

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Dissertação

**Efeitos da administração do
cetoprofeno sobre as alterações
cognitivas ocasionadas pela exposição
à fumaça de cigarro livre de tabaco em
ratos Wistar**

Aline Maria dos Santos

Ouro Preto
2020



UFOP

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO CETOPROFENO SOBRE AS ALTERAÇÕES
COGNITIVAS OCASIONADAS PELA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO
LIVRE DE TABACO EM RATOS WISTAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes

Coorientador: Dr. Frank Silva Bezerra

Coorientador: Dr. Deoclécio Chianca Júnior

Ouro Preto, Minas Gerais

Fevereiro de 2020

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S237e Santos, Aline Maria dos.

Efeitos da administração do cetoprofeno sobre as alterações cognitivas ocasionadas pela exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco em ratos Wistar. [manuscrito] / Aline Maria dos Santos. - 2020. 72 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes.

Coorientadores: Prof. Dr. Deoclécio Chianca Júnior, Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Neurobiologia. 2. Cigarros. 3. Memória. 4. Agentes antiinflamatórios. I. Bezerra, Frank Silva. II. Chianca Júnior, Deoclécio. III. Menezes, Rodrigo Cunha Alvim de. IV. Universidade Federal de Ouro Preto. V. Título.

CDU 616.8:613.84



FOLHA DE APROVAÇÃO

Aline Maria Dos Santos

Efeitos da administração do cetoprofeno sobre as alterações cognitivas o assinadas pela exposição à fumaça livre de tabaco em ratos wistar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020

Membros da banca

Doutor Rodrigo Cunha Alvim de Menezes - Orientador- Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor Fabrício de Araújo Moreira - Universidade Federal de Minas Gerais
Doutora Daniela Caldeira Costa - Universidade Federal de Ouro Preto

Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 03/03/2021



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 18/08/2021, às 13:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0208310** e o código CRC **0B806362**.

Este Trabalho foi desenvolvido no **Laboratório de Fisiologia Cardiovascular (LFC)** do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) em parceria com **Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx)**, na vigência de auxílio concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à memória de minha amiga Ana Cristina Lage, que partiu precocemente, mas muito me ensinou no tempo em que estudamos e convivemos juntas. Obrigada Aninha por me despertar essa vontade de aprender cada dia mais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proteger, iluminar meus caminhos e me dar forças para ir atrás dos meus objetivos.

Agradeço imensamente à minha família, à minha mãe Maria Quitéria, a melhor mãe do mundo, por ser um exemplo de mulher forte, guerreira, por sempre me apoiar e acreditar nos meus sonhos, mais que eu mesma, por ser protetora e carinhosa. Ao meu Pai Manoel por me ensinar a ser responsável e comprometida com meus objetivos. À minha irmã Manuele por sempre me apoiar e me ensinar a levar uma vida mais leve. À minha prima Fabricia que é mais irmã do que prima, por estar sempre do meu lado em todos os momentos. Amo todos vocês!

Ao meu esposo Leandro Cândido por sempre me incentivar e me ajudar em todos os momentos dessa caminhada. Por estar ao meu lado e mostrar que sou capaz. Pelo amor dedicado diariamente, pela amizade e pela ajuda. Sem você não teria conseguido!

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Cunha Alvim de Menezes, pelo incentivo e pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho, por acreditar no meu potencial e sempre se mostrar acessível a ajudar.

Ao meu coorientador Dr. Frank Silva Bezerra, pelos acréscimos ao trabalho por me acolher em sua equipe e pelos ensinamentos dispensados sempre que precisei.

Ao meu coorientador Dr. Deoclécio Chianca Júnior pelo incentivo, carinho e atenção dispensados a todos os alunos.

A toda equipe LFC por ter me acolhido com tanto carinho e ter se tornado uma família; pela amizade diária, pelo ombro amigo, nos momentos de tristeza e o companheirismo nas risadas altas e os intermináveis cafés da tarde. Em especial minha madrinha de casamento Máira Tereza Talma Chirico por ser essa pessoa incrível e sempre estar disposta a ajudar, conversar e se fazer presente. Ao meu amigo padrinho de casamento, amigo e dupla de mestrado, Lucas Gabriel Vieira (a melhor dupla!), por

sempre me ajudar com novas ideias e estar do meu lado quando pego atalhos pela UFOP. As amigas Thayane, Mariana, Glenda, Sylvana, Fernanda (professora), Fabiana, Érica, Fernanda, Gabriela, Sabrina e Yasmin. Aos técnicos que muito nos ajudam na execução dos projetos, Sr. Miltinho e Dona Marli.

Ao LAFEx por ser minha segunda equipe, por me acolher tão bem e me ajudar muito nesse trabalho. Agradeço a todos, em especial a Dra. Natália Alves de Matos, pela extrema dedicação e ensinamentos, Thalles de Freitas Castro, pela ajuda diária, Ana Beatriz Farias de Souza por sempre se mostrar solícita a ajudar, e a professora Dra. Silvia Dantas Cangussú pela essencial parceria e ajuda com as análises histológicas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, obrigada pelos importantes ensinamentos compartilhados em cada aula.

À Banca Examinadora pela atenção dispensada na leitura desse trabalho.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (NUPEB) pela concessão de espaço físico, equipamentos e laboratórios.

Ao Centro de Ciência Animal da UFOP.

Aos laboratórios colaboradores, Laboratório de Imunopatologia (LIMP), Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LABIIN).

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFOP, pelo apoio financeiro.

E a TODOS que de alguma maneira me ajudaram, meu MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O tabagismo caracteriza-se como uma das mais importantes causas evitáveis de morte no mundo, sendo assim, o cigarro representa um risco substancial para saúde dos fumantes ativos e passivos. Recentes estudos indicam uma relação direta entre a exposição à fumaça de cigarro e o comprometimento cognitivo. Entretanto, as alterações cognitivas causadas pela exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco ainda não são claras. O objetivo do presente estudo é avaliar as alterações cognitivas, do status redox e inflamatório em ratos Wistar expostos à fumaça de cigarro livre de tabaco e tratados com cetoprofeno. Trinta e dois ratos Wistar machos (protocolo nº 2017/15) foram divididos em quatro grupos: grupo Salina (SLN), salina mais fumaça de cigarro modificada (sem tabaco) (SLN+FCM), Cetoprofeno (CET) e Cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada (CET+FCM). Os animais foram submetidos a testes comportamentais: teste de reconhecimento de novos objetos, paradigma claro/escuro e campo aberto. Os animais foram expostos ao teste de função pulmonar, em seguida foi colhido sangue para análise gasométrica e hemograma. Em seguida, os animais foram eutanasiados e coletado o lavado broncoalveolar (LBA), sangue, pulmão e fígado. O LBA foi usado para contagem total e diferencial de células, o pulmão e fígado foram utilizados para a dosagem de enzimas antioxidantes, TBARS, proteína carbonilada, e análise estereológica do tecido hepático. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 6.0. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão de média e a diferença significativa foi considerada quando o valor de $p < 0,05$. Nossos resultados demonstraram que exposição à fumaça de cigarro modificada promoveu uma perda de memória de curto e longo prazo, e que o tratamento com o cetoprofeno, atuou prevenindo essas alterações. Com relação a função pulmonar encontramos valores reduzidos em relação ao volume corrente nos grupos SLN+FCM e CET. A exposição à fumaça de cigarro modificada foi capaz de promover um aumento nos valores de COHb no grupo SLN+FCM. Com relação aos parâmetros hematológicos, observamos valores mais altos no grupo CET+FCM quando comparados aos demais grupos. Em relação ao esfregaço sanguíneo encontramos um influxo de células inflamatórias nos grupos expostos à fumaça de cigarro modificada. Na contagem diferencial no LBA não encontramos diferença significativa entre os grupos analisados. Observamos aumento da atividade da enzima antioxidante SOD no homogenato do pulmão, no grupo SLN+FCM. Em relação ao homogenato do fígado verificamos que a exposição à fumaça modificada também gerou dano ao fígado com aumento dos níveis de TBARS e proteína carbonilada. Verificamos também, em relação a análise do tecido hepático um aumento do número de núcleos inflamatórios no grupo SLN+FCM. Nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco foi capaz de promover alterações cognitivas, em contrapartida, o tratamento com o cetoprofeno preveniu essas alterações.

Palavras-chave: fumaça de cigarro, memória, comportamento, anti-inflamatório, cetoprofeno.

ABSTRACT

Smoking is characterized as one of the most important preventable causes of death in the world, therefore, smoking represents a substantial risk to the health of active and passive smokers. Recent studies indicate a direct relationship between exposure to cigarette smoke and cognitive impairment. However, the cognitive changes caused by exposure to tobacco-free cigarette smoke are still unclear. The aim of the present study is to assess cognitive, redox and inflammatory changes in wistar rats exposed to tobacco smoke and treated with ketoprofen. Thirty-two male Wistar rats (protocol No. 2017/15) were divided into four groups: Saline group (SLN), saline plus modified cigarette smoke (no tobacco) (SLN + FCM), Ketoprofen (CET) and Ketoprofen plus smoke modified cigarette (CET + FCM). The animals were subjected to behavioral tests: new object recognition test, light / dark paradigm and open field. The animals were exposed to the pulmonary function test, then blood was collected for blood gas analysis and blood count. Then, the animals were euthanized and the bronchoalveolar lavage (BAL), blood, lung and liver were collected. The BAL was used for total and differential cell count, the lung and liver were used for the measurement of antioxidant enzymes, TBARS, carbonylated protein, and stereological analysis of the liver tissue. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism software version 6.0. The data were expressed as mean \pm standard error of mean and the significant difference was considered when the p value <0.05 . Our results demonstrated that exposure to modified cigarette smoke promoted a short and long-term memory loss, and that treatment with ketoprofen acted to prevent these changes. Regarding lung function, we found reduced values in relation to tidal volume in the SLN + FCM and CET groups. Exposure to modified cigarette smoke was able to promote an increase in COHb values in the SLN + FCM group. Regarding hematological parameters, we observed higher values in the CET + FCM group when compared to the other groups. Regarding the blood smear, we found an influx of inflammatory cells in the groups exposed to modified cigarette smoke. In the differential counting in the BAL, we did not find any significant difference between the groups analyzed. We observed an increase in the activity of the antioxidant enzyme SOD in the lung homogenate, in the SLN + FCM group. Regarding the liver homogenate, we found that exposure to modified smoke also caused liver damage with increased levels of TBARS and carbonylated protein. We also noticed, in relation to the analysis of liver tissue, an increase in the number of inflammatory nuclei in the SLN + FCM group. Our results suggest that exposure to tobacco-free cigarette smoke was able to promote cognitive changes, in contrast, treatment with ketoprofen prevented these changes.

Keywords: cigarette smoke, memory, behavior, anti-inflammatory, ketoprofen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do cetoprofeno.....	21
Figura 2. Esquema da Câmara de Inalação	29
Figura 3. Esquema do manuseio dos animais.....	30
Figura 4. Paradigma claro/escuro.....	31
Figura 5. Esquema do Campo aberto.....	32
Figura 6. Representação ilustrativa do esquema de RNO	33
Figura 7. Análise do estresse oxidativo no tecido pulmonar.....	50
Figura 8. Análise do estresse oxidativo fígado	51
Figura 9. Número de núcleos inflamatórios no parênquima hepático.....	52
Figura 10. Teste de reconhecimento de novo objeto de curto prazo	53
Figura 11. Teste de reconhecimento de novo objeto de longo prazo	55
Figura 12. Teste paradigma claro/escuro	56
Figura 13. Teste de atividade locomotora no CA.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva padrão albumina.....	38
Tabela 2. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da SOD.....	39
Tabela 3. Função pulmonar.	43
Tabela 4. Análises gasométricas.	44
Tabela 5. Parâmetros hematológicos.	46
Tabela 6. Contagem total e diferencial de células do sangue.....	47
Tabela 7. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AINE: Anti-inflamatório não esteroides

BHT: Butil hidroxitolueno

BSA: Albumina bovina

CA: Campo aberto

Carb: Carbonilada

CAT: Catalase

CCA: Centro de Ciência Animal

CET: Grupo cetoprofeno

CET+FCM: Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COHb: Carboxihemoglobina

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNPH: 2,4- difenil hidrazina

DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica

FMC: Fumaça de cigarro modificada

FR: Frequência respiratória

ERO: Espécie Reativa de Oxigênio

GPX: Glutathione peroxidase

GSH: Glutathione reduzida

GSSG: Glutathione oxidada

HE: Hematoxilina e Eosina

HCl: Ácido clorídrico

HCO₃-: Bicarbonato

H₂O: Água

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio

IL: Interleucina

LBA: Lavado broncoalveolar

LIMP: Laboratório de Imunopatologia

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H] - 2,5-diferenilterazolio

NUPEB: Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

O₂: Oxigênio

PCE: Paradigma claro/escuro

PCO₂: Pressão parcial de gás carbônico

pH: Potencial hidrogeniônico

pO₂: Pressão parcial de oxigênio

PTN: Proteína

RNO: Teste de reconhecimento de novo objeto

RPM: Rotações por minuto

SLN: Grupo salina

SLN+FCM: Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TCA: Ácido tricloroacético

TNF: Fator de necrose tumoral

UFOP: Universidade Federal de Ouro Preto

VC: Volume corrente

V_{min}: Volume minuto

Vv[a]: Densidade de volume de espaço alveolar

Vv[sa]: Densidade de volume de septo alveolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Cigarro	16
1.1.1 Nicotina	17
1.2 Cetoprofeno	21
1.3 Inflamação, cigarro e estresse oxidativo.....	18
2. JUSTIFICATIVA	16
3. Objetivos	26
3.1 Objetivos geral	26
3.2 Objetivos específicos.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Animais.....	27
4.2 Grupos experimentais	27
4.3 Administração medicamentosa.....	28
4.4 Exposição à fumaça livre de tabaco	28
4.5 Testes comportamentais.....	30
4.5.1 Paradigma claro/escuro	30
4.5.2 Campo aberto.....	31
4.5.3 Reconhecimento de novo objeto.....	32
4.6 Avaliação da função pulmonar.....	33
4.7 Coleta de sangue e eutanásia	34
4.8 Esfregaço sanguíneo.....	35
4.9 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA).....	35
4.10 Processamento do tecido pulmonar e homogeneização.....	36
4.11 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano	38
4.11.1 Proteínas totais	38
4.11.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	39
4.11.3 Atividade da Catalase (CAT)	39
4.11.4 Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	40
4.11.5 Proteína Carbonilada.....	41
4.13 Análises estatísticas.....	42
5. Resultados	43
5.1 Função pulmonar	43

5.2 Análises gasométricas	44
5.3 Parâmetros hematológicos	45
5.4 Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA	48
5.6 Análises bioquímicas do dano e o estresse oxidativo	49
5.7. Testes comportamentais.....	52
5.7.1 Memória de reconhecimento de novos objetos a curto prazo	52
5.7.2 Memória de reconhecimento de novo objeto de longo prazo.....	54
5.7.3 Paradigma Claro/Escuro.....	55
5.7.4 Atividade locomotora no campo aberto	56
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES.....	65
REFERÊNCIAS.....	66
ANEXOS	73
Anexo 1. Certificado de Aprovação do CEUA.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cigarro

De acordo com a Organização Mundial de Saúde o uso do tabaco promove elevadas ameaças à saúde pública, mais de 8 milhões de pessoas morrem por ano, sendo que destes, 1,2 milhão de mortes está diretamente relacionado ao fumo passivo. O óbito devido ao uso do tabaco é considerado uma das mais importantes causas evitáveis de morte no mundo (WHO, 2019).

O cigarro pertence a uma classe especial de produtos de consumo que não trazem benefícios para a comunidade e o usuário, o que apresenta um risco substancial para a saúde dos fumantes ativos e passivos. Estima-se que a mistura da fumaça de cigarro contém mais de 7000 componentes (UNITED STATES. PUBLIC HEALTH SERVICE. OFFICE OF THE SURGEON GENERAL, 2010), atualmente alguns cigarros apresentam a composição de aditivos para tabaco que incluem aromas, intensificadores, umectantes, açúcares e compostos de amônio (PAUMGARTTEN; GOMES-CARNEIRO; OLIVEIRA, 2017).

A principal dependência, ocorre devido a presença de nicotina nos produtos à base de tabaco, fazendo com que os fumantes inalem substâncias tóxicas como o monóxido, amônia, cetonas, formaldeídos, acetaldeído, incluindo substâncias cancerígenas, mutagênicas e causadoras de tumor, sendo as principais o arsênio, níquel, benzopireno, cádmio, chumbo, resíduos de agrotóxicos e substâncias radioativas (INCA, 2019).

A queima do cigarro, leva a formação de uma fumaça, que pode ser dividida em duas fases: a fase gasosa e fase do alcatrão ou particulado. A fase gasosa compreende a fumaça que passa pelo filtro, já a fase particulada compreende todo o material que fica preso quando a corrente de fumaça passa pelo filtro (AMBROSE; BARUA, 2004). Sendo assim, a fumaça liberada no meio ambiente produz dois tipos de fumaça: a principal (10 a 20%) e a lateral (80 a 90%), a principal é gerada diretamente pelo fumante, enquanto a lateral é liberada pelo cigarro quando aceso. Embora por mais que a inalação direta a fumaça de cigarro pareça mais prejudicial, a

fumaça de fluxo lateral, apresenta uma concentração maior de componentes, com maior toxicidade (MELLO, 2005).

Embora alguns fatores de risco ambientais e genéticos também sejam envolvidos na patogênese de doenças pulmonares, estudos diversos consideram o tabagismo como um fator de risco para doenças pulmonares, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), enfisema, asma, câncer, doença cardiovascular, infecções respiratórias, acidente vascular, dentre outras (MUNAKATA; ISHIMORI; KITAMURA; ISHIKAWA *et al.*, 2018; SILVA; OYARZUN; OLLOQUEQUI, 2015).

