secretam uma série de citocinas pró-inflamatórias, incluindo proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8) [7–9]. Os linfócitos T por sua vez podem promover inflamação celular adicional pelo recrutamento de mais macrófagos e neutrófilos, morte celular induzida por perforina e eventualmente destruição e remodelação tecidual observada na DPOC [10].

A ativação dos neutrófilos e macrófagos desencadeia a formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), principalmente ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito (ONOO⁻), respectivamente [11,12]. Desse modo, os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos do hospedeiro são fundamentais para limitar o dano oxidativo além de contribuir com a homeostase e a sobrevivência do parênquima pulmonar. Todavia, quando a concentração dessas espécies excede a capacidade antioxidante, estabelece-se o estresse redox e, conseqüentemente, ocorre a oxidação irreversível de biomoléculas do hospedeiro, dano tecidual e sustentação da resposta inflamatória [11].

Dentre os sistemas antioxidantes, destaca-se aqueles dependentes da via do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) [13]. Esse fator de transcrição controla a expressão basal e indutível de uma série de enzimas antioxidantes e proteínas citoprotetoras [14]. As proteínas e enzimas transcritas sob controle do Nrf2 exercem papel central na manutenção da homeostase pulmonar em doenças inflamatórias com base redox. De fato, estudos com humanos e modelos animais concluíram que a ativação da via do Nrf2 reduz a injúria não apenas nos pulmões como também em tecidos extrapulmonares em decorrência à exposição à fumaça do cigarro [15–17].

O tempol (4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxil) é um nitróxido cíclico sintético, atóxico, hidrossolúvel e de baixo peso molecular que pode facilmente permear membranas biológicas. Esse composto catalisa o metabolismo de uma variedade de espécies reativas e reduz o estresse redox celular, o que o caracteriza como um potente antioxidante [18–20]. Os efeitos protetores dos nitróxidos foram inicialmente atribuídos a sua ação como miméticos da superóxido dismutase [21], sequestrantes de radicais [22] e redutores de hemoproteínas [19,23]. Recentemente, essas moléculas também se mostraram como inibidores da mieloperoxidase (MPO) [23,24], da migração de neutrófilos *in vitro* e na inflamação aguda [25,26], da expressão do óxido nítrico sintase induzível na infecção cutânea por *Leishmania* [27], e como imunomoduladores em modelo de encefalomielite viral murina [28]. Estudos recentes sugerem ainda que o tempol e outros nitróxidos podem ativar a via do

Nrf2 por mecanismos ainda não completamente entendidos, mas que parecem envolver os respectivos cátions oxamônio [29,30]

Embora o potencial farmacológico *in vivo* do tempol seja conhecido há muito tempo, os efeitos dessa molécula sobre a inflamação causada pela exposição à fumaça de cigarro são desconhecidos. Apesar da DPOC não se instalar em pacientes sob exposição aguda à fumaça de cigarro, os modelos propostos podem auxiliar a compreender como moléculas que modulam o processo inflamatório e o estresse redox incipientes podem contribuir com a descoberta das vias relacionadas com lesão pulmonar e, conseqüentemente, instalação da DPOC (LOPES et al., 2013; KENNEDY-FEITOSA et al., 2016). Dessa forma, este trabalho objetivou elucidar parte dos mecanismos moleculares e bioquímicos decorrente à administração do tempol em camundongos e macrófagos (RAW 264.7) expostos agudamente à fumaça de cigarro, com foco nos genes controlados pela via do Nrf2.

Procedimentos experimentais

Materiais

Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), Merck (EUA), Invitrogen (EUA), AppliedBiosystem (EUA), Vector (EUA), Pierce (EUA), Dinâmica (Brasil) e da NewProv (Brasil). Anti-DNP e Anti-GPx2, foram obtidos da Sigma-Aldrich. Anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho, anti-HO-1, anti-MPO, anti-3-nitrotirosina foram obtidos da Dako (EUA), Abcam (EUA), Upstate (EUA) e Millipore (EUA), respectivamente. A concentração do tempol foi determinada espectrofotometricamente ($\epsilon_{242} = 2,05 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [32]. As soluções de H_2O_2 foram preparadas antes do uso e as concentrações foram determinadas espectrofotometricamente ($\epsilon_{240} = 43,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [33]. A água utilizada em todos os experimentos foi purificada em sistema Milli-Q da Millipore.

Animais

Camundongos C57BL/6 machos (n=32), com 8 semanas de idade (20 – 25 g), foram adquiridos da Anilab (Paulínia, Brasil) e acondicionados no Biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal da Bahia, mantidos em ambiente com condições de temperatura ($23 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) e umidade (50 – 70%) controladas, ciclo claro-escuro de

12 h, e com acesso *ad libitum* à água e ração padrão comercial (Pragsoluções, Brasil). Todos os protocolos experimentais *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (CEUA/UESB), sob o parecer de número 168/2017. Os animais foram divididos em 4 grupos (n=8): grupo controle exposto ao ar ambiente (GC); grupo exposto à fumaça do cigarro por 5 dias (GFC); grupos tratados preventivamente ou concomitantemente com tempol (50 mg/kg/dia) (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em salina estéril e expostos à fumaça do cigarro por 5 dias (TP+FC e TC+FC, respectivamente). No grupo TP+FC, tempol foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 3 dias antes do início da exposição à fumaça do cigarro, seguido por salina estéril por 5 dias. No grupo TC+FC, salina estéril foi administrada 2 dias e, em seguida, substituiu-se por tempol 1 dia antes e concomitante à exposição à fumaça do cigarro. Nos grupos GC e GFC, os camundongos receberam salina i.p. por 8 dias consecutivos. Tempol ou salina foram administrados uma vez ao dia, 30 min antes da primeira exposição à fumaça do cigarro.

Exposição à fumaça de cigarro

Os camundongos (n=24) foram expostos a 15 cigarros comerciais da marca Marlboro Red® (composição de acordo com fabricante: 10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono) por dia, divididos em cinco cigarros por exposição (08:00, 12:00 e 16:00 h) por 5 dias consecutivos, em câmara de inalação descrita anteriormente com algumas modificações [8,34]. A câmara de inalação, disposta em capela de exaustão desligada, continha a seguinte configuração: 40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura (volume total = 30 L); segmentada internamente por 24 baias construídas de telas metálicas hexagonais com 6,5 cm de comprimento, 7,5 cm de largura e 25 cm de altura. Cada animal foi alojado separadamente em uma baia da câmara de inalação antes da exposição simultânea à fumaça do cigarro. Um cigarro foi acoplado a uma seringa plástica de 60 mL para obtenção de 50 mL de fumaça e subsequentemente insuflada na câmara de inalação. A combustão de cada cigarro gerou aproximadamente 1 L de fumaça e, conseqüentemente a concentração de fumaça dentro câmara foi ~3%. Após 6 min de exposição à fumaça do cigarro, a tampa da câmara foi aberta, o exaustor foi ligado para total eliminação da fumaça e os animais mantiveram contato com o ar ambiente por 1 min. O procedimento acima foi repetido com os demais cigarros. Após 24 h da última exposição, os animais foram eutanasiados por aprofundamento anestésico de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (16 mg/kg) via i.p.

Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, os animais foram submetidos à traqueostomia para canulação da traqueia com cateter de infusão (G22), e os pulmões lavados três vezes com 0,5 mL de solução PBS glicose para a coleta do LBA. As células foram diluídas em solução de Turk (NewProv, Brasil) e a contagem total dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer. Em seguida 50 µL do LBA foram citocentrifugados 4500g (Presvac CT-12, Brasil) por 7 min e as lâminas foram coradas com kit Panótico rápido (NewProv, Brasil). Um total de 100 células por lâmina foram contadas em triplo-cego utilizando os critérios morfológicos padrões [35], e a contagem absoluta diferencial foi calculada multiplicando a concentração relativa pelo número total de leucócitos obtido na câmara de Neubauer.

Determinação dos níveis de nitrito no LBA

O nitrito do LBA foi dosado pelo método de Griess [36]. O sobrenadante do lavado (50 µL) foi incubado com 50 µL de solução de naftiletlenodiamina (0.1%) e 50 µL de solução de sulfanilamida (1%) por 10 min a 25°C, a absorbância foi determinada a 540 nm e interpolada numa curva padrão de nitrito (1,65 a 100 µM).

Obtenção dos tecidos

Os animais foram submetidos à toracotomia mediana para extração dos pulmões após coleta do LBA. O pulmão direito foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C para as análises bioquímicas. O pulmão esquerdo foi dividido longitudinalmente, no qual: 1) uma metade do tecido foi imediatamente imersa em 300 µL de RNA^{later} (Invitrogen, EUA), congelado em nitrogênio líquido e armazenado à -80 °C, para posterior extração de RNA para o PCR em tempo real (qPCR); 2) a outra metade do pulmão foi imerso numa solução fixadora de Methacarn (metanol 60%, clorofórmio 30% e ácido acético 10%) durante 24 h, seguido pela substituição do fixador por álcool etílico (70%), para uso nas análises histológicas e imuno-histoquímicas. A carcaça foi armazenada à -20 °C para posterior incineração.

Análise histológica pulmonar

O pulmão fixado e desidratado foi parafinizado, cortado longitudinalmente em secções de 4 μm de espessura em micrótomo (Leica RM2125RTS, China) e corados com hematoxilina e eosina (HE). O infiltrado neutrofílico foi avaliado em 30 campos aleatórios (10 campos aleatórios de 3 secções diferentes) dos tecidos corados, e fotografados com uma câmara digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão), sob aumento de 400x [37]. A quantificação do número de neutrófilos e macrófagos por campo foi realizada com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

Análise imuno-histoquímica

Os antígenos das secções histológicas do tecido pulmonar esquerdo foram ativados pelo tratamento com tampão citrato após desparafinização e hidratação [38]. As peroxidases endógenas foram inibidas pela incubação das secções com azida sódica (0,1%) e H_2O_2 (0,3%) por 10 min a 25 °C. As lâminas foram lavadas duas vezes, 5 min cada, com PBST (PBS contendo Tween® 20 0,1%) e a ligação inespecífica de imunoglobulinas foi bloqueada pela incubação com solução de soro de cabra (20%). Após 30 min, as secções foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-proteína carbonilada (anti-DNP) (Sigma D9656, diluição 1:100) e anti-mieloperoxidase (anti-MPO) (Upstate 0796, diluição 1:50) por 1 h a 25 °C, anti-3-nitrotirosina (Millipore 06-284, diluição 1:200) e anti-glutationa peroxidase 2 (anti-GPx2) (Sigma GT39428, diluição 1:50) por 14 h a aproximadamente 4 °C. As lâminas foram lavadas duas vezes, 5 min cada, com PBST, seguido pela incubação com o anticorpo secundário biotilado anti-imunoglobulina de coelho (Dako E0432, diluição 1:300) por 1 h a 25 °C. O produto da reação foi detectado pela incubação das secções histológicas com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories, EUA) por 30 min e a cor desenvolvida pela adição de *Stable DAB* (Invitrogen, reagente completo com 3,3-diaminobenzidina e H_2O_2) após aproximadamente 2,5 min. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris [39]. Dez campos aleatórios das secções pulmonares foram fotografados com auxílio de uma câmara digital (Kontron Electronic KS-300, Eching, Germany) acoplada a um microscópio de luz (BX51, Olympus, Japão), sob aumento de 400x. As imunomarcações para DNP [40], nitrotirosina [41] e GPx2 [42] foram expressas como porcentagem de área marcada/ μm^2 , em relação a área total da imagem, enquanto os níveis de MPO foram expressos pela contagem de células positivas [43]. Os resultados foram analisados com auxílio do programa ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

Atividade peroxidásica da MPO

O tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (50 mM), pH 6,0, e em seguida centrifugado a 10.000g por 10 min a 4 °C. Brometo de Cetil Trimetilamonio (CTAB, 0,5%) foi adicionado ao sobrenadante para evitar adesão da MPO nas paredes do tubo durante a armazenagem. O homogenato (10 µL) foi misturado com 110 µL da solução trabalho contendo TMB (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina) (2,9 mM em dimetilsulfóxido 14%, diluído em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 5,4). A reação foi iniciada pela adição de 80 µL de H₂O₂ (0,75 mM). A oxidação do TMB foi acompanhada a cada 30 s em 450 nm (Thermoplate, Tp-reader, EUA) por 5 min a 25 °C ($\epsilon_{450\text{ nm}} = 5,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). O ácido 4-aminobenzóico hidrazida (ABAH) (50 µM), reconhecido inibidor da MPO [25,44], foi adicionado ao meio reacional das amostras do grupo GFC, 5 min antes da adição da solução de TMB para avaliar o envolvimento da MPO na oxidação do substrato. Os resultados foram expressos como atividade específica (U/mg proteína), onde uma unidade de atividade peroxidásica foi definida como a quantidade de enzima que produziu 1 µmol de TMB oxidado por min a 25 °C [45,46].

Atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada conforme o método proposto por Paglia e Valentine [47]. O tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 7,0 e centrifugado a 10.000g por 10 min a 4 °C. Na cubeta de quartzo 300 µL do tampão Tris HCl foi misturado a 250 µL do homogenato diluído (1:10) em tampão Tris HCl e 400 µL do mix reacional contendo NADPH (0,25mM), GSH (2,1 mM), GR (0,5 U/mL) e azida sódica (1 mM), inibidor das hemeperoxidases presentes no homogenato [48]. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de H₂O₂ (0,2 mM), e a decomposição do NADPH foi monitorada a 340 nm a cada 15 s por 6 min a 25 °C (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que consumiu 1 µmol de NADPH por min a 25 °C. A atividade específica foi expressa em unidades por g de proteína (U/g de proteína).

Quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica no homogenato do tecido pulmonar foi estimada pelo ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês, *thiobarbituric acid reactive substances* – TBARS) [49]. O tecido pulmonar direito (100 mg/mL) foi homogeneizado em tampão Tris HCl (50 mM), pH 8,0, contendo hidroxitolueno butilado (BHT, 0,02 %) para evitar oxidações espúrias. O homogenato foi centrifugado a 1600g por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. O sobrenadante foi então diluído (1:2) em tampão Tris HCl para 100 µL, adicionado de 100 µL de ácido tricloroacético (10%) e 800 µL de ácido tiobarbitúrico (0,53%, dissolvido em ácido acético a 20%). A mistura reacional foi incubada por 1 h a 95 °C, seguido pelo resfriamento em gelo por 10 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 1600g por 10 min a 4 °C, e a absorbância foi lida a 535 nm (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil). A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (Cayman Chemical, EUA) (0 a 50 µM), normalizada pela concentração de proteínas e expressa em mol de equivalentes de MDA/g de proteína.

Determinação da concentração de proteínas totais nos pulmões

A concentração de proteína total no homogenato pulmonar foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford a 595 nm [50]. Albumina de soro bovino (Sigma-Aldrich, EUA) (0 a 1,4 mg/mL) foi utilizada como padrão.

Expressão de genes inflamatórios, anti-inflamatórios e citoprotetores

Os tecidos pulmonares (~50 mg) foram homogeneizados em 1 mL do reagente de lise TRIzolTM (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, com o auxílio do sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA). Durante a purificação, o RNA foi tratado com TURBO DNA-freeTM (Invitrogen) para digestão do ácido desoxirribonucléico (DNA) contaminante, de acordo as orientações do fabricante. A concentração (ng/µL) e pureza (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}) do RNA total foram determinadas por espectrofotometria (NanoDropTM 2000, Thermo Fisher Scientific, EUA), na qual apenas as amostras com a razão $A_{260}/A_{280} = 1,8-2,1$ foram utilizadas. O RNA foi acondicionado à -80 °C até a transcrição reversa.

O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa High-Capacity RNA-to-cDNATM (AppliedBiosystem, EUA), segundo as instruções do fabricante e acondicionado à -80 °C até a realização da qPCR.

A expressão dos genes-alvo, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), interleucina 17 (IL-17) e interleucina 1 β (IL-1 β), que são envolvidos no processo inflamatório; interleucina-10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento β (TGF- β), que são relacionados com processos anti-inflamatórios; heme-oxigenase 1 (HO-1) e glutathiona peroxidase 2 (GPx2), sob controle transcricional do fator de transcrição Nrf2; e beta-actina (ACTB), gene de referência, foi quantificada por PCR em tempo real utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (AppliedBiosystem, EUA) a partir das amostras de cDNA (100 ng/ μ L). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata e de acordo com as instruções do fabricante (Sistema StepOne Plus, AppliedBiosystem, EUA) [51]. A expressão relativa (*fold-change*) foi determinada por meio do método comparativo ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) a partir da obtenção das médias dos resultados de C_t (*cycle threshold*) [52]. As sequências específicas dos primers para os genes alvos foram obtidas na literatura e os anelamentos testados pela ferramenta BLAST do NCBI.

Tabela 1. Sequência dos primers utilizados na qPCR

| Gene | Sequência | Referência |
|--------------------------------|--|------------|
| <i>Tnf-α</i> | <i>Forward:</i> CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA <i>Reverse:</i> TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC | [53] |
| <i>Il-6</i> | <i>Forward:</i> TGATGCTGGT GACAACCACG <i>Reverse:</i> CAGAATTGCCATTGCACA ACTC | [53] |
| <i>Il-17</i> | <i>Forward:</i> ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC <i>Reverse:</i> GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG | [54] |
| <i>Il-1β</i> | <i>Forward:</i> AGAAGAGCCCATCCTCTGTGACTCATG <i>Reverse:</i> CACACACCAGCAGGTTATCATCA | [55] |
| <i>Il-10</i> | <i>Forward:</i> TGAATTCCTGGGTGAGAAG <i>Reverse:</i> TGGCCTTG TAGACACCTTGG | [56] |
| <i>Tgf-β</i> | <i>Forward:</i> CCCGAAGCGGACTACTATGC <i>Reverse:</i> TAGATGGCGTTGTTGCGGT | [53] |
| <i>Ho-1</i> | <i>Forward:</i> AAC AAGCAGAACCCAGTCTATGC <i>Reverse:</i> AGGTAGCGGGTATATGCGTGGGCC | [53] |
| <i>Gpx2</i> | <i>Forward:</i> GTGGCGTCACTCTGAGGAACA <i>Reverse:</i> CAGTTCTCCTGATGTCCGA ACTG | [57] |
| <i>Actb</i> | <i>Forward:</i> TGTCCACCTTCCAGCAGATGT <i>Reverse:</i> GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA | [57] |

Cultivo celular

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brasil) e mantidos no Laboratório de Bioquímica de Oxidantes e Radicais, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP). Os macrófagos foram

cultivados em garrafas estéreis de 75cm² (Sigma-Aldrich, EUA) contendo meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco *high-glucose* (DMEM – Sigma-Aldrich) adicionado de soro fetal bovino (10%) e penicilina (1%), denominado aqui como DMEM-suplementado. As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C sob atmosfera úmida de 5% de dióxido de carbono (CO₂). As células foram cultivadas até atingirem 80% de confluência e removidas com *cell scraper* para subcultivo ou experimentos. A suspensão celular foi centrifugada a 1600g a 25 °C (Sorvall RT6000B, EUA). Após 5 min, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 10 mL de DMEM-suplementado. A suspensão celular foi diluída (1:100, v/v) em meio DMEM-suplementado antes da contagem total de células no contador MuseTM Cell Analyzer (Merck Millipore, EUA).

Preparo do extrato da fumaça do cigarro

A fumaça de um cigarro (Marlboro Red®) foi borbulhada em 10 mL de DMEM contendo soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%). O pH da suspensão resultante foi ajustado para 7,4, seguido pela filtração em filtro de 0,22 µm (Millipore). O extrato bruto da fumaça do cigarro (EFC) foi diluído a 10% em meio (EFC 10%) e padronizado pela determinação da densidade óptica (0,80 ± 0,05) a 320 nm (Shimadzu UV-2550, EUA) [58]. EFC foi preparado imediatamente antes dos experimentos. O meio controle continha soro fetal bovino (1%) e penicilina (0,1%), e foi borbulhado com ar. O pH também foi ajustado para 7,4 e filtrado em condições estéreis [34,59].

Atividade metabólica dos macrófagos

As células (2x10⁵ por poço) foram transferidas para microplacas de 96 poços contendo 200 µL de DMEM-suplementado, e incubadas em estufa por 6 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂ (5%) para aderência. Em seguida, os macrófagos foram incubados com tempol (10, 50, 100 e 500 µM) ou EFC (0,5, 1,0, 2,5, 5,0,7,5 e 10%) por 24 h. O sobrenadante foi removido, 200 µL de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio, 0,5 mg/mL) adicionados e as células incubadas por cerca de 1 h a 37 °C. O sobrenadante foi descartado e 200 µL de dimetilsufóxido (DMSO) utilizados para dissolução do precipitado. A absorbância foi determinada a 570 nm em leitor de microplacas (Tecan, infinite 200 PRO, EUA). As células incubadas apenas com o meio foram consideradas como 100% viáveis. Triton 1% foi utilizado para a morte total das células [60].

Oxidação intracelular da diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)

A DCFH-DA foi usada para medir o estado redox intracelular geral por reagir inespecificamente com diversas espécies oxidantes [61]. A suspensão de macrófagos (2×10^5 por poço) em um volume final de 200 μL de DMEM-suplementado foi transferida para microplacas de 96 poços para aderência. Após 14 h, as células foram pré-tratadas com tempol (25, 50 e 100 μM), diluído em DMEM sem corante vermelho de fenol, por 24 h em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%). O sobrenadante foi removido, as células lavadas com 300 μL de PBS estéril, seguida pela adição de 200 μL do meio DMEM sem corante contendo DCFH-DA (20 μM). Após 30 min, as células foram lavadas com PBS e expostas ao EFC 0,5%, também diluído em DMEM sem corante. A oxidação da DCFH foi acompanhada por 1 h em leitor de microplacas sob excitação de 485 nm e emissão de 520 nm (Tecan, infinite 200 PRO, EUA).

Ativação da óxido nítrico sintase

Os macrófagos (5×10^6 por poço) foram transferidos para placas de cultura contendo 2 mL de DMEM-suplementado para aderência. Após 14 h, as células foram pré-tratadas com tempol (25, 50 ou 100 μM) por 24 h a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%). O sobrenadante foi retirado, as células lavadas com 3 mL de PBS, seguida pela incubação com EFC (2,5%) por 24 h. Interferon-gama (200 U/mL) e lipopolissacarídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram utilizados como controle de ativação da óxido nítrico sintase induzível. O sobrenadante foi então coletado, centrifugado a 5000g por 5 min a 25 °C (Eppendorf™ 5452000018). O sobrenadante obtido foi congelado em gelo seco e armazenado à -80 °C para posterior quantificação de nitrito e nitrato por quimioluminescência [62].

Determinação dos produtos do óxido nítrico por quimioluminescência

A determinação de óxido nítrico nos macrófagos expostos ao EFC foi realizada por quantificação de seus produtos de oxidação, nitrito e nitrato, pela técnica de quimioluminescência, através de um analisador de óxido nítrico (NOA280; Sievers Instruments) seguindo o procedimento otimizado por Feelisch e colaboradores. O sobrenadante foi dividido em 2 alíquotas. A primeira alíquota foi injetada diretamente na cela contendo uma solução de iodeto de potássio (45 mM) e iodo (10 mM) em ácido acético

glacial, mantida a 60 °C e sob fluxo de nitrogênio. Sob estas condições, o nitrito é reduzido à óxido nítrico, que é carregado via corrente do nitrogênio até a cela de reação com ozônio onde forma dióxido de nitrogênio excitado eletronicamente, que ao decair para o estado fundamental emite quimioluminescência. A segunda alíquota foi injetada diretamente na cela contendo uma solução saturada de cloreto de vanádium (III) em HCl (1 M) mantida a 90 °C. Nestas condições, nitrato e nitrito são reduzidos a óxido nítrico que é carregado pelo gás de arraste e detectado por quimioluminescência, conforme descrito acima. As áreas dos picos das amostras foram obtidas por integração com o software do aparelho e as concentrações (μM) de nitrito e de nitrato foram calculadas utilizando-se curva padrão de nitrito e nitrato [62].

Expressão da HO-1

Os macrófagos (2×10^6 por poço) em um volume final de 2 mL de DMEM-suplementado foram transferidas para placas de cultura de 6 poços para aderência. Após 14 h as células foram pré-tratadas com tempol (25, 50 e 100 μM) ou hemina (5 μM) durante 24 h em estufa a 37 °C sob atmosfera de CO_2 (5%). A hemina foi preparada inicialmente em NaOH (0,15 M), seguida pela diluição por 10 vezes em Tris HCl (0,15 M), pH 7,0 [63]. Após esse período 300 μL do tampão RIPA (tampão Tris 50 mM, pH 7,5, contendo NaCl 150 mM, Nonidet 1%, deoxicolato de sódio 0,5%, SDS 0,1%, inibidores de proteases, sem EDTA) foi adicionado em cada poço. As células foram removidas com auxílio de *cell scraper*, a suspensão celular homogeneizada em vortex, e mantida em gelo por 20 min. O lisado celular foi então centrifugado a 1000g por 5 min a 25 °C (Eppendorf™ 5452000018). O sobrenadante foi recolhido, congelado em gelo seco e armazenado à -80 °C para SDS-PAGE/Western Blotting.

