

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

ESCOLA DE NUTRIÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E NUTRIÇÃO

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE UMA DIETA COM ALTO TEOR DE
CARBOIDRATOS REFINADOS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO**

KARINA BRAGA PENA

OURO PRETO, MINAS GERAIS

2016

KARINA BRAGA PENA

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE UMA DIETA COM ALTO TEOR DE
CARBOIDRATOS REFINADOS E A RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde e Nutrição.

Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

OURO PRETO, MINAS GERAIS

2016

P397a Pena, Karina Braga.
A associação entre uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro [manuscrito] / Karina Braga Pena. - 2016.
82f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição.
Área de Concentração: Bioquímica e Fisiopatologia da Nutrição.

1. Obesidade. 2. Fumo - Efeito fisiológico. 3. Reação de oxidação-redução. 4. Pulmões - Doenças. I. Bezerra, Frank Silva. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 612.396:616.24



ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado

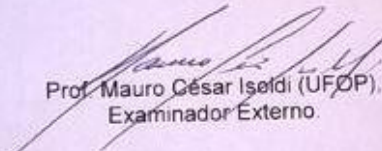
Aos quinze dias do mês de abril de dois mil e dezesseis, às nove horas, no Auditório da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, realizou-se a Defesa da Dissertação de Mestrado da aluna **Karina Braga Pena**. A Banca Examinadora, definida anteriormente, foi composta pelos Professores Daniela Caldeira Costa (UFOP), Mauro César Isoldi (UFOP) e Frank Silva Bezerra (UFOP). Dando início ao exame, a aluna apresentou sua Dissertação de Mestrado intitulada: **"A associação entre uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro"**. Após a apresentação, a candidata foi arguida pela Banca que avaliou o domínio do conteúdo metodológico e teórico relacionado à dissertação. Após julgamento, os membros da Banca decidiram por:



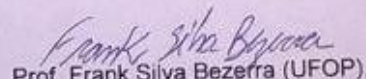
APROVAR

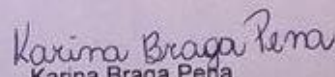


REPROVAR


Prof. Mauro César Isoldi (UFOP),
Examinador Externo.


Profa. Daniela Caldeira Costa (UFOP),
Examinadora Interna.


Prof. Frank Silva Bezerra (UFOP),
Orientador.


Karina Braga Pena,
Mestranda.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, aos meus pais Kátia e Haroldo, irmão Haroldo Filho e noivo Ricardo, por serem a base da minha vida e fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador professor Doutor Frank Silva Bezerra por ter me recebido de portas abertas quando ainda nem possuía um laboratório e as coisas eram muito mais difíceis do que são nos dias atuais. Pela oportunidade de conhecimento e crescimento acadêmico, por toda a paciência nesses anos e por podermos finalizar esta etapa juntos.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx) por todo o conhecimento compartilhado, pelas críticas construtivas, eutanásias, reuniões e pelos congressos e momentos de descontração. Muito obrigada Ana Beatriz Farias de Souza, Clarissa Rodrigues Nardeli, Dafne Fernandes Machado, Frederico Prado, Jacqueline Alfenas, Jéssica Sampaio, Keila Karine Duarte Campos, Lucas Antunes Araujo, Máira Tereza Talma Chirico, Mônica Campos Andrade, Natália Pereira da Silva Araújo, Thais Lourenço, Thalles de Freitas Castro.

De forma especial as amigas de laboratório e também de vida Camila de Oliveira Ramos, Nícia Pedreira Soares e Pamela Félix da Silva por todo o apoio nos experimentos e análises, pela consideração e incentivo em todos os momentos fora do laboratório e também por se tornarem amigas essenciais.

Agradeço também aos professores que integram o LAFEx, Doutor Luiz Eduardo de Souza por ser sempre gentil, Doutora Silvia Dantas Cangussu pelo carinho e auxílio na realização das análises histomorfométricas, e ao técnico Luís Nicolau dos Reis por ser sempre prestativo e auxiliar na organização e manutenção do nosso laboratório.

Agradeço a minha turma de mestrado 2014.1, em especial aos Mestres Filipe Rios Drummond, Mariana Araújo, Priscila Gabriela Braga por toda a amizade, consideração e incentivo em todos os momentos, e que fizeram com que esses dois anos valessem ainda mais a pena.

Aos amigos Jaqueline Schultz e doutorando Victor Neiva Lavorato pelo carinho, parceria e incentivo, além de serem exemplos de profissionais nesta Universidade.

Agradeço ao Ricardo Augusto Moreira de Souza Corrêa por ser o exemplo de professor que eu quero seguir na carreira acadêmica, por todo o auxílio prestado durante esses dois anos para que esta dissertação ficasse pronta de forma tão digna. Além disso, por toda a dedicação e amor com que transmite o seu conhecimento e dizer que é um mero acaso que seja também o meu noivo.

Aos meus tios Alda Rita de Cássia Braga Berbert e Gladstone Berbert por serem exemplos de professores e por todo o incentivo que me proporcionaram desde a infância, através da imensa admiração que sempre tive por eles. Agradeço por fazerem parte desta conquista e da carreira que estou almejando.

Aos colegas e professores do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição da Escola de Nutrição (ENUT) que me acompanharam nesses anos de mestrado, muito obrigada pelo conhecimento compartilhado.

Aos professores Doutores Marcelo Eustáquio da Silva por disponibilizar o biotério, o laboratório e os equipamentos para que este projeto fosse realizado; e André Talvani pela parceria e por disponibilizar o laboratório, os equipamentos e os alunos para a realização de várias análises, sem as quais não seria possível finalizar esta dissertação.

Ao Doutor Guilherme de Paula Costa por ser sempre tão solícito e por todo o auxílio na realização dos ensaios imunoenzimáticos, além do conhecimento compartilhado e por ter se tornado um amigo e exemplo a ser seguido.

A doutoranda Ana Carla Balthar Bandeira por todo o auxílio na realização de diversas análises e por ser sempre tão solícita.

Agradeço aos Laboratórios de Nutrição Experimental (LABNEX-ENUT), de Bioquímica Metabólica (LBM), de Imunologia da Inflamação (LII) e aos técnicos administrativos e funcionários Jair Pastor Mota, Clodoaldo e Renata Rebeca Pereira por toda a atenção, paciência e conhecimentos específicos compartilhados.

Ao Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), ao professor Doutor Roney Luiz de Carvalho Nicolato e aos técnicos administrativos Adão José da Rocha e Gustavo Silveira Breguez pela disponibilidade, atenção e realização das análises hematológicas.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro durante esses dois anos, a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) por possibilitar pela segunda vez um ensino de qualidade, por ser a minha segunda casa e também pelo apoio financeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição (ENUT) pela possibilidade de especialização na minha área de formação, pelo título de Mestre e pelo apoio financeiro.

A professora Doutora Marília Alfenas por ter sido uma das primeiras inspirações para que eu seguisse a carreira acadêmica. Por todo o carinho e incentivo com que acompanha os meus passos nesta Universidade.

Agradeço enfim aos professores Doutores Daniela Caldeira Costa e Mauro César Isoldi pela disponibilidade e por aceitarem fazer parte das bancas de qualificação e defesa de dissertação de mestrado, contribuindo para a qualidade e relevância deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial com influências genéticas, sociais e ambientais. A prevalência mundial desta doença tem aumentado, uma vez que está associada com outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Assim como a Obesidade, o Tabagismo é um problema de saúde pública mundial e fator de risco para muitas doenças. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos de uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e a resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro (FC). Utilizou-se 24 camundongos, machos, divididos em 4 grupos: grupo controle (GC) que recebeu dieta padrão; grupo exposto à fumaça de cigarro (GFC); grupo que recebeu uma dieta com alto teor de carboidratos refinados (GCR); e grupo que recebeu uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e foi exposto à fumaça de cigarro (GCRFC). Os animais foram controlados em relação à ingestão alimentar e o ganho de massa corporal durante 12 semanas. Após este período, os animais dos GFC e GCRFC foram expostos à FC por 5 dias consecutivos. Ao término do protocolo experimental, todos os animais foram eutanasiados para as análises posteriores. Os resultados mostraram que o GCR apresentou maior consumo calórico comparado ao GC. A massa corporal aumentou no GCR comparado aos GC e GFC, e aumentou no GCRFC comparado GFC. Os níveis plasmáticos de glicose em jejum aumentaram no GCR comparado ao GC. Os valores de eritrócito aumentaram no GFC comparado aos GC e GCR. Os valores de hematócrito e hemoglobina aumentaram no GFC comparado aos GC, GCR e GCRFC. A dieta não alterou os parâmetros bioquímicos de colesterol total, triglicérides, aspartato aminotransferase (AST) e creatinina nos grupos experimentais. No entanto, os níveis de alanina aminotransferase (ALT) diminuíram no GCRFC comparado ao GC, os níveis de fosfatase alcalina aumentaram no GCR comparado ao GFC e GCRFC; e os níveis de ureia diminuíram nos GFC, GCR e GCRFC comparados ao GC. Observou-se aumento de células inflamatórias no lavado broncoalveolar (LBA) do GFC comparado ao GC e do GCRFC comparado aos GC, GFC e GCR. Em relação as citocinas, houve diminuição no homogeneizado pulmonar do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no GCRFC comparado ao GFC e GCR, diminuição de interferon gama (IFN- γ) no GCR e GCRFC comparados ao GC, e diminuição de interleucina 10 (IL-10) no GCRFC comparado ao GC. Além disso, houve aumento no LBA de TNF- α no GCRFC comparado aos GC, GFC e GCR, aumento de IFN- γ no GCRFC comparado ao GFC, e aumento de IL-10 no GCRFC comparado ao GC e GCR. A densidade de volume alveolar (Vva) aumentou no GFC e GCRFC comparados aos GC e GCR, e a densidade de volume de septo alveolar (Vvsa) diminuiu no GFC comparado aos GC, GCR e GCRFC, e diminuiu no GCRFC comparado aos GC e GCR. A dieta aumentou o índice de adiposidade corporal (IAC) no GCR comparado aos GC, GFC e GCRFC. A concentração de leptina plasmática aumentou nos GCR e GCRFC comparados ao GC. A peroxidação lipídica aumentou no GCRFC comparado aos GC, GFC e GCR. Além disso, a oxidação de proteínas aumentou no GFC comparado ao GC. As análises do estresse oxidativo demonstraram aumento da superóxido dismutase (SOD) no GCRFC comparado aos GC, GFC e GCR, aumento da atividade de catalase (CAT) no GCRFC comparado ao GC. Em adição, houve diminuição da razão de glutathiona reduzida por glutathiona oxidada (GSH/GSSG) nos GFC, GCR e GCRFC comparados ao GC. Portanto, a administração da dieta alterou os parâmetros biométricos, bioquímicos e a associação com a exposição à FC potencializou a inflamação e o estresse oxidativo pulmonar.

Palavras-chave: Obesidade, fumaça de cigarro, estresse oxidativo, inflamação pulmonar.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial etiology disease with genetic, social and environmental influences. The worldwide prevalence of this disease has increased, since it is associated with other chronic non-communicable diseases (NCDs). As Obesity, tobacco is a worldwide public health problem and a risk factor for many diseases. This study aimed to evaluate the effects of a high refined carbohydrates diet and pulmonary inflammatory response in C57BL/6 mice exposed to cigarette smoke (CS). Twenty-four male mice were divided into 4 groups: control group (CG) which received a standard diet; cigarette smoke group (CSG) which was exposed to cigarette smoke; a high refined carbohydrate diet group (RG) which received a high refined carbohydrate diet; and a high refined carbohydrates diet and cigarette smoke group (RCSG) which received a high refined carbohydrate diet and was exposed to cigarette smoke. The animals were monitored for food intake and body weight gain for 12 weeks. After this period, the CSG and RCSG were exposed to CS for 5 consecutive days. At the end of the experimental protocol, all animals were euthanized for subsequent analyses. The results showed that RG had higher food intake compared with CG. The body mass increased in RG compared with CG and CSG and increase in RCSG compared to CSG. Oral glucose tolerance test (OGTT) showed an increase in blood glucose levels of RG compared with CG at initial time. The erythrocyte levels increased in CSG compared to CG and RG. Hematocrit and hemoglobin levels increased in the CSG compared to CG, RG and RCSG. The diet did not change the biochemical parameters of total cholesterol, triglycerides, aspartate aminotransferase (AST) and creatinine in the experimental groups. However, alanine aminotransferase levels (ALT) decreased in RCSG compared to CG, the alkaline phosphatase levels increased in RG compared to the CSG and RCSG; and urea levels decreased in the CSG, RG and RCSG compared to the CG. There was an increase of inflammatory cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) of CSG compared to the CG and RCSG compared to CG, CSG and RG. In relation to the cytokines, there was a decrease in the pulmonary homogenized of tumor necrosis factor alfa (TNF- α) in RCSG compared to CSG and RG, decrease of interferon gamma (IFN- γ) in the RG, and RCSG compared to CG and decreased of Interleukin 10 (IL-10) in RCSG compared to the CG. In addition, in the BAL there was an increase of TNF- α in RCSG compared to CG, CSG and RG, IFN- γ increase in RCSG compared to the CSG, and increased IL-10 in RCSG compared to CG and RG. Alveolar volume density (Vva) increased in CSG and RCSG compared to CG and RG, and the alveolar septa volume density (Vvsa) decreased in the CSG compared to CG, RG and RCSG, and decreased in RCSG when compared to CG and RG. The diet increased body adiposity index (BAI) in RG compared with CG, CSG and RCSG. The concentration of plasmatic leptin increased in RG compared with CG and RCSG. Lipid peroxidation increased in RCSG compared to CG, CSG and RG. Furthermore, the oxidation of proteins increased in CSG compared to CG. The analysis of oxidative stress showed an increase in of superoxide dismutase (SOD) in RCSG compared to CG, CSG and RG, and an increase in the catalase activity (CAT) in RCSG compared with CG. In addition, there was a decrease in the GSH/GSSG ratio of CSG, RG and RCSG compared to CG. Therefore, the administration of a high refined carbohydrate diet changed biometric and biochemical parameters and the association with exposure to CS promoted the increase of pulmonary inflammation and oxidative stress.