Gulec e colaboradores em seu estudo demonstraram uma relação direta entre tabagismo crônico e o comprometimento cognitivo através de dados que demonstraram haver uma alta prevalência de tabagismo entre jovens e adultos que apresentam Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade, sugerindo existir uma possível associação entre tabagismo e doenças psiquiátricas. (GULEC; AKARSU; MUTLU SAHIN; ESSIZOGLU *et al.*, 2018).

1.1.1 Nicotina

A nicotina, se caracteriza como uma substância psicoativa primária presente no tabaco é um alcaloide (substância orgânica nitrogenada) que é absorvida pelos pulmões e pele, é metabolizada pelo fígado, rins e também pelos pulmões. Exerce seu efeito ao ligar-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs), expressos por células neuronais e não neuronais (ENGLAND; BUNNELL; PECHACEK; TONG *et al.*, 2015). Está presente nos diferentes tipos de cigarros e em concentrações variadas. Atuando diretamente no sistema colinérgico do sistema nervoso central que por sua vez está associado a função cognitiva, incluindo memória, processamento emocional e atenção seletiva (ENGLAND; BUNNELL; PECHACEK; TONG *et al.*, 2015; YUAN; CROSS; LOUGHLIN; LESLIE, 2015).

Estudos anteriores demonstraram a capacidade de alterações neurocomportamentais e cognitivas, devido a facilidade de dependência da droga (MAJDI; KAMARI; VAFAEE; SADIGH-ETEGHAD, 2017). Considerada uma substância com grande potencial de viciar que desempenha um papel fundamental no início e na manutenção do uso de tabaco, devido a rápida taxa de entrega ao cérebro

após a inalação de um cigarro (10 a 20 segundos), este fato provavelmente contribui para as propriedades gratificantes da nicotina (VALENTINE; SOFUOGLU, 2018).

Quando administrada isoladamente em animais, a nicotina foi capaz de alterar padrões neurocomportamentais nos animais muito semelhantes das alterações encontradas em humanos, como por exemplo, implicações para o aprendizado geral (SICILIANO; MCINTOSH; JONES; FERRIS, 2017). Contudo, alguns estudos procuram avaliar os efeitos da nicotina juntamente com os demais componentes do cigarro, confirmando a influência de ambos em alterações cognitivas (SCHICK; BLOUNT; JACOB; SALIBA *et al.*, 2017).

De acordo com Chirico e colaboradores, através de um trabalho em que os animais foram expostos a fumaça de cigarro com seus ativos e a fumaça de cigarro modificado contendo apenas papel em sua queima foi encontrado significativo resultado, mostrando alterações comportamentais e inflamatórias não somente na exposição do cigarro comum, como também, alterações comportamentais nos animais expostos à fumaça de cigarro de papel livre de tabaco. Reforçando assim, a hipótese de que não somente as substâncias presentes no cigarro, como a nicotina, mas também outros fatores presentes são determinantes para alterações neurocomportamentais (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018).

1.2 Inflamação, cigarro e estresse oxidativo

A fumaça de cigarro, bem como fatores ambientais e agentes patológicos são capazes de ativar mediadores inflamatórios promovendo uma vasodilatação e o aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, o que facilita assim a saída e locomoção de células do sistema imunológico para a área de inflamação, a fim de reduzir e eliminar a causa da lesão. De acordo com o tipo de resposta inflamatória, aguda ou crônica as células de defesa (macrófagos, neutrófilos e linfócitos) são recrutadas (CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013; PARIKH; SHAH; TANDON, 2016; PENA; RAMOS; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016).

O trato respiratório é alvo de frequentes processos inflamatórios devido a exposição contínua aos antígenos e patógenos existentes no meio ambiente. Com isso, existem mecanismos específicos e inespecíficos de defesa que promovem a remoção desses agentes invasores e proteção do sistema respiratório (MISHARIN;

MORALES-NEBREDA; MUTLU; BUDINGER *et al.*, 2013). A primeira proteção que encontramos é a barreira epitelial presente nas vias aéreas, porém, uma vez que o agente agressor consegue ultrapassá-la, o organismo responde estabelecendo um influxo de células para combatê-lo (ADLER; LI, 2001; WONG; MAGUN; WOOD, 2016).

A resposta inflamatória varia de acordo com a quantidade e o tempo de exposição à fumaça de cigarro, bem como a inalação de poluentes. O processo inflamatório se diferencia entre a fase aguda e crônica, na aguda há um influxo predominante de neutrófilos (leucócito polimorfonuclear) para os pulmões. Os neutrófilos são caracterizados por serem as primeiras células de defesa e participam do processo de produção de espécies reativas de oxigênio através da NADPH oxidase e mieloperoxidase durante o processo de fagocitose. (HOENDERDOS; CONDLIFFE, 2013; MEIJER; RIJKERS; VAN OVERVELD, 2013; WONG; MAGUN; WOOD, 2016). Já a inflamação crônica, caracteriza-se por resposta a uma exposição prolongada e persistente a um agente potencialmente tóxico, ocorrendo um influxo migratório de produzem mediadores que podem levar a destruição do tecido e fibrose. Essas células ativadas também podem produzir citocinas, principalmente IL-1 e TNF, que prolongam a resposta inflamatória por recrutarem leucócitos (COTRAN, 2005).

AS EROs são produzidas em células aeróbicas fisiologicamente durante várias reações metabólicas endógenas por meio de um mecanismo conhecido como cadeia respiratória mitocondrial (LUSHCHAK, 2014; LUU; WEN; LI; DAI *et al.*, 2015). O consumo de cigarro promove um aumento da produção endógena de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio das células inflamatórias, principalmente fagócitos (Reddy, 2008). A molécula de oxigênio em condições fisiológicas sofre uma redução tetravalente, com aceitação de 4 elétrons, resultando na formação de água. Durante esse processo são formados intermediários reativos, tais como, os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (CASTELLO; COSTANTINI; SCALA, 2010; JÚNIOR; SOUZA; SANTOS; ANDRADE, 2019; THOMPSON; CHAMBERS; LIU, 2017).

As espécies reativas de oxigênio não são só produzidas por meio da inflamação e exposição a agentes físicos, químicos e ambientais, elas também desempenham um papel importante no processo de homeostase, sinalização celular, proliferação celular e indução de apoptose. Porém, em altas concentrações as espécies reativas de oxigênio produzem modificações adversas nos componentes celulares, como lipídios, proteínas e ácido desoxirribonucleico (DNA) (BIRBEN; SAHINER;

SACKESEN; ERZURUM *et al.*, 2012; LUSHCHAK, 2014; LUU; WEN; LI; DAI *et al.*, 2015).

Esse grau de desequilíbrio varia de acordo com o tempo de exposição à fumaça de cigarro com todos os compostos, a quantidade de cigarros consumidos e o número de tragadas em cada cigarro (CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013; PENA *et al.*, 2016; SILVA BEZERRA *et al.*, 2006; SS; SILVA BEZERRA *et al.*, 2008). O que mostra que os oxidantes presentes no cigarro podem gerar danos nas células e tecidos, prejudicar os mecanismos de defesa do organismo e dar início ao processo inflamatório (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015).

Definido pela primeira vez por Sies em 1985, o estresse oxidativo foi caracterizado como o distúrbio no balanço de pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, levando à danos ao organismo. Lushchak em 2015, propôs uma nova definição, onde o aumento transitório ou persistente do nível de EROs no estado estacionário, perturba as vias de sinalização, conduzindo a modificações oxidativas dos constituintes celulares, que se não contrabalanceadas, podem culminar em morte celular via necrose ou apoptose (SIES, 1985; (LUSHCHAK, 2015).

Frente a esse desequilíbrio, o organismo promove diversas alterações a nível celular com o propósito comum de evitar ou reduzir ao máximo possível o dano e o processo inflamatório causado pela exposição (CASTRO *et al.*, 2004; SILVA BEZERRA *et al.*, 2006; VALENCA; SILVA BEZERRA *et al.*, 2008). O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que pode ser enzimático e não enzimático que tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pelas EROs (CAMPOS *et al.*, 2013).

O sistema enzimático pode ser classificadas em sistema de defesa primário e secundário (BIRBEN; SAHINER; SACKESEN; ERZURUM *et al.*, 2012). As principais enzimas são a glutathiona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Posteriormente, o H₂O₂ pode ser convertido em água (H₂O) e oxigênio (O₂) pela atividade de CAT e GPx, a catalase reduz H₂O₂ em duas moléculas de água e uma de oxigênio, já a glutathiona peroxidase catalisa a reação com oxidação de duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) a glutathiona oxidada (GSSG). O sistema não-enzimático é constituído por substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA; BRESSAN, 2010; BIRBEN; SAHINER; SACKESEN; ERZURUM *et al.*, 2012).

1.3 Cetoprofeno

O cetoprofeno (ácido 3-benzoil- α -metilbenzenoacético) (Figura1) que foi sintetizado em 1963 e lançado como uma droga oral na década de 1970 (KANTOR, 1986). Caracteriza-se como um analgésico, antipirético e um anti-inflamatório não esteroide derivado do ácido propiônico, atua inibindo a atividade da enzima ciclo-oxigenase, diminuindo a síntese de precursores das prostaglandinas e tromboxanos a partir do ácido araquidônico (KAWANO; TAKAHASHI; IWATA; MORIKAWA *et al.*, 2014; SEDA RENÇBER, 2009).

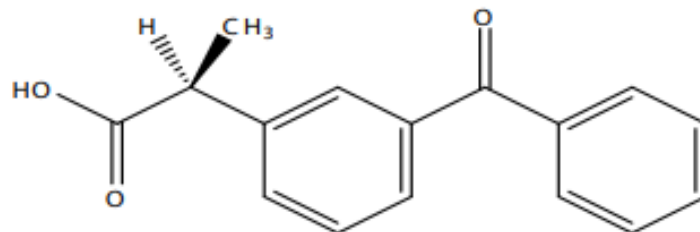


Figura 1. Estrutura química do cetoprofeno. **Fonte:** Adaptado de RENÇBER *et al.*, 2009.

Este fármaco faz parte da família dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), que estão entre os medicamentos mais vendidos no mundo. É considerado um fármaco de escolha no tratamento dos traumatismos musculoesqueléticos, osteoartrite, artrite reumatóide entre outras. Sua administração pode ser por via oral e muscular. Possui rápida absorção, apresenta uma rápida passagem pela barreira hematoencefálica e alta atividade antinociceptiva, sendo que sua biodisponibilidade é proporcional a dose utilizada, com uma meia-vida plasmática de cerca de 2 a 4 horas, atingindo seu pico em níveis plasmáticos em 1-2 horas. Sua metabolização hepática, é derivada de uma alta afinidade de ligações com as proteínas plasmáticas (aproximadamente 99%), quando convertido em seus metabólitos inativos são eliminados através da excreção renal (CHAWLA; RANJAN; KUMAR; SIDDIQUI, 2017; MANENTE; MELLO; KHALIL; CARVALHO *et al.*, 2011).

As propriedades analgésicas dos AINEs podem ter uma origem periférica, porém uma ação central foi demonstrada através de injeções intracerebrais. Como resultado foi possível observar efeitos positivos (antinociceptivos), nas seguintes localizações: região cinza central, núcleo centro-medial do tálamo, núcleo reuniens, parte anterior do núcleo geniculado medial (MGV), núcleo geniculado dorso-lateral (DLG), dorso-medial, núcleos ventro-medial do hipotálamo, região posterior do núcleo do hipotálamo e núcleo vestibular lateral. Os resultados encontrados corroboram com a ideia que cetoprofeno é um AINE capaz de diminuir a sensibilidade à dor tanto por mecanismo central quanto por periférico (DE BEAUREPAIRE; SUAUDEAU; CHAIT; CIMETIERE, 1990).

Devido a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, apresentada por alguns anti-inflamatórios e atuar diretamente no sistema nervoso central, alguns estudos experimentais vem correlacionando os efeitos protetores dos anti-inflamatórios com relação a neuroinflamação, plasticidade sináptica e déficits cognitivos dependentes do hipocampo, através de tratamentos subagudos com anti-inflamatórios, esses estudos foram capazes de mostrar uma ação do fármaco que suprimiu a ativação dos astrócitos e restaurou a plasticidade sináptica e a função de memória em camundongos com idade avançada (ROGERS; LIU; ZHAO; WANG *et al.*, 2017; ZAMINELLI; GRADOWSKI; BASSANI; BARBIERO *et al.*, 2014).

1.4 Memória e cigarro

Estudo recente vem demonstrando essa correlação entre a fumaça ambiental do tabaco, combinada com a fumaça lateral emitida pela extremidade da queima do cigarro e a fumaça principal que é inalada pelo fumante, podendo levar a problemas sistêmicos, como também o comprometimento cognitivo e demência. Embora essa patogênese devido a exposição à fumaça de cigarro ainda não tenha sido completamente compreendida, alguns fatores como estresse oxidativo e inflamação vem sendo correlacionado (YANG; GUO; PANG; CHENG *et al.*, 2019).

O tabagismo também tem sido associado a mudanças psicológicas como hiperatividade, déficit de atenção, agressividade, diminuição do comportamento social, sendo mais susceptível a doenças de saúde mental como depressão, ansiedade e comportamento antissocial. Em estudo utilizando modelos animais,

expostos à fumaça do cigarro eletrônico com aerossóis, com e sem nicotina para investigar alterações comportamentais (memória, ansiedade e hiperatividade), mostrou que a exposição materna a aerossóis de cigarros eletrônicos resultou em alterações epigenéticas e cognitivas na prole sugerindo que o uso de cigarros eletrônicos durante a gravidez pode ter consequências neurológicas até então não detectadas em recém-nascidos (NGUYEN; LI; CHEN; CRANFIELD *et al.*, 2018).

Outra relação importante também ocorre com relação ao tabagismo passivo e o comprometimento cognitivo. Chen e colaboradores demonstraram por meio de uma revisão sistemática que o tabagismo passivo pode ser considerado um importante fator de risco para comprometimento cognitivo em idosos, já que a nicotina atua no sistema colinérgico e o longo prazo de exposição pode levar a uma estimulação exacerbada de neurônios implicados na aprendizagem e na memória (CHEN; HU; ORTON; CHEN *et al.*, 2013).

Nesse contexto, altas concentrações de monóxido de carbono no sangue podem prejudicar o fluxo de oxigênio. Sendo assim evitar essa exposição ao tabagismo passivo poderia ajudar a preservar o declínio cognitivo na idade mais avançada (CHEN; HU; ORTON; CHEN *et al.*, 2013).

1.5 Memória e Inflamação

Os processos inflamatórios promovem, respostas que não se limitam à periferia, ou seja, uma inflamação sistêmica também afeta o sistema nervoso central. Essas condições podem estar diretamente relacionadas ao comprometimento cognitivo, déficits de aprendizado e memória, distúrbios comportamentais e depressão. Apesar de apresentar importante impacto na qualidade de vida, poucos estudos têm investigado os mecanismos centrais subjacentes aos problemas comportamentais decorrentes do estado inflamatório crônico (CHESNOKOVA; PECHNICK; WAWROWSKY, 2016).

A inflamação é caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias na circulação, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e fator de necrose tumoral, que atualmente vem associado ao pior desempenho cognitivo. Vários mecanismos alertam o cérebro para inflamação na periferia. As citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente ativam as vias aferentes primárias, como o nervo vago, e as

citocinas pró-inflamatórias circulantes acessam o cérebro através dos órgãos circumventriculares e sistemas de transporte saturáveis . As citocinas pró-inflamatórias atravessam a barreira hematoencefálica, permitindo a circulação de linfócitos e citocinas ativadas entre o sistema imunológico periférico e o cérebro. Que sugere um mecanismo pelo qual essa mudança no sistema imunológico, atua ativando a função cerebral, promovendo a infiltração de células sanguíneas periféricas no cérebro (CABRERA-PASTOR; LLANSOLA; MONTOLIU; MALAGUARNERA *et al.*, 2019; MORRIS; BERK; WALDER; MAES, 2015).

Um importante conceito com relação a memória é a neurogênese adulta, que ocorre em animais e humanos. Os novos neurônios presentes nas células granulares têm níveis mais altos de excitabilidade e plasticidade. Acredita-se que desempenham um papel importante no aprendizado espacial, formação de memória, flexibilidade cognitiva e a associação entre memórias antigas e nova. Sabe-se que desordens no processo de neurogênese interfere na recuperação da memória espacial e contextual, sendo assim se faz necessária novas investigações mostrando uma ligação entre inflamação aguda e crônica e reduções na neurogênese do hipocampo adulto e comportamentos dependentes do hipocampo (CABRERA-PASTOR; LLANSOLA; MONTOLIU; MALAGUARNERA *et al.*, 2019; JESSBERGER; GAGE, 2014).

Diante do fato que indivíduos fumantes e animais submetidos a protocolos de inalação à fumaça de cigarro apresentam quadros de ansiedade generalizada, ou comportamento do tipo ansiedade no caso dos animais (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018), e alterações no aprendizado e consolidação da memória, hipotetizamos que exista uma interligação do processo inflamatório e alterações cognitivas. Sendo assim nossa hipótese é que as alterações pulmonares, devido a exposição a fumaça livre de tabaco causariam déficits de memória e que o cetoprofeno preveniria tais alterações.