Western Blotting

As proteínas (17 μg) foram transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) em transferidor semi-seco a 350 mA fixos por 1 h (Trans-Blot®SD, Bio-Rad). A membrana foi cortada em aproximadamente 35 kDa e bloqueada por 2 h com leite desnatado (5%) em tampão TBS (do inglês, Tris Buffered Saline – Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Após lavagem em TBS, as membranas foram incubadas com anti-HO-1 (Abcam, ab13243, diluição 1:2000, 14 h) e anti-actina (Sigma, A2103, diluição 1:1000, 14 h), produzidos em coelho e diluídos em tampão TBST (TBS adicionado de Tween® 20 0,05%)

contendo leite desnatado (1%). Após lavagem em TBST (três vezes, 10 min cada), incubou-se as membranas com o anticorpo anti-IgG de coelho marcado com a peroxidase (KPL 04-15-06, diluição 1:10000, 2 h) diluído em TBTS contendo em leite desnatado (1%). As membranas foram reveladas com o kit SuperSignal™ West Pico Plus – *Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, EUA) em fotodocumentador (UVITEC CAMBRIDGE). A densitometria foi determinada no *software* ImageJ 1.44P (National Institutes of Health, EUA).

Determinação da concentração de proteínas totais nos macrófagos

A concentração de proteína total no homogenato celular foi quantificada pelo método do ácido bicinonínico (BCA 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina), conforme kit comercial da Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA). Albumina de soro bovino (0 a 2,0 mg/mL) foi utilizado como padrão.

Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média ± erro padrão. A significância estatística foi calculada com ANOVA one-way e Newman-Keuls como pós-teste, quando apropriado. Os experimentos *in vitro* foram realizados em triplicata. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. As análises foram realizadas no programa GraphPad-Prism 5.0.3 (GraphPad Software; San Diego, CA, USA).

Resultados

Redução do infiltrado inflamatório e dano resultante em camundongos expostos à fumaça do cigarro

Nós inicialmente avaliamos o efeito do tempol sobre a infiltração leucocitária nas vias aéreas e parênquima pulmonar de animais expostos agudamente à fumaça de cigarro. O tempol quando administrado previamente ou concomitante à exposição à fumaça de cigarro reduziu significativamente a migração de leucócitos totais para o LBA ($p < 0,0001$) (Fig. 1A-E). Dentre os leucócitos, os neutrófilos foram os mais abundantes, sendo que o tratamento com tempol também diminuiu a quantidade dessas células no LBA em 55 e 70% ($p < 0,0001$) no tratamento preventivo e terapêutico, respectivamente (Fig. 1F). O número de linfócitos

($p < 0,0001$) (Fig. 1G) e basófilos ($p < 0,0001$) (Fig. 1H), também foi reduzido no LBA de camundongos tratados com tempol e expostos à fumaça de cigarro. A quantidade de macrófagos foi menor no LBA dos animais expostos ao cigarro em comparação ao grupo exposto ao ar ($p = 0,0002$) (Fig. 1I). Contudo, os macrófagos estavam aumentados no parênquima dos camundongos expostos à fumaça do cigarro, nos quais o tempol reverteu essa contagem para níveis basais ($p < 0,0001$) (Fig. 2F). Por fim, a exposição dos camundongos à fumaça do cigarro elevou a concentração de nitrito no LBA em relação ao grupo controle, no entanto, o tratamento com tempol não alterou esses níveis (Tabela 2).

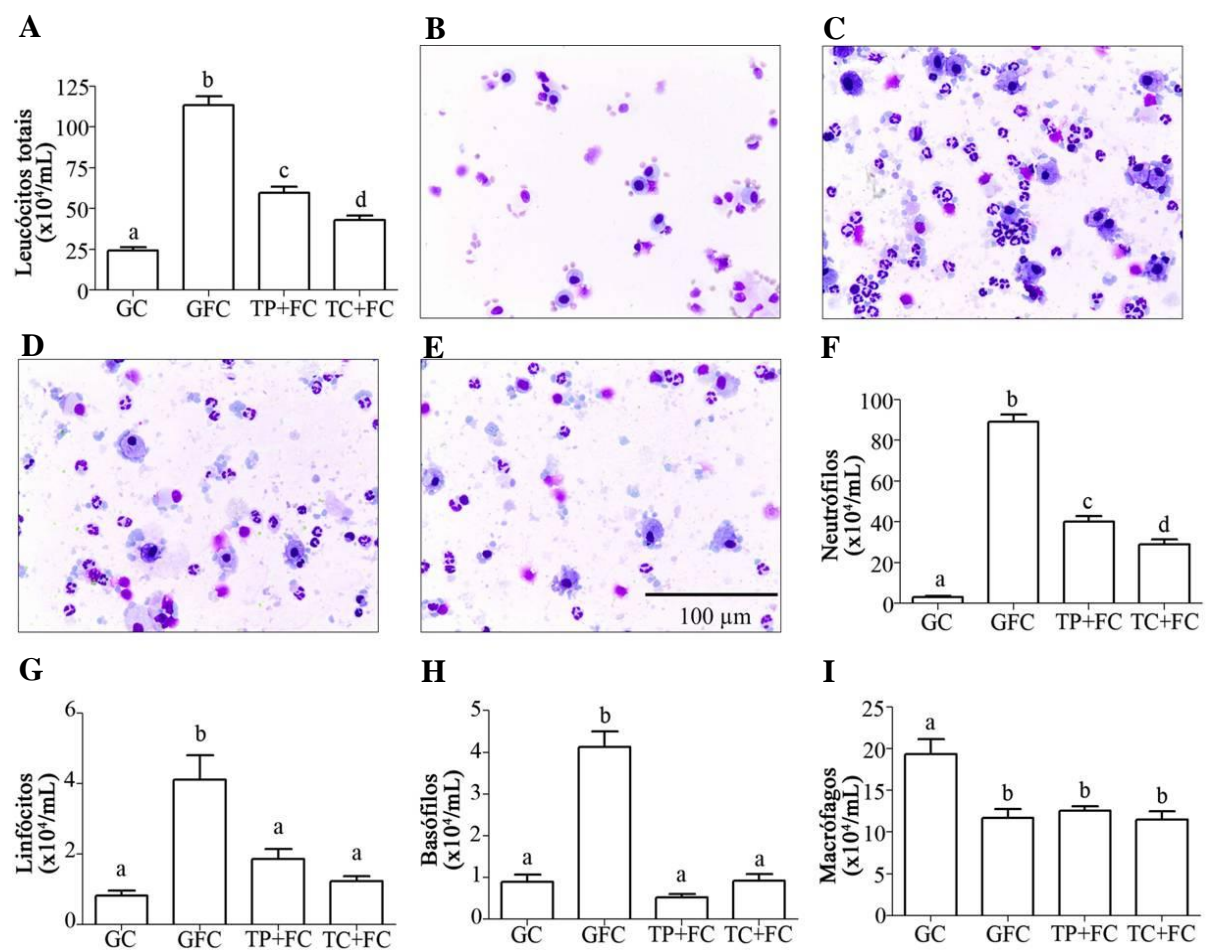


Fig. 1. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro. Após 5 dias de exposição à fumaça de cigarro, os camundongos foram eutanaziados, o LBA coletado e os leucócitos totais foram quantificados em câmara de Neubauer (A). Em seguida, o LBA foi citocentrifugado e corado com kit Panótico para contagem diferencial dos leucócitos (B-I) no total de 100 células. Fotomicrografias representativas das células do LBA de um animal dos grupos GC (B), GFC (C), TP+FC (D), TC+FC (E), sob aumento de 400x. O número absoluto de neutrófilos (F), linfócitos (G), basófilos (H) e macrófagos (I) no LBA foi calculado pela multiplicação da quantidade relativa de cada tipo célula pelo total de leucócitos. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste

de Newman Keuls. ^{a,b,c,d} Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

Tabela 2. Concentração de nitrito no lavado broncoalveolar.

| Grupos | Nitrito (μM) |
|--------|---------------------------|
| GC | $13,2 \pm 1,0^a$ |
| GFC | $17,8 \pm 0,8^b$ |
| TP+FC | $16,5 \pm 1,3^b$ |
| TC+FC | $18,9 \pm 0,8^b$ |

Os camundongos foram eutanaziados após 5 dias de exposição à fumaça de cigarro, o LBA coletado e a concentração de nitrito foi dosada pelo método de Griess. Nitrito foi utilizado como padrão. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c,d} Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

A infiltração de neutrófilos foi então determinada no parênquima pulmonar por histologia e imunohistoquímica. Os números de neutrófilos por campo ($p < 0,0001$) (Fig. 2A e C) e células positivas para MPO ($p < 0,0001$) (Fig. 2B e D) nos camundongos tratados com tempol diminuíram em aproximadamente 50% quando comparados com os animais do grupo GFC. Como consequência, a atividade peroxidásica da MPO nos homogenatos de pulmão dos camundongos tratados com tempol reduziu em 50% ($p < 0,0001$) em comparação ao grupo GFC (Fig. 2E). A atividade peroxidásica no homogenato foi decorrente à presença da MPO, pois a adição de ABAH (50 μM), reconhecido inibidor irreversível da enzima [25,44], ao homogenato do pulmão dos animais expostos à fumaça de cigarro inibiu completamente a oxidação do TMB (Fig. 2E).

Em seguida, o dano oxidativo ao pulmão resultante da infiltração celular foi por imunohistoquímica, e dosagem dos produtos reativos ao ácido tiobarbitúrico no homogenato tecidual, como indicativo preliminar da peroxidação lipídica. Os pulmões dos camundongos expostos à fumaça de cigarro apresentaram níveis elevados de proteínas carboniladas (38% *versus* 7%, $p < 0,0001$) (Fig. 3A e C) e nitradas em resíduos de tirosina (30% *versus* 17%, $p < 0,0001$) (Fig. 3B e D) em comparação ao grupo exposto ao ar ambiente. Além disso, a concentração de equivalentes de malondialdeído nos homogenatos dos pulmões foram maiores nos camundongos expostos à fumaça do cigarro (1,3 *versus* 0,6 mol de MDA/g de proteína, $p < 0,0001$) quando comparado com o grupo controle (Fig. 3E). O tempol quando

administrado preventivamente ou concomitantemente reduziu a carbonilação e nitração de proteínas estimuladas pela exposição à fumaça em aproximadamente 3 e 5 vezes, respectivamente (Fig. 3A-D), como também inibiu completamente a peroxidação lipídica (Figura 3E).

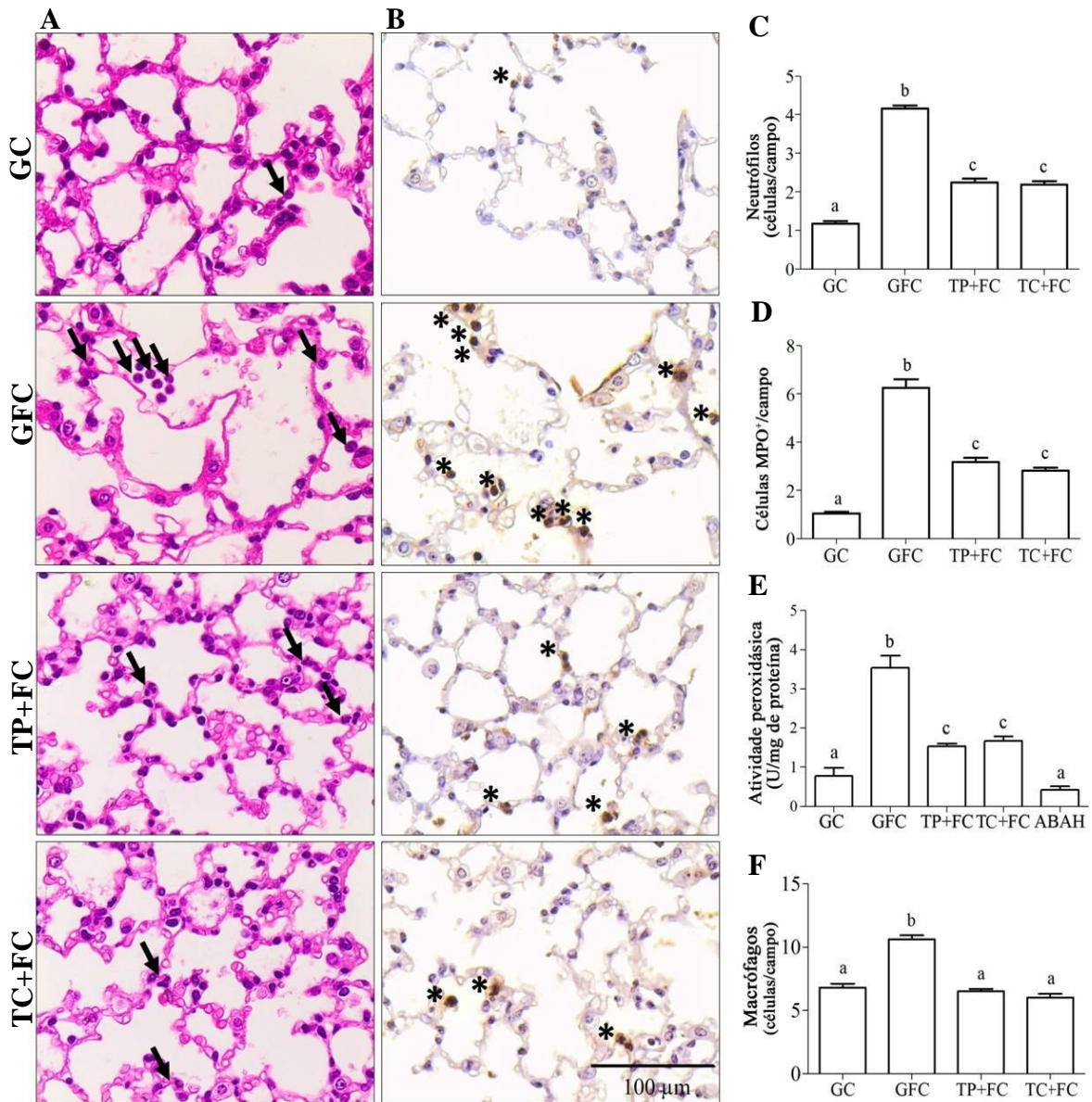


Fig. 2. Quantificação de neutrófilos (A e C), mieloperoxidase (B, D e E) e macrófagos (F) no parênquima pulmonar. Após 5 dias de exposição à fumaça de cigarro, os camundongos foram eutanaziados e os pulmões coletados para histologia, imunohistoquímica, e dosagem da atividade peroxidásica. Fotomicrografias representativas da contagem de neutrófilos (setas) nas lâminas do tecido pulmonar coradas com HE (A) e de células imunomarcadas para MPO (asteriscos) (B) de um animal dos grupos GC, GFC, TP+FC e TC+FC, sob aumento de 400x. Número de neutrófilos (C) e macrófagos por campo no tecido pulmonar (F) e número de células imunomarcadas com anticorpo anti-MPO (células MPO+) (D). Os pulmões foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (50 mM), e o homogenato foi incubado com