Keywords: Obesity, cigarette smoke, oxidative stress, pulmonary inflammation.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 21 |
| 2.1. Obesidade | 21 |
| 2.2. Tabagismo | 23 |
| 2.3. Estresse oxidativo..... | 27 |
| 3. OBJETIVOS..... | 30 |
| 3.1. Objetivo geral:..... | 30 |
| 3.2. Objetivos específicos:..... | 30 |
| 4. METODOLOGIA | 31 |
| 4.1. Cuidados éticos..... | 31 |
| 4.2. Animais..... | 31 |
| 4.3. Grupos experimentais..... | 31 |
| 4.4. Composição das dietas | 32 |
| 4.5. Ingestão alimentar e massa corporal..... | 33 |
| 4.6. Teste oral de tolerância à glicose..... | 33 |
| 4.7. Exposição à fumaça de cigarro..... | 33 |
| 4.8. Eutanásia..... | 34 |
| 4.9. Coleta do sangue..... | 34 |
| 4.9.1. Hemograma | 35 |
| 4.9.2. Análises bioquímicas do sangue..... | 35 |
| 4.10. Coleta do lavado broncoalveolar | 35 |
| 4.11. Pulmões | 36 |
| 4.11.1. Homogeneizado pulmonar..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 4.11.2. Ensaio imunoenzimáticos do homogeneizado pulmonar e do lavado broncoalveolar..... | 36 |
| 4.11.3. Processamento histológico | 37 |
| 4.11.4. Estereologia | 38 |
| 4.12. Tecido adiposo..... | 38 |
| 4.12.1. Índice de adiposidade corporal | 38 |
| 4.12.2. Ensaio imunoenzimático do tecido adiposo epididimal..... | 39 |
| 4.12.3. Análises histomorfométricas do tecido adiposo epididimal | 39 |
| 4.13. Análises do dano e estresse oxidativo | 39 |
| 4.13.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico | 39 |
| 4.13.2. Proteína Carbonilada | 40 |
| 4.13.3. Proteínas totais | 40 |
| 4.13.4. Atividade da superóxido dismutase | 41 |
| 4.13.5. Atividade da catalase | 41 |
| 4.13.6. Concentração da glutatona..... | 42 |
| 4.14. Análises estatísticas | 44 |
| 5. RESULTADOS..... | 45 |
| 5.1. Ingestão alimentar e massa corporal..... | 45 |
| 5.2. Teste oral de tolerância à glicose..... | 47 |
| 5.3. Hemograma | 48 |
| 5.4. Bioquímica do sangue | 49 |
| 5.5. Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar..... | 50 |
| 5.6. Pulmões | 51 |
| 5.6.1. Ensaio imunoenzimáticos | 51 |
| 5.6.2. Estereologia | 52 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 5.7. | Tecido adiposo..... | 56 |
| 5.7.1. | Índice de adiposidade corporal..... | 56 |
| 5.7.2. | Ensaio imunoenzimático..... | 56 |
| 5.7.3. | Análises histomorfométricas..... | 57 |
| 5.8. | Análises do estresse oxidativo nos pulmões..... | 60 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 61 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 67 |
| 8. | FINANCIAMENTO..... | 68 |
| 9. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 69 |
| 10. | ANEXOS..... | 81 |
| 10.1. | ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais..... | 81 |
| 10.2. | ANEXO II – Parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue..... | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Esquema ilustrativo do processo inflamatório no tecido adiposo. Adaptado de Speretta | 22 |
| Figura 2: Sistema Respiratório. Adaptado de Martini e Bartholomew | 24 |
| Figura 3: Esquema dos insultos oxidativos ocasionados pela fumaça de cigarro. Adaptado de Cantin e colaboradores | 26 |
| Figura 4: Esquema ilustrativo do sistema glutaciona. Adaptado de Cantin e colaboradores | 29 |
| Figura 5: Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) proposta por Valença e colaboradores | 34 |
| Figura 6: Consumo alimentar acumulado dos animais alimentados com dieta padrão e dieta com alto teor de carboidratos refinados. A) Consumo alimentar acumulado em gramas B) Consumo alimentar acumulado em quilocalorias.. | 46 |
| Figura 7: Massa corporal. A) Início do experimento B) Término do experimento.. | 47 |
| Figura 8: Níveis de Glicemia realizados nos grupos experimentais.. | 48 |
| Figura 9: Densidade de volume alveolar..... | 53 |
| Figura 10: Densidade de volume de septo alveolar..... | 54 |
| Figura 11: Fotomicrografias representativas de cortes do pulmão corados com HE. Aumento de 40x. | 55 |
| Figura 12: Índice de adiposidade corporal nos grupos experimentais.. | 56 |
| Figura 13: Níveis plasmáticos de leptina.. | 57 |
| Figura 14: Área dos adipócitos.. | 58 |
| Figura 15: Fotomicrografias representativas do tecido adiposo epididimal corados com HE. Aumento de 10x. | 59 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose das dietas | 32 |
| Tabela 2: Reagentes utilizados para a dosagem. | 41 |
| Tabela 3: Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão. | 43 |
| Tabela 4: Reagentes utilizados para a dosagem. | 43 |
| Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais..... | 49 |
| Tabela 6: Avaliações bioquímicas no sangue dos grupos experimentais..... | 50 |
| Tabela 7: Influxo de células no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais..... | 51 |
| Tabela 8: Análises imunoenzimáticas no homogeneizado pulmonar dos grupos experimentais..... | 52 |
| Tabela 9: Análises imunoenzimáticas no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais..... | 52 |
| Tabela 10: Avaliação bioquímica no homogeneizado pulmonar dos grupos experimentais..... | 60 |
| Tabela 11: Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de camundongos C57BL/6. | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- α** – Alfa
- γ** – Gama
- μL** – Microlitros
- ALP** – Fosfatase alcalina
- ALT** – Alanina aminotransferase
- AST** – Aspartato aminotransferase
- BHT** – 2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
- CAT** – Catalase
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- ChREBP** – Elemento responsivo ao carboidrato
- cm** – Centímetro
- CO** – Monóxido de carbono
- CO₂** – Dióxido de carbono
- DC** – Dieta controle
- DCNT** – Doenças crônicas não transmissíveis
- DH** – Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados
- DM** – Diabetes mellitus
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico
- DNPH** – 2,4-dinitrofenilhidrazina
- DPOC** – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- DTNB** – Ácido 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- e⁻** – Elétron livre
- EDTA** – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- ELISA** – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- ENUT** – Escola de Nutrição
- EROS** – Espécies reativas de oxigênio
- FC** – Fumaça de cigarro
- Fe** – Ferro
- g** – Gramas
- GC** – Grupo Controle

GFC – Grupo Fumaça de Cigarro

GDH – Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados

GDH+FC – Grupo Dieta com Alto Teor de Carboidratos Refinados e Fumaça de Cigarro

GPx – Glutathione peroxidase

GRd – Glutathione reductase

GSH – Glutathione reduzida

GSSG – Glutathione oxidada

H – Hidrogênio

HAS – Hipertensão arterial sistêmica

H₂O – Água

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

HCl – Ácido clorídrico

HE – Hematoxilina e Eosina

IAC – Índice de adiposidade corporal

ICEB – Instituto de Ciências Exatas e Biológicas

IFN – Interferon

IL – Interleucinas

IMC – Índice de Massa Corporal

IPA – Inflamação pulmonar aguda

Kcal – Quilocalorias

Kg – Quilogramas

KH₂PO₄ – Fosfato de potássio monobásico

KPE – Tampão contendo 0,1 M de tampão fosfato com 5 mM de sal dissódico EDTA, pH 7,5

L – Litro

LABNEX – Laboratório de Nutrição Experimental

LAFEx – Laboratório de Fisiopatologia Experimental

LAPAC – Laboratório Piloto de Análises Clínicas

LBA – Lavado broncoalveolar

LBM – Laboratório de Bioquímica Metabólica

LII – Laboratório de Imunobiologia da Inflamação

M – molar

mM – milimolar

MDA – Malondialdeído

mg – Miligramas

mL – Mililitros

MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazoli

Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina.

NRC – National Research Council

O₂ – Oxigênio molecular

O₂⁻ – Ânion superóxido

OH• – Radical hidroxila

OMS – Organização Mundial de Saúde (OMS)

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial Hidrogeniônico

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

Pp – Ponto a ponto

ppb – Partes por bilhão

ppm – Partes por milhão

Pt – Pontos totais

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SOD – Superóxido dismutase

SSA – ácido de sulfosalicílico

TAE – Tecido adiposo epididimal

TAM – Tecido adiposo mesentérico

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloroacético

TNB – 5-tio-2-ácido nitrobenzóico

TNF – Fator de necrose tumoral

TOTG – Teste oral de tolerância à glicose

UFOP – Universidade Federal de Ouro Preto

Vv [a] – Densidade de volume de alvéolo

Vv [sa] – Densidade de volume do septo alveolar

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença de etiologia multifatorial com influências genéticas, sociais e ambientais ¹. O aporte calórico excessivo e crônico principalmente em alimentos ricos em sal, açúcares e gorduras, porém pobres em vitaminas, minerais e outros micronutrientes, em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física), resultam em um acúmulo excessivo de gordura corporal através do desequilíbrio positivo a favor da quantidade de energia ingerida em contraste à energia gasta ².

Estudos relacionados à obesidade têm se intensificado devido ao aumento da prevalência dessa doença nas últimas décadas, o que a torna uma epidemia mundial. Em 2005, o número de indivíduos adultos com sobrepeso ou obesidade representou 54,7 % dos homens e 62,3 % das mulheres. Em relação ao ano de 2014, mais de 1,9 bilhões de adultos estavam acima do peso, e destes casos, mais de 600 milhões foram considerados como obesos (39% de sobrepeso e 13% de obesidade) ³. A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) de 2008-2009, no Brasil, verificou que o sobrepeso e a obesidade aumentaram na população de 20 anos de idade ou mais desde 1974. O sobrepeso aumentou entre os homens de 18,5% (1974-1975) para 50,1% (2008-2009), porém foi menor nas mulheres, de 28,7% para 48%. Em adição, a obesidade aumentou entre os homens, de 2,8% para 12,4%, e entre as mulheres, de 8% para 16,9% ⁴.

Em relação às condições socioeconômicas e gênero, estudos mostraram que em famílias com menor renda e indivíduos do gênero feminino são observadas uma maior prevalência da obesidade ⁵. Acredita-se que ocorre um aumento da obesidade em indivíduos de baixa renda uma vez que uma alimentação correta tem se tornado cada vez menos acessível, enquanto que alimentos industrializados e com grandes quantidades de carboidratos refinados e gorduras apresentam preços cada vez mais baixos nas gondolas dos supermercados. Adicionalmente, a probabilidade de prevalência de sobrepeso e obesidade é maior em mulheres de baixa renda com três ou mais filhos, o que pode indicar dificuldade destas mulheres em retornar ao peso ideal após a gestação, em concomitância com a abstenção de uma boa qualidade de vida para melhor cuidado dos filhos ⁶. Desta forma, essa doença representa um problema de saúde pública, uma vez que está associada a outras doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), tais como

dislipidemia, intolerância à glicose, diabetes mellitus, aterosclerose, hipertensão arterial sistêmica (HAS), insuficiência cardíaca e diversos tipos de cânceres ⁷. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) 2,8 milhões de pessoas vão a óbito a cada ano no mundo, como resultado de sobrepeso ou obesidade ². Portanto, é considerada a responsável por diversas consequências econômicas e de diminuição da qualidade e expectativa de vida ^{8; 9; 10}.

Assim como a Obesidade, o Tabagismo é um problema de saúde pública mundial e fator de risco para muitas doenças como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e o câncer ^{11; 12; 13; 14}. Além disso, é uma doença crônica e representa a 2ª causa de morbidade e mortalidade evitável no mundo ^{11; 15}. Logo, tem como consequência o óbito de 6 milhões de pessoas por ano no mundo e 200 mil óbitos por ano no Brasil. Deste modo, tabagistas adquirem um risco 71% maior de desenvolverem câncer (pulmão), 42% maior para doenças respiratórias e 10% maior para doenças cardiovasculares ¹⁵. As projeções da OMS para o ano de 2020 alertam que as consequências do hábito de fumar causarão cerca de 7,5 milhões de óbitos por ano, ou 10% de todos os óbitos ocorridos no mundo. Além disso, destes, mais de 80% ocorrerão em países em desenvolvimento ^{15; 16}. No Brasil um terço da população adulta é de fumantes, o correspondente a 16,7 milhões de homens e 11,2 milhões de mulheres. A prevalência destes casos, bem como os problemas de saúde causados pelo hábito de fumar, levou a OMS a considerar o tabagismo como epidemia mundial ¹⁷.

A fumaça de cigarro (FC) é composta por mais de 5.000 substâncias, o que a torna uma fonte exógena de radicais livres capazes de iniciar reações químicas cujos resultados causam disfunção celular e citotoxicidade ¹⁸. As espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) são produzidas nos organismos vivos como resultado do metabolismo celular e em baixas concentrações atuam na sinalização celular (combate a patógenos) ^{19; 20}. Segundo estudos de Fubini e Hubbard ²¹ e Perlstein e Lee ²², a FC produz espécies reativas que em altas concentrações promovem um dano biológico em moléculas, tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA), proteínas e ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares. Entretanto, o organismo humano é composto por um sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX) as quais agem na decomposição do ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e lipoperóxidos, respectivamente. No entanto, pode ocorrer um desequilíbrio entre a

produção destas espécies reativas em relação às enzimas antioxidantes, o que caracteriza o estresse oxidativo^{23; 24}.

Diante destes argumentos citados, torna-se necessário um estudo que associe as duas maiores causas de morte evitáveis do mundo, uma vez que tais condições estão, muitas vezes, concomitantes em diversos indivíduos. Nenhum estudo anterior se propôs a investigar tal associação, bem como os agravos da mesma aos insultos causados ao organismo. Desta forma, tomou-se este argumento como incentivo para desenvolvimento do estudo aqui apresentado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Obesidade

A obesidade é definida como um acúmulo de gordura anormal ou excessivo e prejudicial à saúde, além de ser uma consequência do estilo de vida sedentário da sociedade moderna²⁵. A patogênese ainda não foi totalmente elucidada²⁶, porém, sabe-se que tal doença não é definida por uma causa singular, mas sim por um conjunto heterogêneo de condições causadas por múltiplos fatores e por fim, resultam no fenótipo dessa doença. A etiologia apresenta contribuições genéticas, as quais podem ser amenizadas ou acentuadas por fatores como o ambiente externo e interações psicossociais interferentes nos mediadores fisiológicos de controle energético²⁷. A obesidade é um problema de saúde pública em todo o mundo devido a sua prevalência, mortalidade e a incapacidade física associada²⁸. Segundo a OMS³, houve um aumento da prevalência mundial entre os anos de 1980 e 2014. Assim, os valores para o ano de 2014 demonstraram que mais de 1,9 bilhões de adultos apresentaram sobrepeso, dos quais 600 milhões estavam obesos, dados correspondentes a 13% da população mundial.

Os indivíduos diagnosticados com essa doença podem desencadear resistência à insulina, dislipidemia e aterosclerose. Desta forma, é necessária a normalidade do tecido adiposo para a manutenção da homeostase lipídica e da glicose sistêmica²⁹. O reconhecimento do tecido adiposo como órgão endócrino ocorreu em 1994 com a descoberta da leptina³⁰, e por meio disso deixou de ser considerado apenas como um depósito de armazenamento de excesso de calorias. Logo, nos anos subsequentes, pesquisadores identificaram uma variedade de fatores biologicamente ativos secretados pelo tecido adiposo, denominados adipocitocinas²⁹.

A obesidade, em particular o acúmulo de gordura visceral, é considerada como uma inflamação crônica de baixo grau³¹ e apresenta fatores importantes para a iniciação e progressão de desordens metabólicas³². Assim, as adipocitocinas compreendem os mediadores pró-inflamatórios, por exemplo, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), Interleucina 6 (IL-6), Leptina e Resistina, responsáveis pela progressão da doença. Por outro lado, adipocitocinas anti-inflamatórias como Interleucina 10 (IL-10) e Adiponectina, normalmente encontradas em valores baixos nos indivíduos obesos, são

responsáveis pela proteção contra o desenvolvimento de complicações relacionadas a obesidade ³³.