2. JUSTIFICATIVA

O tabagismo é considerado uma das mais importantes causas evitáveis de morte no mundo, representando um risco substancial para fumantes ativos e passivos. A literatura tem demonstrado que sua utilização está relacionada a alterações comportamentais e cognitivas, justificada pelos compostos químicos presentes no cigarro. Em um estudo recente realizado em nosso grupo de pesquisa observamos que a exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco foi capaz de promover alterações comportamentais do tipo ansiedade e pânico nos animais submetidos ao protocolo de exposição. Dessa maneira, o estudo dos efeitos da administração do cetoprofeno sobre as alterações cognitivas ocasionadas pela exposição a fumaça de cigarro livre de tabaco em ratos Wistar torna-se relevante, uma vez que, possibilitará uma melhor compreensão e elucidação dos déficits cognitivos, principalmente alterações de memória.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos geral

Avaliar as alterações cognitivas, do status redox e inflamatório em ratos wistar expostos à fumaça de cigarro livre de tabaco e tratados com cetoprofeno.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a função pulmonar dos grupos experimentais;
- Avaliar o influxo de células infamatórias no sangue e lavado broncoalveolar;
- Avaliar os biomarcadores do estresse oxidativo no homogenato pulmonar e no homogenato do fígado;
- Avaliar as alterações cognitivas nos grupos experimentais;
- Avaliar a prevenção do cetoprofeno nas alterações cognitivas dos grupos expostos à fumaça de papel.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados 32 ratos da linhagem Wistar com idade entre 5 e 7 semanas, massa corporal média 190 ± 10 gramas obtidos do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e posteriormente mantidos no Biotério do Laboratório de Fisiologia Cardiovascular. Os ratos foram acondicionados em caixas de polipropileno, com quatro animais por caixa, mantidos em ambiente com condições adequadas de temperatura, umidade e foram submetidos a condições ambientais de luminosidade controlada (alternando ciclo claro e escuro de 12 horas). Receberam dieta (*ad libitum*), ração comercial Nuvilab® e livre acesso à água. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e aprovados pelo protocolo número 2017/15 (Anexo I).

4.2 Grupos experimentais

No presente estudo os ratos foram divididos de forma randomizada em quatro grupos contendo oito animais cada. Os grupos foram denominados da seguinte forma:

- Grupo Salina (SLN);
- Grupo Salina + Fumaça de Cigarro Modificada “livre de tabaco” (SLN+FCM);
- Grupo Cetoprofeno (CET);
- Grupo Cetoprofeno + Fumaça de Cigarro Modificada “livre de tabaco” (CET+FCM).

4.3 Administração medicamentosa

Antes da primeira exposição à fumaça de papel livre de tabaco os animais receberam por via intramuscular a dose terapêutica de 1mL/kg como recomendado pela bula do medicamento da marca ketoflex com composição (Cetoprofeno 10,00mg e veículo 1,00 ml) ou solução salina de acordo com o grupo pertencente. Em seguida os animais foram expostos à fumaça de cigarro livre de tabaco ou ao ar ambiente.

4.4 Exposição a Fumaça Livre de Tabaco

Os ratos dos grupos SLN+FCM e CET+FCM foram expostos durante um período de oito dias a um total de 12 cigarros livre de tabaco (cigarro de papel) por dia, divididos em três períodos (manhã, tarde e noite). Para composição do cigarro de papel foi utilizado o filtrado Marlboro, onde foi retirado todos os componentes do tabaco (naftalina, metanol, uretano, tolueno, arsênio, formol, fenol, butano, nicotina, polônio, cádmio, dentre outros) e em seu lugar foi adicionado oito folhas de papel de cigarro (folha para cigarro da marca Trevo fabricado especificamente pela Souza Cruz - 76 mm de comprimento e 46 mm de largura) para garantir fumaça suficiente durante a queima. No Marlboro permaneceu apenas o filtro e o papel utilizado na sua composição. Com o objetivo de promover a inalação da fumaça de papel pelos animais, cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60 ml com a qual também foi injetada a fumaça no interior da câmara de inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) dentro de uma capela exaustão.

O procedimento de inalação da fumaça de papel pelo animal ocorreu a partir da insuflação da seringa acoplada ao cigarro aceso e posterior expulsão (desinsuflação) da fumaça no interior da câmara. A queima do cigarro de papel até o seu terço final, restando apenas o filtro, ocorreu quando realizado aproximadamente 30 puffs (insuflação e desinsuflação da seringa). Aproximadamente três minutos foi o tempo gasto para a queima de um cigarro e cada cigarro produziu cerca de um litro de fumaça que foi diluído em 30 litros de ar presentes na câmara. A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% com duração de 6 minutos por cigarro (concentrações de CO que variam de 250 para 350 ppm no interior da câmara). Terminado o período de inalação da fumaça de papel, a tampa da câmara foi retirada

e exposta à exaustão da capela por mais um minuto para liberar toda a fumaça interna (PENA; RAMOS; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016). Terminada a exposição, os animais foram realojados em sua caixa onde permaneceram até o próximo período de exposição. Os animais dos grupos SLN e CET passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, exceto a exposição à fumaça de papel, ou seja, foram expostos e inalaram apenas o ar ambiente (Figura 2).

A padronização da quantidade de folhas de cigarro para a produção da fumaça foi realizada em um estudo anterior realizado no Laboratório de Fisiologia Cardiovascular, onde foram levados em consideração os parâmetros como o peso, a quantidade de puffs produzidos e o tempo necessário para a queima total do cigarro de papel que foi de aproximadamente 3 minutos, tempo próximo a queima de um cigarro comum (Marlboro original) (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018).

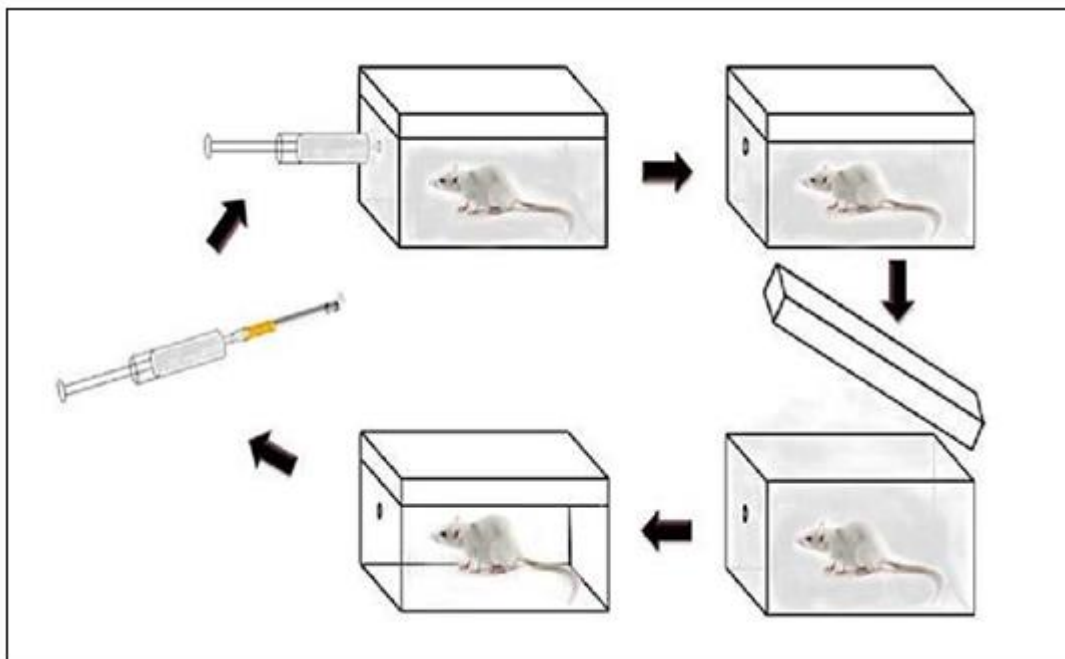


Figura 2. Esquema da Câmara de Inalação. **Fonte:** Adaptado de (CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013).

4.5 Testes comportamentais

Os testes comportamentais foram realizados em uma sala específica com controle de ruído, temperatura e luminosidade. Os animais foram ambientalizados na sala de testes comportamentais por 30 min antes do início da realização dos procedimentos. Todos os animais foram previamente habituados ao experimentador por 5 minutos no dia anterior ao início dos procedimentos experimentais (Figura 3). É necessário habituar o animal ao experimentador para que o contato durante o teste não interfira na resposta comportamental expressada pelo animal, o que poderia alterar os resultados. Após a finalização de cada teste comportamental e a cada troca de animal, os aparatos foram limpos com álcool 20% a fim de eliminar os estímulos olfatórios.

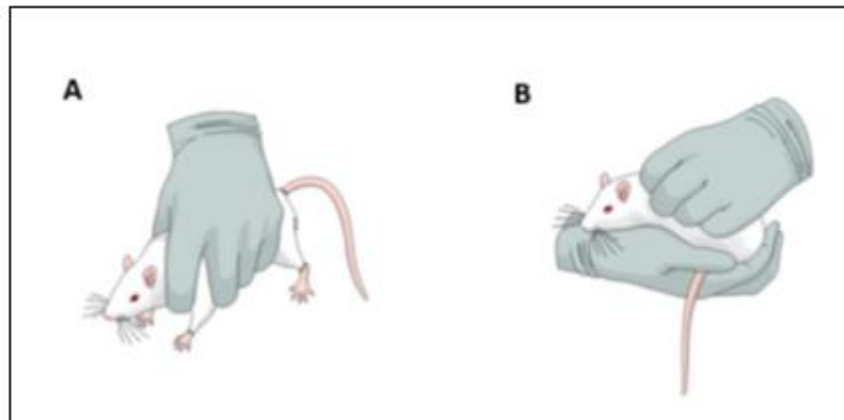


Figura 3. Esquema do manuseio dos animais durante o período de habituação ao experimentador. A) demonstra a forma correta como o animal deve ser segurado para que o mesmo não morda ou escape do experimentador durante a habituação e também durante a condução dos testes; B) ilustra a forma segura como o animal deve ser acalmado para que o mesmo não entenda a manipulação como um risco. **Fonte:** Figura extraída da plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.5.1 Paradigma claro/escuro

O teste do paradigma claro/escuro (PCE) é realizado através de um aparato composto por dois compartimentos de acrílico, um feito com material transparente (claro) e outro feito com material preto e opaco (escuro). Os dois compartimentos são conectados por uma abertura de 11 cm, permitindo que os animais transitem de um lado para outro da caixa (Figura 4). O teste foi iniciado quando o animal foi colocado

no compartimento claro e os animais tiveram 300s para explorar todo o ambiente. O número de vezes que o animal atravessou de um compartimento ao outro e o tempo que permaneceu em cada um deles foi registrado, sendo a menor exploração na parte clara do aparato associada ao comportamento do tipo ansiedade. O teste baseia-se no comportamento inato de aversão dos roedores a áreas iluminadas, e no conflito natural decorrente da exposição a um ambiente não-familiar (BOURIN; HASCOET, 2003).

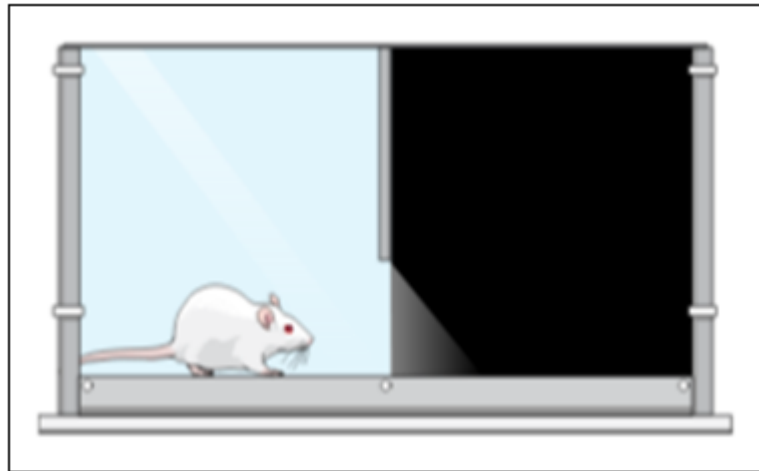


Figura 4. Paradigma claro/escuro. **Fonte:** Figura extraída da plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.5.2 Campo aberto

O campo aberto (CA) é um aparato que tem como finalidade avaliar atividade locomotora espontânea e exploração do ambiente, como de respostas associadas à ansiedade, devido ao medo natural dos roedores de espaços abertos e com dimensões maiores que o ambiente ao qual estão familiarizados, onde o animal encontra-se em uma situação nova, isolado do seu grupo. Assim, nesta etapa utilizamos uma arena quadrada de acrílico medindo 60 x 60 x 40 cm com paredes perpendiculares e a base subdividida em 16 quadrantes (Figura 5). No teste, o animal foi colocado com cuidado no centro da arena e seu tempo de exploração ao ambiente foi cronometrado, totalizando 5 minutos, em apenas uma única exposição. Os quadrantes percorridos pelo animal nesse intervalo de tempo foram quantificados e

anotados para avaliar locomoção do animal. Este aparato fica localizado em uma sala isolada, silenciosa, iluminada com luz adequada para realização de testes comportamentais. Ao final dos testes com cada animal o aparato foi higienizado com álcool 20 % afim de evitar qualquer viés pelo cheiro de outro animal (HOLTER; EINICKE; SPERLING; ZIMPRICH *et al.*, 2015; ROGERS; LIU; ZHAO; WANG *et al.*, 2017; ZANGROSSI; GRAEFF, 2014).

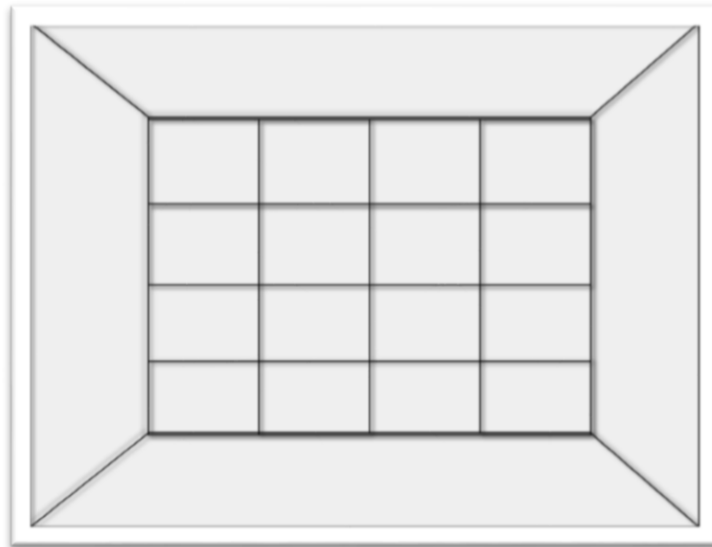


Figura 5. Esquema do Campo aberto. **Fonte:** Figura extraída da plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.5.3 Reconhecimento de novo objeto

O teste de reconhecimento de novo objeto (RNO) é um teste que avalia a memória dependente do hipocampo não espacial (PEREIRA; GUIMARAES; OLIVEIRA; BASTOS *et al.*, 2018). Esse teste baseia-se no comportamento inato dos roedores explorarem novos contextos e novos ambientes, nesse sentido quando o animal explora preferencialmente um objeto em relação a outro objeto conhecido indica que o animal apresentou uma memória de reconhecimento (ENNACEUR; CAVOY; COSTA; DELACOUR, 1989).

O protocolo utilizado neste trabalho consistiu em três fases: habituação, treino e testes (memória de curta e longa duração) (Figura 6) todas as etapas foram realizadas na mesma arena em que o teste de CA foi conduzido. Na fase de habituação os animais foram expostos na arena vazia para livre exploração por 20

min, após todos os animais passarem pela fase de habituação, foi realizada a fase de treino onde os animais foram recolocados na arena e reabilitados por 1 minuto, passado esse período, foram colocados dois objetos idênticos onde os animais tiveram 10 minutos para investigar os objetos. Uma hora após a fase do treino, foi realizada a fase de escolha onde um dos objetos foi substituído por um objeto novo, e o animal teve um período de 10 minutos para explorar, nesse teste avaliamos a memória de curto duração. No dia seguinte, vinte quatro horas após realizado o teste de memória de curta duração os animais foram novamente expostos ao teste, com um objeto familiar, já conhecido desde a fase de treino e um outro objeto novo, o animal também teve um período de 10 minutos para explorar os objetos, nessa fase de escolha o objetivo foi avaliar a memória de longa duração (PEREIRA; GUIMARAES; OLIVEIRA; BASTOS *et al.*, 2018).

Consideramos como comportamento exploratório quando o animal tocava o objeto com as patas, vibrissas ou focinho. O tempo de exploração de cada objeto durante as fases treino e teste foram registrados e o resultado do teste de RNO foi obtido através da seguinte fórmula: Tempo de exploração do objeto novo/ Tempo total de exploração dos dois objetos. Valores acima de 0,5 indicam a preferência pelo novo objeto (CAPETTINI; MORAES; PRADO; PRADO *et al.*, 2011; PEREIRA; GUIMARAES; OLIVEIRA; BASTOS *et al.*, 2018). Ao final de cada teste, com cada animal o aparato foi higienizado com álcool 20 % afim de evitar qualquer viés pelo cheiro de outro animal.

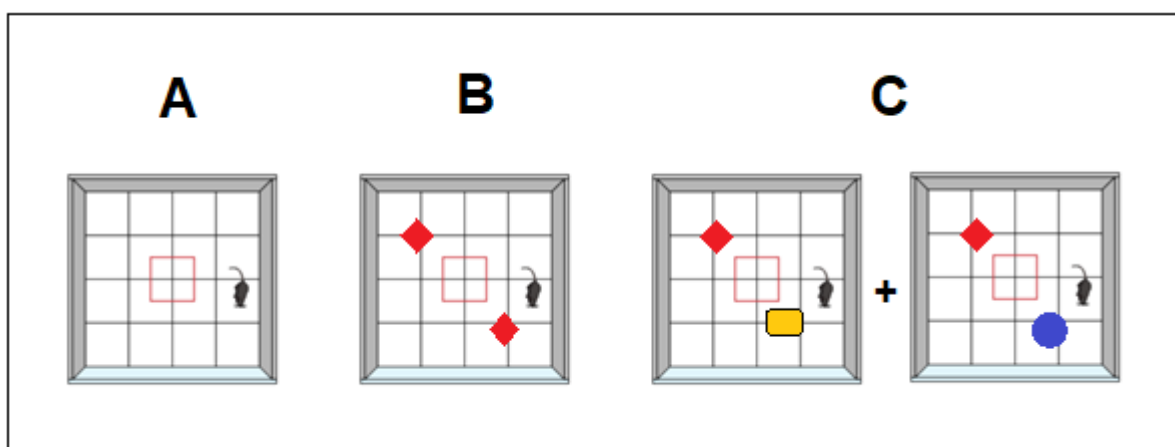


Figura 6. Representação ilustrativa do esquema de reconhecimento de novo objeto. (A) período de habituação; (B) período de treino; (C) corresponde aos testes de memória de curta e longa duração. **Fonte:** Figura extraída e adaptada da plataforma *Mind the Graph* (www.mindthegraph.com).