TMB (2,9 mM) e H_2O_2 (0,75 mM). A taxa de oxidação do TMB foi monitorada a 450 nm. ABAH (50 μ M) foi pré-incubado aos homogenatos dos camundongos GFC por 5 min, antes da adição da solução de TMB. A atividade peroxidásica foi expressa como atividade específica (U/mg proteína). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls.^{a,b,c} Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

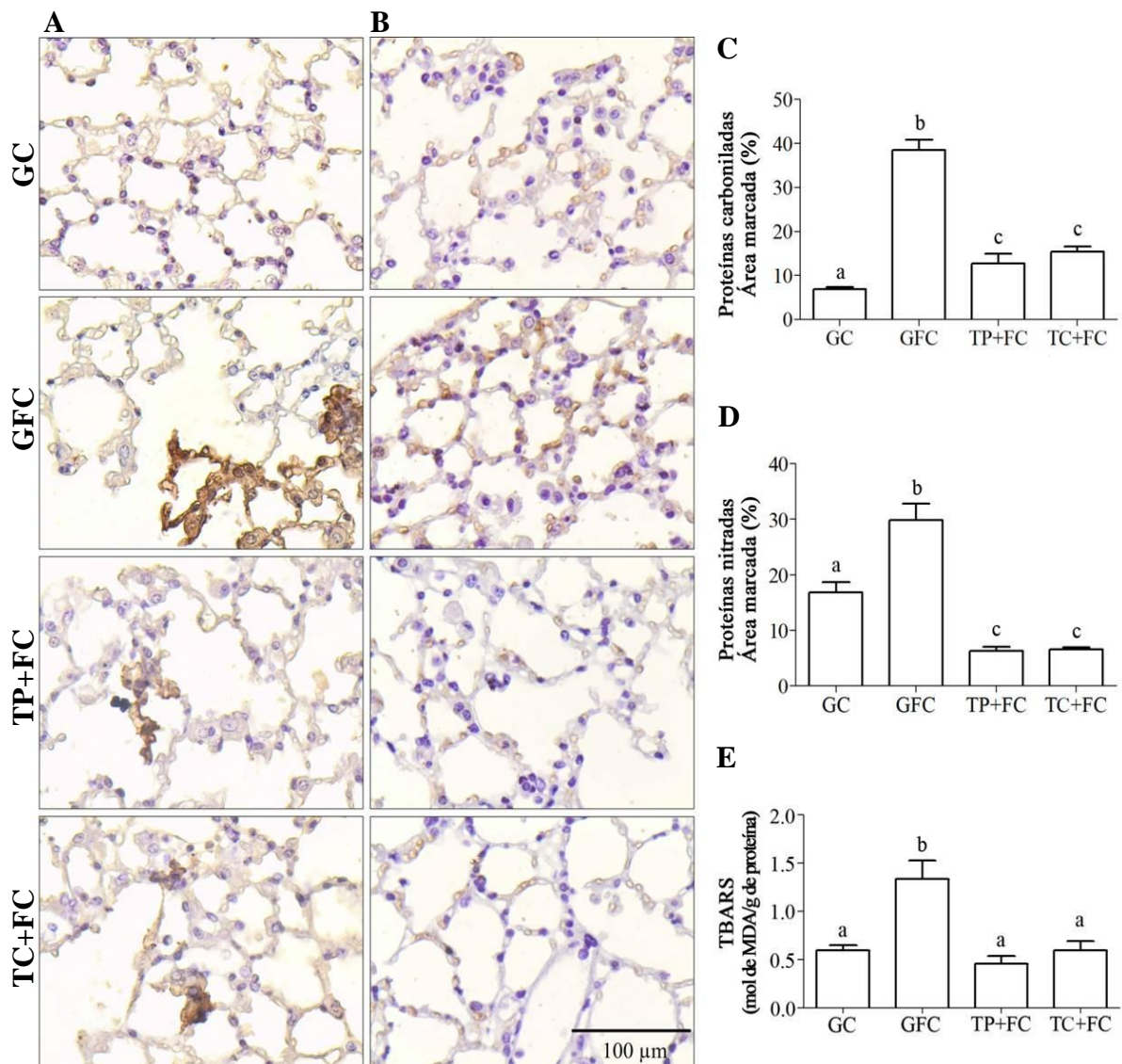


Fig. 3. Determinação de proteínas carboniladas (A e C), nitradas (B e D) e peroxidação lipídica no parênquima pulmonar (E). Após 5 dias de exposição à fumaça de cigarro, os camundongos foram eutanaziados e os pulmões coletados para análise de imunohistoquímica e determinação da peroxidação lipídica. Fotomicrografias representativas de um animal indicando a área marcada para proteínas carboniladas (A) e nitradas (B) nos grupos GC, GFC, TP+FC e TC+FC, sob aumento de 400x e porcentagem de área marcada/ μm^2 com anticorpo anti-proteína carbonilada (C) e anti- 3-nitrotirosina (D). Os pulmões foram homogeneizados

em tampão Tris HCl (50 mM) e hidroxitolueno butilado (0,02%). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado, o sobrenadante coletado e diluído em tampão Tris HCl contendo de ácido tricloroacético e ácido tiobarbitúrico. O meio reacional foi então aquecido, centrifugado e a absorbância do sobrenadante medida a 535 nm. A concentração de TBARS no tecido pulmonar foi calculada com base na curva feita com o padrão de malondialdeído e expressa em mol de MDA/g de proteína (E). Os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

Atividade imunomoduladora e citoprotetora do tempol

Na tentativa de avaliar o estado inflamatório do animal, a expressão de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias nos pulmões dos camundongos expostos à fumaça de cigarro foi quantificada por PCR de tempo real (qPCR). As expressões dos genes *Tnf- α* ($p < 0,0001$) (Fig. 4A), *Il-6* ($p = 0,004$) (Fig. 4B), *Il-1 β* ($p < 0,001$) (Fig. 4C) e *Il-17* ($p < 0,001$) (Fig. 4D) aumentaram nos camundongos expostos à fumaça de cigarro em relação ao grupo exposto ao ar ambiente. Por outro lado, as expressões de *Il-10* ($p < 0,002$) (Fig. 4E) e *Tgf- β* ($p = 0,001$) (Fig. 4F) foram menores nos camundongos expostos à fumaça do cigarro. O tempol reverteu a expressão dos genes *Il-6*, *Il-1 β* e *Il-17*, e reduziu os níveis de *Tnf- α* em aproximadamente 50% (Fig. 4A-D). Em paralelo, o tempol restaurou a transcrição de *Il-10* e *Tgf- β* nos camundongos expostos à fumaça do cigarro (Fig. 4E e F).

O tratamento com tempol também aumentou a transcrição de dois genes sob controle do Nrf2, *Gpx2* ($p = 0,0112$) (Fig. 4G) e *Ho-1* ($p < 0,0001$) (Fig. 4H). A análise de imunohistoquímica demonstrou que os níveis de GPx2 se elevaram em cerca de 3 vezes nos pulmões dos camundongos tratados com tempol em relação ao controle, independentemente do esquema de tratamento ($p < 0,0001$) (Fig. 5A e B). Esse aumento nos níveis de Gpx2 refletiu na maior atividade da GPx nos pulmões desses animais ($p < 0,0001$) (Fig 5C).

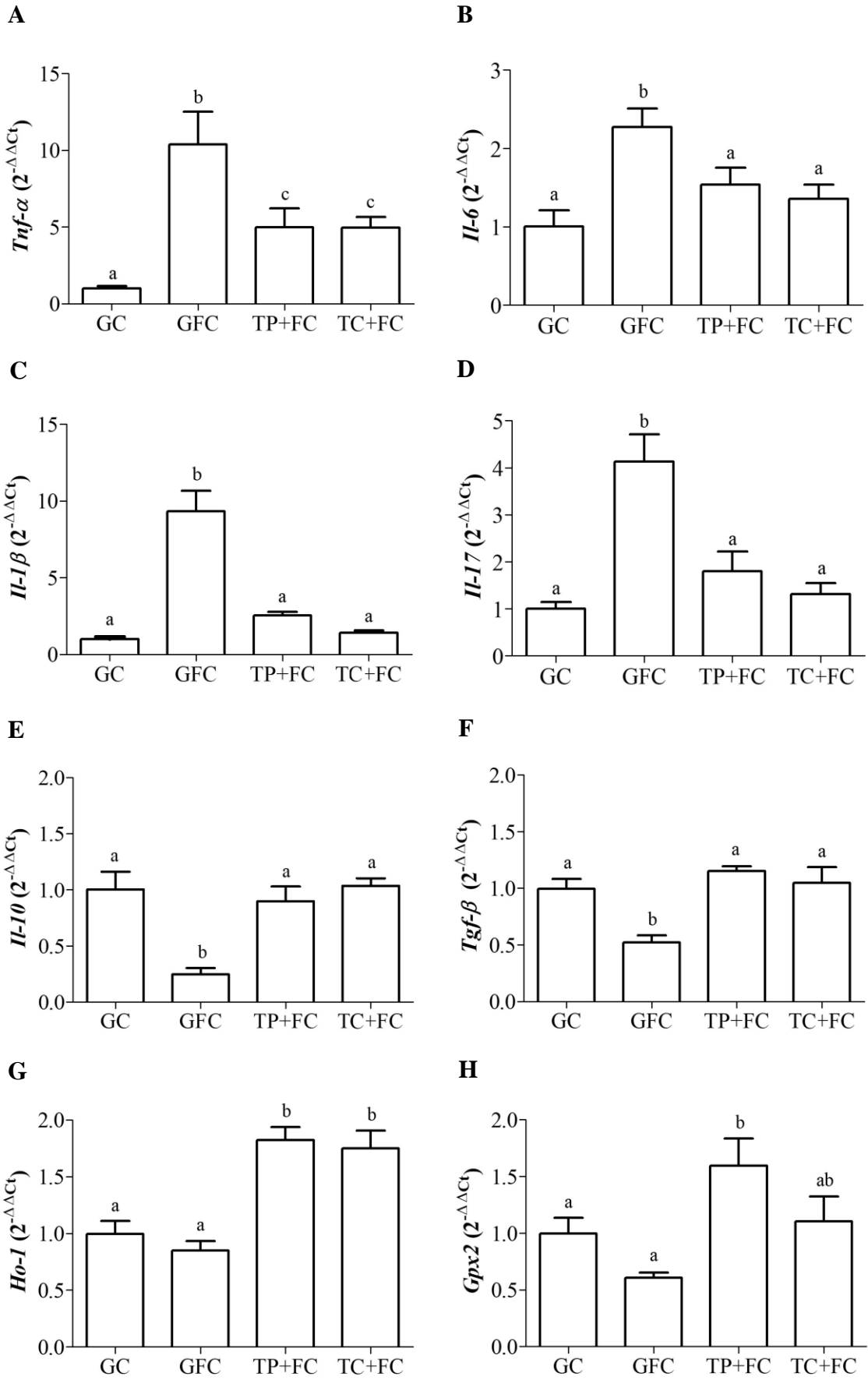


Fig. 4. Expressão gênica de genes inflamatórios (A-D), anti-inflamatórios (E e F) e citoprotetores (G e H). O RNA total foi extraído dos pulmões dos camundongos C57/BL6 sintetizado a partir de 2 µg do RNA total por meio do kit de transcrição reversa *High-Capacity RNA-to-cDNA*. O sistema *SYBR Green Mastermix* foi utilizado no PCR *real-time*. Os resultados de expressão gênica foram obtidos a partir das médias de *cycle threshold* de cada gene, e os dados foram expressos como média ± erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b}Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