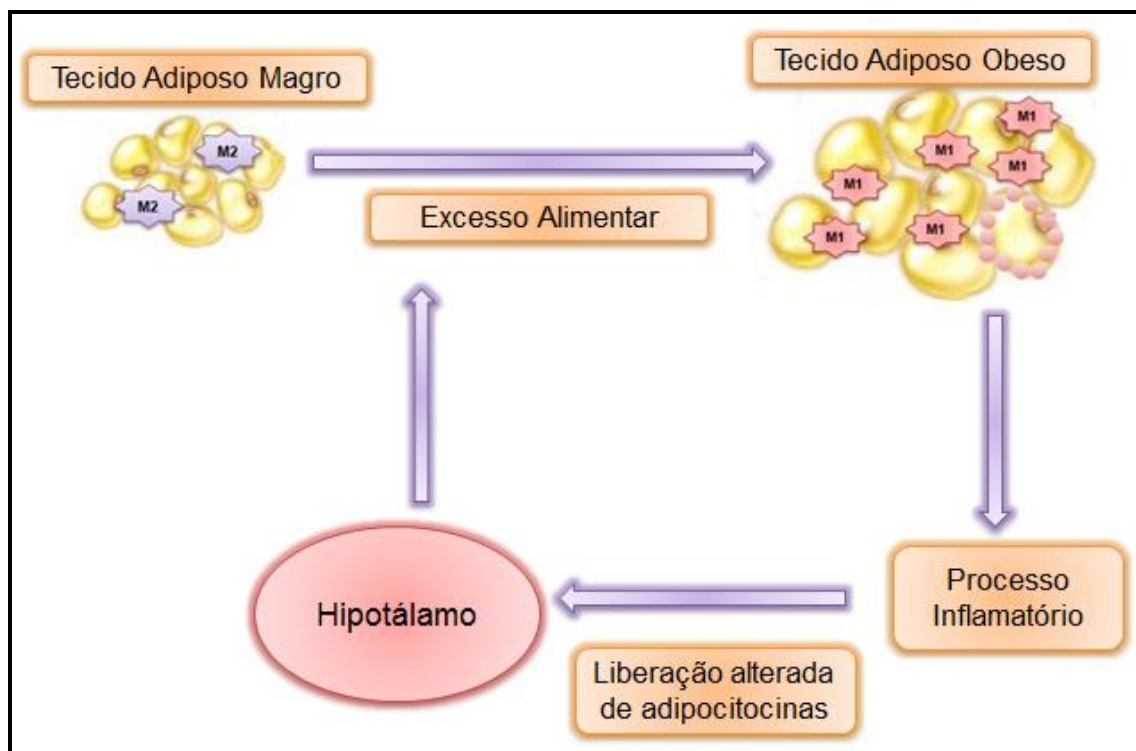


Figura 1: Esquema ilustrativo do processo inflamatório no tecido adiposo. Adaptado de Speretta ³⁴.

A obesidade em humanos pode ser diagnosticada através de vários parâmetros como o índice de massa corporal (IMC) que é calculado dividindo a massa corporal (em quilogramas) pela estatura ao quadrado (em metros), como mostra a seguinte fórmula ¹: $IMC = \text{Peso} / \text{altura}^2$. A classificação é realizada através do resultado desta equação, assim quando os valores estiverem entre 25 e 29,9; 30 a 34,9; 35 a 39,9 ou ≥ 40 o indivíduo (adulto) será diagnosticado com sobrepeso, obesidade grau I, II ou III respectivamente ³⁵. Entretanto, o IMC desconsidera a composição da massa corporal e, portanto não deve ser considerado como uma medida isolada para o diagnóstico de obesidade. Desta forma, esse índice deve ser complementado com outros parâmetros como a medida de pregas cutâneas, densitometria, bioimpedância, entre outras ³⁶.

Harrold e colaboradores ³⁷ descreveram que o modelo experimental semelhante ao modelo humano está condicionado a alimentos palatáveis. Estes alimentos são produzidos para gerar satisfação a quem os consome e promovem alterações neurológicas que podem ser permanentes e passar para os descendentes. Essas alterações causam um desequilíbrio fisiológico com modificações em processos

metabólicos envolvendo processos de memória, aprendizagem e influências do contexto social ³⁸. Assim, dietas hipercalóricas são comumente utilizadas em tentativas experimentais de indução da obesidade para mimetizar os efeitos orgânicos associados à adiposidade ^{39; 40; 41}. Nesses animais, a obesidade pode ser mensurada através do índice de adiposidade corporal (IAC), método utilizado para calcular o ganho de massa de camundongos. O IAC é calculado através do somatório de três depósitos de gordura branca: o tecido adiposo epididimal (TAE), tecido adiposo retroperitoneal (TAR) e o tecido adiposo mesentérico (TAM) dividido pela massa corporal vezes cem, conforme mostra a fórmula a seguir:

$$\text{IAC} = [(\text{TAE} + \text{TAR} + \text{TAM}) / \text{massa corporal}] \times 100 \text{ }^{42}$$

Este método é facilmente realizado e permite analisar os depósitos de gordura corporal de maneira consistente ⁴⁰. Para que estudos possam ser conduzidos nesses modelos, uma das alternativas para a indução da obesidade consiste na dieta com alto teor de carboidratos refinados. O desequilíbrio energético devido à ingestão excessiva de energia causa hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. Em adição, este saldo positivo também pode induzir a resistência à insulina no fígado, hiperlipidemia e intolerância à glicose ⁴³. A adoção destas dietas é utilizada devido ao fato dos carboidratos acionarem enzimas lipogênicas devido a ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo ao carboidrato (ChREBP), o que favorece o desenvolvimento da obesidade ⁴⁴. Desta forma, a finalidade de desenvolver modelos experimentais é a de colaborar na compreensão da fisiopatologia da obesidade, devido à sua semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes dessa doença em humanos ⁴⁵.

2.2. Tabagismo

O Sistema Respiratório é constituído pelos pulmões e por um seguimento de vias aéreas. A função primária dos pulmões é captar o oxigênio (O₂) para o organismo e eliminar o gás carbônico (CO₂) ⁴⁶. Adicionalmente, as vias aéreas são responsáveis por conduzirem o ar para dentro e para fora das cavidades pulmonares, além de atuarem no fornecimento do O₂ e na eliminação do CO₂ das células corporais ^{47; 48}. Esse sistema pode ser subdividido em uma porção condutora (responsável por transportar, filtrar, umidificar e aquecer o ar inspirado) e uma porção respiratória, responsável pela troca

gasosa de CO_2 por O_2 entre o ar contido em seus espaços e o sangue nos capilares adjacentes ^{47; 48}.

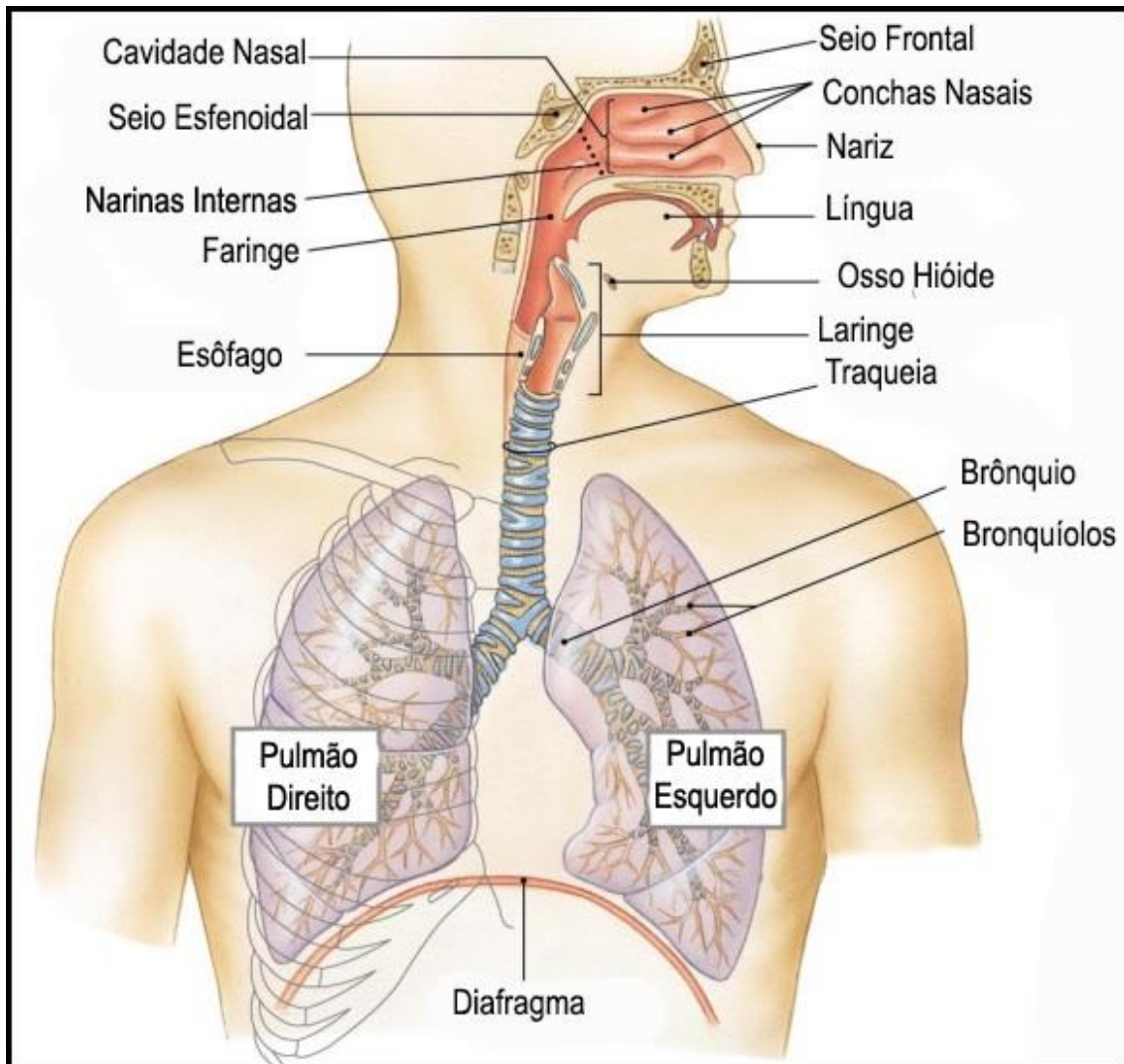


Figura 2: Sistema Respiratório. Adaptado de Martini e Bartholomew ⁴⁹.

As células pulmonares são suscetíveis aos efeitos nocivos dos insultos ambientais, por exemplo, aqueles causados pela FC ⁵⁰, uma mistura complexa composta por mais de 5.000 componentes químicos (por exemplo, CO, nicotina, acroleína, formaldeído e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos). Estima-se que o volume médio de aspiração em uma inalação de FC é de 35 mL e o número médio de aspirações por cigarro é de 15 mL, o que significa que um fumante inala 525 mL de fumaça por cigarro, 13L por dia para um maço ao dia, ou 5.000 L por ano ⁵¹. A FC é dividida em duas fases, a fase de alcatrão e a fase de gases, onde cada uma destas fases é uma fonte significativa de radicais livres. Na fase de alcatrão, moléculas estáveis podem gerar radicais livres, em um período de tempo prolongado. Em adição, na fase gasosa cada

inalação contém aproximadamente 10^{15} radicais livres e um grama de alcatrão contém 10^{17} radicais livres ⁵¹. As quinonas e hidroquinonas estão em equilíbrio na fase de alcatrão com os radicais semiquinona de longa duração, que reduzem o O_2 em ânion superóxido (O_2^-). O superóxido por sua vez, pode sofrer uma única redução para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma reação que é catalisada na presença da enzima SOD. A FC é fonte de metais a nível traço (concentrações entre 1 ppb e 1 ppm), por exemplo, ferro e chumbo. Na presença destes metais, o H_2O_2 é eficientemente reduzido através da reação de Fenton no radical hidroxila ($\bullet OH$). Ambos, superóxido e semiquinonas podem reduzir o ferro do seu estado férrico (Fe^{3+}) para o estado ferroso (Fe^{2+}). O ferro reduzido pode então catalisar a conversão de H_2O_2 em $\bullet OH$, um processo conhecido como a reação de Haber-Weiss ⁵¹. Embora o H_2O_2 seja tóxico, sua conversão para o $\bullet OH$ é desfavorável pois este apresenta poder oxidativo superior quando comparado ao H_2O_2 . Paralelamente, a fase gasosa da FC contém uma maior quantidade de intermediários de oxidação estáveis com potencial de induzir estresse oxidativo e inflamação, tais como acetaldeído, acroleína e crotonaldeído. Em fumantes e pacientes com DPOC, o aumento dos níveis de aldeídos foram documentados no ar expirado condensado e na saliva ⁵².

O material particulado da FC se deposita nas vias aéreas e nas superfícies das células epiteliais alveolares, por isso mecanismos de defesa inespecíficos e específicos estão envolvidos na remoção dessas substâncias. Dessa forma, as respostas imunes inatas e adaptativas são a forma de proteção contra substâncias tóxicas que atingem os alvéolos pulmonares. O sistema de defesa do pulmão é fornecido pela resposta inflamatória aguda que causa lesão tecidual pelo recrutamento e ativação de neutrófilos, eosinófilos e macrófagos ⁵³. Assim, quando estes são recrutados para os pulmões causam um desequilíbrio oxidante/antioxidante e protease/antiprotease ⁵¹.

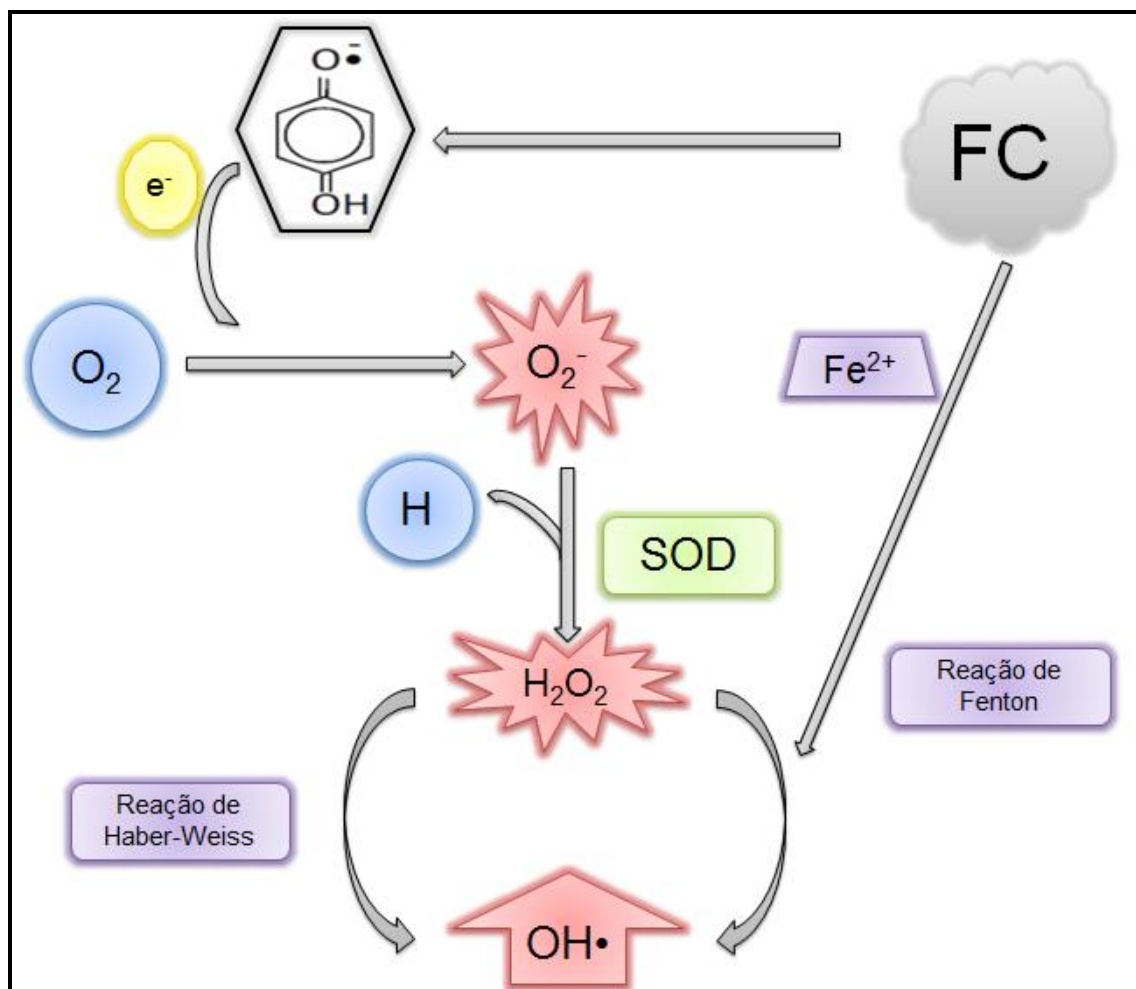


Figura 3: Esquema dos insultos oxidativos ocasionados pela fumaça de cigarro. Adaptado de Cantin e colaboradores⁵¹.