4.6 Avaliação da função pulmonar

Após realizado os testes de RNO os animais foram previamente ambientalizados a uma caixa hermeticamente fechada para adaptação prévia por 15 minutos. No dia seguinte os animais foram colocados individualmente nesta caixa e permaneceram cerca de 8 minutos para registro dos parâmetros ventilatórios (frequência respiratória, volume corrente e volume minuto) por meio de pletismografia de corpo total, sendo expostos a ar medicinal (21% O₂ + 79% N₂ nominal; Medipure™ Medical Gases WHITE MARTINS) com um fluxo de (1 L/min) por meio de um tubo conectado ao sistema. Para o registro, o fluxo de gases respiratórios foi detectado pelo espirômetro de mesa (AdInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) e o sinal amplificado e analisado pelo software PowerLab.

4.7 Coleta de sangue e eutanásia

Após 24 horas da última exposição à fumaça livre de tabaco, os animais foram sedados com anestésicos (0,1mL por 100g de peso animal da combinação ketamina e xilazina, sendo 10 mL de ketamina 10% (p/v) para 2,5 mL de xilazina 2,5% (p/v)). Em seguida foi realizado a punção cardíaca entre o segundo e o terceiro espaço intercostal. De cada animal foi coletado uma alíquota de sangue arterial, que foi imediatamente analisada no gasômetro (Nova Biomedical, Waltham, Massa, EUA) para avaliar a quantidade de gases sanguíneos, em seguida os animais receberam uma sobre dose de sedativos, onde o tórax de cada animal foi aberto, pela dissecação anatômica, e realizada mais uma punção cardíaca que foi colhido a outra alíquota sanguínea de 200 µL foi colocada em um tubo de polipropileno contendo 15 µL de heparina e encaminhada ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) - UFOP para a realização do Hemograma e Leucograma.

4.8 Esfregaço sanguíneo

O esfregaço sanguíneo, foi realizado com a utilização de uma gota de sangue (2 μ L) obtida também no momento da punção cardíaca. Esta gota de sangue foi adicionada na extremidade de uma lâmina histológica, devidamente esterilizada. Outra lâmina posicionada a 45° dessa foi utilizada para realizar o movimento de deslizamento e deposição uniforme desse sangue em torno de toda a lâmina. Para garantir melhor observação microscópica dos diferentes tipos celulares presentes, o esfregaço sanguíneo deve ter como característica uma camada fina e uniforme de sangue em torno de toda lâmina. Após realização do esfregaço, as lâminas histológicas devidamente identificadas foram deixadas em repouso para total secagem e fixação do sangue, e então coradas com o kit Panóptico Rápido. O protocolo desse kit recomenda 5 banhos de imersão, na ordem indicada, em cada uma das três soluções: metanol, eosina e azul de metileno. Após imersão nas soluções desse kit, as lâminas foram mergulhadas em água corrente para a retirada do excesso dos corantes e deixadas em repouso para secarem em temperatura ambiente. A contagem total ficou estabelecida em 100 leucócitos por lâmina, diferenciando: monócitos, linfócitos e neutrófilos, através da morfologia do núcleo e do citoplasma, da coloração, e observação de grânulos citoplasmáticos (PENA; RAMOS; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016).

4.9 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após a eutanásia, foi realizada a coleta do LBA já com o tórax aberto o pulmão esquerdo foi clampeado, a traqueia canulada e o pulmão direito foi lavado com 3 mL de solução salina gelada (2 x 1500 μ L). As amostras foram mantidas em gelo até o final do procedimento a fim de evitar lise celular. Para a contagem total de leucócitos no LBA o material coletado foi centrifugado em Centrífuga Refrigerada (Eppendorf 5415R; Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) durante 10 minutos com 3000 RPM a 4°C, após a centrifugação foi retirado o sobrenadante e armazenado em freezer – 80°C, o *pellet* que contém os leucócitos foi ressuspenso com 100 μ L de solução salina gelada. Para corar as células foi utilizada a solução de Turk (RenyLab, Minas Gerais, BR), para isso, 180 μ L de solução Turk foi adicionado em um eppendorf

juntamente de 20 μ L da solução ressuspensa e agitado, logo em seguida, a contagem total de leucócitos foi realizada na câmara de Neubauer. Os leucócitos foram contados nos quatro quadrantes encontrados na câmara e tirada a média simples (DE SOUZA; CHIRICO; CARTELLE; DE PAULA COSTA *et al.*, 2018; MATOS; SILVA; DAMASCENO; CASSALI *et al.*, 2014).

Para a contagem diferencial de células no LBA 40 μ L das amostras foram centrifugadas em uma Cito-centrífuga (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR) na qual foram colocadas lâminas, e ajustada a rotação em 1.000 RPM durante 1 minuto. Após a obtenção das lâminas, essas foram coradas com o *Kit Rápido de Corantes para uso Hematológico* (RenyLab, Minas Gerais, BR), através de banhos de imersão de 40 segundos em cada uma das três soluções distintas. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corantes e secadas em temperatura ambiente. Após secagem foram contadas 100 células por lâmina e diferenciadas em: macrófagos, linfócitos e neutrófilos em microscópio óptico com óleo de imersão com aumento de 100x (DE SOUZA; CHIRICO; CARTELLE; DE PAULA COSTA *et al.*, 2018).

4.10 Processamento do tecido pulmonar e homogeneização

Posteriormente a coleta do LBA, foi realizada uma pequena incisão no ventrículo esquerdo e com uma agulha o ventrículo direito foi perfundido com soro fisiológico para remover o sangue residual do pulmão. O pulmão direito foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traqueia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH₂O por 2 min. O pulmão esquerdo então foi removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, as amostras foram colocadas em cassetes histológicos e processadas da seguinte forma: banho em álcool 70% e 90% por 30 minutos em cada, seguido de dois banhos de álcool absoluto por 30 minutos, dois banhos de xilol por 30 minutos, dois banhos de parafina por 30 minutos e inclusão em parafina histológica. Após o processamento histológico e a inclusão em parafina foram feitos cortes seriados com 4 micrômetros de espessura. Posteriormente, esse material foi corado com hematoxilina e eosina (HE) para ser realizada a análise estereológicas (PENA; RAMOS; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016).

O pulmão direito foi removido e retiradas quatro alíquotas para as análises bioquímicas, o restante do tecido pulmonar foi armazenado em tubos devidamente etiquetados para serem acomodados no freezer (-80°C). Depois, as alíquotas foram homogeneizadas (Homogeneizador Nova Técnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 mL de tampão fosfato de potássio e centrifugado a 13000 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e as amostras foram novamente armazenadas no freezer (-80°C) para posteriores análises bioquímicas (DE SOUZA; CHIRICO; CARTELLE; DE PAULA COSTA *et al.*, 2018).

4.11 Análise do tecido hepático

As análises do tecido hepático foram realizadas morfológicamente e morfometricamente de maneira semiquantitativa em microscopia óptica no aumento de 400x. Foram obtidas 20 imagens por animal através do microscópio LEICA DM5000B acoplado a câmera digital da LEICA DFC 300FX por intermédio do Software Leica Applications, capturadas com resolução de 720 X 480 pixels e transferidas por meio de vídeo-câmera digital colorida JVC. Após obtenção das imagens avaliamos, de maneira semiquantitativa, a presença e o tipo de fenômenos degenerativos, tais como, esteatose, inflamação, congestão sinusoidal, hiperemia, infiltrado inflamatório, hemorragia, necrose e fibrose.

Utilizamos a ferramenta na plataforma de morfometria/análise de imagem para obtenção de dados de inflamação, onde foi realizada a contagem de núcleos inflamatórios através do programa ImageJ/Fiji 1.46r (desenvolvido por Wayne Rasband do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland), com código-fonte livre, para contagem dos núcleos celulares.

4.12 Biomarcadores de estresse oxidativo e dano no pulmão e fígado

4.12.1 Proteínas totais

Nas amostras do homogeneizado tecidual foi realizada a dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976). O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga as proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm. Para essa análise uma curva padrão foi reproduzida por meio de concentrações crescentes da proteína albumina, para isso, 0,01g de albumina foi dissolvida em 1000 μ L de água Mili-Q. A partir dessa solução inicial, foi utilizado 200 μ L adicionado em 3,8 mL de água Mili-Q, obtendo-se um total de 4 mL de solução na concentração de 0,5 mg/mL (BRADFORD, 1976). Os pontos da curva variam de 0,5 mg/mL até 0,05 mg/mL, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Curva padrão albumina.

Diluição de albumina	Albumina 0,01 g/mL	Água Mili-Q
0,5 mg/mL	1000 μ L	--
0,4 mg/mL	800 μ L	200 μ L
0,3 mg/mL	600 μ L	400 μ L
0,2 mg/mL	400 μ L	600 μ L
0,1 mg/mL	200 μ L	800 μ L
0,05 mg/mL	100 μ L	900 μ L

A solução de Coomassie azul foi realizada a diluição em água Mili-Q na concentração de 4:1 (água Mili-Q: Solução Coomassie azul). Feito a curva padrão e a diluição da curva, em seguida foram adicionados em cada poço correspondente 2 μ L de amostra do homogenato pulmonar diluído em 8 μ L de água Mili-Q. Posteriormente, 190 μ L de Solução Coomassie azul diluída foi pipetada em todos os poços da placa. A placa então foi incubada em temperatura ambiente por 30 min e a leitura realizada em espectrofotômetro de placas a 595 nm (CAMPOS; DE OLIVEIRA RAMOS; MARTINS; COSTA *et al.*, 2019).

4.12.2 Atividade da Superóxido dismutase (SOD)

De acordo com o método descrito por Marklund (1974) na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Foi mensurado a atividade da enzima antioxidante nas amostras. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol, MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]- 2,5-difenilterazolio) e Dimetilsulfóxido (DMSO). Para a realização da dosagem, foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido em 5.9. O sobrenadante foi pipetado em placa de 96 poços seguido a adição dos reagentes como descrito na Tabela 2 (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

Tabela 2. Reagentes utilizados para mensurar a atividade da Superóxido Dismutase.

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

As amostras foram incubadas por 5 minutos em estufa a 37°C. Logo após, 150 μL de DMSO foram adicionados às mesmas para parar a reação. As absorbâncias foram lidas no leitor de Elisa em um comprimento de onda de 570 nm. Considerando que uma unidade de SOD (U) é responsável pela oxidação de 50% do pirogalol, e que a absorbância da amostra obtida em unidades de SOD, é convertida a absorbância da amostra obtida em unidades de SOD. Para cálculo da atividade de SOD, foi subtraído o resultado obtido da amostra pelo valor encontrado do branco e, a seguir, foi dividido esse valor pelo encontrado da subtração do padrão pelo branco (CAMPOS; DE OLIVEIRA RAMOS; MARTINS; COSTA *et al.*, 2019).

4.12.3 Atividade da Catalase (CAT)

A atividade de Catalase (CAT) foi avaliada de acordo com o método descrito por Aebi (1984) A atividade da enzima catalase (representada por U/mg de proteína)

foi avaliada através de um método de cinética enzimática, a partir do decréscimo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a uma absorvância de 240 nm. O método se baseia na decomposição enzimática do H_2O_2 em um intervalo de 60 segundos por espectrofotometria. Para a realização da análise foi utilizada uma alíquota do sobrenadante obtido em 5.9 como amostra biológica. Inicialmente foram utilizados os seguintes reagentes para o preparo do tampão fosfato: cloreto de sódio (NaCl), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), os sais foram diluídos em água destilada e mantidos na geladeira. No momento do ensaio foi utilizado 25 mL de tampão, que foram misturados com 40 μL de peróxido de hidrogênio. Depois do preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliquotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 μL e 30 μL , respectivamente) e registrados a 240 nm durante 60 segundos, com anotação a cada 10 segundos. A atividade da catalase foi definida pela diminuição da absorvância a 240 nm, de acordo com a Lei de Lambert Beer, onde 1 U equivale a 1 μmol de hidrólise de H_2O_2 por minuto, por mL (DE SOUZA; CHIRICO; CARTELLE; DE PAULA COSTA *et al.*, 2018; MACHADO; CAMPOS; DA SILVA; DE OLIVEIRA RAMOS *et al.*, 2018; PENA; RAMOS; SOARES; DA SILVA *et al.*, 2016).

4.12.4 Dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O método de análise de ensaio de substâncias reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi utilizado como índice de dano oxidativo, determinando a peroxidação lipídica de acordo com método descrito por Buege (1978). O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com lipídios oxidados, e gera malondialdeído. Para a realização da análise foram utilizados 500 μL do homogenato tecidual (obtido em 5.9). Posteriormente, 250 μL de solução de ácido tricloroacético (TCA 28% p/v dissolvido em ácido clorídrico), 250 μL de TBA 1% dissolvido em ácido acético e 125 μL de butilhidroxitolueno (BHT) 5 mM dissolvido em etanol foram adicionados. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a 95°C por 15 minutos. Após serem resfriadas em banho de gelo por 5 minutos, o material foi centrifugado por 10 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 535 nm. A concentração de TBARS foi determinada utilizando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$).

1), seguindo a lei de *Lambert Beer*. O resultado foi representado em nmols/mL (CAMPOS; DE OLIVEIRA RAMOS; MARTINS; COSTA *et al.*, 2019).

4.12.5 Proteína Carbonilada

A oxidação de proteínas geradas a partir da formação de derivados carbonílicos pelas espécies reativas de oxigênio. Podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O DNPH reage com grupos carbonílicos e gera a hidrazona correspondente, a qual foi analisada espectrofotometricamente. Para a análise da proteína carbonilada foi utilizado um protocolo adaptado do método descrito por Reznick e Packer (1994). Para tal foram utilizados 500 μ L do homogeneizado pulmonar que foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados 500 μ L de TCA, misturou-se no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 500 μ L de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por sessenta minutos e a cada 15 minutos eram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 μ L de TCA e as amostras eram novamente centrifugadas por 3 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (SDS) 6% misturou-se no vórtex e centrifugou-se à 10000 rpm por 3 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm (ANDRADE; SOUZA; HORTA; PAULA COSTA *et al.*, 2018). A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de *Lambert Beer* descrita abaixo:

- Abs = Absorbância
- ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de 22000 M.L⁻¹ cm⁻¹;
- VA = volume da amostra;
- C = concentração de proteína carbonilada na amostra (nmol/mL).

Para a determinação da concentração de proteína carbonilada em relação à concentração de proteínas totais utilizou-se o valor encontrado na análise de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

$$\text{Equação: } \frac{\text{Proteína carbonilada da amostra (nmol/mL)}}{\text{Proteína total da amostra (mg/mL)}}$$

4.13 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism versão 6.0 (San Diego, CA, EUA). A distribuição paramétrica dos dados foi avaliada utilizando o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição paramétrica foram expressos em média e erro padrão da média, os dados não paramétricos foram expressos em mediana, valor máximo e valor mínimo. Para comparação entre os grupos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de dupla classificação (Two-way ANOVA) seguido pelo pós-teste de Fisher's. As diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Função pulmonar

Para avaliar a função pulmonar dos animais estudados, foi realizada a pletismografia de corpo total, os resultados encontrados podem ser observados na tabela 3. Observamos que não houve diferença significativa na frequência respiratória em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 26)} = 1,989$, $p=0,1703$] em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 26)} = 0,2633$, $p= 0,6122$] e em relação ao tratamento [$F_{(1, 26)} = 0,7627$, $p= 0,3905$]. Em relação ao volume corrente (VC) houve diferença significativa na interação entre a exposição à fumaça de cigarro modificada e o tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 26)} = 7,253$, $p= 0,0122$] contudo não foi observado diferença significativa em relação ao tratamento [$F_{(1, 26)} = 0,4218$, $p= 0,5218$] e em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 26)} = 0,2905$, $p=0,5945$]. Em relação ao volume minuto (V_{\min}), observamos que não houve diferença significativa em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 26)} = 1,576$, $p= 0,2205$] em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 26)} = 0,001127$, $p= 0,9735$] e em relação ao tratamento [$F_{(1, 26)} = 1,916$, $p= 0,1781$].

Tabela 3. Função pulmonar.

Grupo	SLN	SLN+FCM	CET	CET + FCM
FR (irpm)	95,38 ± 7,28	100,9 ± 5,54	98,6 ± 7,12	86,88 ± 4,24
VC (mL)	1,70 ± 0,15	1,09 ± 0,17 ^a	1,07 ± 0,22 ^a	1,48 ± 0,20
V_{\min} (mL/min)	105,6 ± 12,21	88,58 ± 14,37	68,82 ± 12,51	86,79 ± 15,06

SLN – Grupo salina; SLN+FCM – Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada; CET – Grupo cetoprofeno; CET+FCM – Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada. FR: frequência respiratória; VC: volume corrente; V_{\min} : volume minuto. (a) representa diferença significativa quando comparado ao SLN. Os dados paramétricos

estão expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.2 Análises gasométricas

Por meio das análises dos gases sanguíneos arteriais foi avaliada a condição fisiológica dos animais estudados, os resultados podem ser observados na Tabela 4. Em relação ao pH não observamos diferença significativa em relação a interação entre exposição à fumaça e ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 26)} = 0,2291$, $p= 0,6362$] não houve diferença significativa com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 26)} = 0,6769$, $p= 0,4181$] e nem em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 26)} = 1,097$, $p= 0,4181$]. Com relação a PCO₂ não foi encontrada diferença significativa em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 27)} = 0,7034$, $p= 0,4090$] nem em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 2,468$, $p= 0,1278$] e nem em relação ao tratamento [$F_{(1, 27)} = 1,521$, $p= 0,2281$]. Com relação ao HCO₃ não foram observadas diferenças significativas em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 26)} = 0,6165$, $p= 0,4395$] em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 26)} = 2,916$, $p= 0,0996$] e em relação ao tratamento [$F_{(1, 26)} = 0,7361$, $p= 0,3988$]. Com relação ao COHb observamos que houve uma diferença significativa entre os grupos CET + FCM comparado ao grupo SLN + FCM em relação a interação entre as variáveis estudadas [$F_{(1, 24)} = 6,738$, $p= 0,0159$] porém não foram observadas diferenças significativa em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 24)} = 0,4522$, $p= 0,05077$] e em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 24)} = 0,02662$, $p= 0,8718$].