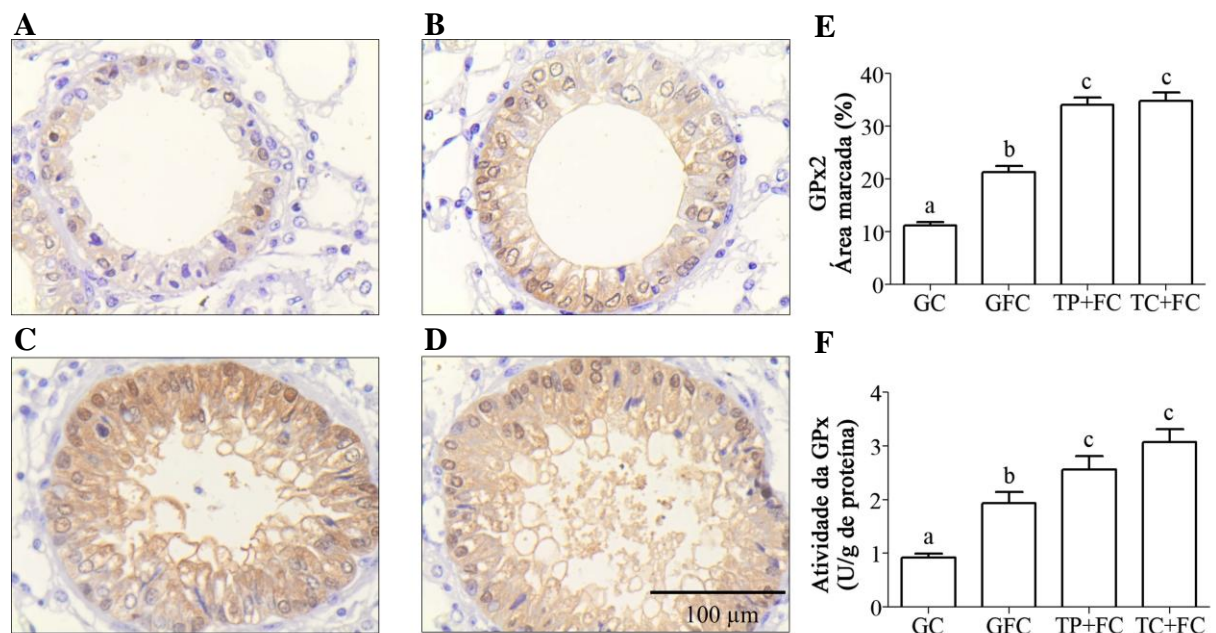


Fig. 5. Determinação da expressão da GPx2 (A-E) e atividade da GPx (F) no tecido pulmonar de camundongos C57/BL6. Após 5 dias de exposição à fumaça de cigarro, os camundongos foram eutanaziados e os pulmões coletados para análise de imunohistoquímica e determinação da atividade da GPx tecidual. Fotomicrografias representativas de um animal indicando a área marcada para GPx2 nos grupos GC (A), GFC (B), TP+FC (C) e TC+FC (D), sob aumento de 400x e porcentagem de área marcada/µm² com anticorpo anti-GPx2 (E). Os pulmões foram homogeneizados em tampão Tris HCl (50 mM) e a atividade da GPx foi determinada pela oxidação do NADPH na presença do H₂O₂ (0,2 mM) em 340 nm. A atividade da GPx foi expressa como atividade específica (U/g de proteína) (F). Os dados foram expressos como média ± erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. GC, camundongos expostos ao ar ambiente, GFC, camundongos expostos à fumaça

de cigarro; TP+FC, camundongos tratados preventivamente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro; TC+FC, camundongos tratados concomitantemente com tempol (50 mg/kg, i.p.) e expostos à fumaça do cigarro.

Inibição da resposta oxidativa de macrófagos Raw 264.7 pelo tempol

Diante dos efeitos imunomodulatório, antioxidante e citoprotetor do tempol no modelo de inflamação pulmonar induzido pela exposição aguda à fumaça de cigarro, nós também decidimos investigar o potencial antioxidante do nitróxido *in vitro*. Inicialmente, macrófagos RAW 264.7 foram incubados com tempol ou extrato da fumaça de cigarro (EFC) em diferentes concentrações por 24 h, e a viabilidade metabólica celular foi estimada pelo método do MTT [60]. Tempol reduziu a viabilidade dos macrófagos apenas na concentração de 500 μM quando comparado com as células não tratadas ($p < 0,0001$) (Fig. 6A). Nas incubações com EFC, a atividade metabólica celular reduziu significativamente quando sua concentração foi maior que 5% ($p < 0,0001$) (Fig. 6B), sendo que EFC a 7,5 e 10% diminuíram o número de células viáveis similarmente ao Triton X-100.

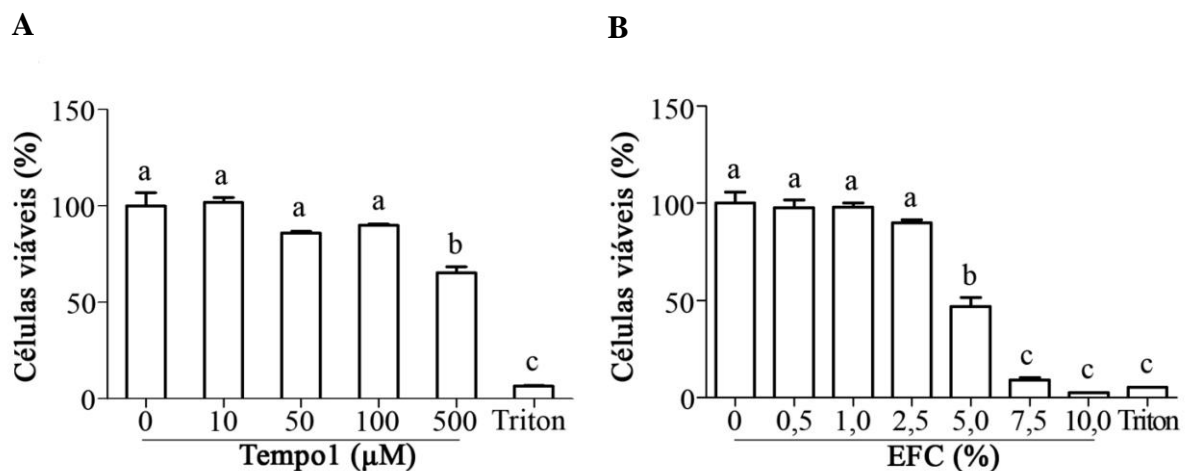


Fig. 6. Atividade metabólica dos macrófagos RAW 264.7 na presença do tempol (A) ou extrato da fumaça de cigarro (EFC) (B). Os macrófagos (2×10^5 por poço) foram incubados com tempol (10, 50, 100 e 500 μM) ou EFC (0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10%) por 24 h. Em seguida, as células aderidas foram incubadas com MTT, os cristais de formazan dissolvidos em DMSO, e a absorbância medida a 570 nm. As células não tratadas foram consideradas como 100% viáveis, enquanto Triton X-100 (1%) foi utilizado como controle positivo de morte celular. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c} Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$.

Na tentativa de investigar a atividade antioxidante de células pré-incubadas com tempol, nós determinamos o estado redox intracelular dos macrófagos utilizando a probe inespecífica para ROS denominada de DCFH-DA [61]. A oxidação intracelular da DCFH aumentou em cerca de 3 vezes nas células expostas ao EFC (0,5%) em comparação ao meio de cultura (DMEM) sem corante. O pré-tratamento das células com tempol por 24 h inibiu a oxidação intracelular da diclorofluoresceína de maneira concentração dependente ($p=0,02$) (Fig. 7A), sugestivo de um aumento no potencial antioxidante dessas células.

Em seguida, a formação de nitrato e nitrito foi analisada como indicador da atividade da óxido nítrico sintase induzível em macrófagos. A pré-incubação do tempol a 100 μ M com os macrófagos diminuiu significativamente os níveis basais de nitrito no sobrenadante quando comparado com o controle ($p=0,02$) (Fig. 7B). Quando as células foram incubadas com EFC (0,5%) por 24 h, as concentrações de nitrato e nitrito aumentaram significativamente ($p=0,0006$ e $0,0002$, respectivamente). No entanto, a pré-incubação com tempol não alterou significativamente os níveis de nitrito e nitrato produzidos pelas células expostas ao EFC (Fig. 7C). A incubação dos macrófagos com interferon-gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) por 24 h elevou os níveis de nitrato e nitrito em mais de 9 e 26 vezes ($p<0,0001$), respectivamente, quando comparados com o controle (DMEM) (Fig. 7D). Nesse caso, todas as concentrações de tempol testadas reduziram a concentração de nitrito ($p<0,0001$), mas não de nitrato ($p=0,338$), em relação às células expostas apenas ao IFN- γ e LPS (Fig. 7D).

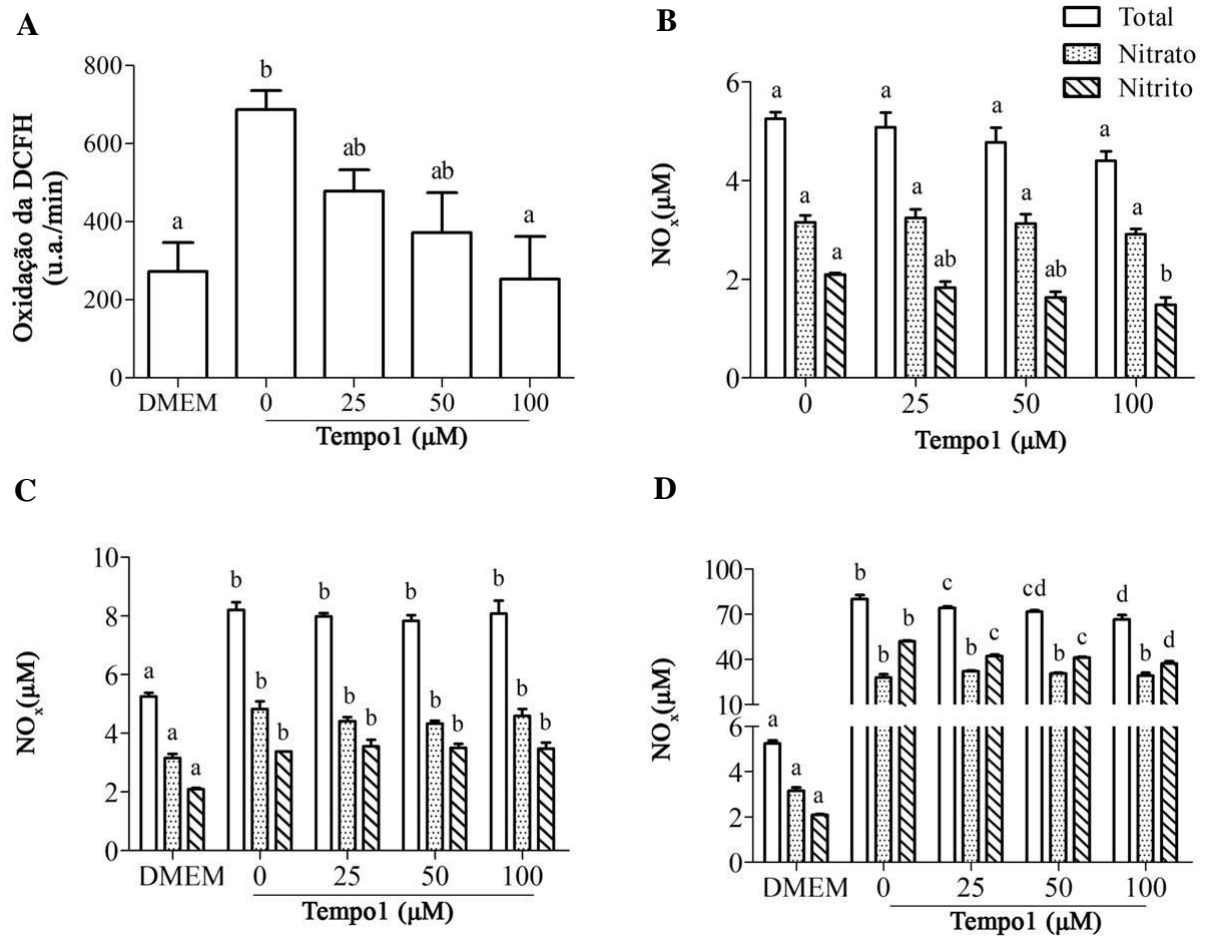


Fig. 7. Avaliação do estado redox intracelular e quantificação dos produtos do óxido nítrico (A). Os macrófagos (2×10^5 por poço) foram pré-tratados com tempol (0, 25, 50 e 100 μM) por 24 h. O sobrenadante foi retirado, DCFH-DA (20 μM) foi adicionado e as placas incubadas por 30 min. Após adição do EFC (0,5%), a cinética de oxidação da DCFH foi monitorada por 1 h em um leitor de microplacas sob excitação e emissão em 484 e 520 nm, respectivamente. A oxidação da DCFH foi expressa com unidade arbitrária por minuto (u.a./min). Em seguida, os macrófagos (5×10^6 por poço) foram pré-tratados com tempol (0, 25, 50 e 100 μM) por 24 h e expostos ao EFC (2,5%) ou IFN- γ e LPS. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado e a concentração de nitrito e nitrato foram determinados por quimioluminescência. Determinação dos produtos do óxido nítrico nos macrófagos incubados apenas com o tempol (B), EFC a 2,5% (C) e IFN- γ /LPS (D) e tratados com diferentes concentrações de tempol. Os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média \pm erro padrão. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c} Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p < 0,05$. DMEM, células expostas apenas ao meio de cultura, as quais foram consideradas controle.