A quantidade elevada de moléculas oxidantes para as quais os pulmões de fumantes são expostos oferecem dificuldades para a manutenção da homeostase das vias aéreas e das células alveolares. Desta forma, inicia-se uma sequência de eventos de sinalização no retículo endoplasmático a fim de formar o sistema de defesa dos pulmões em relação aos oxidantes^{51; 54}. A exposição à FC tem sido relatada por induzir ou potencializar a inflamação através de mecanismos relacionados a diferentes tipos de células. As vias aéreas, as células epiteliais alveolares e os macrófagos alveolares são os alvos iniciais da exposição à FC e, em resposta, estas células produzem fatores quimiotáticos capazes de recrutar, para os pulmões, células inflamatórias da circulação sistêmica, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos⁵⁰. O consumo ativo de tabaco é o principal fator etiológico causador da DPOC, uma doença caracterizada pelo progressivo e parcialmente irreversível estreitamento do fluxo aéreo^{51; 55; 56}.

2.3. Estresse oxidativo

As EROs são produzidas nos organismos vivos como resultado do metabolismo celular. Desta forma, em baixas concentrações essas espécies reativas atuam em processos biológicos, por exemplo, a sinalização celular, onde atuam no combate a patógenos. Por outro lado, em concentrações elevadas produzem modificações adversas aos componentes celulares, tais como lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucleico (DNA) ²⁰. As EROs são formadas principalmente nas mitocôndrias, onde o O₂ é o acceptor final de elétrons no metabolismo oxidativo da respiração celular. Na acepção de um elétron não emparelhado pelo O₂ molecular há formação do radical superóxido ($\bullet\text{O}_2$), uma espécie reativa, com baixo tempo de meia vida capaz de promover dano biológico. A doação de um segundo elétron ao $\bullet\text{O}_2^-$, com consecutiva protonação, ocasiona a formação do H₂O₂. Embora não seja um radical, este apresenta alta reatividade e assim proporciona a formação de outras espécies reativas, como o $\bullet\text{OH}$. Em casos prolongados, pode ocorrer dano ao DNA com posterior instabilidade genômica e contribuição para carcinogênese. Em adição, qualquer lesão biológica sem reparação pode tornar-se uma mutação permanente na célula com capacidade de replicação, e por meio disso aumentar o risco de carcinogênese ¹⁹. No entanto, é improvável que o $\bullet\text{OH}$ gerado no compartimento celular possa difundir-se para o núcleo, devido à sua reatividade. Desta forma, tem sido proposto que o H₂O₂ sirva como uma forma latente de $\bullet\text{OH}$ que reage com um íon metal de uma molécula de DNA para gerar as espécies oxidantes ^{19; 20}.

As EROs são divididas em dois grupos: os radicais livres e os compostos não-radicaais. As moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados são chamadas de radicais livres. Quando dois radicais livres compartilham seus elétrons desemparelhados, as formas não radicalares são formadas. As três principais EROs, citadas anteriormente, e com importância fisiológica são: $\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$ e H₂O₂ ^{19; 20}. Além das propriedades mencionadas acima, as EROs funcionam como mensageiros secundários nas respostas celulares mediadas por receptores e assim alteram o equilíbrio redox intracelular.

O desequilíbrio entre oxidantes/antioxidantes, seja este em favor de qualquer um dos processos é denominado estresse oxidativo. O aumento do desequilíbrio em favor dos oxidantes é resultado dos compostos químicos presentes na FC e de poluentes

presentes no ar ambiente. Além disso podem ser gerados por células inflamatórias ativadas, tais como macrófagos e neutrófilos ⁵⁷.

A FC aumenta a concentração das EROs nos pulmões e acarreta na redução de antioxidantes pulmonares, seja pela composição da FC ou através das células inflamatórias. Adicionalmente, a presença da FC nos pulmões é responsável pela Inflamação Pulmonar Aguda (IPA) ⁵⁸. A FC causa uma resposta inflamatória no trato respiratório inferior, caracterizada pelo acúmulo de macrófagos e neutrófilos. Estas células inflamatórias ativadas liberam uma variedade de mediadores como proteases, oxidantes e peptídeos tóxicos, capazes de danificar as estruturas dos pulmões e, acredita-se ser uma das principais causas da destruição de tecidos, com consequente desenvolvimento de DPOC quando tal dano ocorre por longos períodos de tempo ^{59: 60}. O estresse oxidativo contribui para condições patológicas, por exemplo, câncer, doenças neurológicas, aterosclerose, HAS, isquemia, DM, doenças respiratórias agudas, fibrose pulmonar idiopática, DPOC e asma ¹⁹. Assim como a FC, a obesidade é responsável por acarretar aumento das EROs, porém, é desconhecido o papel desta doença sobre o estresse oxidativo pulmonar ^{61; 62}.

Para combater os efeitos do estresse oxidativo e tentar manter o equilíbrio, o organismo conta com sistemas de defesa baseados na ação de enzimas antioxidantes. Dentre estas, destacam-se a SOD, que é responsável pela dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; e a Catalase que, por sua vez, decompõe o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ⁵¹. Outra alternativa para contornar o processo de estresse oxidativo ocorre por meio da enzima glutatona peroxidase (GPx), onde o organismo converte glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG), reduzindo o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a água (H₂O). Para manter o equilíbrio redox e a reversibilidade da reação, a enzima glutatona redutase (GRd) é capaz de converter a GSSG em GSH, ao custo da oxidação de moléculas de NADPH ⁵¹.

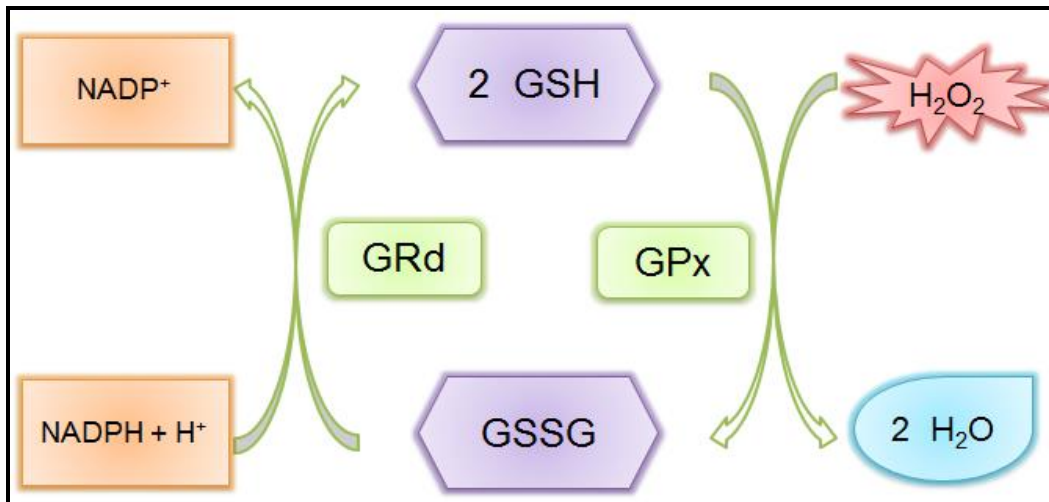


Figura 4: Esquema ilustrativo do sistema glutatona. Adaptado de Cantin e colaboradores ⁵¹.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

Avaliar os efeitos de uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e a resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro.

3.2. Objetivos específicos:

- I. Avaliar os efeitos da dieta com alto teor de carboidratos refinados sobre: a ingestão alimentar, a massa corporal, o índice de adiposidade corporal e a leptina plasmática dos animais;
- II. Analisar os parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue;
- III. Analisar e comparar o influxo de células inflamatórias no parênquima pulmonar;
- IV. Realizar dosagens de citocinas no homogeneizado pulmonar e lavado broncoalveolar;
- V. Analisar os parâmetros de estresse oxidativo no homogeneizado pulmonar;
- VI. Analisar o padrão histológico do parênquima pulmonar e do tecido adiposo epididimal.

4. METODOLOGIA

A coleta e análise dos dados desta dissertação foram realizadas no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx-ICEB), Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX-ENUT), Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM-ICEB), Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LII-ICEB) e Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC).

4.1. Cuidados éticos

Os procedimentos deste projeto obedeceram aos Princípios Éticos da Experimentação Animal estabelecidos pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA-UFOP) e foram aprovados sob o protocolo nº 2014/06 (ANEXO I).

4.2. Animais

Os animais utilizados foram camundongos da linhagem C57BL/6, machos, com idade entre 5 a 7 semanas e um total de 24 animais, provenientes do LABNEX/ENUT - UFOP. Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno, com seis animais por caixa, mantidos em ambiente com condições de luz, temperatura e umidade controladas.

4.3. Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos:

Grupo Dieta Controle (GC): animais que receberam uma dieta padrão para roedores Labina-Purina durante 12 semanas (n=6);

Grupo Dieta Controle e Exposição à Fumaça de Cigarro (GFC): animais que receberam uma dieta padrão para roedores Labina-Purina durante 12 semanas e foram expostos à fumaça de cigarro por 5 dias consecutivos (n=6). A exposição em curto prazo foi escolhida com base em resultados já obtidos em trabalhos anteriores do grupo

Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados (GCR): animais que receberam uma dieta com alto teor de carboidratos refinados durante 12 semanas (n=6);

Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados e Exposição à Fumaça de Cigarro (GCRFC): animais que receberam uma dieta com alto teor de carboidratos refinados durante 12 semanas e foram expostos à fumaça de cigarro por 5 dias consecutivos (n=6).

4.4. Composição das dietas

Os animais dos grupos GC e GFC foram alimentados com dieta padrão Labina-Purina e os camundongos dos grupos GCR e GCRFC foram alimentados com dieta de alta palatabilidade, composta por 10% de açúcar cristal, 45% de ração padrão e 45% de leite condensado Nestlé®, utilizada para promover o ganho de massa corporal nos animais conforme descrito por Oliveira e colaboradores ⁴² e Menezes-Garcia e colaboradores ⁶⁴. Os requerimentos nutricionais apresentados por ambas às dietas são compatíveis com as recomendações do NRC (National Research Council - Nutrient Requirements of Laboratory of the mouse) ⁶⁵.

Tabela 1: Composição nutricional e análise quantitativa de sacarose das dietas ⁴².

| | DC* | DH* |
|-------------------|-------|-------|
| Calorias (Kcal/g) | 4,0 | 4,4 |
| Carboidratos (%) | 65,8 | 74,2 |
| Lipídeos (%) | 3,1 | 5,8 |
| Proteínas (%) | 31,1 | 20,0 |
| Sacarose (%) | 37,04 | 48,40 |

*DC: Dieta Controle. DH: Dieta com alto teor de carboidratos refinados.

4.5. Ingestão alimentar e massa corporal

O controle da ingestão de alimentos e do ganho de massa corporal foi realizado uma vez por semana. As dietas foram pesadas antes de serem servidas para os animais e após uma semana de consumo, assim como a quantidade que foi desperdiçada com as fezes, desta forma foi mensurada a quantidade ingerida. Além disso, para o controle do ganho de massa corporal os animais foram pesados individualmente através de uma balança digital (MARK®, Série M/ *Bel* Equipamentos Analíticos LTDA, São Paulo, Brasil).

4.6. Teste oral de tolerância à glicose

Após 11 semanas de experimento, os animais foram utilizados para mensurar a sensibilidade à insulina utilizando um teste oral de tolerância à glicose (TOTG). Para a realização do teste, os animais permaneceram 12 horas em jejum e receberam uma solução contendo 2,5 g de glicose por kg de massa corporal, via gavagem orogástrica. Assim, a glicemia foi determinada nos tempos zero (antes da sobrecarga), 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração da solução, com o auxílio de um glicosímetro automatizado (Accu-Chek® Advantage / Roche Diagnóstica Brasil Ltda.) e fitas para mensurar a glicose sanguínea^{42; 64}.

4.7. Exposição à fumaça de cigarro

Os camundongos C57BL/6 foram expostos a 12 cigarros comerciais filtrados Virginia (10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro) por dia, divididos em três vezes ao dia (manhã, tarde e noite, quatro cigarros por inalação) durante cinco dias consecutivos. Os camundongos dos GFC e GCRFC foram colocados na câmara de inalação (40 cm comprimento, 30 cm largura e 25 cm altura), dentro de uma capela de exaustão. Cada cigarro foi acoplado a uma seringa plástica de 60 mL, com a qual foi injetada a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa foi finalizado com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Um cigarro gerou aproximadamente 1 L de fumaça que foi diluído em 30 L (capacidade da câmara). Portanto, a concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% por cigarro durante

6 minutos (que produziu concentrações de CO que variam de 250 para 350 ppm no interior da câmara). Após este período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça e, por 1 minuto, os animais tiveram contato com o ar ambiente, quando então, o procedimento foi repetido com os demais cigarros ^{66; 67; 68; 69}. Os animais considerados grupo controle foram submetidos às mesmas condições citadas acima, com exceção da utilização dos cigarros.

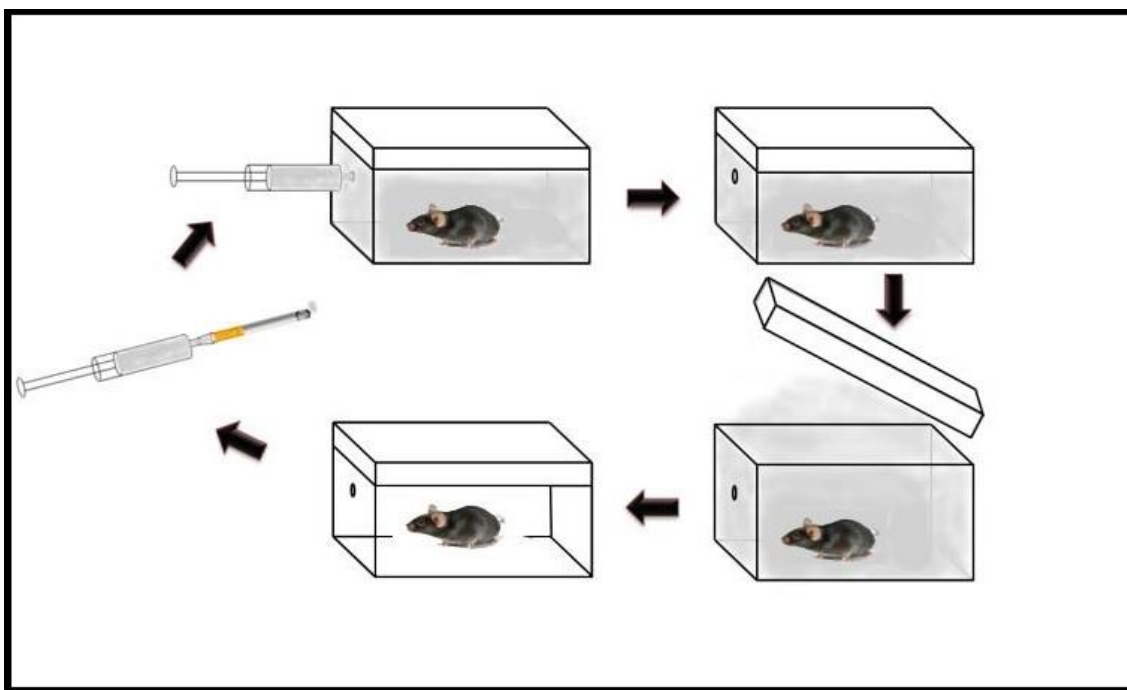


Figura 5: Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) proposta por Valença e colaboradores ⁶⁷.