Tabela 4. Análises gasométricas.

Grupo	SLN	SLN+FCM	CET	CET+FCM
pH	7,39 \pm 0,02	7,42 \pm 0,03	7,37 \pm 0,01	7,38 \pm 0,01
PCO₂ (mmHg)	38,85 \pm 2,14	36,22 \pm 3,21	39,83 \pm 2,50	38,01 \pm 1,80
HCO₃ (mEq/L)	23,97 \pm 0,63	21,53 \pm 0,90	24,04 \pm 1,65	23,14 \pm 0,39
COHb (%)	0,51 \pm 0,05	0,84 \pm 0,26	0,77 \pm 0,17	0,40 \pm 0,02 ^b

SLN – Grupo salina; SLN+FCM – Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada; CET – Grupo cetoprofeno; CET+FCM – Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN+FCM. Os dados paramétricos estão expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.3 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos dos grupos experimentais foram obtidos e quantificados através dos valores de hemoglobina, hemácias, hematócrito, plaquetas e leucócitos. Conforme representado na Tabela 5, em relação a hemoglobina, foi observado diferença significativa no grupo CET+FCM em relação aos demais grupos, com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 9,209$, $p = 0,0053$] e tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 27)} = 5,767$, $p = 0,0235$] entretanto não houve diferença significativa com relação a interação entre exposição à fumaça e o tratamento [$F_{(1,27)} = 2,384$, $p = 0,1342$]. Com relação aos eritrócitos, encontramos diferença significativa no grupo CET+FCM quando comparados aos demais grupos com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 17,31$, $p = 0,0003$] e não foram observadas diferenças significativas em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1,27)} = 2,244$, $p = 0,1458$] e em relação ao tratamento [$F_{(1,27)} = 3,541$, $p = 0,0707$]. Em relação ao hematócrito observamos diferença significativa no grupo CET+FCM quando comparado aos demais grupos em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 9,672$, $p = 0,0044$] em relação a interação entre as variáveis não encontramos diferença significativa [$F_{(1, 27)} = 3,883$, $p = 0,0591$] também não encontramos diferença significativa em relação ao tratamento [$F_{(1, 27)} = 3,368$, $p = 0,0775$]. Já em relação aos valores de plaquetas, não foram encontradas diferenças significativas em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 0,5560$, $p = 0,4621$] em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 0,04793$, $p = 0,8283$] e em relação ao tratamento [$F_{(1, 28)} = 0,1051$, $p = 0,7481$]. Por último com relação aos leucócitos houve diferença significativa entre o grupo CET+FCM quando comparado aos grupos SLN e SLN+FCM em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 8,886$, $p = 0,0059$] porém não houve diferença significativa em relação a interação

entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 0,03949$, $p = 0,8439$] e nem com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 1,935$, $p = 0,1751$].

Tabela 5. Parâmetros hematológicos.

Grupo	SLN	SLN+FCM	CET	CET + FCM
Hemoglobina (g/dL)	14,85 ± 0,47	15,87 ± 0,14	15,44 ± 1,13	18,58 ± 0,47 ^{a, b, c}
Eritrócitos (g/dL)	6,66 ± 0,23	7,60 ± 0,10	6,80 ± 0,58	8,79 ± 0,23 ^{a, b, c}
Hematócrito (%)	41,21 ± 1,24	43,53 ± 0,83	40,94 ± 3,27	51,26 ± 1,60 ^{a, b, c}
Plaquetas (X10⁹/L)	343,8 ± 45,70	323,8 ± 32,44	303,1 ± 48,31	339,8 ± 17,11
Leucócitos (X10⁹/L)	4,01 ± 0,65	4,65 ± 0,37	5,50 ± 0,61	6,35 ± 0,44 ^{a, b}

SLN – Grupo salina; SLN+FCM – Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada; CET – Grupo cetoprofeno; CET+FCM – Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN e (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN+FCM e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.4 Contagem total e diferencial de células do sangue

Foram realizadas avaliações no sangue periférico dos grupos experimentais para a determinação de parâmetros inflamatórios sistêmicos conforme descrito na Tabela 6. Com relação a contagem de leucócitos, encontramos diferença no grupo CET+FCM, quando comparado ao grupo SLN em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 17)} = 7,668$, $p = 0,0131$], não foi encontrada diferença significativa com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 17)} = 0,005787$, $P = 0,9402$], como também com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 17)} = 7,668$, $P = 0,0131$]. Em relação

a quantidade de monócitos encontramos diferença significativa no grupo CET quando comparado aos grupos SLN e SLN+FCM e CET+FCM em relação ao tratamento com o cetoprofeno [$F_{(1, 22)} = 29,29, p < 0,0001$] não encontrando diferença significativa com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 22)} = 0,2158, p = 0,6469$], e com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 22)} = 0,9332, p = 0,3445$]. Com relação a contagem de neutrófilos encontramos diferença significativa do grupo SLN+FCM quando comparado aos grupos SLN e CET em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 13,23, p = 0,0011$], não foi observada diferença significativa da interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 1,798, p = 0,1908$], e em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 0,5508, p = 0,4642$]. Finalmente com relação aos linfócitos observamos diferença significativa entre o grupo SLN+FCM quando comparado ao grupo SLN em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 5,991, p = 0,0209$] e não foi encontrada diferença significativa com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 2,624, p = 0,1165$] bem como com relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 0,03061, p = 0,8624$].

Tabela 6. Contagem total e diferencial de células do sangue

Grupo	SLN	SLN+FCM	CET	CET + FCM
Leucócitos (x 10⁵/mL)	4,01 ± 0,65	4,65 ± 0,37	5,50 ± 0,61	6,10 ± 0,59 ^a
Monócitos (x 10⁵/mL)	1,68 ± 0,35	1,83 ± 0,18	3,11 ± 0,32 ^{a, b}	3,52 ± 0,17 ^{a, b}
Neutrófilos (x 10⁵/mL)	0,16 ± 0,04	0,41 ± 0,04 ^a	0,19 ± 0,05 ^b	0,31 ± 0,05
Linfócitos (x 10⁵/mL)	1,48 ± 0,25	2,70 ± 0,21 ^a	2,17 ± 0,35	1,92 ± 0,34

SLN – Grupo salina; SLN+FCM – Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada; CET – Grupo cetoprofeno; CET+FCM – Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN, (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN+FCM. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.5 Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA

A presença de células inflamatórias nas vias aéreas nos grupos experimentais foi avaliada por meio da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar. Conforme pode ser visto na Tabela 7, em relação aos leucócitos totais não observamos diferenças significativas em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 21)} = 0,001168$, $p = 0,973$] a exposição à fumaça [$F = 0,03019$, $p = 0,8637$] e ao tratamento [$F_{(1, 21)} = 0,7254$, $p = 0,4040$]. Com relação a quantidade de macrófagos, também não encontramos diferenças significativas em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 24)} = 0,06550$, $p = 0,8002$] exposição à fumaça [$F_{(1, 24)} = 0,4123$, $p = 0,5269$] e tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 24)} = 1,990$, $p = 0,1712$]. Em relação aos neutrófilos não encontramos diferença estatística em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 2,272$, $p = 0,1430$] a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 2,272$, $p = 0,1430$] e ao tratamento [$F_{(1, 28)} = 2,272$, $p = 0,1430$]. Por último também não observamos diferença significativa nos linfócitos com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 1,000$, $p = 0,3259$] exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 1,000$, $p = 0,3259$] e tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 1,000$, $p = 0,3259$].

Tabela 7. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA.

Grupo	SLN	SLN+FCM	CET	CET + FCM
Leucócitos (x 10 ⁵ /mL)	16,96 ± 2,86	17,25 ± 2,29	15,11 ± 1,46	15,54 ± 1,60
Macrófagos (x 10 ⁵ /mL)	18,50 ± 2,86	17,72 ± 2,04	16,16 ± 1,64	14,33 ± 0,60
Neutrófilos (x 10 ⁵ /mL)	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Linfócitos (x 10 ⁵ /mL)	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

SLN – Grupo salina; SLN+FCM – Grupo salina mais fumaça de cigarro modificada; CET – Grupo cetoprofeno; CET+FCM – Grupo cetoprofeno mais fumaça de cigarro modificada. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.6 Análises bioquímicas do dano e o estresse oxidativo no pulmão

Em relação às enzimas antioxidantes (na Figura 07), observamos que houve diferença significativa na atividade da SOD, do grupo SAL+FCM em comparado ao grupo CET [$F_{(1, 24)} = 4,733$, $p = 0,0397$] em relação a exposição à fumaça, não havendo diferença entre a interação entre as variáveis [$F_{(1, 24)} = 0,2615$, $p = 0,6138$] e ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 24)} = 3,717$, $p = 0,0658$]. Com relação a atividade da catalase, não observamos diferenças significativas da interação entre as variáveis [$F_{(1, 25)} = 0,03045$, $p = 0,8629$] a exposição à fumaça [$F_{(1, 25)} = 1,444$, $p = 0,2408$] e ao tratamento [$F_{(1, 25)} = 0,1527$, $p = 0,6992$]. Em relação ao dano da membrana lipídica, não houve diferença significativa da concentração de TBARS nos grupos estudados em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 22)} = 1,476$, $p = 0,2373$] a exposição à fumaça [$F_{(1, 22)} = 4,021$, $p = 0,0574$] e ao tratamento [$F_{(1, 22)} = 0,7799$, $p = 0,3867$]. Por último com relação a Proteína carbonilada, também não foram encontradas diferenças significativas entre a interação da exposição à fumaça e ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 24)} = 0,3983$, $p = 0,5339$] bem como também não houve diferença com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 24)} = 0,01148$, $p = 0,9156$] e ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 24)} = 2,121$, $p = 0,1583$].

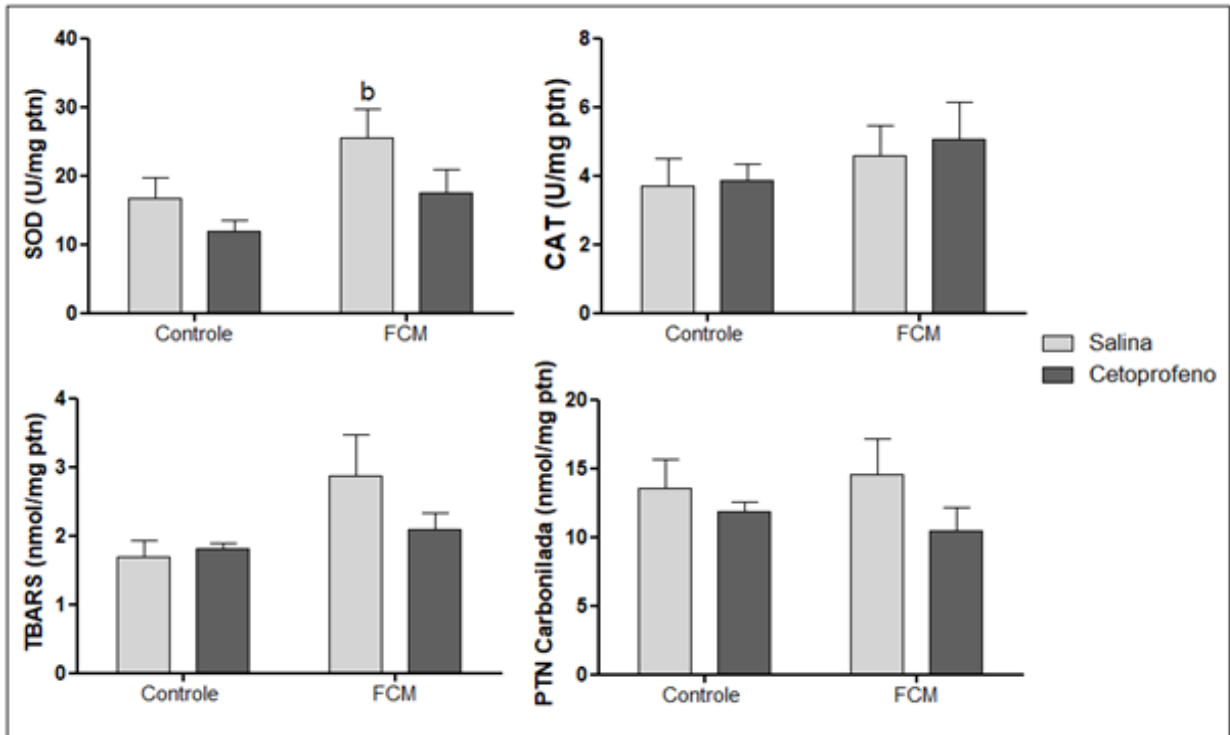


Figura 7. Análise do estresse oxidativo no tecido pulmonar. (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.7 Análises bioquímicas do dano e o estresse oxidativo no fígado

Em relação às enzimas antioxidantes do fígado (Figura 8), observamos que não houve diferença significativa na atividade da SOD em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 24)} = 0,01300$, $p = 0,9102$] exposição à fumaça [$F_{(1, 24)} = 1,109$, $p = 0,3028$] e tratamento [$F_{(1, 24)} = 1,549$, $p = 0,2253$]. Com relação a atividade da catalase, não houve diferença significativa em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 25)} = 0,9797$, $p = 0,3318$] exposição à fumaça [$F_{(1, 25)} = 2,039$, $p = 0,1656$] e ao tratamento [$F_{(1, 25)} = 0,2716$, $p = 0,6068$]. Em relação ao dano da membrana lipídica, houve diferença significativa da concentração de TBARS nos grupos SLN+FCM e CET+FCM quando comparados ao grupo SLN, em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 23)} = 5,759$, $p = 0,0249$], entretanto, não houve diferença significativa com relação a interação das variáveis [$F_{(1, 23)} = 1,688$, $p = 0,2068$], e em relação ao tratamento [$F_{(1, 23)} = 0,3419$, $p = 0,5644$]. Com relação a Proteína carbonilada, foi encontrada diferença significativa

com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 23)} = 8,798$, $p = 0,0069$] no grupo SLN+FCM quando comparado aos grupos SLN e CET. Não foram encontradas diferenças significativas com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 23)} = 3,119$, $p = 0,0907$] e em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 23)} = 1,030$, $p = 0,3208$].

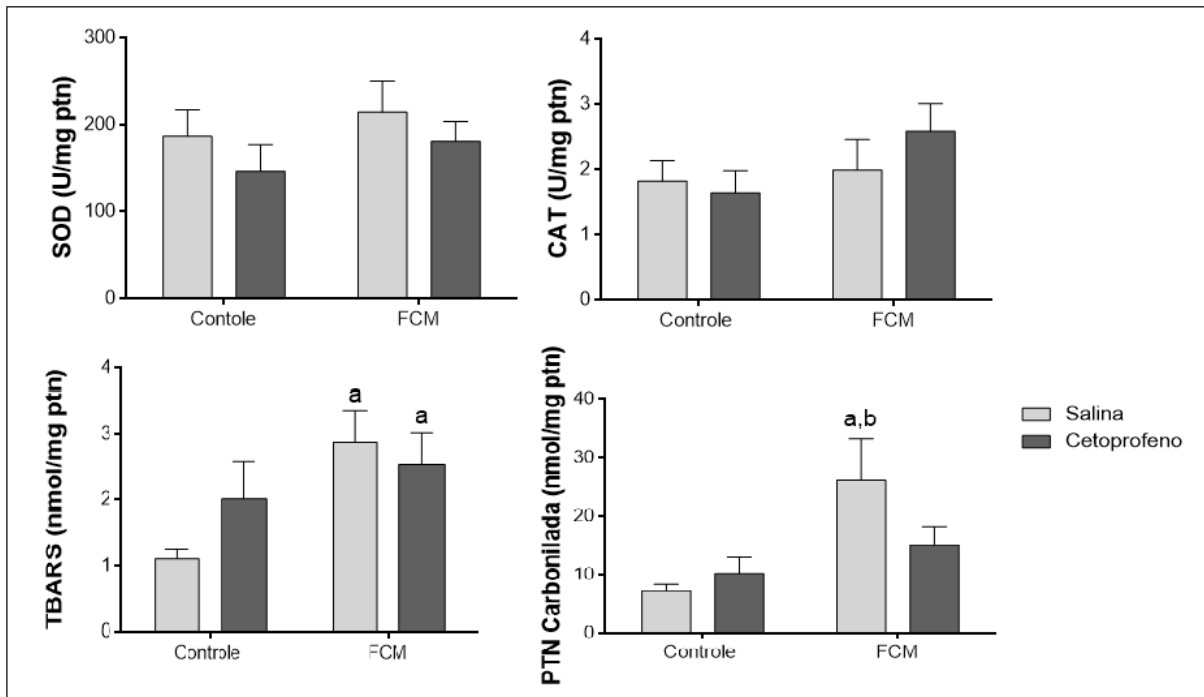


Figura 8. Análise do estresse oxidativo no fígado. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN, (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.8 Análise do tecido hepático

No presente estudo a inflamação hepática foi avaliada por meio de uma análise semi-quantitativa do número de núcleos inflamatórios (Figura 09). O grupo exposto à fumaça de cigarro modificada (SLN+FCM) apresentou um maior influxo de células inflamatórias em relação aos demais grupos com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 37,20$, $p < 0,0001$], com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 23,75$, $p < 0,0001$] e com relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 29,72$, $p < 0,0001$].