Indução da expressão da HO-1 em macrófagos Raw 264.7 pelo tempol

Dados anteriores da literatura [29,30], e os resultados *in vitro* e *in vivo* acima sugerem que os efeitos antioxidante e citoprotetor do tempol envolvam a ativação da via do Nrf2. No intuito de testar essa hipótese, a expressão de HO-1 foi avaliada em macrófagos RAW 264.7

incubados com tempol por 24 h. Conforme observado na Figura 8, tanto tempol nas concentrações de 50 e 100 μM quanto hemina a 5 μM aumentaram significativamente a expressão da HO-1 em relação às células não tratadas ($p=0,01$ e $p<0,0001$, respectivamente).

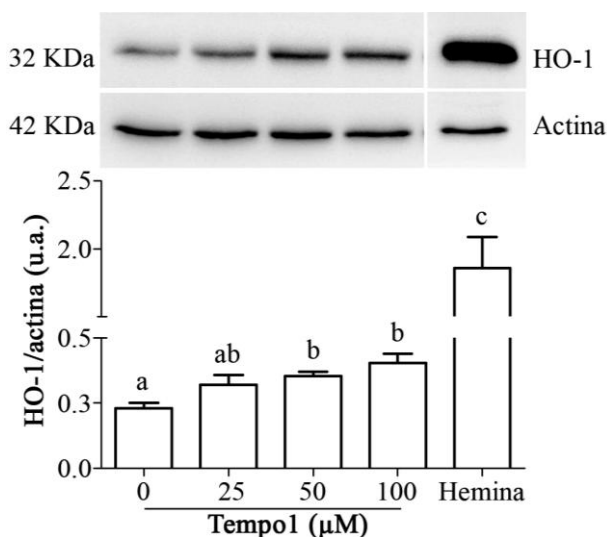


Fig. 8. Expressão da HO-1 em macrófagos RAW 264.7. Macrófagos (5×10^6 por poço) foram pré-incubados com tempol (0, 25, 50 ou 100 μM) ou hemina (5 μM) por 24 h. Em seguida, as células foram ressuspensas em tampão RIPA e o homogenato (17 μg de proteína) foi submetido a SDS-PAGE/Western Blotting. As membranas foram cortadas em aproximadamente 35 kDa e incubadas com o anticorpo anti-HO-1 (diluição 1:2000) ou anti-actina (diluição 1:1000). O inserto é representativo de três replicatas. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada com o teste ANOVA one-way, seguido do pós-teste de Newman Keuls. ^{a,b,c}Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística, $p<0,05$.

Discussão

O tempol e outros nitróxidos cíclicos demonstraram efeitos protetores em diversos modelos de inflamação *in vitro* e *in vivo* [20,64,65], sugerindo que essas moléculas atuam além de antioxidantes clássicos. Na verdade, o tempol e derivados já foram descritos como imunomoduladores [28,64], inibidores da expressão de iNOS [27], da ativação do NF- κ B [26], da atividade da MPO [23,24], e potenciais moduladores da via do Nrf2 [29,30], o que explicaria, ao menos em parte, a versatilidade de suas propriedades biológicas. Neste estudo, demonstramos pela primeira vez que o tempol atenuou a inflamação e o estresse redox no pulmão de camundongos e macrófagos RAW 264.7 expostos agudamente à fumaça de cigarro através da redução da migração neutrofílica e da ativação de alguns dos genes controlados pela via do Nrf2.

A exposição aguda de camundongos à fumaça de cigarro causa o aumento de marcadores inflamatórios e estresse redox não apenas no pulmão como também sistemicamente [8,12,31,34]. Nós demonstramos que a exposição de camundongos C57/BL6 à fumaça principal de 15 cigarros ao dia por 5 dias elevou todos os índices inflamatórios e de estresse redox utilizados. Tempol (50 mg/kg/dia) administrado preventivamente ou concomitantemente reduziu os parâmetros inflamatórios (Fig. 1 e 4A-D) e oxidativos (Fig. 3) nos pulmões dos camundongos expostos à fumaça de cigarro. Conforme demonstrado anteriormente [25], o tempol inibiu indiretamente a atividade da MPO *in vivo*, desde que a atividade da enzima (Fig. 2E) se correlacionou com o número de neutrófilos ($r=0,838$; $p<0,0001$) (Fig. 2A e C) e a imunomarcação contra MPO no parênquima pulmonar (Fig. 2B e D). De maneira similar, os níveis de proteínas carboniladas (Fig. 3A e C) e nitradas (Fig. 3B e D), e a peroxidação lipídica (Fig. 3E) nos pulmões foram proporcionais à concentração e atividade da MPO no tecido de animais não tratados e tratados com tempol. Na fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as células mais abundantes e que migram rapidamente para o sítio inflamatório [66,67], sendo detectados no lavado broncoalveolar e parênquima pulmonar a partir do terceiro dia de exposição à fumaça de cigarro [68,69]. Dentre as enzimas presentes em neutrófilos, a MPO representa 6% da proteína total dessas células [70]. Os neutrófilos quando ativados secretam parte da MPO no meio extracelular que, através dos ciclos peroxidásico e clorinante, aumenta o potencial oxidativo do H_2O_2 ao produzir radicais livres, como a molécula nitrante $\cdot NO_2$, e ácidos de halogênio, respectivamente [71,72]. Essas espécies podem modificar biomoléculas do hospedeiro e contribuir com a instalação, manutenção e progressão da resposta inflamatória pulmonar [11,12]. É importante destacar que além da baixa toxicidade [73,74], os nitróxidos tem grande volume de distribuição [73]. Em camundongos a dose máxima tolerada de tempol administrado por via i.p. foi 275 mg/kg, o que resultou em níveis máximos desse nitróxido no sangue total em 5-10 min após a injeção [75]. De fato, não foi observado nenhum sinal de toxicidade nos animais ao longo dos experimentos realizados neste trabalho, assim como os macrófagos RAW 264 só diminuíram a viabilidade quando as concentrações de tempol foram maiores que 500 μM (Fig. 6A).

A inflamação das vias aéreas foi também acompanhada pela elevação do número de leucócitos no lavado broncoalveolar dos camundongos expostos agudamente ao cigarro (Fig. 1A). Conforme descrito em outros estudos *in vivo* [76,77], a análise diferencial da contagem celular no lavado revelou um aumento significativo não apenas do número de neutrófilos (Fig. 1E) como também de linfócitos (Fig. 1F) e basófilos (Fig.1G) nos animais expostos ao cigarro em comparação aqueles expostos ao ar ambiente, e o tratamento com tempol diminuiu a

contagem dessas células. Anteriormente, análises de citometria de fluxo identificaram os linfócitos T do tipo CD4⁺ e CD8⁺ no lavado broncoalveolar de camundongos expostos a fumaça de cigarro a partir do 3º dia [69]. Além disso, os linfócitos T do tipo CD8⁺ foram os mais abundantes nos brônquios de pacientes fumantes com enfisema, o que possivelmente foi responsável pela apoptose das células pulmonares [10]. Os basófilos, apesar de representarem menos de 1% do infiltrado celular em pulmões em fibrose, são os principais produtores de IL-4, a qual possui papel determinante na instalação e progressão do enfisema ao aumentar a quantidade de macrófagos intersticiais e liberação de metaloproteinase da matriz 12 [78]. A análise diferencial do leucócitos no LBA demonstrou ainda que o número de macrófagos não aumentou nos animais expostos à fumaça do cigarro (Fig. 1I) ao contrário do que foi observado por outros autores [12,34,79]. No entanto, a contradição entre esses resultados pode ser explicada por algumas diferenças entre os protocolos. Experimentos preliminares demonstraram que o acréscimo de uma hora entre as exposições à fumaça do cigarro não levou à inflamação, e muitos trabalhos não detalham exatamente esse intervalo. Também, a infiltração de neutrófilos observada aqui é maior que o descrito no trabalho de Campos e colaboradores [34], o que implicaria num processo inflamatório com perfil mais agudo [67]. No nosso modelo, todos os animais foram alojados em baias dentro de uma câmara de exposição, enquanto um outro artigo que descreveu o aumento de macrófagos no lavado utilizaram uma caixa fechada conectada a um gerador de fumaça, no qual a mesma é direcionada às narinas do animal por 1 h [80]. Ainda, outros trabalhos [8,31,37] relatam o maior influxo de macrófagos no parênquima pulmonar, e não realizam contagem no LBA.

A contagem de macrófagos no tecido pulmonar demonstrou um aumento do número dessas células nos pulmões dos camundongos expostos à fumaça de cigarro (Fig 2E). Quando ativados, os macrófagos são responsáveis pela liberação de mediadores como TNF- α , MMPs, citocinas e quimiocinas perpetuando o processo inflamatório. Com a persistência do processo inflamatório, a partir da exposição contínua as partículas nocivas do cigarro, ocorre um aumento do número de macrófagos em regiões de lesão, bem como sua migração para o lavado broncoalveolar [81, 82]. O resultado observado em nosso modelo corrobora com os achados relacionados com neutrófilos, que suportam a hipótese de que a inflamação induzida pela fumaça não foi suficiente para promover a migração de macrófagos para o lavado broncoalveolar, devido ao caráter mais agudo do modelo.

Embora o tempol seja inibidor da MPO *in vitro* e em neutrófilos [83,84], em modelos *in vivo* de inflamação o nitróxido parece agir diferentemente do ABAH, cujos efeitos protetores são decorrentes à inibição da atividade da MPO *in vivo* [25,85]. Na verdade, o

tempol inibiu a migração de neutrófilos *in vivo* de maneira similar a colchicina, um reconhecido inibidor da polimerização da tubulina e, conseqüentemente, da quimiotaxia [86]. Os mecanismos pelos quais os nitróxidos interferem na quimiotaxia ainda não são compreendidos, mas devem envolver cascatas de sinalização redox sensíveis [87,88]. Estudos recentes demonstraram o envolvimento do Nrf2/Keap1/ARE na regulação da migração de células vasculares e tumorais por diminuir os níveis de ROS celulares [89,90], e há evidências que os nitróxidos possam induzir a ativação da via do Nrf2 [29,30]. Nós confirmamos que o tratamento dos camundongos com tempol aumentou a transcrição de dois genes sob controle do Nrf2, GPx2 (Fig. 4G) e HO-1 (Fig. 4H). Similarmente, os níveis de expressão da GPx2 e a atividade da GPx tecidual (Fig. 5) foram maiores nos pulmões dos animais que receberam tempol (Fig. 5). Macrófagos RAW 264.7 pré-tratados com tempol apresentaram menor oxidação intracelular diante à exposição ao extrato da fumaça de cigarro (Fig. 7A), como também expressaram mais HO-1 (Fig. 8). A HO-1 catalisa a degradação microsomal do grupo heme em bilirrubina, CO e ferro [91,92]. Além das propriedades vasorelaxantes [93–95], CO inibe a migração de neutrófilos e monócitos [96,97]. Esses achados suportam a hipótese de que o tempol diminui a inflamação pulmonar, pelo menos em parte, por reduzir a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório possivelmente pela regulação da via do Nrf2.

As interleucinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17 são mediadores da migração leucocitária na inflamação pulmonar causada pela fumaça de cigarro [8,98], cujas expressões foram encontradas aumentadas em nosso modelo (Fig. 4 A-D). O TNF- α estimula a quimiotaxia de células inflamatórias, ativação celular, formação de ROS e expressão de outras citocinas, incluindo IL-6 e IL-1 [67,99,100]. A IL-6 é um dos principais estimuladores da produção da maioria das proteínas de fase aguda [100], sendo importante na iniciação da reposta imune aguda como também na cronificação através do acúmulo de células mononucleares no sítio inflamatório [101]. As interleucinas IL-1 β e IL-17 sustentam a resposta inflamatória quando aumenta o recrutamento e ativação de fagócitos [102,103]. As citocinas IL-10 e TGF- β apresentam efeitos contrários às interleucinas acima. A IL-10 foi capaz de suprimir a expressão de metaloproteinase da matriz 9 [104] e, portanto, a degradação da elastina na matrix extracelular e destruição da parede alveolar [82]. A TGF- β inibe a apoptose de células epiteliais alveolares [105] como também ativa a translocação nuclear de Nrf2 e expressão de HO-1 em células da musculatura lisa da aorta [106]. A administração de tempol nos camundongos expostos ao cigarro reduziu a expressão das citocinas inflamatórias (Fig. 4A-D). Em paralelo, ele também restaurou a expressão de IL-10 e TGF- β nos pulmões inflamados (Fig. 4E e F). Embora os efeitos imunomodulatórios do tempol foram descritos anteriormente

[28,64], os mecanismos ainda são desconhecidos, mas provavelmente envolvem vias redox sensíveis [15,107]. De modo geral, uma menor expressão de citocinas inflamatórias suporta a inibição do recrutamento leucocitário e dano tecidual em camundongos tratados com tempol e expostos à fumaça do cigarro.