4.8. Eutanásia

Os animais foram deixados em jejum por 12 horas após o término do experimento e, em seguida, foram submetidos à anestesia com Ketamina (130 mg/kg) e Xilazina (0,3mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação. O sangue, o lavado broncoalveolar (LBA), os pulmões e os coxins adiposos (retroperitoneal, epididimal e mesentérico) foram coletados para posteriores análises.

4.9. Coleta do sangue

A coleta do sangue foi realizada através da técnica de punção cardíaca onde duas alíquotas sanguíneas de cada animal foram coletadas em tubos de polipropileno com 15

μL de anticoagulantes (heparina) para obtenção do plasma. A primeira alíquota com 200 μL de sangue foi encaminhada ao LAPAC - UFOP para a realização do Hemograma. A segunda alíquota com aproximadamente 800 μL foi centrifugada a 10.000 RPM por 15 minutos e o sobrenadante foi retirado e armazenado em um freezer (-80°C) para a realização das seguintes dosagens bioquímicas: leptina, triglicerídeos, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), ureia e creatinina que foram realizadas no mesmo laboratório.

4.9.1. Hemograma

Para a realização do hemograma, a alíquota com 200 μL de sangue foi diluída em solução salina (1:2) e os parâmetros hematológicos avaliados utilizando aparelho de contagem eletrônica (ABX diagnostics, micro 60) do LAPAC - UFOP. Os parâmetros determinados foram eritrócitos, hematócritos e hemoglobina.

4.9.2. Análises bioquímicas do sangue

As concentrações de triglicerídeos e colesterol total, ALT, AST, ALP, ureia e creatinina foram determinadas por espectrofotometria automática no analisador clínico Randon Access Clinical Analyser, Wiener Lab, modelo CM-200 (WIENER LAB, Rosario, Argentina) pelo método enzimático-colorimétrico por meio de kits específicos disponíveis comercialmente (Bioclin®, Quibasa), e foi realizado pelo técnico responsável do LAPAC - UFOP.

4.10. Coleta do lavado broncoalveolar

Imediatamente após a eutanásia, o tórax de cada animal foi aberto para a coleta do LBA. O pulmão esquerdo foi clampeado, a traquéia canulada e o pulmão direito foi lavado com 1,5 mL de solução salina (3 x 500 μL). As amostras foram mantidas no gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Para a contagem total de leucócitos no LBA, foi utilizada a câmara de Neubauer, onde foi colocado 0,1 mL do LBA e 0,3 mL de corante azul de tripano 0,2%, obtendo assim uma diluição de 1/4. Logo após, os leucócitos foram contados nos quatro quadrados encontrados nos extremos da câmara. Para a contagem diferencial de células no LBA, 250 μL das amostras foram cito-centrifugadas em uma centrífuga cytopspin (Shandon, Waltham,

MA, EUA) na qual foram colocadas lâminas e centrifugadas a 1.000 RPM durante 1 minuto. Após a obtenção das lâminas, estas foram coradas com o *kit Panótico Rápido*, através de 7 banhos de imersão em cada uma das três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente para a retirada do excesso de corantes, e secadas em temperatura ambiente. Um total de 100 células por lâmina foi contado utilizando o critério morfológico padrão⁷⁰.

4.11. Pulmões

4.11.1. Homogeneizado pulmonar

A quantidade referente a 0,1 g do pulmão direito e 1,5 mL de tampão (KPE) foram adicionados ao tubo de hemólise e homogeneizado em 5 repetições séricas, por meio de um homogeneizador de tecidos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 10.000 RPM durante 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -80 °C para as análises bioquímicas.

4.11.2. Ensaios imunoenzimáticos do homogeneizado pulmonar e do lavado broncoalveolar

As análises teciduais e do LBA de TNF- α , IFN- γ e IL-10, foram realizadas sob um protocolo no qual 10 mg de tecido foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato (PBS), e para o LBA foram utilizados 100 μ L. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o conteúdo final foi coletado e armazenado a -80 °C para posterior análise por meio do método de ELISA. Para estes ensaios foram utilizados kits, sendo todos os anticorpos e reagentes reconstituídos e aliquotados de acordo com as orientações dos fabricantes. Em placas de 96 poços foram adicionados 100 μ l de anticorpo monoclonal contra o peptídeo (anticorpo de captura), reconstituído em PBS, sendo estas placas incubadas por 12 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos não adsorvidos pelas placas foram descartados, por inversão e sucessivas lavagens em PBS-*Tween* (PBS adicionado de 0,05% de *Tween* 20) e as placas foram bloqueadas com 100 μ l/poço de uma solução contendo PBS-BSA 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. A seguir as placas foram novamente lavadas. As amostras foram aplicadas em um volume de 100 μ l para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da

curva padrão e, a seguir, foi realizada incubação por 2 horas em temperatura ambiente. Os anticorpos secundários (anticorpo de detecção), após os poços serem devidamente lavados, foram diluídos em PBS-BSA 0,1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. A placa foi novamente lavada e 100 µl de estreptoavidina ligada à peroxidase (na diluição recomendada pelo protocolo de cada kit) em PBS-BSA 0,1% foram adicionados à placa e a mesma incubada por 20 minutos à temperatura ambiente. O cromógeno escolhido para revelação foi a Tetrametilbenzidina (*Color Reagent B* - R&D Systems, Minneapolis, USA). 5 mL do cromógeno foi adicionado a 5 mL de água oxigenada (H₂O₂) fornecida pelo mesmo fabricante (*Color reagent A* - R&D Systems, Minneapolis, USA). 100 µL dessa solução foram adicionados em cada um dos poços e após 20 minutos de incubação em ausência de luz e temperatura ambiente, a reação foi bloqueada adicionando-se 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2,5 M por poço. A leitura da intensidade de coloração foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 450 nm, imediatamente após a adição de H₂SO₄ para o bloqueio das reações. A quantificação das citocinas presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão dos peptídeos, analisadas pelo software SOFTmax PRO 4.0.

4.11.3. Processamento histológico

Após a realização do lavado broncoalveolar, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. O pulmão direito foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traquéia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cmH₂O por 2 minutos. O pulmão esquerdo então foi removido e imerso em solução fixadora por 48 horas. Em seguida, o material foi processado da seguinte forma: banho em água corrente por 30 minutos, banho em álcool a 70% e 90% por 1 h cada etapa, 2 banhos em álcool a 100% por 1 h cada, 2 banhos de xilol de 1 h cada, 2 banhos em parafina de 1 h cada e inclusão em parafina. Após o processamento de rotina e inclusão em parafina, foram realizados cortes seriados a quatro micrômetros de espessura, os quais foram corados em hematoxilina-eosina (HE) para a análise morfométrica.

4.11.4. Estereologia

A análise da densidade de volume do septo alveolar V_v [sa] foi realizada em um sistema-teste composto por 16 pontos e em uma área-teste conhecida^{68; 71} onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. O número de pontos (Pp) que atingiram os septos alveolares (V_v [sa]) e os espaços alveolares (V_v [a]) foram avaliados de acordo com o número total de pontos de um sistema teste (Pt). Então: $V_v = Pp/Pt$. Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 18 campos e um sistema ciclóide de ensaio sobreposto sobre a tela do monitor. O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos de utilização dos sistemas de ponto de teste (Pt). Uma área total de 1,94 mm² foi analisada para determinar as densidades de volumes dos septos alveolares (V_v [sa]) e dos espaços alveolares (V_v [a]) em cortes corados em HE, respectivamente.

4.12. Tecido adiposo

4.12.1. Índice de adiposidade corporal

Os coxins adiposos (retroperitonal, epididimal e mesentérico) foram coletados durante a eutanásia e posteriormente pesados em balança de precisão de 0,001g para determinação do índice de adiposidade que foi calculado segundo a seguinte equação⁴²:

$$IAC = \frac{(TAE+TAR+TAM)}{\text{Massa corporal}} \times 100$$

IAC: Índice de adiposidade

TAE: Tecido adiposo epididimal

TAR: Tecido adiposo retroperitonal

TAM: Tecido adiposo mesentérico

4.12.2. Ensaio imunoenzimático do tecido adiposo epididimal

O TAE foi aliquoteado e congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análise posterior de leptina. As concentrações plasmáticas de leptina foram determinadas através do método ELISA utilizando-se kit específico (Kits de ELISA R & D Systems) conforme descrito previamente para os pulmões.

4.12.3. Análises histomorfométricas do tecido adiposo epididimal

As análises foram realizadas com 400 mg de TAE que foram fixados em formaldeído por 48 horas e em seguida, o material foi processado da mesma forma que o pulmão esquerdo. As análises histomorfométricas dos adipócitos foram realizadas através de fotomicrografias das lâminas em microscópio de luz equipado com câmera digital (Leica DFC 300 FX) acoplada e associada ao software de captura de imagens Leica Application Suite e foi utilizada uma lente objetiva com aumento de 10 vezes. A área foi obtida por meio da medida aleatória de 50 adipócitos por lâmina através do programa Image J® (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA)^{42; 64}.

4.13. Análises do dano e estresse oxidativo

4.13.1. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi determinada por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando o método de Buege e colaboradores⁷². A concentração de TBARS é baseada na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em se ligar a lipídios oxidados. Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do pulmão foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (pH 7,4) e, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo foram adicionados 500 μL de homogeneizado, 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) 28% p/v dissolvido em HCL (0,25 M), 250 μL de TBA 1% dissolvido em ácido acético (0,25 M) e 125 μL de hidroxibutiltolueno (BHT 125 mM) dissolvidos em etanol. Em seguida, o tubo foi levado ao vórtex e colocado em banho-maria a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Após serem resfriados em banho de gelo, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a absorbância do sobrenadante determinada a 535 nm. Água destilada foi

utilizada como branco. A concentração de TBARS foi calculada através do coeficiente de extinção molar do malondialdeído (MDA) ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). De acordo com a lei de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$), onde: A = absorvância; ϵ = coeficiente de extinção molar em unidades de $\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$; b = caminho óptico; c = concentração da enzima expressa em mol L^{-1} . Esta concentração foi representada em nM/mg de proteína.

4.13.2. Proteína Carbonilada

A reação das EROs com a porção proteica da membrana celular pode levar à oxidação desta com a consequente formação de derivados carbonílicos. Assim, para a determinação da concentração de proteína carbonilada no homogeneizado pulmonar foi utilizado o método descrito por Levine⁷³. Cada amostra foi precipitada com TCA (ácido tricloroacético) a 10%. Após a centrifugação, o precipitado foi tratado com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), incubado no escuro em temperatura ambiente por uma hora e passado no vórtex a cada 15 minutos. Logo após foi administrado TCA 10% seguido de centrifugação, as amostras foram lavadas duas vezes com composto etanol/acetato de etila (1:1) e dissolvidas em 1 mL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 6% seguido por centrifugação. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro à 370 nm. O conteúdo de proteína carbonilada foi calculado usando o coeficiente de extinção molar de $22\,000 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ e expresso por nmol de proteína carbonilada formada por mg de proteína. Os resultados foram expressos em nmol/mg proteína. A dosagem de proteínas foi realizada pelo Método de Bradford⁷⁴.

4.13.3. Proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford⁷⁴. O reagente de Bradford contém como principal componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga às proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Esta concentração foi representada em mg/mL.

4.13.4. Atividade da superóxido dismutase

A atividade da SOD foi medida no homogeneizado pulmonar de acordo com o método de Marklund e colaboradores ⁷⁵ que se baseia na capacidade da enzima em inibir a auto-oxidação do pirogalol. Os reagentes de trabalho utilizados foram: fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Pirogalol, brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difenilterazolio (MTT) e dimetilsulfóxido DMSO. Para a realização da dosagem, fragmentos de 100 mg do tecido foram homogeneizados com 1 mL de tampão fosfato (50 mM), pH 7,0, em seguida, centrifugados por 10 minutos a 12.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. A confecção das dosagens nas amostras utilizando a placa de Elisa seguiu a sequência de adições de reagentes, conforme a tabela a seguir.

Tabela 2: Reagentes utilizados para a dosagem.

| Poço | 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. Para o cálculo da concentração 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. Esta concentração foi representada em U/mg ptn.

4.13.5. Atividade da catalase

A determinação da atividade da enzima CAT é baseada na sua capacidade de converter H_2O_2 em água e O_2 molecular, conforme descrito por Aebi ⁷⁶. Para a preparação da amostra biológica 100 mg do pulmão foram homogeneizados com 1 mL

de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e em seguida, foram centrifugados por 10 minutos a 10.000 RPM a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Em um tubo de polipropileno, foi adicionado 50 µL de tampão fosfato 0,1 mM (pH 7,2) e 40 µL de água destilada, o qual foi mantido em banho-maria a 30 °C por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 10 µL das amostras e 900 µL de H₂O₂ (10 mM). As absorvâncias foram determinadas no espectrofotômetro a 240 nm, exatamente a cada minuto, durante 3 minutos. A água destilada é utilizada como branco. A atividade da CAT foi calculada segundo a lei de Lambert Beer citada anteriormente. A absorvância utilizada nessa expressão é o delta obtido da primeira e da última absorvância lida (absorvância final - absorvância inicial). O coeficiente de extinção molar utilizado foi o do H₂O₂ (39,4 M⁻¹cm⁻¹). Esta concentração foi representada em U/mg ptn. Uma unidade de catalase é equivalente a hidrólise de 1 µmol de H₂O₂ por minuto.

4.13.6. Concentração da glutaciona

A Glutaciona total (GSH + GSSG) foi determinada enzimaticamente de acordo com Akerboom e colaboradores ⁷⁷. Esse ensaio utilizou um método cinético fundamentado na redução do ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB). A GSH presente na amostra reage com DTNB, produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e GSSG. Para preparo dos reagentes de estoque foram utilizados: solução de ácido sulfosalicílico (SSA) 5%; tampão fosfato (500 mM), contendo 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); solução padrão estoque de glutaciona (0,3 mg de glutaciona reduzida em 0,1 mL de água destilada); solução de estoque de DTNB (8 mg de DTNB foram diluídos em 5,33 mL de DMSO) o que resultou em uma solução com 1,5 mg/mL e estoque de NADPH (40 mg/mL). A amostra biológica foi preparada com 100 mg do pulmão homogeneizado em 1 mL de SSA 5% e em seguida, centrifugada a 10.000 RPM, por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e utilizado como amostra biológica. Os reagentes utilizados foram: solução de enzima diluída (15,2 µL de glutaciona redutase (100 unidades/mL) diluída em 250 µL de tampão fosfato 100 mM); solução de NADPH de trabalho (da solução de estoque de NADPH preparada são retirados 30 µL para 7,5 mL de tampão fosfato 100 mM); mistura de trabalho (8 mL de tampão 100 mM, 228 µL da solução de enzimas diluída e 228 µL de DNPH solução de estoque); solução padrão de glutaciona – preparada para a curva padrão (foi diluído 10 µL de solução estoque de glutaciona padrão com 2 mL de SSA 5%). Para a confecção da

curva padrão e das dosagens nas amostras foi utilizado placa de Elisa seguindo a sequência de adições de reagentes, conforme mostradas nas tabelas a seguir.

Tabela 3: Reagentes utilizados para obtenção da curva padrão.