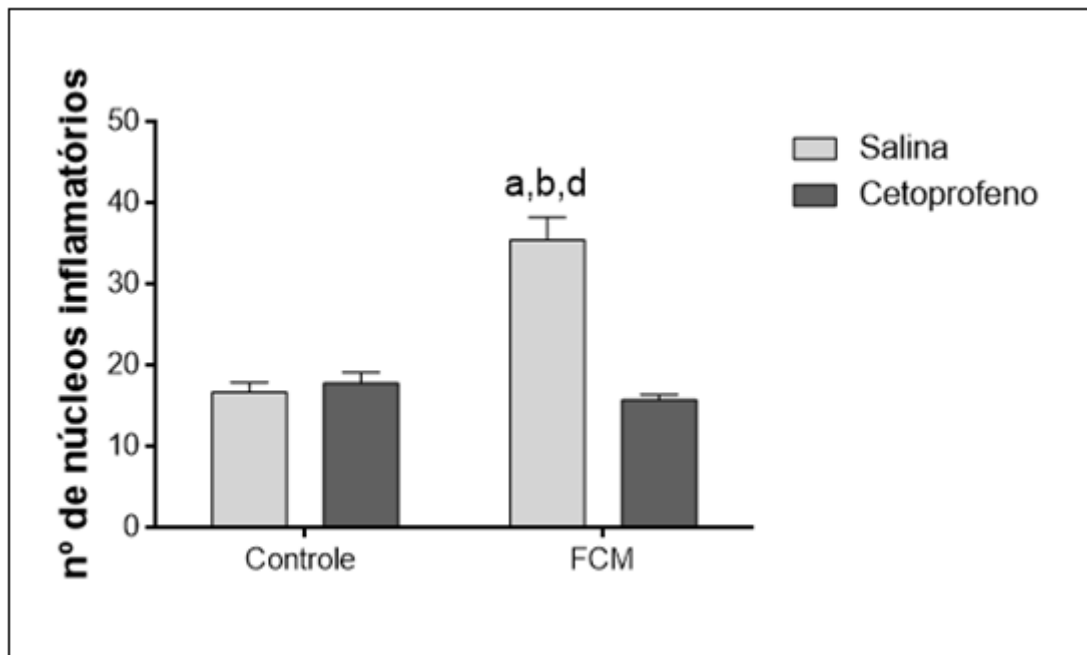


Figura 9. Número de núcleos inflamatórios no parênquima hepático de ratos Wistar. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN, (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET e (d) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET+FCM. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.9 Testes comportamentais

5.9.1 Memória de reconhecimento de novos objetos a curto prazo

Para verificar se a exposição a FCM alterou a capacidade exploratória dos animais e se o cetoprofeno foi capaz de prevenir o quadro avaliamos os animais estudados por meio do teste de reconhecimento de novo objeto a curto prazo conforme apresentado na Figura 10. Em relação ao treino realizado com os animais, observamos diferença significativa entre os grupos SLN+FCM e CET+FCM quando comparado ao grupo SLN em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 27)} = 4,582$, $p = 0,0415$] e a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 7,378$, $p = 0,0114$], não foi observada diferença significativa com relação ao tratamento [$F_{(1, 27)} = 0,04252$, $p = 0,8382$]. Com

relação ao teste de reconhecimento de novo objeto, foi observado diferença significativa entre os grupos SLN+FCM e CET+FCM quando comparado aos grupos SLN e CET, em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 18,17, p = 0,0002$], porém não foi observada diferença significativa com relação a interação entre as variáveis estudadas [$F_{(1, 28)} = 0,01759, p = 0,8955$] e em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 0,1898, p = 0,6664$]. Com relação ao índice de reconhecimento, observamos diferença significativa do grupo SLN+FCM quando comparado ao grupo SAL, e diferença significativa entre o grupo CET+FCM quando comparado ao grupo SLN+FCM, em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 6,810, p = 0,0144$], mas não encontramos diferença significativa em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 3,319, P = 0,0792$], como também em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 0,6206, p = 0,4374$].

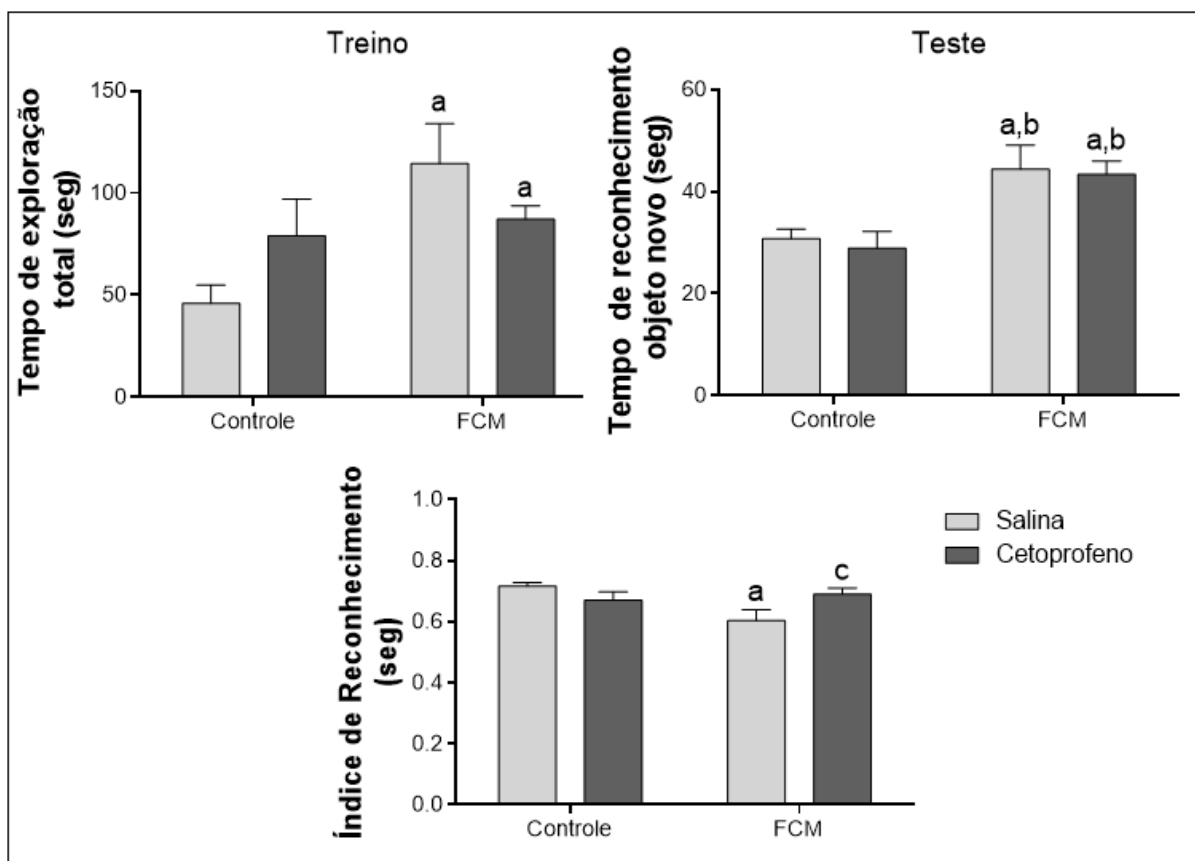


Figura 10. Teste de reconhecimento de novo objeto de curto prazo. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN e (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SAL+FCM. Os dados são expressos como média \pm erro

padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$

5.9.2 Memória de reconhecimento de novo objeto de longo prazo.

Para verificar se a exposição a FCM alterou a capacidade exploratória dos animais e se o cetoprofeno foi capaz de prevenir o quadro avaliamos os animais estudados por meio do teste de reconhecimento de novo objeto a longo prazo conforme apresentado na Figura 11. Em relação ao treino realizado com os animais, observamos diferença significativa entre os grupos SLN+FCM e SLN+CET quando comparado ao grupo SLN, em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 27)} = 4,582$, $p = 0,0415$] e a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 7,378$, $p = 0,0114$], não foi observada diferença significativa com relação ao tratamento [$F_{(1, 27)} = 0,04252$, $p = 0,8382$]. Em relação ao tempo de reconhecimento do objeto novo, observamos diferença significativa entre o grupo CET+FCM quando comparado aos grupos SLN e SLN+FCM, com relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 9,354$, $p = 0,0049$], porém não encontramos diferença significativa em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 3,887$, $p = 0,0586$] e em relação exposição à fumaça de cigarro modificada [$F_{(1, 28)} = 0,02916$, $p = 0,8656$]. Com relação ao índice de reconhecimento, houve diferença significativa do grupo CET+FCM quando comparado ao grupo SLN+FCM, e diferença significativa entre o grupo SLN+FCM quando comparado aos grupos SLN e CET, em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 32,22$, $p < 0,0001$], a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 12,76$, $p = 0,0013$], e em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 36,40$, $p < 0,0001$].

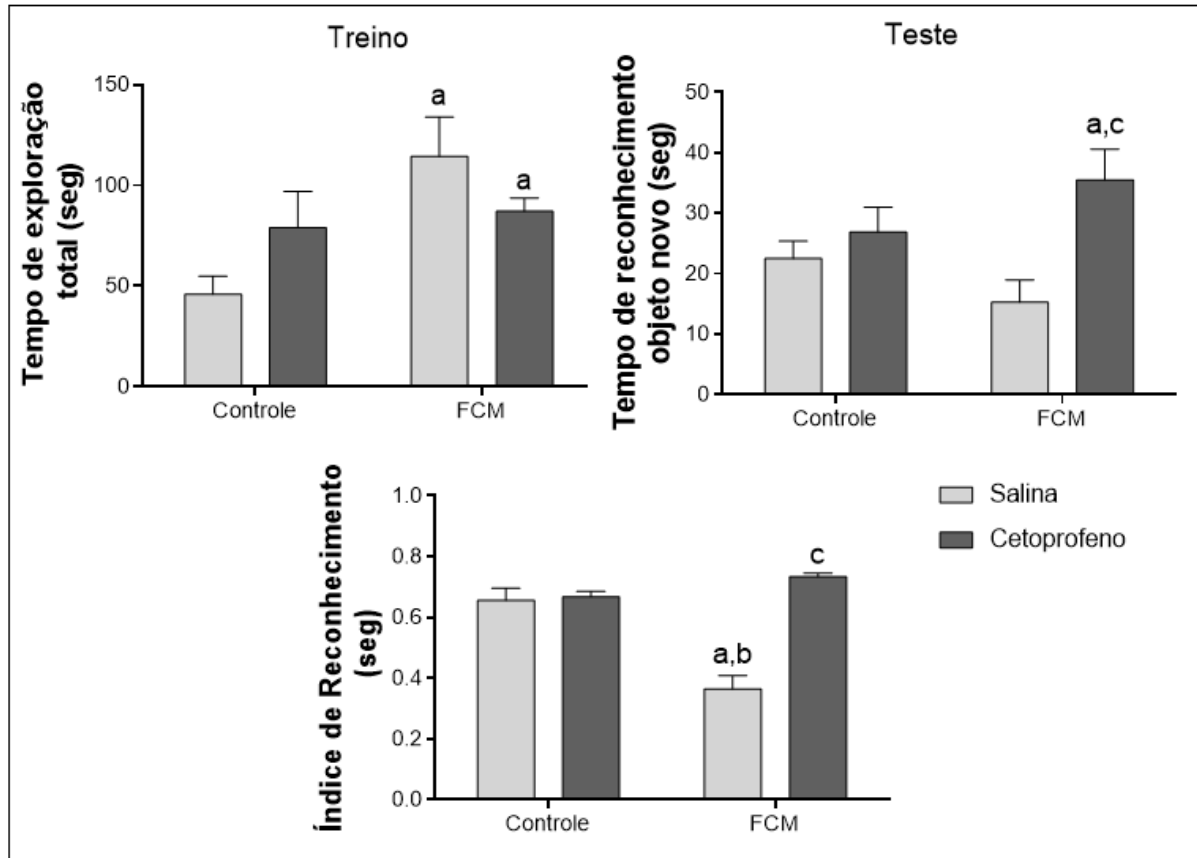


Figura 11. Teste de reconhecimento de novo objeto de longo prazo. (a) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SLN e (b) representa diferença significativa quando comparado ao grupo CET e (c) representa diferença significativa quando comparado ao grupo SAL+FCM. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.9.3 Paradigma Claro/Escuro

Conforme representado na Figura 12, em relação ao teste comportamental claro/escuro, observamos diferença significativa em relação ao tempo de permanência no compartimento claro dos animais do grupo CET quando comparados ao grupo SLN [$F_{(1, 27)} = 4,665$; $p = 0,0329$] com relação ao tratamento quando comparado aos demais grupos, não havendo diferença significativa com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 27)} = 1,154$, $p = 0,2921$] como também em relação a exposição a fumaça [$F_{(1, 27)} = 0,2526$, $p = 0,6193$]. Em relação ao número de entradas no compartimento claro não encontramos diferença estatística em relação a interação entre as variáveis [$F_{(1,$

27) = 0,002994, $p = 0,9568$] com relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 27)} = 1,754$, $p = 0,1965$] e em relação ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 27)} = 0,04324$, $p = 0,8368$].

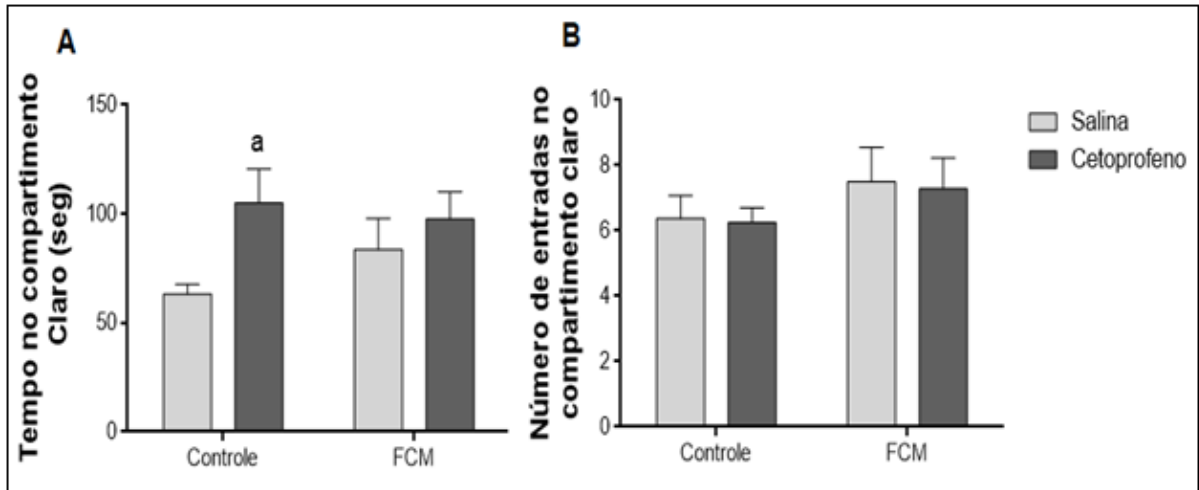


Figura 12. Teste paradigma claro/escuro. (A) Número de entradas no compartimento claro do PCE; (B) Tempo de exploração do compartimento claro do PCE. (a) representa a diferença significativa entre os grupos CET quando comparado ao grupo SLN. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

5.9.4 Atividade locomotora no campo aberto

Em relação a atividade locomotora avaliada no campo aberto conforme descrito na Figura 13, não observamos diferença significativa com relação a interação entre as variáveis [$F_{(1, 28)} = 0,1191$, $p = 0,7326$] também não houve diferença significativa em relação a exposição à fumaça [$F_{(1, 28)} = 2,009$, $p = 0,1674$] e ao tratamento com cetoprofeno [$F_{(1, 28)} = 0,5501$, $p = 0,4645$].

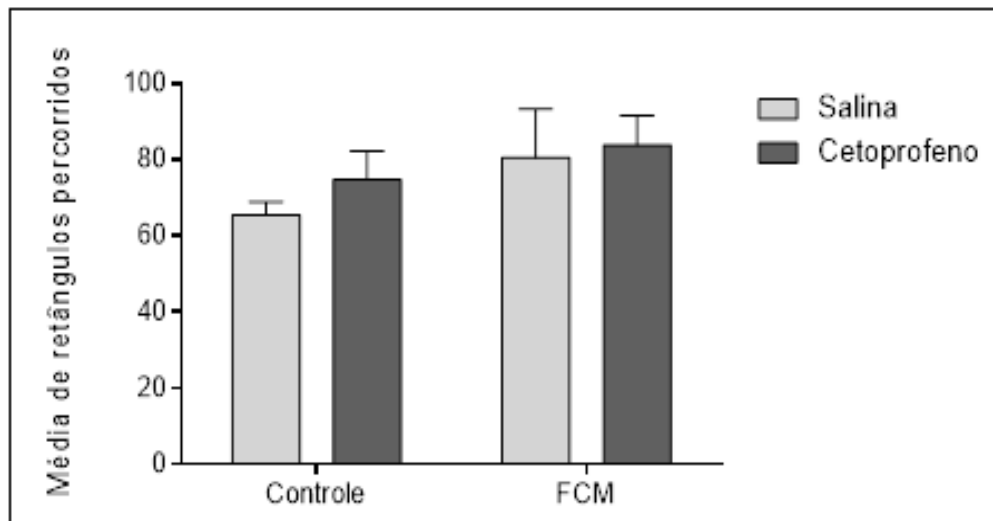


Figura 13. Teste de atividade locomotora no CA. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram analisados pelo teste de variância Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Fisher's ($p < 0,05$), $n=8$.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos as alterações cognitivas ocasionadas pela exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco assim como, os efeitos do cetoprofeno na prevenção das alterações ocasionadas. Observamos primeiramente que o período de exposição de 8 dias à fumaça de cigarro livre de tabaco não foi suficiente para proporcionar um quadro de inflamação pulmonar, nesse aspecto encontramos um resultado contrário ao estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, que foi capaz de demonstrar que tanto a fumaça de cigarro comum, quanto a fumaça de cigarro livre de tabaco, foram capazes de causar um processo inflamatório pulmonar por meio do influxo de células inflamatórias e alterações estereológicas pulmonares (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018). O estudo citado também utilizou o mesmo período de exposição à fumaça de cigarro comum e livre de tabaco, corroborando com o período de exposição realizado em nosso atual trabalho.