O tempol demonstrou anteriormente proteger os animais de lesões associadas ao aumento da produção de óxido nítrico e seus derivados oxidantes [108]. Esse nitróxido não alterou a produção de óxido nítrico pelos macrófagos RAW 264.7 expostos ao EFC (2,5%) (Fig. 7C). Similarmente, a concentração de nitrito no LBA dos animais expostos à fumaça do cigarro também se manteve constante sob tratamento com tempol (Tabela 2). Por outro lado, o tempol reduziu a concentração de nitrito formado por macrófagos ativados com interferon-gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) (Fig. 7D). O nitrito é um subproduto do óxido nítrico em condições aérobicas como também pode advir da dieta [109]. Quando o tempol é oxidado pelo $\cdot\text{NO}_2$, produzido por vias dependentes da MPO ou ONOO \cdot , ao cátion oxamônio, ocorre a regeneração do nitrito no sistema [20]. Esse mecanismo catalítico poderia, por sua vez, mascarar uma eventual inibição da formação de óxido nítrico pelo tempol, embora os nossos dados suportam que a inibição da nitratação das proteínas (Fig. 3B e D) nos camundongos decorre majoritariamente ao menor influxo de neutrófilos para o pulmão (Fig. 2A e C).

Em conjunto, nosso estudo demonstrou pela primeira vez os mecanismos antioxidantes e anti-inflamatórios do tempol sobre o pulmão de camundongos e macrófagos RAW 264.7 expostos agudamente à fumaça de cigarro. O tempol agiu em vias *upstream* à migração leucocitária e ao dano oxidativo, possivelmente ao regular sinalização redox [85,86] *in vitro* e *in vivo*. Nesse sentido, os estudos direcionados ao entendimento dos mecanismos pelos quais os nitróxidos atuam sobre cascatas de sinalização em leucócitos podem contribuir com o desenvolvimento futuro de novas moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, pelo auxílio na condução dos experimentos de qPCR, a Prof^a Dr^a Regiane Yatsuda, Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade

Federal da Bahia, pela concessão do espaço no Biotério, a Prof^a Dr^a Telma de Jesus Soares, pelo suporte nos experimentos de imuno-histoquímica, e a Prof^a Dr^a Amélia Cristina Mendes de Magalhães Gusmão, pela permissão do uso do laboratório para os ensaios bioquímicos.

Financiamento

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia (FAPESB) (RED038/2014, APP0024/2016 e BOL2154/2017), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (462401/2014-6) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (2008/57721-3 e 2013/07937-8).

REFERÊNCIAS

- [1] WHO. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) - Facts sheets 2019.
- [2] WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. WHO 2015.
- [3] GOLD. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease - POCKET GUIDE TO COPD DIAGNOSIS, MANAGEMENT, AND PREVENTION, A Guide for Health Care Professionals 2018:1–44.
- [4] Dalrymple A, Ordoñez P, Thorne D, Dillon D, Meredith C. An improved method for the isolation of rat alveolar type II lung cells : Use in the Comet assay to determine DNA damage induced by cigarette smoke. *Regul Toxicol Pharmacol* 2015;72:141–9.
- [5] Hecht SS. Research opportunities related to establishing standards for tobacco products under the family smoking prevention and tobacco control act. *Nicotine Tob Res* 2012;14:18–28.
- [6] Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138:16–27.
- [7] Pinho-ribeiro V, Melo AC, Kennedy-feitosa E, Graca-reis A, Barroso MV, Cattani-cavalieri I, et al. Atorvastatin and Simvastatin Promoted Mouse Lung Repair After Cigarette Smoke-Induced Emphysema. *Inflammation* 2017;40.
- [8] Kennedy-Feitosa E, Okuro RT, Pinho Ribeiro V, Lanzetti M, Barroso MV, Zin WA, et al. Eucalyptol attenuates cigarette smoke-induced acute lung inflammation and oxidative stress in the mouse. *Pulm Pharmacol Ther* 2016;41:11–8.
- [9] Di Stefano A, Coccini T, Roda E, Signorini C, Balbi B, Brunetti G, et al. International Journal of COPD Dovepress Blood MCP-1 levels are increased in chronic obstructive

- pulmonary disease patients with prevalent emphysema. *Int J COPD* 2018;13:1691–700.
- [10] Majo J, Ghezzi H, Cosio MG. Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *Eur Respir J* 2001;17:946–53.
- [11] Fischer BM, Voynow JA, Ghio AJ. COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J COPD* 2015;10:261–76.
- [12] Ramos C de O, Campos KKD, Costa G de P, Cangussú SD, Talvani A, Bezerra FS. Taurine treatment decreases inflammation and oxidative stress in lungs of adult mice exposed to cigarette smoke. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018;98:50–7.
- [13] Tan X, Jin P, Feng L, Song J, Sun E, Liu W, et al. Protective effect of luteolin on cigarette smoke extract-induced cellular toxicity and apoptosis in normal human bronchial epithelial cells via the Nrf2 pathway. *Oncol Rep* 2014;31:1855–62.
- [14] Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med* 2015;88:314–36.
- [15] Ahmed SMU, Luo L, Namani A, Wang XJ, Tang X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2017;1863:585–97.
- [16] Suzuki M, Betsuyaku T, Ito Y, Nagai K, Nasuhara Y, Kaga K, et al. Down-regulated NF-E2-related factor 2 in pulmonary macrophages of aged smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008;39:673–82.
- [17] Rangasamy T, Tuder RM, Biswal S, Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, et al. Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke – induced emphysema in mice Find the latest version: Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke – induced emphysema in mice. *J Clin Invest* 2004;114:1248–59.
- [18] Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev* 2008;60:418–69.
- [19] Soule BP, Hyodo F, Matsumoto K ichiro, Simone NL, Cook JA, Krishna MC, et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. *Free Radic Biol Med* 2007;42:1632–50.
- [20] Augusto O, Trindade DF, Linares E, Vaz SM. Cyclic nitroxides inhibit the toxicity of nitric oxide-derived oxidants: Mechanisms and implications. *An Acad Bras Cienc* 2008;80:179–89.
- [21] Samuni A, Mitchell JB, DeGraff W, Krishna CM, Samuni U, Russo A. Nitroxide SOD-mimics: modes of action. *Free Radic Res Commun* 1991;12-13 Pt 1:187–94.
- [22] Pattison DI, Lam M, Shinde SS, Anderson RF, Davies MJ. The nitroxide TEMPO is an

- efficient scavenger of protein radicals: Cellular and kinetic studies. *Free Radic Biol Med* 2012;53:1664–74.
- [23] Rees MD, Bottle SE, Fairfull-Smith KE, Malle E, Whitelock JM, Davies MJ. Inhibition of myeloperoxidase-mediated hypochlorous acid production by nitroxides. *Biochem J* 2009;421:79–86.
- [24] Queiroz RF, Vaz SM, Augusto O. Inhibition of the chlorinating activity of myeloperoxidase by tempol: revisiting the kinetics and mechanisms. *Biochem J* 2011;431:423–31.
- [25] Queiroz RF, Cunha AC, Ferreira VF, Jord AK, Malvezzi A, Amaral AT, et al. Nitroxides attenuate carrageenan-induced inflammation in rat paws by reducing neutrophil infiltration and the resulting myeloperoxidase-mediated damage. *Free Radic Biol Med* 2012;53:1942–53.
- [26] Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel NSA, Caputi AP, et al. Tempol reduces the activation of nuclear factor- κ B in acute inflammation. *Free Radic Res* 2004;38:813–9.
- [27] Linares E, Giorgio S, Augusto O. Inhibition of in vivo leishmanicidal mechanisms by tempol: Nitric oxide down-regulation and oxidant scavenging. *Free Radic Biol Med* 2008;44:1668–76.
- [28] Tshako MH, Augusto O, Linares E, Chadi G, Giorgio S, Pereira CA. Tempol ameliorates murine viral encephalomyelitis by preserving the blood-brain barrier, reducing viral load, and lessening inflammation. *Free Radic Biol Med* 2010;48:704–12.
- [29] Greenwald MBY, Anzi S, Sasson S Ben, Bianco-peled H, Kohen R. Can nitroxides evoke the Keap1 – Nrf2 – ARE pathway in skin ? *Free Radic Biol Med* 2014;77:258–69.
- [30] Greenwald MBY, Frušić-Zlotkin M, Soroka Y, Sasson S Ben, Bianco-Peled H, Bitton R, et al. Nitroxide delivery system for Nrf2 activation and skin protection. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;94:123–34.
- [31] Lopes AA, Ferreira TS, Nesi RT, Lanzetti M, Pires KMP, Silva AM, et al. Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. *Bioorganic Med Chem* 2013;21:7570–7.
- [32] Hoffman BM, Eames TB. Protonated Nitroxide Free Radical. *J Am Chem Soc* 1969;91:2169–70.
- [33] Coulter ED, Kurtz J. A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: Catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron

- superoxide reductase. *Arch Biochem Biophys* 2001;394:76–86.
- [34] Campos KKD, Araújo GR, Martins TL, Bandeira ACB, Costa G de P, Talvani A, et al. The antioxidant and anti-inflammatory properties of lycopene in mice lungs exposed to cigarette smoke. *J Nutr Biochem* 2017;48:9–20.
- [35] Gueirard P, Druilhe A, Pretolani M, Guiso N. Role of Adenylate Cyclase-Hemolysin in Alveolar Macrophage Apoptosis during *Bordetella pertussis* Infection in Vivo. *Infect Immun* 1998;66:1718–25.
- [36] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of Nitrate, Nitrite, and [¹⁵N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem* 1982;126:131–8.
- [37] De Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KMP, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (AÇAÍ) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine* 2012;19:262–9.
- [38] Shi SR, Chaiwun B, Young L, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval technique utilizing citrate buffer or urea solution for immunohistochemical demonstration of androgen receptor in formalin-fixed paraffin sections. *J Histochem Cytochem* 1993;41:1599–604.
- [39] Kim JW, Ku SK, Kim KY, Kim SG, Han MH, Kim GY, et al. *Schisandrae fructus* supplementation ameliorates sciatic neurectomy-induced muscle atrophy in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2015;2015.
- [40] Sato T, Seyama K, Sato Y, Mori H, Souma S, Akiyoshi T, et al. Senescence marker protein-30 protects mice lungs from oxidative stress, aging, and smoking. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:530–7.
- [41] Oyagbemi AA, Omobowale TO, Ochigbo GO, Asenuga ER, Ola-Davies OE, Ajibade TO, et al. Polyphenol-Rich Fraction of *Parquetina nigrescens* Mitigates Dichlorvos-Induced Cardiorenal Dysfunction Through Reduction in Cardiac Nitrotyrosine and Renal p38 Expressions in Wistar Rats. *J Diet Suppl* 2018;15:269–84.
- [42] Lee C, Jang MJ, Kim BH, Park JY, You D, Jeong IG, et al. Recovery of renal function after administration of adipose-tissue-derived stromal vascular fraction in rat model of acute kidney injury induced by ischemia/reperfusion injury. *Cell Tissue Res* 2017;368:603–13.
- [43] Sakai T, Inoue S, Takei M, Ogawa G, Hamazaki Y, Ota H, et al. Activated inflammatory cells participate in thrombus size through tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in acute coronary syndrome: Immunohistochemical analysis.

- Thromb Res 2011;127:443–9.
- [44] Kettle AJ, Gedye CA, Winterbourn CC. Mechanism of inactivation of myeloperoxidase by 4-aminobenzoic acid hydrazide. *Biochem J* 1997;321:503–8.
- [45] Pulli B, Ali M, Forghani R, Schob S, Hsieh KLC, Wojtkiewicz G, et al. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples. *PLoS One* 2013;8:1–10.
- [46] Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Skatani T, Fujikura T. Assay Method for Myeloperoxidase in Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Anal Biochem* 1983;132:345–52.
- [47] Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158–69.
- [48] Zhang D, Yang Z, Li H, Pei Z, Sun S, Xu Y. A simple excited-state intramolecular proton transfer probe based on a new strategy of thiol-azide reaction for the selective sensing of cysteine and glutathione. *Chem Commun* 2016;52:749–52.
- [49] Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993;15:353–63.
- [50] Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [51] Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE Guidelines : M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments SUMMARY : *Clin Chem* 2009;55:611–22.
- [52] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [53] Sun C, Li S, Li D. Sulforaphane mitigates muscle fibrosis in *mdx* mice via Nrf2-mediated inhibition of TGF- β /Smad signaling. *J Appl Physiol* 2016;120:377–90.
- [54] Hui W, Yu D, Cao Z, Zhao X. Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. *Int Immunopharmacol* 2019;68:226–33.
- [55] Markó L, Szijártó IA, Filipovic MR, Kaßmann M, Balogh A, Park JK, et al. Role of Cystathionine Gamma-Lyase in Immediate Renal Impairment and Inflammatory Response in Acute Ischemic Kidney Injury. *Sci Rep* 2016;6:1–10.
- [56] Kosaka S, Tamauchi H, Terashima M, Maruyama H, Habu S, Kitasato H. Il-10 controls th2-type cytokine production and eosinophil infiltration in a mouse model of allergic airway inflammation. *Immunobiology* 2011;216:811–20.