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

Tabela 4: Reagentes utilizados para a dosagem.

| Poço | Volume da amostra | Tampão | MTT (1,25 mM) | Pirogalol (100 μM) |
|---------|-------------------|------------------|-------------------|--------------------------------|
| Branco | - | 10 μl | 150 μl | 50 μl |
| Padrão | 10 μl | - | 150 μl | 50 μl |
| Amostra | 10 μl | - | 150 μl | 50 μl |

As amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi adicionado NADPH às mesmas com o cronômetro sendo iniciado. As absorbâncias foram lidas, durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de Elisa a 412 nm. As absorbâncias de diluições seriadas de uma solução padrão de glutatona reduzida foram determinadas e a GSSG já presente na amostra foi reduzida a GSH pela presença de NADPH (chamado de método enzimático), medido após derivação da glutatona total com acréscimo de 2-vinilpiridina (2-VP). Após análise de regressão linear, foi

determinada a equação da reta [Concentração = $a \cdot (\text{delta das absorbâncias}) + b$]. Essa equação foi utilizada para determinar a concentração em nmols de glutathiona total em 10 μl de amostra, e esse valor extrapolado para 1 mL de amostra. O índice de estresse oxidativo foi calculado pela razão GSH/GSSG. Estas concentrações foram representadas em nmol/mL.

4.14. Análises estatísticas

Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média. A avaliação da normalidade dos dados foi realizada através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados paramétricos foram utilizadas as análises de variância univariada e bivariada (ANOVA one-way e two-way) seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para os dados não paramétricos foram utilizados o teste Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's. A diferença significativa foi considerada quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism versão 5.00 para Windows 7, GraphPad Software (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

5.1. Ingestão alimentar e massa corporal

A avaliação da eficiência da dieta com alto teor de carboidratos refinados foi realizada através da capacidade da mesma em influenciar a ingestão alimentar e a massa corporal dos animais. Conforme está representado na Figura 6 A, não houve diferenças significativas no consumo alimentar acumulado (gramas/grupo/semana) dos animais alimentados com dieta padrão e dieta com alto teor de carboidratos refinados no decorrer das 12 semanas de protocolo experimental. Entretanto, está representado na Figura 6 B que os animais do GCR apresentaram maior consumo alimentar acumulado (quilocalorias/grupo/semana) nas últimas quatro semanas de protocolo quando comparados ao GC.

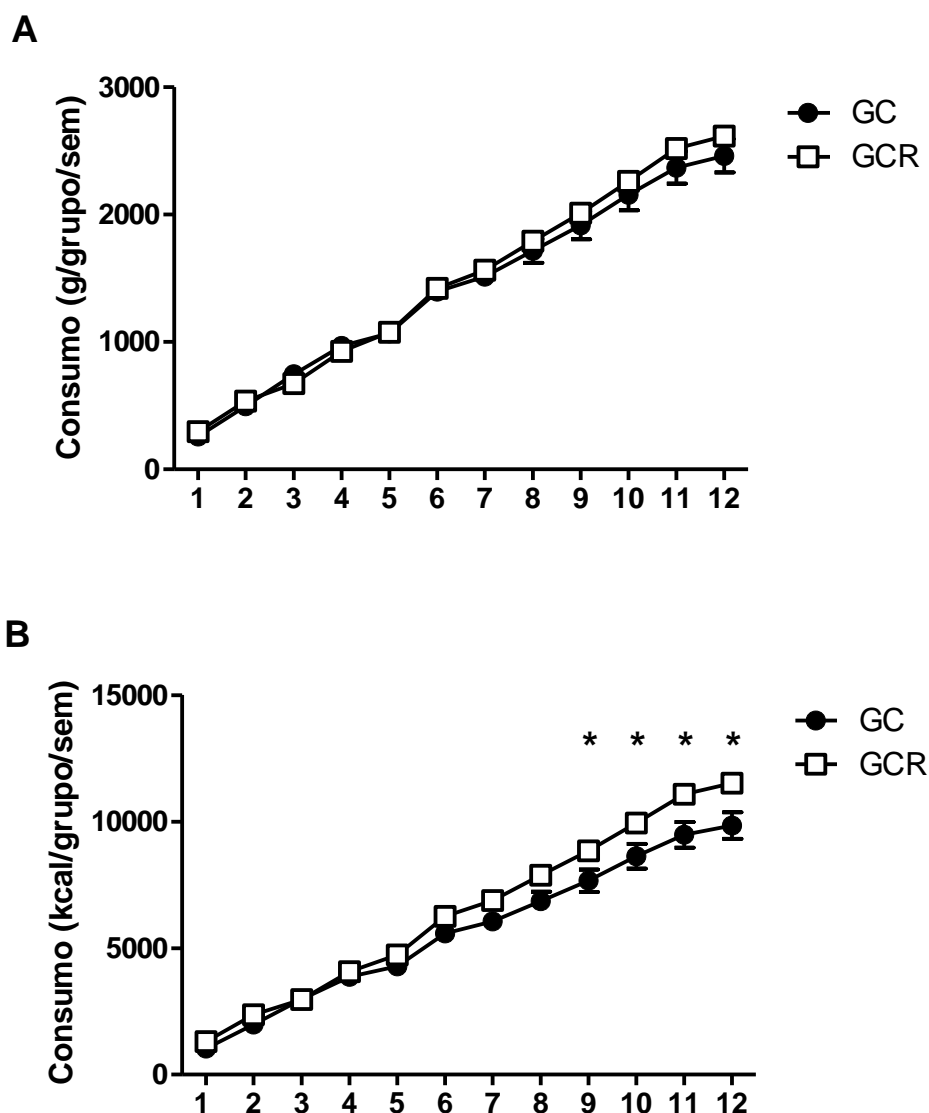


Figura 6: Consumo alimentar acumulado dos animais alimentados com dieta padrão e dieta com alto teor de carboidratos refinados. A) Consumo alimentar acumulado em gramas B) Consumo alimentar acumulado em quilocalorias. GC: Grupo Controle; GCR: Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados. O símbolo (*) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GC. Os dados estão expressos como média \pm EPM (n=6) e foram analisados pelo ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

A fim de avaliar a influência da dieta e da exposição a FC sobre a massa corporal dos animais foi realizada a pesagem dos mesmos no início do experimento e ao término dos protocolos experimentais. Desta forma, é possível observar através da Figura 7 A que não houve diferenças significativas em relação a massa corporal dos grupos antes do início do protocolo de dieta. Porém, após a administração da dieta e a exposição a FC, a massa corporal dos animais do GCR foi maior quando comparado aos

GC e GFC. Assim como a massa corporal foi maior no GCRFC quando comparado ao GFC, conforme representado na Figura 7 B.

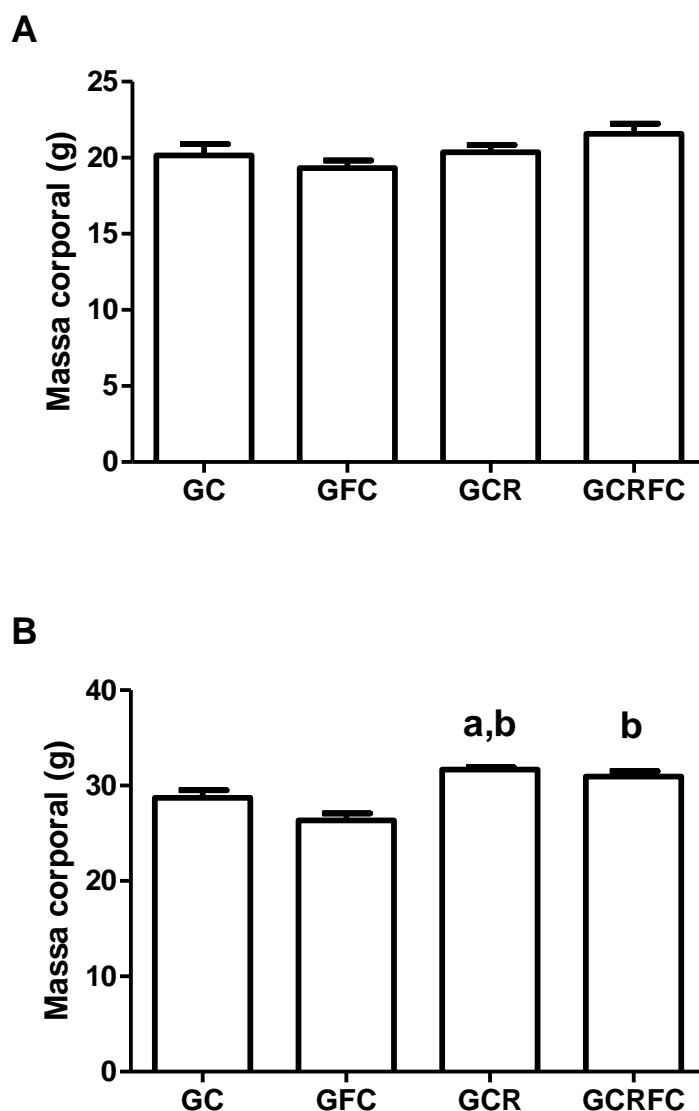


Figura 7: Massa corporal. A) Início do experimento B) Término do experimento. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre o GCR e GCRFC quando comparados ao GFC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.2. Teste oral de tolerância à glicose

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) é utilizado para avaliar se a glicose foi metabolizada pela insulina⁷⁸. Assim, o TOTG mensurou a sensibilidade à insulina e os

resultados demonstraram que os níveis de glicemia dos animais do GCR foi maior no tempo zero (antes da sobrecarga) quando comparado ao GC, conforme pode ser observado na Figura 8.

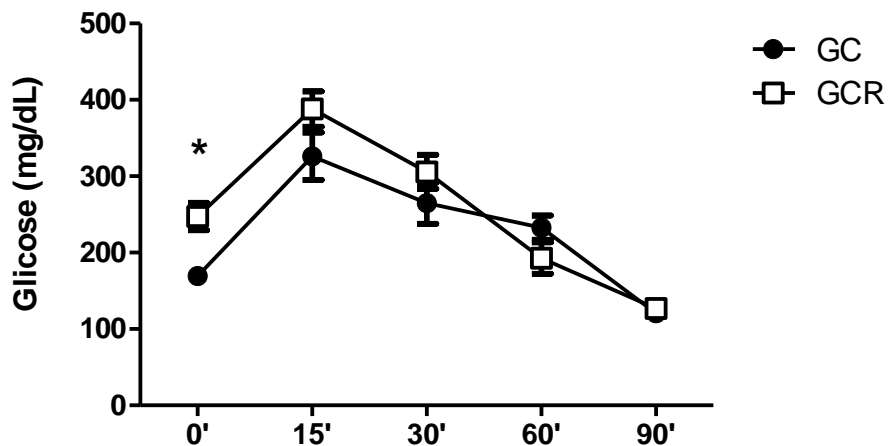


Figura 8: Níveis de Glicemia realizados nos grupos experimentais. GC: Grupo Controle; GCR: Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados. O símbolo (*) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA two-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3. Hemograma

Conforme representado na Tabela 5, em relação as concentrações de eritrócito, hematócrito e hemoglobina é possível observar que houve aumento destes nos animais do GFC quando comparados somente ao GC e aos GC, GCR e GCRFC, respectivamente.

Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | P |
|---|------------------|---------------------------------|------------------|----------------------------|--------|
| Eritrócito ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | $1,76 \pm 0,04$ | $2,07 \pm 0,06^{\text{a,c}}$ | $1,82 \pm 0,04$ | $1,98 \pm 0,05^{\text{a}}$ | < 0,05 |
| Hematócrito (%) | $36,96 \pm 1,47$ | $43,08 \pm 1,38^{\text{a,c,d}}$ | $35,41 \pm 0,99$ | $37,44 \pm 0,70$ | < 0,05 |
| Hemoglobina (g/dL) | $12,36 \pm 0,45$ | $14,18 \pm 0,26^{\text{a,c,d}}$ | $12,64 \pm 0,23$ | $12,96 \pm 0,28$ | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCR e a letra (d) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCRFC.

5.4. Bioquímica do sangue

Inicialmente, a dieta com alto teor de carboidratos refinados não alterou os parâmetros bioquímicos de colesterol total, triglicerídeos, AST e creatinina dos grupos experimentais. No entanto, os níveis de ALT foram menores no GCRFC quando comparado ao GC; os níveis de fosfatase alcalina foram maiores no GCR quando comparado ao GC; e os níveis de ureia foram menores nos GFC, GCR e GCRFC quando comparados ao GC, conforme pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6: Avaliações bioquímicas no sangue dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | p |
|--------------------------|--------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|--------|
| Colesterol Total (mg/dL) | 80,3 ± 4,6 | 78,1 ± 5,6 | 86,9 ± 3,4 | 85,8 ± 2,6 | > 0,05 |
| Triglicerídeos (mg/dL) | 98,8 ± 18,7 | 78,7 ± 10,1 | 68,6 ± 7,9 | 70,5 ± 8,7 | > 0,05 |
| AST (U/L) | 115,3 ± 19,2 | 88,9 ± 6,7 | 122,2 ± 13,7 | 117,6 ± 12,1 | > 0,05 |
| ALT (U/L) | 56,9 ± 8,3 | 39,5 ± 3,7 | 40,7 ± 3,0 | 26,9 ± 2,4 ^a | < 0,05 |
| ALP (U/L) | 55,7 ± 8,6 | 42,5 ± 5,7 | 80,8 ± 3,3 ^{b,d} | 34,6 ± 6,1 | < 0,05 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,5 ± 0,1 | 0,5 ± 0,05 | 0,4 ± 0,02 | 0,4 ± 0,02 | > 0,05 |
| Ureia (mg/dL) | 84,1 ± 4,4 | 59,0 ± 3,0 ^a | 61,5 ± 3,5 ^a | 53,9 ± 2,3 ^a | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GFC e a letra (d) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCRFC.

5.5. Análise do influxo de células no lavado broncoalveolar

O influxo de células foi avaliado no LBA com o objetivo de analisar o recrutamento celular após a administração da dieta com alto teor de carboidratos refinados e posterior exposição a FC. Assim, foram determinadas as quantidades de leucócitos totais e diferenciais (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) presentes no LBA dos grupos experimentais. Deste modo, os resultados obtidos estão representados na Tabela 7 e é possível observar que o número de leucócitos totais no GFC foi maior em relação ao GC, e maior no GCRFC quando comparado aos demais grupos. Em adição, houve aumento de macrófagos no GCRFC quando comparado aos GC e GFC, aumento de linfócitos no GCRFC quando comparado aos demais grupos e aumento de neutrófilos no GFC e GCRFC quando comparados aos GC e GCR.

Tabela 7: Influxo de células no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | p |
|---------------------------------------|-------------|---------------------------|-------------|-------------------------------|--------|
| Leucócitos (x10 ³ /mL) | 162,3 ± 6,6 | 212,0 ± 9,7 ^a | 200,8 ± 8,6 | 270,0 ± 12,2 ^{a,b,c} | < 0,05 |
| Macrófagos (x10 ³ /mL) | 155,3 ± 5,1 | 181,8 ± 6,9 | 191,2 ± 6,9 | 224,7 ± 7,2 ^{a,b} | < 0,05 |
| Linfócitos (x10 ³ /mL) | 5,3 ± 1,2 | 4,6 ± 0,5 | 4,8 ± 0,8 | 15,8 ± 1,9 ^{a,b,c} | < 0,05 |
| Neutrófilos (x10 ³ /mL) | 1,7 ± 0,3 | 25,6 ± 2,3 ^{a,c} | 4,8 ± 0,9 | 29,5 ± 3,1 ^{a,c} | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GFC e a letra (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCR.

5.6. Pulmões

5.6.1. Ensaio imunoenzimático

As análises das citocinas inflamatórias foram realizadas no homogeneizado pulmonar e no LBA para avaliar o quadro inflamatório nos pulmões. Os resultados demonstraram que no homogeneizado (Tabela 8) houve diminuição nas concentrações de TNF- α no GCRFC quando comparado aos GFC e GCR, diminuição de IFN- γ nos GCR, GCRFC quando comparados ao GC e diminuição de IL-10 no GCRFC quando comparado ao GC. Em relação ao LBA (Tabela 9), houve aumento nas concentrações de TNF- α no GCRFC quando comparado aos GC, GFC e GCR, aumento de IFN- γ no GCRFC quando comparado ao GFC e aumento de IL-10 no GCRFC quando comparado aos GC e GCR.