O modelo de exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco utilizado nesse estudo teve como principal objetivo influenciar o mínimo possível no comportamento de estresse do animal, portanto, todos os animais passaram pelos mesmos procedimentos experimentais, exceto na exposição à fumaça de cigarro comum, como demonstrado em trabalhos anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa (BEZERRA; VALENCA; PIRES; LANZETTI *et al.*, 2011; CAMPOS; DOURADO; DINIZ; BEZERRA *et al.*, 2014; CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013; CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018; F; SS; M; WA *et al.*, 2006; FS; SS; KM; M *et al.*, 2011; KK; VA; MF; FS *et al.*, 2014; SILVA BEZERRA; VALENCA; LANZETTI; PIMENTA *et al.*, 2006). No estudo em questão utilizamos ratos machos objetivando minimizar os efeitos comportamentais provocados pelas alterações hormonais evidenciadas em fêmeas como descrito por Borella e colaboradores (CELIA MOREIRA BORELLA; SEEMAN; CARNEIRO CORDEIRO; VIEIRA DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Em nosso estudo observamos menores valores em relação ao VC nos grupos SLN+FCM e CET quando comparados com o grupo SLN, em contrapartida, observamos que estes mesmos grupos apresentaram maiores valores de FR, entretanto, não houve diferença significativa na análise estatística. Hipotetizamos que essa redução do volume corrente ocorreu porque os animais no momento que foram

analisados apresentaram um padrão respiratório superficial quando comparado aos demais grupos. De certa maneira, observamos que apenas esse achado não seja conclusivo para afirmarmos que houve uma alteração da mecânica respiratória destes animais. Acreditamos que esses resultados são justificados devido ao curto período de exposição à fumaça. Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa utilizando um modelo de camundongos expostos à fumaça de cigarro, porém, com exposição a longo prazo (60 dias) foram observadas alterações pulmonares importantes (BEZERRA; VALENCA; PIRES; LANZETTI *et al.*, 2011).

Em relação as análises gasométricas, observamos uma alteração dos valores de COHb (carboxihemoglobina), o grupo de animais expostos à fumaça de cigarro livre de tabaco apresentou maiores valores de COHb quando comparado aos demais grupos, porém nos animais que foram expostos à fumaça e receberam o tratamento esses valores foram menores quando comparados ao grupo SLN+FCM. Recentes estudos demonstraram que indivíduos fumantes ativos e fumantes passivos apresentaram maiores concentrações de COHb no sangue, o que corrobora com nossos resultados (MULLER PDE; BARBOSA; O'DONNELL; NEDER, 2019; SCHIMMEL; GEORGE; SCHWARZ; YOUSIF *et al.*, 2018). Em relação a redução dos valores de COHb nos animais que receberam o tratamento, hipotetizamos que possa ter ocorrido devido a ação anti-inflamatória do fármaco. Charrin e colaboradores em seu estudo correlacionaram os efeitos anti-inflamatórios através do treinamento aeróbico com a melhora dos parâmetros ventilatórios e gasométricos, e observaram uma redução dos valores de COHb nos grupos experimentais que realizaram treinamento aeróbico de forma contínua, fortalecendo o conceito da melhora ventilatória e gasométrica através da ação anti-inflamatória da atividade, bem como observamos com relação atuação anti-inflamatória do fármaco (EMMANUELLE CHARRIN, 2018).

Em nosso estudo, em relação aos parâmetros sanguíneos dos animais estudados, observamos que os animais que receberam o cetoprofeno e foram expostos à fumaça apresentaram maiores valores na concentração de hemoglobina, aumento na porcentagem de hematócrito e um aumento no número de eritrócitos. Nossos achados divergem do encontrado por Shahabinejad e colaboradores que utilizando ratos expostos à fumaça de cigarro apresentaram menores concentrações de células sanguíneas nesses animais (SHAHABINEJAD; SIRATI-SABET; KAZEMI-ARABABADI; NABATI *et al.*, 2016). Em nosso estudo, em relação ao total de

plaquetas não encontramos diferença significativa nos grupos avaliados. Os nossos achados divergem com os resultados encontrados por Chirico e colaboradores que utilizando um modelo de ratos expostos à fumaça de cigarro livre de tabaco encontraram menores valores de plaquetas no sangue destes animais (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018).

Nos animais que receberam cetoprofeno e foram expostos à fumaça observamos maiores valores de leucócitos, sugerindo uma ativação do sistema imunológico. Nossos dados corroboram com os valores encontrados por Chirico e colaboradores que observaram uma concentração maior de leucócitos nos animais expostos à fumaça livre de tabaco (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018). Dessa maneira, observamos que o cetoprofeno não preveniu a ativação do sistema imune, sugerimos que esse aumento significativo nos parâmetros hematológicos e leucócitos, possam ser justificados pelo fato de que a interação entre a fumaça e o cetoprofeno seja um fator capaz de desencadear tais alterações.

Por meio da contagem total e diferencial das células sanguíneas, encontramos um maior valor de leucócitos no grupo que recebeu cetoprofeno e foi exposto à fumaça quando comparado ao grupo SLN. O que corrobora com nosso resultado encontrado no leucograma descrito anteriormente. Observamos também, um influxo de monócitos, que são células de defesa do sistema imunológico nos grupos CET e CET+FCM. Castellsague e colaboradores demonstraram que o uso de altas doses diárias de AINEs está associado à complicações gastrointestinais em indivíduos que fazem uso deste fármaco (CASTELLSAGUE; RIERA-GUARDIA; CALINGAERT; VARAS-LORENZO *et al.*, 2012). Sendo assim, podemos entender que apenas o cetoprofeno seja um fator que possa desencadear uma injúria. Hipotetizamos que se associado o tempo de tratamento utilizado (tempo de tratamento maior que o recomendado pela bula do cetoprofeno) e a exposição à fumaça sejam capazes de potencializar esses agravos.

Apesar da exposição à fumaça de cigarro comum, ser responsável por causar, danos irreversíveis a todo o sistema respiratório, em nosso modelo experimental a exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco não foi capaz de promover um influxo celular inflamatório no LBA dos animais expostos. Nossos achados divergem dos encontrados por outros autores em relação a contagem total e diferencial de leucócitos no LBA que utilizaram o modelo de exposição de fumaça de cigarro (CAMPOS; LEAL; COSTA; DE LIMA *et al.*, 2015; CAMPOS; MANSO; GONCALVES; SILVA *et al.*, 2013;

HE; CHEN; CHEN; HE *et al.*, 2015; LIU; LIN; LU; PENG *et al.*, 2014; LOPES; FERREIRA; NESI; LANZETTI *et al.*, 2013; SS; F; AA; B *et al.*, 2008). Tais estudos demonstraram um influxo de células inflamatórias no LBA confirmando a presença de inflamação pulmonar, o que não foi observado em nosso trabalho.

A literatura tem descrito os males que a inalação à fumaça de cigarro pode causar no sistema respiratório. Diante disso, consideramos analisar o estado redox por meio da avaliação do dano de proteína, peroxidação de lipídeos e atividade das enzimas antioxidantes no homogenato pulmonar dos animais estudados. Em relação ao dano avaliado por meio da peroxidação de lipídeos e oxidação de proteína, em nosso estudo observamos que oito dias de exposição não foram suficientes para gerar alterações nos pulmões dos animais estudados o que difere dos achados de Chirico e colaboradores que demonstraram maiores valores na concentração de TBARS e proteína carbonilada nos animais expostos à fumaça livre de tabaco (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018). Em relação as enzimas antioxidantes, avaliamos neste estudo a atividade de duas enzimas antioxidantes cruciais no processo de equilíbrio dos oxidantes e antioxidantes. A superóxido dismutase que é uma importante enzima que protege as células contra danos causados pelo ânion superóxido e a catalase que responsável por reduzir o peróxido de hidrogênio em água. Em relação a atividade da SOD, observamos que a atividade dessa enzima foi maior no grupo de animais expostos à fumaça quando comparado ao grupo cetoprofeno dos animais que não foram expostos à fumaça, nossos achados corroboram com os apresentados Chirico e colaboradores e por Toledo-Arruda e colaboradores que também observaram maior atividade desta enzima (TOLEDO-ARRUDA; VIEIRA; GUARNIER; SUEHIRO *et al.*, 2017); (AC; RP; FA; CL *et al.*, 2017; CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018). Em contrapartida, não encontramos diferença na atividade da enzima catalase. Podemos sugerir que nosso resultado seja justificado por utilizarmos em nosso modelo um curto período de exposição, caso mantivéssemos um maior período de exposição, talvez observaríamos maior atividade da CAT também (LUSHCHAK, 2015).

Em relação ao dano oxidativo no fígado, avaliado também por meio da peroxidação de lipídeos e oxidação de proteína, avaliamos a concentração de TBARS e proteína carbonilada. A concentração de TBARS apresentou maiores valores nos grupos de animais expostos à fumaça quando comparado ao grupo SLN, em contrapartida, a concentração de proteína carbonilada apenas aumentou no grupo

SLN+FCM em comparação aos grupos SLN e CET. Nossos dados corroboram com os dados apresentados por Napierala e colaboradores que demonstraram que o tabagismo induziu danos hepáticos e renais por meio do envolvimento de mecanismos envolvidos na ativação de biomarcadores de estresse oxidativo (NAPIERALA; OLSZEWSKI; MIECHOWICZ; JABLECKA *et al.*, 2019).

De modo adicional, na análise do tecido hepático, observamos o número de núcleos inflamatórios. Encontramos um valor maior de núcleos inflamatórios no grupo SLN+FCM quando comparado aos demais grupos. Nossos dados, mais uma vez, corroboram com os achados de Napierala e colaboradores, que demonstraram que o tabagismo foi capaz de induzir danos hepáticos em ratos expostos à fumaça (NAPIERALA; OLSZEWSKI; MIECHOWICZ; JABLECKA *et al.*, 2019). Um achado importante importante em nosso estudo é que quando avaliamos esse resultado, observamos que o cetoprofeno conseguiu conter o aumento desses núcleos inflamatórios, exercendo assim sua função anti-inflamatória nos animais que foram expostos à fumaça e receberam o tratamento com este fármaco.

Embora haja uma grande quantidade de trabalhos avaliando as alterações comportamentais e cognitivas decorrentes da exposição à fumaça de cigarro com todos os componentes químicos presentes em sua composição, a literatura tem demonstrado uma maior ação destes componentes, principalmente da nicotina, na compreensão destas alterações apresentadas. Em contrapartida, poucos estudos são realizados com o objetivo de demonstrar que não apenas os aditivos contidos no cigarro, mas também, a fumaça causada pela queima do papel possa causar comprometimentos a nível do sistema nervoso central, refletindo em alterações comportamentais e cognitivas nos indivíduos que são expostos diariamente a agente lesivo. Por essa razão, ainda são pouco consistentes os dados encontrados na literatura no que se refere aos efeitos causados por curtos e longos períodos de exposição à fumaça, ou a poluição de forma generalizada sobre o processo de memória.

Neste trabalho objetivamos verificar se a exposição à fumaça foi capaz de induzir déficit de memória. Para tal, avaliamos a memória declarativa de curto prazo por meio da tarefa de RNO. Os grupos expostos à fumaça demonstraram não ter reconhecido durante a sessão do teste o objeto previamente apresentado na sessão do treino, de modo que, os grupos SLN e CET reconheceram. Nossos achados corroboram com os resultados apresentados por Nguyen e colaboradores que

demonstraram que a prole de animais expostos à fumaça de cigarro eletrônico com nicotina, avaliados através do mesmo teste também apresentaram déficits de memória declarativa de curto prazo (NGUYEN; LI; CHEN; CRANFIELD *et al.*, 2018). Em relação a memória declarativa de longo prazo, observamos um déficit cognitivo de memória declarativa de longo prazo através do teste de RNO, onde o grupo SLN+FCM demonstrou não reconhecer o objeto previamente apresentado na sessão treino. Nossos resultados corroboram com os resultados encontrados por Abreu-Villaça e colaboradores que demonstraram em seu estudo um déficit de memória declarativa de longo prazo nos animais expostos à fumaça de cigarro (ABREU-VILLACA; DE CARVALHO GRACA; RIBEIRO-CARVALHO; NAIFF VDE *et al.*, 2013). Em contrapartida, os animais que foram expostos à fumaça e receberam tratamento com cetoprofeno reconheceram o objeto previamente apresentado na sessão do treino, sugerindo que o tratamento com o cetoprofeno foi capaz de prevenir esse déficit de memória de longo prazo. Nossos achados corroboram com o que a literatura científica tem apresentado nos últimos anos, demonstrando uma importante ação dos anti-inflamatórios em relação a melhora cognitiva, agindo de forma a atenuar os déficits de memória (KAWANO; TAKAHASHI; IWATA; MORIKAWA *et al.*, 2014; ROGERS; LIU; ZHAO; WANG *et al.*, 2017).

Inicialmente antes de avaliar as alterações com relação a memória dos animais expostos a fumaça, buscamos analisar se houve alterações comportamentais do tipo ansiedade nos animais que foram expostos à fumaça e ao tratamento com cetoprofeno. Essa avaliação se fez importante já que na literatura encontramos vários estudos que demonstram o efeito ansiolítico dos componentes químicos presentes na composição do cigarro. Sendo assim, poderíamos observar se tais efeitos se manteriam em relação a exposição à fumaça livre de tabaco. Nossos resultados indicaram que a exposição à fumaça de cigarro, não alterou a exploração do compartimento claro do PCE, entretanto, os animais que receberam o tratamento com cetoprofeno permaneceram por mais tempo explorando o compartimento claro do PCE. Doukkaliz e colaboradores em seu estudo demonstraram uma atividade ansiolítica dos animais avaliados, determinado pelo tempo gasto no lado iluminado do aparelho nos animais que receberam tratamento com extrato metanólico de *urtica urens* (DOUKKALI; TAGHZOUTI; BOUIDIDA; NADJMOUDDINE *et al.*, 2015).

De modo adicional, após o teste do PCE, os animais foram colocados no campo aberto e sua atividade locomotora foi avaliada, não foi observada diferença

significativa entre os grupos com relação a atividade locomotora dos animais. Nossos achados nos levam a acreditar que o comportamento emitido pelos animais não foi induzido por alteração da atividade locomotora. Nossos resultados corroboram com os achados de Chirico e colaboradores que também não encontraram alterações na atividade locomotora dos animais expostos à fumaça de cigarro comum e fumaça de cigarro livre de tabaco (CHIRICO; BEZERRA; GUEDES; SOUZA *et al.*, 2018).

Em resumo, na análise cognitiva e comportamental a exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco, ou seja, fumaça sem qualquer componente que possa intervir nas respostas comportamentais, como por exemplo, a nicotina, revelou apresentar influência nas alterações de aquisição de memória de curto e longo prazo. Nossos dados corroboram com os dados apresentados por Abreu-Villaça e colaboradores que também demonstraram alterações de memória nos animais estudados (ABREU-VILLACA; DE CARVALHO GRACA; RIBEIRO-CARVALHO; NAIFF VDE *et al.*, 2013). Em contrapartida, o cetoprofeno foi capaz de prevenir essas alterações, ficando mais visível quando observamos sua atuação na avaliação da memória de longa duração. Em relação ao paradigma claro/escuro, os animais que receberam apenas o tratamento permaneceram mais tempo no ambiente claro, sugerindo que estes animais estavam mais tranquilos para explorar um ambiente que naturalmente é aversivo para os roedores. Por último, observamos que não houve alteração locomotora nos animais que foram expostos à fumaça e receberam o cetoprofeno tratamento com cetoprofeno.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a exposição à fumaça de cigarro livre de tabaco foi capaz de promover alterações cognitivas, em contrapartida, o tratamento com o cetoprofeno preveniu essas alterações.

REFERÊNCIAS

ABREU-VILLACA, Y.; DE CARVALHO GRACA, A. C.; RIBEIRO-CARVALHO, A.; NAIFF VDE, F. *et al.* Combined exposure to tobacco smoke and ethanol in adolescent mice elicits memory and learning deficits both during exposure and withdrawal. **Nicotine Tob Res**, 15, n. 7, p. 1211-1221, Jul 2013.

ADLER, K. B.; LI, Y. Airway epithelium and mucus: intracellular signaling pathways for gene expression and secretion. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 25, n. 4, p. 397-400, Oct 2001.

AMBROSE, J. A.; BARUA, R. S. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. **J Am Coll Cardiol**, 43, n. 10, p. 1731-1737, May 19 2004.

ANDRADE, M. C.; SOUZA, A. B. F.; HORTA, J. G.; PAULA COSTA, G. *et al.* Applying Positive End-Expiratory Pressure During Mechanical Ventilation Causes Pulmonary Redox Imbalance and Inflammation in Rats. **Shock**, 50, n. 5, p. 572-578, Nov 2018.

BARBOSA, K. B. F.; BRESSAN, J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios**. Revista de Nutrição, 2010. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013.

BEZERRA, F. S.; VALENCA, S. S.; PIRES, K. M.; LANZETTI, M. *et al.* Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. **Respir Physiol Neurobiol**, 177, n. 2, p. 120-126, Jul 31 2011.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S. *et al.* Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**, 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012.

BOURIN, M.; HASCOET, M. The mouse light/dark box test. **Eur J Pharmacol**, 463, n. 1-3, p. 55-65, Feb 28 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976.

CABRERA-PASTOR, A.; LLANSOLA, M.; MONTOLIU, C.; MALAGUARNERA, M. *et al.* Peripheral inflammation induces neuroinflammation that alters neurotransmission and cognitive and motor function in hepatic encephalopathy: Underlying mechanisms and therapeutic implications. **Acta Physiol (Oxf)**, 226, n. 2, p. e13270, Jun 2019.