- [57] Newsome BJ, Petriello MC, Han SG, Murphy MO, Eske KE, Sunkara M, et al. Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by up-regulating antioxidant enzymes. *J Nutr Biochem* 2014;25:126–35.
- [58] Li L, Zhang M, Zhang L, Cheng Y, Tu X, Lu Z. Klotho Regulates Cigarette Smoke-Induced Autophagy: Implication in Pathogenesis of COPD. *Lung* 2017;195:295–301.
- [59] Guan SP, Tee W, Ng DSW, Chan TK, Peh HY, Ho WE, et al. Andrographolide protects against cigarette smoke-induced oxidative lung injury via augmentation of Nrf2 activity. *Br J Pharmacol* 2013;168:1707–18.
- [60] Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods* 1983;65:55–63.
- [61] Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999;27:612–6.
- [62] Feelisch M, Rassaf T, Mnaimneh S, Singh N, Bryan NS, Jourdain D, et al. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J* 2002;16:1775–85. doi:10.1096/fj.02-0363com.
- [63] Sheftel AD, Kim SF, Ponka P. Non-heme induction of heme oxygenase-1 does not alter cellular iron metabolism. *J Biol Chem* 2007;282:10480–6.
- [64] Neil S, Huh J, Baronas V, Li X, McFarland HF, Cherukuri M, et al. Oral administration of the nitroxide radical TEMPOL exhibits immunomodulatory and therapeutic properties in multiple sclerosis models. *Brain Behav Immun* 2017;62:332–43.
- [65] Kagan VE, Jiang J, Bayir H, Stoyanovsky DA. Targeting nitroxides to mitochondria: location, location, location, and ...concentration. Highlight Commentary on “Mitochondria superoxide dismutase mimetic inhibits peroxide-induced oxidative damage and apoptosis: Role of mitochondrial superoxide.” *Free Radic Biol Med* 2007;43:348–50.
- [66] Meijer M, Rijkers GT, van Overveld FJ. Neutrophils and emerging targets for treatment in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:1055–68.
- [67] Wong J, Magun BE, Wood LJ. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: A review. *Int J COPD* 2016;11:1391–401.
- [68] D’hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005;26:204–13.

- [69] Campos KKD, Manso RG, Gonçalves EG, Silva ME, de Lima WG, Menezes CAS, et al. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. *Cell Immunol* 2013;284:29–36.
- [70] Malle E, Furtmüller PG, Sattler W, Obinger C. Myeloperoxidase: A target for new drug development? *Br J Pharmacol* 2007;152:838–54.
- [71] Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 2000;28:1717–25.
- [72] Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol* 2008;4:278–86. doi:10.1038/nchembio.85.
- [73] Wilcox CS, Pearlman A. Chemistry and Antihypertensive Effects of Tempol and Other Nitroxides. *Pharmacol Rev* 2008;60:418–69.
- [74] Mitchell JB, Samuni A, Krishna MC, DeGraff WG, Ahn MS, Samuni U, et al. Biologically Active Metal-Independent Superoxide Dismutase Mimics. *Biochemistry* 1990;29:2802–7.
- [75] Hahn SM, Tochner Z, Krishna CM, Glass J, Wilson L, Samuni A, et al. Tempol, a Stable Free Radical, Is a Novel Murine Radiation Protector. *Cancer Res* 1992;52:1750–3.
- [76] Lee H, Jung K-H, Park S, Kil Y-S, Chung EY, Jang YP, et al. Inhibitory effects of *Stemona tuberosa* on lung inflammation in a subacute cigarette smoke-induced mouse model. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:1–12.
- [77] Wang D, Tao K, Xion J, Xu S, Jiang Y, Chen Q, et al. TAK-242 attenuates acute cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mouse via the TLR4/NF- κ B signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;472:508–15.
- [78] Shibata S, Miyake K, Tateishi T, Yoshikawa S, Yamanishi Y, Miyazaki Y, et al. Basophils trigger emphysema development in a murine model of COPD through IL-4-mediated generation of MMP-12-producing macrophages. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115:13057–62.
- [79] Pena KB, Ramos C de O, Soares NP, da Silva PF, Bandeira ACB, de Paula Costa G, et al. The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. *Int J COPD* 2016;11:3207–17.
- [80] Zhang DF, Zhang J, Li R. Salvianolic acid B attenuates lung inflammation induced by cigarette smoke in mice. *Eur J Pharmacol* 2015;761:174–9.
- [81] Boorsma CE, Draijer C, Melgert BN. Macrophage heterogeneity in respiratory

- diseases. *Mediators Inflamm* 2013;2013. doi:10.1155/2013/769214.
- [82] Vlahos R, Bozinovski S. Role of alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease. *Front Immunol* 2014;5:1–8. doi:10.3389/fimmu.2014.00435.
- [83] Kettle AJ, Gedye CA, Hampton MB, Winterbourn CC. Inhibition of myeloperoxidase by benzoic acid hydrazides. *Biochem J* 1995;308:559–63.
- [84] Kettle AJ, Winterbourn CC. Myeloperoxidase: A key regulator of neutrophil oxidant product. *Redox Rep* 1997;3:3–15.
- [85] Forghani R, Wojtkiewicz G, Zhang Y, Seeburg D, Bautz BR, Pulli B, et al. Demyelinating Diseases : Myeloperoxidase as an Imaging. *Radiology* 2012;263:451–60.
- [86] Vinegar R, Truax JF, Selph JL, Johnston PR, Venable AL, Voelker FA. Development of Carrageenan Pleurisy in the Rat: Effects of Colchicine on Inhibition of Cell Mobilization. *Proc Soc Exp Biol Med* 1981;168:24–32.
- [87] Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Luo HR. Reactive Oxygen Species as Signaling Molecules. *Commun Integr Biol* 2010;3:278–81.
- [88] Hattori H, Subramanian KK, Sakai J, Jia Y, Li Y, Porter TF, et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107:3546–51.
- [89] Zhang HS, Zhang ZG, Du GY, Sun HL, Liu HY, Zhou Z, et al. Nrf2 promotes breast cancer cell migration via up-regulation of G6PD/HIF-1 α /Notch1 axis. *J Cell Mol Med* 2019;23:3451–63.
- [90] Ashino T, Yamamoto M, Yoshida T, Numazawa S. Redox-sensitive transcription factor Nrf2 regulates vascular smooth muscle cell migration and neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:760–8.
- [91] Motterlini R, Foresti R. Heme Oxygenase-1 As a Target for Drug Discovery. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:1–57.
- [92] Choi YH. The cytoprotective effect of isorhamnetin against oxidative stress is mediated by the upregulation of the Nrf2-dependent HO-1 expression in C2C12 myoblasts through scavenging reactive oxygen species and ERK inactivation. *Gen Physiol Biophys* 2016;35:145–54.
- [93] Foresti R, Hammad J, Clark JE, Johnson TR, Mann BE, Friebe A, et al. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 2004;142:453–60.
- [94] Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, Agarwal A. Heme oxygenase-1 and carbon

- monoxide in vascular pathobiology: Focus on angiogenesis. *Circulation* 2008;117:231–41.
- [95] Sammut IA, Foresti R, Clark JE, Exon DJ, Vesely MJ, Sarathchandra P, et al. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol* 1998;125:1437–44.
- [96] Anderson JA, Uddman R, Cardell LO. Hemin, a heme oxygenase substrate analog, both inhibits and enhances neutrophil random migration and chemotaxis. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol* 2002;57:1008–12.
- [97] Morita T, Imai T, Yamaguchi T, Sugiyama T, Katayama S, Yoshino G. Induction of Heme Oxygenase-1 in Monocytes Suppresses Angiotensin II-Elicited Chemotactic Activity Through Inhibition of CCR2: Role of Bilirubin and Carbon Monoxide Generated by the Enzyme. *Antioxid Redox Signal* 2003;5:439–47.
- [98] Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, et al. P38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *BMC Pulm Med* 2014;14.
- [99] Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 2005;15:24–7.
- [100] Mackay BF, Loetscher H, Stueber D, Gehr G, Lesslauer W. Tumor Necrosis Factor alpha (TNF-alpha)-induced Cell Adhesion to Human Endothelial Cells Is under Dominant Control of One TNF Receptor Type, TNF-R55. *J Exp Med* 1993;177:1277–86.
- [101] Yu M, Zheng X, Witschi H, Pinkerton KE. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environment air pollutants. *Toxicol Sci* 2002;68:488–97.
- [102] Lappalainen U, Whitsett JA, Wert SE, Tichelaar JW, Bry K. Interleukin-1 β Causes Pulmonary Inflammation, Emphysema, and Airway Remodeling in the Adult Murine Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;32:311–8.
- [103] Levänen B, Glader P, Dahlén B, Billing B, Qvarfordt I, Palmberg L, et al. Impact of tobacco smoking on cytokine signaling via interleukin-17A in the peripheral airways. *Int J COPD* 2016;11:2109–16.
- [104] Sam L, Roche N, Oliver BG, Mattos W, Barnes PJ, Fan Chung K. Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers: Regulation by interleukin-10. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:1355–60.
- [105] Undevia NS, Dorscheid DR, Marroquin BA, Gugliotta WL, Tse R, White SR. Smad

- and p38-MAPK signaling mediates apoptotic effects of transforming growth factor- β 1 in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2004;287:L515–24.
- [106] Churchman AT, Anwar AA, Li FYL, Sato H, Ishii T, Mann GE, et al. Transforming growth factor- β 1 elicits Nrf2-mediated antioxidant responses in aortic smooth muscle cells. *J Cell Mol Med* 2009;13:2282–92.
- [107] Kobayashi EH, Suzuki T, Funayama R, Nagashima T, Hayashi M, Sekine H, et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* 2016;7:1–14.
- [108] Thiernemann C. Membrane-permeable radical scavengers (tempol) for shock, ischemia-reperfusion injury, and inflammation. *Crit Care Med* 2003;31:S76–84.
- [109] Snyder SH, Bredt DS. Biological Roles of Nitric Oxide. *Sci Am* 1992;266:68–77.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, o tempol protegeu células e tecidos contra a inflamação e estresse redox provocados pela exposição aguda à fumaça de cigarro, provavelmente pela ativação dos sistemas antioxidantes dependentes da via do Nrf2 e por reduzir migração leucocitária *in vivo*. Apesar de preliminar, esses resultados podem contribuir no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para processos fisiopatológicos nos quais espécies redox e inflamatórias estejam envolvidas. Esse fato estimula a continuidade dos estudos com o objetivo de identificar os mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos do tempol sobre a sinalização redox, incluindo a via do Nrf2-Keap1.

Anexo 1



Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
 Autorizada pelo Decreto Estadual nº 7344 de 27.05.98
 Comitê de Ética No Uso de Animais – CEUA / UESB

CERTIFICADO

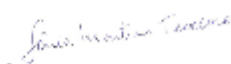
Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos do nitróxido tempol sobre os pulmões de camundongos expostos agudamente à fumaça do cigarro", registrada com o nº 168/2017, sob a responsabilidade de Raphael Ferreira Queiroz, UESB (Departamento de Ciências Naturais – Campus de Vitória da Conquista) - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8/10/2008, do Decreto nº 6.899, de 15/07/2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), em reunião de 15/04/2015.

| | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Finalidade | () Ensino (x) Pesquisa Científica |
| Vigência da autorização | 12/01/2018 a 12/01/2019 |
| Espécie/linhagem/raça | Camundongo isogênico / C57/BL6 |
| Nº de animais | 40 animais |
| Peso/Idade | Não Informado / 02 meses |
| Sexo | Machos |
| Origem | Biotério da UEFS – Bahia. |

Lembramos ao pesquisador que:

- O responsável pela proposta encaminhará à CEUA, ao final do estudo, um relatório de uso de animais. O relatório deverá conter informações básicas acerca da proposta de acordo com o roteiro publicado em conjunto com a RN nº 4 do CONCEA publicado no DOU em 19/04/2012.
- No caso da necessidade da continuidade das propostas usando animais para fins científicos ou didáticos é obrigatório o envio do Relatório à CEUA acrescido da justificativa.
- Para os casos da continuidade de propostas, após a análise do relatório e de esclarecimentos adicionais, se necessário, a CEUA pode deferir, suspender, ou requerer modificação dos mesmos, dentro de suas atribuições.

Itapetinga, 12 de Janeiro de 2018.


Dr.^a Sônia Martins Teodoro
 Coordenadora CEUA/UESB