Tabela 8: Análises imunoenzimáticas no homogeneizado pulmonar dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | p |
|--------------------------|------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|--------|
| TNF- α (pg/mL) | 163,1 \pm 9,10 | 179,5 \pm 17,40 | 164,0 \pm 10,52 | 96,81 \pm 22,38 ^{b,c} | < 0,05 |
| IFN- γ (pg/mL) | 262,9 \pm 32,0 | 183,5 \pm 17,5 | 177,7 \pm 13,4 ^a | 127,0 \pm 14,2 ^a | < 0,05 |
| IL-10 (pg/mL) | 446,8 \pm 46,9 | 399,8 \pm 46,9 | 325,5 \pm 19,4 | 274,2 \pm 35,9 ^a | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GFC e a letra (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCR.

Tabela 9: Análises imunoenzimáticas no lavado broncoalveolar dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | p |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|-----------------------------------|--------|
| TNF- α (pg/mL) | 19,18 \pm 1,52 | 23,05 \pm 1,06 | 18,95 \pm 0,81 | 28,92 \pm 1,79 ^{a,b,c} | < 0,05 |
| IFN- γ (pg/mL) | 30,75 \pm 6,56 | 14,99 \pm 1,22 | 29,27 \pm 3,75 | 39,05 \pm 4,58 ^b | < 0,05 |
| IL-10 (pg/mL) | 90,17 \pm 7,76 | 112,3 \pm 10,69 | 93,21 \pm 5,72 | 128,5 \pm 7,04 ^{a,c} | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GFC e a letra (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCR.

5.6.2. Estereologia

As análises estereológicas foram realizadas para avaliar a influência da dieta com alto teor de carboidratos refinados e da exposição a FC sobre a histoarquitetura do parênquima pulmonar. Conforme pode ser observado na Figura 9, houve aumento da Vv[a] nos GFC, GCRFC quando comparados ao GC e GCR. Além disso, foi observado (Figura 10) diminuição da Vv[sa] no GFC comparado aos demais grupos, e do GCRFC

comparado ao GC e GCR. A Figura 11 demonstra através de fotomicrografias aumento da $Vv[a]$ e diminuição da $Vv[sa]$, assim como o influxo de células inflamatórias descrito nos resultados anteriores.

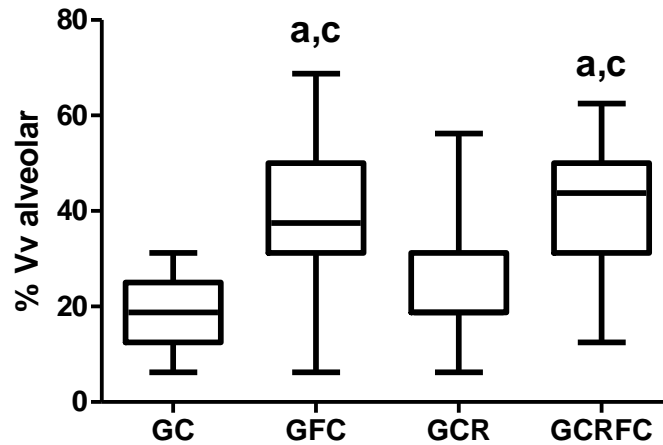


Figura 9: Densidade de volume alveolar. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GFC e GCRFC quando comparados ao GC, a letra (c) representa diferença significativa entre o GFC e GCRFC quando comparados ao GCR. Os dados estão expressos como mediana \pm mínimo e máximo e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$).

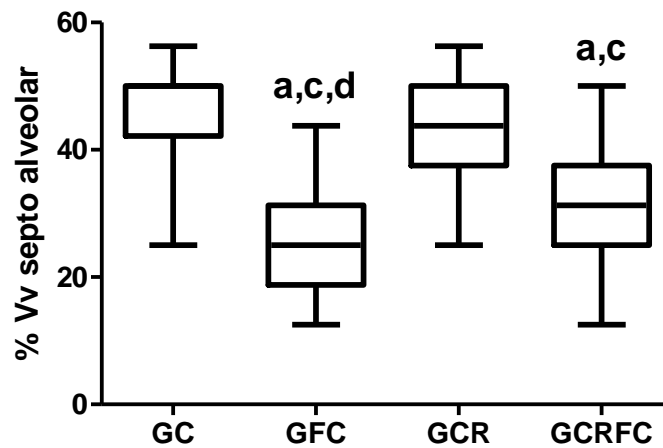


Figura 10: Densidade de volume de septo alveolar. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GFC e GCRFC quando comparados ao GC, a letra (c) representa diferença significativa entre o GFC e GCRFC quando comparados ao GCR, a letra (d) representa diferença significativa entre o GFC quando comparado ao GCRFC. Os dados estão expressos como mediana \pm mínimo e máximo e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de Dunn's ($p < 0,05$).

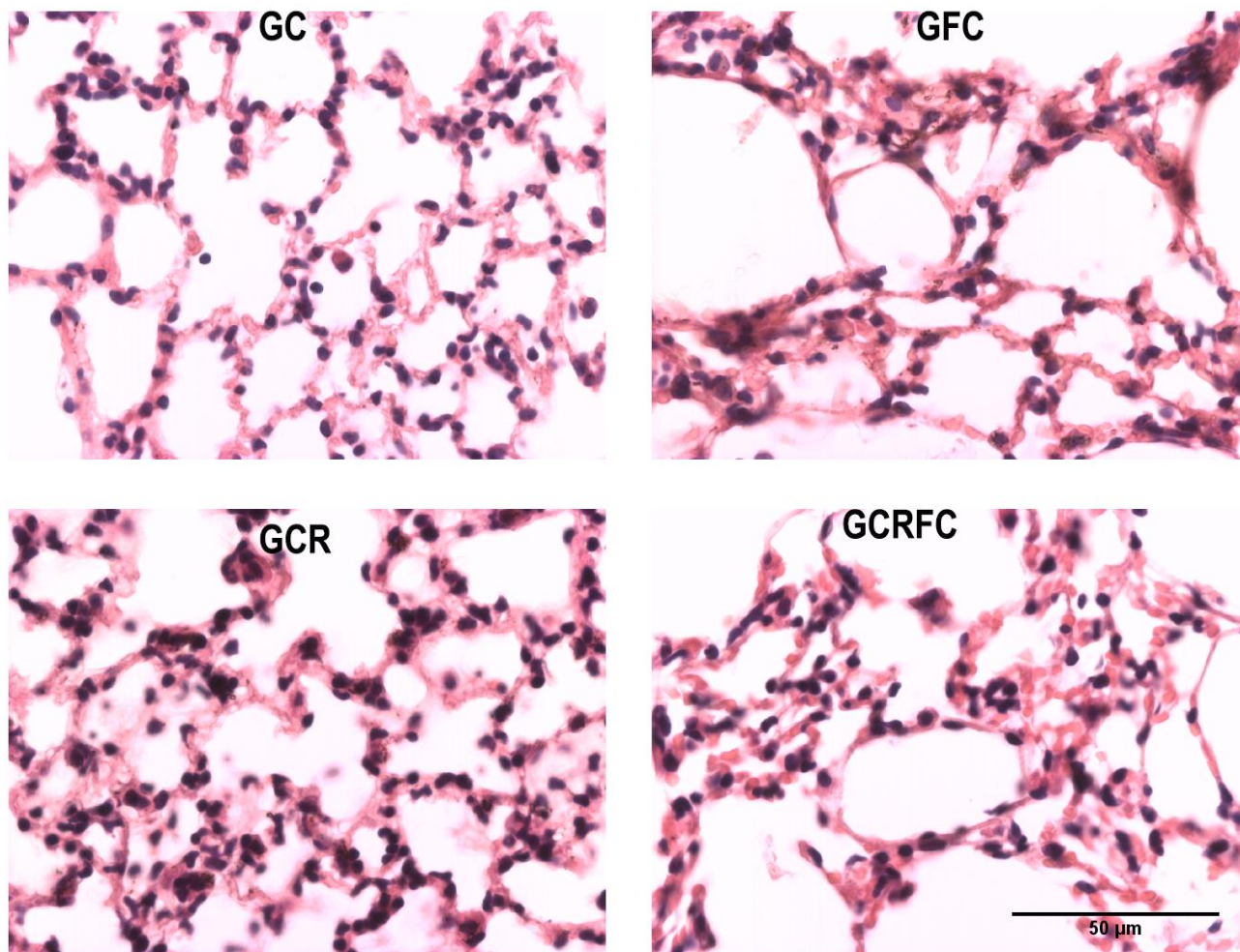


Figura 11: Fotomicrografias representativas de cortes do pulmão corados com HE. Aumento de 40x.

5.7. Tecido adiposo

5.7.1. Índice de adiposidade corporal

O IAC é importante para avaliar a eficiência da dieta utilizada em induzir os animais à obesidade, assim como os níveis plasmáticos de leptina e a área dos adipócitos (resultados posteriores). Em relação ao IAC (Figura 12) os resultados demonstraram aumento dos depósitos de gordura nos animais do GCR quando comparado aos GC, GFC e GCRFC.

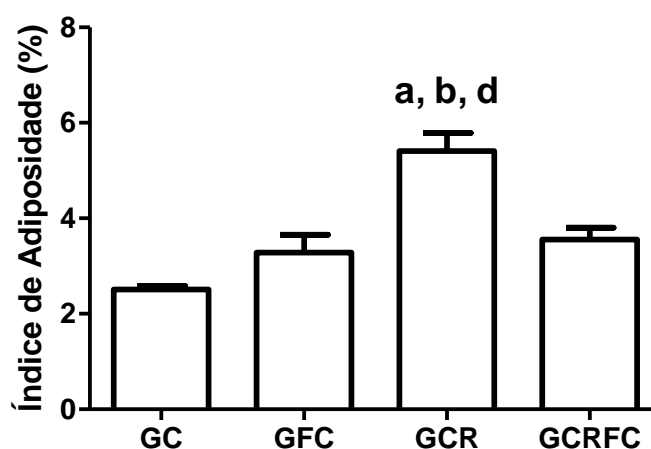


Figura 12: Índice de adiposidade corporal nos grupos experimentais. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GFC e a letra (d) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GCRFC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.7.2. Ensaio imunoenzimático

Os níveis plasmáticos de leptina foram mensurados para avaliar a eficiência da dieta, como citado anteriormente para o IAC. Assim, a Figura 13 demonstra que houve aumento das concentrações de leptina nos GCR e GCRFC quando comparados ao GC.

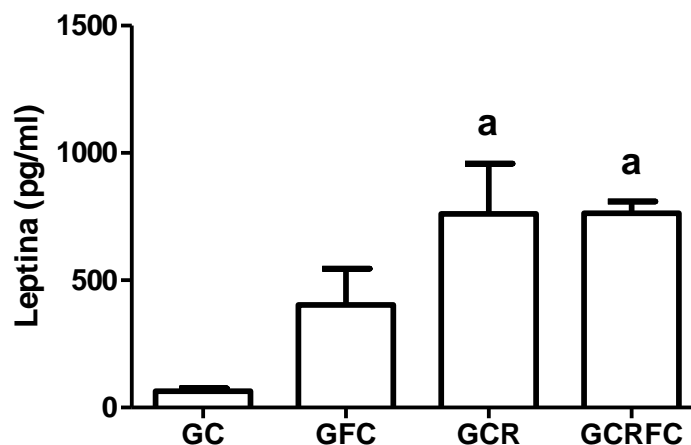


Figura 13: Níveis plasmáticos de leptina. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GCR e GCRFC quando comparados ao GC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.7.3. Análises histomorfométricas

A área dos adipócitos foi mensurada para avaliar a eficiência da dieta, como citado anteriormente para IAC e níveis plasmáticos de leptina. Desta forma, é possível visualizar através da Figura 14 que a área dos adipócitos foi maior no GCR quando comparado ao GC, GFC e GCRFC e foi maior no GCRFC quando comparado ao GC e GFC. Além disso, a área dos adipócitos foi menor no GCRFC quando comparado ao GCR. As fotomicrografias da Figura 15 demonstram essa expansão dos adipócitos.

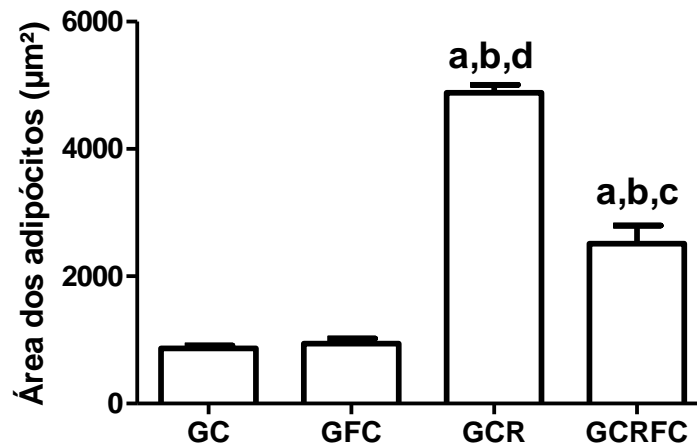


Figura 14: Área dos adipócitos. GC: Grupo Controle; GFC: Grupo Fumaça de Cigarro; GCR: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados; GCRFC: Grupo Dieta com alto teor de Carboidratos Refinados + Fumaça de Cigarro. A letra (a) representa diferença significativa entre o GCR e GCRFC quando comparados ao GC, a letra (b) representa diferença significativa entre o GCR e GCRFC quando comparados ao GFC, a letra (c) representa diferença significativa entre o GCRFC quando comparado ao GCR, e a letra (d) representa diferença significativa entre o GCR quando comparado ao GCRFC. Os dados estão expressos como média \pm EPM e foram analisados pelo ANOVA one-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

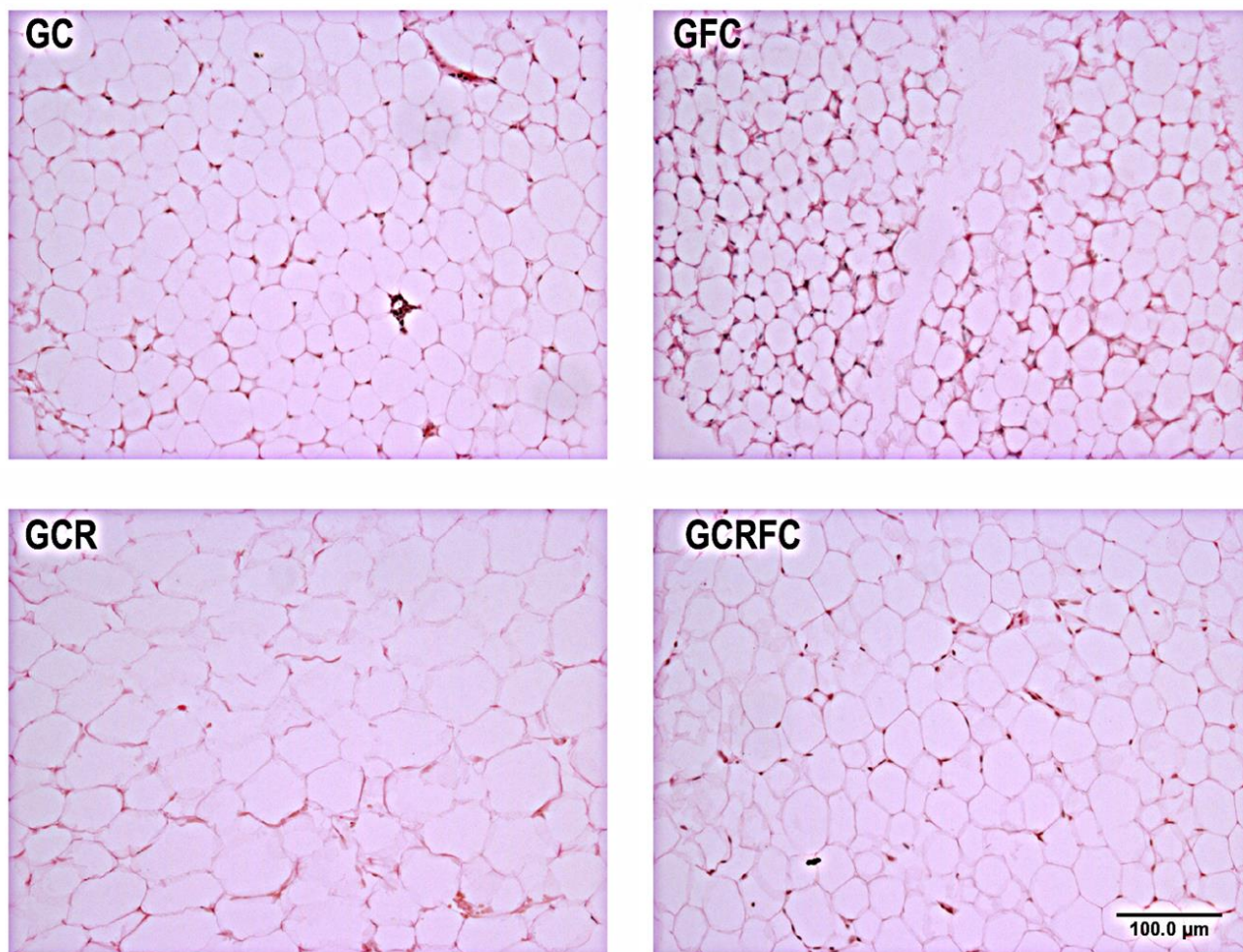


Figura 15: Fotomicrografias representativas do tecido adiposo epididimal corados com HE. Aumento de 10x.