CAMPOS, K. K.; DOURADO, V. A.; DINIZ, M. F.; BEZERRA, F. S. *et al.* Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. **Exp Lung Res**, 40, n. 4, p. 164-171, Apr 2014.

CAMPOS, K. K.; LEAL, S. F.; COSTA, D. C.; DE LIMA, W. G. *et al.* Long-term exposure to ultrasonically nebulized distilled water and saline causes cellular influx and oxidative stress in lung tissue of rats. **Exp Lung Res**, 41, n. 10, p. 546-553, 2015.

CAMPOS, K. K.; MANSO, R. G.; GONCALVES, E. G.; SILVA, M. E. *et al.* Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol**, 284, n. 1-2, p. 29-36, Jul-Aug 2013.

CAMPOS, K. K. D.; DE OLIVEIRA RAMOS, C.; MARTINS, T. L.; COSTA, G. P. *et al.* Lycopene mitigates pulmonary emphysema induced by cigarette smoke in a murine model. **J Nutr Biochem**, 65, p. 93-100, Mar 2019.

CAPETTINI, S. B.; MORAES, M. F.; PRADO, V. F.; PRADO, M. A. *et al.* Vesicular acetylcholine transporter knock-down mice show sexual dimorphism on memory. **Brain Res Bull**, 85, n. 1-2, p. 54-57, Apr 25 2011.

CASTELLO, G.; COSTANTINI, S.; SCALA, S. Targeting the inflammation in HCV-associated hepatocellular carcinoma: a role in the prevention and treatment. **J Transl Med**, 8, p. 109, Nov 3 2010.

CASTELLSAGUE, J.; RIERA-GUARDIA, N.; CALINGAERT, B.; VARAS-LORENZO, C. *et al.* Individual NSAIDs and upper gastrointestinal complications: a systematic review and meta-analysis of observational studies (the SOS project). **Drug Saf**, 35, n. 12, p. 1127-1146, Dec 1 2012.

CASTRO, P.; LEGORA-MACHADO, A.; CARDILO-REIS, L.; VALENCA, S. *et al.* Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. **Eur J Pharmacol**, 498, n. 1-3, p. 279-286, Sep 13 2004.

CELIA MOREIRA BORELLA, V.; SEEMAN, M. V.; CARNEIRO CORDEIRO, R.; VIEIRA DOS SANTOS, J. *et al.* Gender and estrous cycle influences on behavioral and neurochemical alterations in adult rats neonatally administered ketamine. **Dev Neurobiol**, 76, n. 5, p. 519-532, May 2016.

CHAWLA, G.; RANJAN, C.; KUMAR, J.; SIDDIQUI, A. A. Chemical Modifications of Ketoprofen (NSAID) in Search of Better Lead Compounds: A Review of Literature From 2004-2016. **Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem**, 15, n. 3, p. 154-177, 2017.

CHEN, R.; HU, Z.; ORTON, S.; CHEN, R. L. *et al.* Association of passive smoking with cognitive impairment in nonsmoking older adults: a systematic literature review and a new study of Chinese cohort. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, 26, n. 4, p. 199-208, Dec 2013.

CHESNOKOVA, V.; PECHNICK, R. N.; WAWROWSKY, K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis, and behavior. **Brain Behav Immun**, 58, p. 1-8, Nov 2016.

CHIRICO, M. T. T.; BEZERRA, F. S.; GUEDES, M. R.; SOUZA, A. B. *et al.* Tobacco-Free Cigarette Smoke Exposure Induces Anxiety and Panic-Related Behaviours in Male Wistar Rats. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 4943, Mar 21 2018.

DE BEAUREPAIRE, R.; SUAUDEAU, C.; CHAIT, A.; CIMETIERE, C. Anatomical mapping of brain sites involved in the antinociceptive effects of ketoprofen. **Brain Res**, 536, n. 1-2, p. 201-206, Dec 17 1990.

DE SOUZA, A. B. F.; CHIRICO, M. T. T.; CARTELLE, C. T.; DE PAULA COSTA, G. *et al.* High-Fat Diet Increases HMGB1 Expression and Promotes Lung Inflammation in Mice Subjected to Mechanical Ventilation. **Oxid Med Cell Longev**, 2018, p. 7457054, 2018.

DOUKKALI, Z.; TAGHZOUTI, K.; BOUIDIDA, E. L.; NADJMOUDDINE, M. *et al.* Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behav Brain Funct**, 11, p. 19, Apr 24 2015.

EMMANUELLE CHARRIN, J. J. D., PHILIPPE CONNES, VINCENT PIALOUX, SAMIT GHOSH, CAMILLE FAES, SOLOMON F. OFORI-ACQUAH, CYRIL MARTIN. Moderate exercise training decreases inflammation in transgenic sickle cell mice. 2018.

ENGLAND, L. J.; BUNNELL, R. E.; PECHACEK, T. F.; TONG, V. T. *et al.* Nicotine and the Developing Human: A Neglected Element in the Electronic Cigarette Debate. **Am J Prev Med**, 49, n. 2, p. 286-293, Aug 2015.

ENNACEUR, A.; CAVOY, A.; COSTA, J. C.; DELACOUR, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. II: Effects of piracetam and pramiracetam. **Behav Brain Res**, 33, n. 2, p. 197-207, Jun 1 1989.

FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; GHIO, A. J. COPD: balancing oxidants and antioxidants. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 10, p. 261-276, 2015.

GULEC, G.; AKARSU, O.; MUTLU SAHIN, F.; ESSIZOGLU, A. *et al.* [The Effect of Chronic Cigarette Use on Cognitive Function]. **Turk Psikiyatri Derg**, 29, n. 3, p. 154-161, Fall 2018.

HE, Z. H.; CHEN, P.; CHEN, Y.; HE, S. D. *et al.* Comparison between cigarette smoke-induced emphysema and cigarette smoke extract-induced emphysema. **Tob Induc Dis**, 13, n. 1, p. 6, 2015.

HOENDERDOS, K.; CONDLIFFE, A. The neutrophil in chronic obstructive pulmonary disease. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 48, n. 5, p. 531-539, May 2013.

HOLTER, S. M.; EINICKE, J.; SPERLING, B.; ZIMPRICH, A. *et al.* Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice. **Curr Protoc Mouse Biol**, 5, n. 4, p. 291-309, Dec 2 2015.

JESSBERGER, S.; GAGE, F. H. Adult neurogenesis: bridging the gap between mice and humans. **Trends Cell Biol**, 24, n. 10, p. 558-563, Oct 2014.

JÚNIOR, D. R. D. A.; SOUZA, R. B. D.; SANTOS, S. A. D.; ANDRADE, D. R. D. **Oxygen free radicals and pulmonary disease**. vol.31 no.1, São Paulo, 2019. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-37132005000100011&script=sci_arttext&tlng=en.

KANTOR, T. G. Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. **Pharmacotherapy**, 6, n. 3, p. 93-103, May-Jun 1986.

KAWANO, T.; TAKAHASHI, T.; IWATA, H.; MORIKAWA, A. *et al.* Effects of ketoprofen for prevention of postoperative cognitive dysfunction in aged rats. **J Anesth**, 28, n. 6, p. 932-936, Dec 2014.

LIU, M. H.; LIN, A. H.; LU, S. H.; PENG, R. Y. *et al.* Eicosapentaenoic acid attenuates cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting ROS-sensitive inflammatory signaling. **Front Physiol**, 5, p. 440, 2014.

LOPES, A. A.; FERREIRA, T. S.; NESI, R. T.; LANZETTI, M. *et al.* Antioxidant action of propolis on mouse lungs exposed to short-term cigarette smoke. **Bioorg Med Chem**, 21, n. 24, p. 7570-7577, Dec 15 2013.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chem Biol Interact**, 224, p. 164-175, Dec 5 2014.

LUSHCHAK, V. I. FREE RADICALS, REACTIVE OXYGEN SPECIES, OXIDATIVE STRESSES AND THEIR CLASSIFICATIONS. **Ukr Biochem J**, 87, n. 6, p. 11-18, Nov-Dec 2015.

LUU, H. N.; WEN, W.; LI, H.; DAI, Q. *et al.* Are dietary antioxidant intake indices correlated to oxidative stress and inflammatory marker levels? **Antioxid Redox Signal**, 22, n. 11, p. 951-959, Apr 10 2015.

MACHADO, D. F.; CAMPOS, K. K. D.; DA SILVA, N. P.; DE OLIVEIRA RAMOS, C. *et al.* The administration of surfactant decreased oxidative stress in lungs of mice exposed to cigarette smoke. **Int Immunopharmacol**, 54, p. 275-279, Jan 2018.

MAJDI, A.; KAMARI, F.; VAFAEE, M. S.; SADIGH-ETEGHAD, S. Revisiting nicotine's role in the ageing brain and cognitive impairment. **Rev Neurosci**, 28, n. 7, p. 767-781, Oct 26 2017.

MANENTE, F. A.; MELLO, L. R. D. A.; KHALIL, O. A. K.; CARVALHO, C. T. D. *et al.* **Effect of metal complexation to anti-inflammatory over the action against oxidative and free radicals: ketoprofen action.** 2011. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702011000200006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, 47, n. 3, p. 469-474, Sep 1974.

MATOS, N. A.; SILVA, J. F.; DAMASCENO, K. A.; CASSALI, G. D. *et al.* Proteinase-activated receptor 2 blockade impairs CCL11- or allergen-induced eosinophil recruitment in experimental pleurisy. **Eur J Pharmacol**, 740, p. 627-633, Oct 5 2014.

MEIJER, M.; RIJKERS, G. T.; VAN OVERVELD, F. J. Neutrophils and emerging targets for treatment in chronic obstructive pulmonary disease. **Expert Rev Clin Immunol**, 9, n. 11, p. 1055-1068, Nov 2013.

MISHARIN, A. V.; MORALES-NEBREDA, L.; MUTLU, G. M.; BUDINGER, G. R. *et al.* Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, 49, n. 4, p. 503-510, Oct 2013.

MORRIS, G.; BERK, M.; WALDER, K.; MAES, M. Central pathways causing fatigue in neuro-inflammatory and autoimmune illnesses. **BMC Med**, 13, p. 28, Feb 6 2015.

MULLER PDE, T.; BARBOSA, G. W.; O'DONNELL, D. E.; NEDER, J. A. Cardiopulmonary and Muscular Interactions: Potential Implications for Exercise (In)tolerance in Symptomatic Smokers Without Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Front Physiol**, 10, 2019.

MUNAKATA, S.; ISHIMORI, K.; KITAMURA, N.; ISHIKAWA, S. *et al.* Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. **Regul Toxicol Pharmacol**, 99, p. 122-128, Nov 2018.

NAPIERALA, M.; OLSZEWSKI, J.; MIECHOWICZ, I.; JABLECKA, A. *et al.* The influence of tobacco smoke exposure on selected markers of oxidative stress, kidneys and liver function in the serum of rats with streptozotocin-induced diabetes. **Pharmacol Rep**, 71, n. 6, p. 1293-1298, Nov 2019.

NGUYEN, T.; LI, G. E.; CHEN, H.; CRANFIELD, C. G. *et al.* Maternal E-Cigarette Exposure Results in Cognitive and Epigenetic Alterations in Offspring in a Mouse Model. **Chem Res Toxicol**, 31, n. 7, p. 601-611, Jul 16 2018.

PARIKH, R.; SHAH, T. G.; TANDON, R. COPD exacerbation care bundle improves standard of care, length of stay, and readmission rates. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 577-583, 2016.

PAULO ROBERTO BEZERRA DE MELLO, T. S. O., ELIANA FREIRE GASPAR DE CARVALHO DORES, CLOVIS BOTELHO. **Evaluation of experimental tobacco exposure using cotinine and carboxyhemoglobin as exposure markers.** 2005. Disponível em: http://www.sopterj.com.br/wp-content/themes/sopterj_redesign_2017/revista/2005/n_03/07.pdf.

PAUMGARTTEN, F. J. R.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; OLIVEIRA, A. The impact of tobacco additives on cigarette smoke toxicity: a critical appraisal of tobacco industry studies. **Cad Saude Publica**, 33Suppl 3, n. Suppl 3, p. e00132415, Sep 21 2017.

PENA, K. B.; RAMOS, C. O.; SOARES, N. P.; DA SILVA, P. F. *et al.* The administration of a high refined carbohydrate diet promoted an increase in pulmonary inflammation and oxidative stress in mice exposed to cigarette smoke. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 3207-3217, 2016.

PEREIRA, L. M.; GUIMARAES, I. M.; OLIVEIRA, V. E. M.; BASTOS, C. P. *et al.* Estradiol effect on short-term object memory under hypocholinergic condition. **Brain Res Bull**, 140, p. 411-417, Jun 2018.

ROGERS, J. T.; LIU, C. C.; ZHAO, N.; WANG, J. *et al.* Subacute ibuprofen treatment rescues the synaptic and cognitive deficits in advanced-aged mice. **Neurobiol Aging**, 53, p. 112-121, May 2017.

SCHICK, S. F.; BLOUNT, B. C.; JACOB, P.; SALIBA, N. A. *et al.* Biomarkers of exposure to new and emerging tobacco delivery products. *In: Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017. v. 313, p. L425-452.

SCHIMMEL, J.; GEORGE, N.; SCHWARZ, J.; YOUSIF, S. *et al.* Carboxyhemoglobin Levels Induced by Cigarette Smoking Outdoors in Smokers. *In: J Med Toxicol*, 2018. v. 14, p. 68-73.

SEDA RENÇBER, S. Y. K., MINE ÖZYAZICI. **Bioavailability File: KETOPROFEN**. 2009. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/1209/21730cc34d7501cc58736ad3e44a7f7d7bc8.pdf>.

SHAHABINEJAD, G.; SIRATI-SABET, M.; KAZEMI-ARABABADI, M.; NABATI, S. *et al.* Effects of Opium Addiction and Cigarette Smoking on Hematological Parameters. **Addict Health**, 8, n. 3, p. 179-185, Jul 2016.

SICILIANO, C. A.; MCINTOSH, J. M.; JONES, S. R.; FERRIS, M. J. $\alpha 6\beta 2$ subunit containing nicotinic acetylcholine receptors exert opposing actions on rapid dopamine signaling in the nucleus accumbens of rats with high-versus low-response to novelty. **Neuropharmacology**, 126, p. 281-291, Nov 2017.

SILVA BEZERRA, F.; VALENCA, S. S.; LANZETTI, M.; PIMENTA, W. A. *et al.* Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, 22, n. 11-12, p. 1192-1201, Nov-Dec 2006.

SILVA, R.; OYARZUN, M.; OLLOQUEQUI, J. Pathogenic mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease due to biomass smoke exposure. **Arch Bronconeumol**, 51, n. 6, p. 285-292, Jun 2015.

THOMPSON, B. T.; CHAMBERS, R. C.; LIU, K. D. Acute Respiratory Distress Syndrome. *In: N Engl J Med*. United States, 2017. v. 377, p. 1904-1905.

TOLEDO-ARRUDA, A. C.; VIEIRA, R. P.; GUARNIER, F. A.; SUEHIRO, C. L. *et al.* Time-course effects of aerobic physical training in the prevention of cigarette smoke-induced COPD. **J Appl Physiol (1985)**, 123, n. 3, p. 674-683, Sep 1 2017.

UNITED STATES. PUBLIC HEALTH SERVICE. OFFICE OF THE SURGEON GENERAL. How tobacco smoke causes disease : the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease : a report of the Surgeon General. Rockville, M

Washington, DC: U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service For sale by the Supt. of Docs., U.S. G.P.O., 2010. xv, 704 p ISBN 9780160840784.

VALENCA, S. S.; SILVA BEZERRA, F.; LOPES, A. A.; ROMANA-SOUZA, B. *et al.* Oxidative stress in mouse plasma and lungs induced by cigarette smoke and lipopolysaccharide. **Environ Res**, 108, n. 2, p. 199-204, Oct 2008.

VALENTINE, G.; SOFUOGLU, M. Cognitive Effects of Nicotine: Recent Progress. **Curr Neuropharmacol**, 16, n. 4, p. 403-414, 2018.

WONG, J.; MAGUN, B. E.; WOOD, L. J. Lung inflammation caused by inhaled toxicants: a review. **Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**, 11, p. 1391-1401, 2016.

YANG, X.; GUO, A. L.; PANG, Y. P.; CHENG, X. J. *et al.* Astaxanthin Attenuates Environmental Tobacco Smoke-Induced Cognitive Deficits: A Critical Role of p38 MAPK. **Mar Drugs**, 17, n. 1, Jan 3 2019.

YUAN, M.; CROSS, S. J.; LOUGHLIN, S. E.; LESLIE, F. M. Nicotine and the adolescent brain. **J Physiol**, 593, n. Pt 16, p. 3397-3412, Aug 15 2015.

ZAMINELLI, T.; GRADOWSKI, R. W.; BASSANI, T. B.; BARBIERO, J. K. *et al.* Antidepressant and antioxidative effect of Ibuprofen in the rotenone model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, 26, n. 4, p. 351-362, Nov 2014.

ZANGROSSI, H., JR.; GRAEFF, F. G. Serotonin in anxiety and panic: contributions of the elevated T-maze. **Neurosci Biobehav Rev**, 46 Pt 3, p. 397-406, Oct 2014.

ANEXO

Anexo 1. Certificado de Aprovação do CEUA



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

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



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais n.º. **2017/15**, intitulado "***Mecanismo neural implícito aos efeitos da inflamação pulmonar sobre o sistema nervoso central e possível relação com o comportamento do tipo ansiedade e pânico em ratos wistar expostos á fumaça de cigarro.***", que tem como responsável o/a **Prof(a). Dr(a). Rodrigo Cunha Alvim de Menezes**, foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Wistar	230	3 meses	macho	CCA-UFOP

Restrição de dieta: () sim (x) não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 01/04/2021

Ouro Preto, 27 de junho de 2017.

Prof.ª Dr.ª Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da CEUA/UFOP.