5.8. Análises do estresse oxidativo nos pulmões

A avaliação do dano na membrana celular em sua porção lipídica foi mensurada através da formação de TBARS, e a oxidação de proteínas através da análise de proteína carbonilada. Os resultados demonstraram que a peroxidação lipídica foi maior no GCRFC quando comparado aos demais grupos, e em relação à oxidação proteica foi maior no GFC quando comparado ao GC. Além disso, foram avaliadas as concentrações das enzimas SOD, CAT e sistema glutaciona, onde é possível observar aumento da atividade de SOD no GCRFC quando comparado aos demais grupos, assim como aumento da atividade da CAT no GCRFC quando comparado ao GC. Em relação ao sistema glutaciona, os resultados demonstraram diminuição na razão GSH/GSSG nos GFC, GCR e GCRFC quando comparados ao GC, conforme pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10: Avaliação bioquímica no homogeneizado pulmonar dos grupos experimentais.

| | GC | GFC | GCR | GCRFC | P |
|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------|
| TBARS (nM/mg ptn) | 0,24 ± 0,05 | 0,21 ± 0,05 | 0,28 ± 0,06 | 0,61 ± 0,12 ^{a,b,c} | < 0,05 |
| PTN CARB (nmol/mg ptn) | 12,33 ± 1,37 | 20,50 ± 3,31 ^a | 14,88 ± 1,74 | 14,78 ± 0,55 | < 0,05 |
| SOD (U/mg ptn) | 27,77 ± 3,60 | 37,58 ± 2,76 | 28,36 ± 3,38 | 48,71 ± 4,15 ^{a,b,c} | < 0,05 |
| CAT (U/mg ptn) | 0,45 ± 0,04 | 0,86 ± 0,17 | 0,92 ± 0,11 | 1,09 ± 0,19 ^a | < 0,05 |
| GSH/GSSG | 0,41 ± 0,86 | 0,61 ± 0,04 ^a | 0,37 ± 0,03 ^a | 0,33 ± 0,11 ^a | < 0,05 |

A letra (a) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GC; a letra (b) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GFC e a letra (c) representa diferença significativa entre os grupos quando comparados ao GCR.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi avaliada a associação entre uma dieta com alto teor de carboidratos refinados e a resposta inflamatória pulmonar em camundongos C57BL/6 expostos à FC. Para tanto, foram avaliados os efeitos da dieta sobre a ingestão alimentar, a massa corporal, o IAC e a leptina plasmática dos animais. Além disso, foram analisados o influxo celular no parênquima pulmonar, os parâmetros bioquímicos no sangue e os parâmetros de estresse oxidativo nos pulmões. Assim como dosagens de citocinas no LBA e nos pulmões, e análise do padrão histológico do parênquima pulmonar e do TAE.

Conforme previamente observado por Oliveira e colaboradores ⁴², a dieta com alto teor de carboidratos não induziu um maior consumo alimentar (g/grupo) dos animais observados, mas ocasionou um maior consumo energético acumulado (Kcal/grupo/semana) do GCR quando comparado ao GC. Isto ocorreu porque, apesar de não possuir caráter hipercalórico, a dieta hiperglicídica proporcionou um aumento de 10% nas Kcals ingeridas pelos animais, o que somente ocasionou diferença significativa entre as dietas quando o consumo acumulado superou 1916,15 g/grupo/semana.

Em conjunto com o maior consumo calórico dos animais que consumiram a dieta com alto teor de carboidratos refinados, foi observado aumento da massa corporal destes animais quando comparados aos demais grupos experimentais. Este aumento de massa corporal está relacionado com o acréscimo no IAC, uma vez que a sobrecarga energética crônica tende ao armazenamento, no tecido adiposo, de energia excedente na forma de lipídeos ^{64;79}. Isto ocorre, pois a obesidade é um processo inflamatório crônico de baixa intensidade ⁸⁰ caracterizada, dentre outros fatores, pelo aumento da área dos adipócitos e dos níveis séricos de adipocitocinas, como a leptina. O aumento dos níveis plasmáticos de leptina corrobora com os estudos de Oliveira ⁴² e Menezes-Garcia ⁶⁴, que também observaram tal aumento em animais alimentados com a mesma dieta. Por outro lado, os resultados do IAC não foram observados nos animais expostos à FC e que consumiram a dieta quando comparado aos animais que somente consumiram a dieta, uma vez que a FC está relacionada com diversos processos inflamatórios sistêmicos pela ativação e liberação de células inflamatórias ⁸¹. Segundo Dourado ⁸² e Mehta ⁸³, em alguns casos, os processos inflamatórios causam perda de massa corporal e inibição da expansão dos coxins adiposos.

Conforme os estudos realizados por Oberman⁸⁴ e Xue⁸⁵, o ganho de massa ocasionado pelo aumento do IAC está relacionado com diversas doenças associadas à obesidade como DM, doenças cardiovasculares, câncer e hiperglicemia. Em concordância, é conhecido que a composição da dieta ofertada durante a indução da obesidade influencia diretamente no desenvolvimento de tais doenças uma vez que os nutrientes agem como sinalizadores celulares^{86; 87}. Hao e colaboradores⁸⁸ destacaram que a dieta com maior quantidade de sacarose, como no presente estudo, leva ao aumento do índice glicêmico e por sua vez ao aumento da glicemia, e assim favorecendo o armazenamento de gordura. Desta forma, mediante o estímulo insulínico induzido por uma dieta hiperglicídica haverá ativação da glicólise e inibição da gliconeogênese, acúmulo de acetilCoA e triacilgliceróis. Sendo assim, a hiperglicemia de jejum dos animais provavelmente foi ocasionada devido a uma resistência insulínica⁸⁹.

A fumaça de cigarro é composta por diversos componentes químicos que promovem sua toxicidade. Entre eles, o monóxido de carbono possui alta afinidade pela hemoglobina, ligando-se a ela para formação da carboxihemoglobina, uma forma inativa da hemoglobina que não possui capacidade de carregar moléculas de O₂. Desta forma, a FC provoca uma diminuição dos níveis sanguíneos de O₂. Como resultado, o organismo aumenta a produção de glóbulos vermelhos (eritrócito, hematócrito e hemoglobina) para compensar o decréscimo na capacidade de transporte de oxigênio⁹⁰. As alterações encontradas nos animais expostos à FC demonstraram que tais sinais podem ser observados em fases agudas da exposição à FC, apesar dos valores encontrados ainda estarem incluídos dentro dos valores de referência (ANEXO II) para camundongos^{91; 92}.

Paralelamente ao hemograma os exames bioquímicos são capazes de fornecer informações acerca de funções metabólicas, bem como evidenciar doenças ocultas⁹². No nosso estudo, o perfil lipídico se manteve inalterado, pois, de acordo com Wang e colaboradores⁹³, camundongos C57BL/6 são propensos ao desenvolvimento de obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertensão, mas não à hiperlipidemias. Adicionalmente, a creatinina não apresentou alteração uma vez que não é diretamente influenciada pela dieta⁹². A síntese de ureia pode ter se mostrado reduzida por distintos fatores. Por um lado, com o aumento de carboidratos refinados presentes na dieta a ingestão de proteínas foi proporcionalmente reduzida, o que diminuiu a concentração de

aminoácidos no sangue, fator que afeta diretamente na produção de ureia. Por outro lado, nos grupos que receberam dieta rica em carboidratos refinados o aumento de glicose no organismo pode ser também o responsável pelo decréscimo na síntese de ureia, embora não se saiba se essa diminuição é diretamente afetada pela glicose ou por uma combinação de mecanismos envolvendo glicose, glucagon e insulina ⁹⁴. A fosfatase alcalina está presente principalmente nos microvilos dos canalículos biliares e na superfície sinusoidal dos hepatócitos. Seu aumento pode evidenciar cirrose, diabetes, doenças intestinais ou esteatose hepática. O aumento da fosfatase alcalina no GCR corrobora com os estudos de Oishi e colaboradores⁸⁹, onde os mesmos demonstraram que dietas com alto teor de carboidratos ou alto teor de gorduras estão relacionadas com doenças no fígado.

Lanzetti ⁵⁹, Oliveira ⁹⁵ e Hackstein ⁹⁶ demonstraram que camundongos C57BL/6 apresentaram resposta inflamatória moderada a intensa sob diferentes estímulos, desta forma fica evidente que esta linhagem, comparada as demais (BALB/c, DBA/2, C3H e 129SV), representa o modelo mais eficiente para o estudo do processo inflamatório pulmonar. Assim, por meio dos nossos resultados de quantidade de células presentes no lavado broncoalveolar foi possível avaliar que a exposição a curto prazo à FC gerou um influxo celular do sangue periférico para o parênquima pulmonar. Desta forma, nossos resultados corroboram com estudos anteriores de Bezerra e colaboradores ⁵⁸, que relataram aumento no influxo celular nos pulmões dos grupos expostos à FC.

Adicionalmente, a fim de caracterizar o influxo celular, as células no LBA foram fenotipicamente avaliadas e foi observado um aumento dos neutrófilos nos grupos expostos à FC o que, de acordo com Baines e colaboradores ⁹⁷ é esclarecido pelo fato da FC influenciar no acúmulo dessas células nas vias aéreas. Além disso, os neutrófilos são associados com a produção de mediadores da imunidade inata e com aumento da obstrução do fluxo aéreo ⁹⁷. Paralelamente, foi observado que a obesidade intensificou o influxo de células inflamatórias no LBA de animais expostos à fumaça de cigarro e portanto, tem influência sobre o quadro inflamatório pulmonar. Sendo assim, é importante ressaltar, de acordo com Williams ⁹⁸, Milner ⁹⁹ e Calixto ¹⁰⁰ que existem estudos na literatura que correlacionam à obesidade induzida por dieta com a inflamação pulmonar desencadeada por diversos fatores, porém esta correlação ainda não havia sido estudada com a exposição à fumaça de cigarro.

As citocinas são produzidas por diversas células no local da lesão e por células do sistema imunológico como monócitos e macrófagos através da ativação de proteoquinases ativadas por mitógenos ¹⁰¹; ¹⁰². Por meio das análises imunoenzimáticas realizadas no homogeneizado pulmonar foi observada diminuição de TNF- α , resultado que de acordo com Valença e colaboradores ¹⁰³, não é comum em processos inflamatórios agudos devido ao fato deste ser um marcador de processos crônicos, onde ocorre desequilíbrio entre proteases e antiproteases. No entanto, o presente estudo apresentou dois protocolos, o primeiro de indução à obesidade durante 12 semanas e portanto crônico, e o segundo de exposição à FC durante 5 dias, sendo considerado agudo. Em adição, foi observada diminuição no IFN- γ , o que está relacionado com o aumento de macrófagos observado na análise no LBA, pois o IFN- γ é uma citocina responsável pela ativação de macrófagos e possui função pró-inflamatória ¹⁰¹. Em uma reação em cascata, as concentrações de IL-10 diminuíram no homogeneizado pulmonar uma vez que, com o aumento de macrófagos ativados no LBA, ocorre a liberação de IL-10 a partir destas células. Assim, a IL-10 possui função regulatória e anti-inflamatória uma vez que inibe citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ ¹⁰¹. Além disso, o aumento nas concentrações de TNF- α , IFN- γ e IL-10 no LBA dos animais justifica os resultados encontrados no homogeneizado pulmonar, uma vez que a liberação destas citocinas tende a diminuir suas respectivas concentrações intracelulares.

A alteração dos valores observados em macrófagos e neutrófilos presentes no LBA contribuem para que ocorra estresse oxidativo nos pulmões ¹⁰⁴. A alternativa utilizada para constatar a ocorrência do estresse oxidativo consiste em mensurar a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas ¹⁰⁵. Desta forma, a peroxidação lipídica não foi observada nos animais expostos à FC por se tratar de um protocolo de exposição a curto prazo. Porém, conforme discutido anteriormente, a obesidade foi capaz de intensificar o processo inflamatório pulmonar oriundo de diversas causas e, no nosso estudo, foi possível observar a peroxidação lipídica quando a exposição à FC foi associada à obesidade induzida por dieta. Em adição, o processo de oxidação proteica foi observado nos animais expostos à FC, o que comprova a influência da FC sobre o dano celular e consequente perda de funcionalidade da célula ⁵¹.

O somatório do dano celular com as toxinas da FC desencadeia uma série de sistemas antioxidantes no organismo. Dentre eles, a superóxido dismutase é uma enzima

responsável por catalisar a redução do superóxido em peróxido de hidrogênio. Por se tratar de um protocolo de exposição a curto prazo, nossos resultados não apresentaram aumento na atividade da enzima SOD nos animais expostos à FC, porém, quando tal exposição foi associada ao processo inflamatório acarretado pela obesidade, foi possível observar aumento nas concentrações desta enzima. A atividade da SOD estava elevada como resposta ao aumento da presença de radicais superóxido que, por sua vez, são oriundos em grande parte, do processo de redução de O_2 desencadeado pelas quinonas e hidroquinonas presentes na FC ¹⁰⁶. Além disso, como mencionado anteriormente, a obesidade potencializou o processo inflamatório pulmonar e acarretou o aumento de neutrófilos e macrófagos, células excretoras de agentes oxidantes e/ou antioxidantes. Desta forma, os processos inflamatórios oriundos da obesidade e da exposição à FC são, em conjunto, responsáveis pelo desequilíbrio da SOD. Como uma reação em cascata, o desequilíbrio da SOD desencadeou também o desequilíbrio de outros sistemas relacionados com a homeostase redox dos pulmões. Observamos que, na tentativa de neutralizar o excesso de superóxido, a SOD pode ter gerado um excesso de peróxido de hidrogênio que, por sua vez, acarretou no aumento das concentrações do sistema glutaciona. Assim, o aumento nas concentrações de peróxido de hidrogênio acarretou em maior atividade da catalase e do sistema glutaciona, uma vez que se constatou aumento nas concentrações de glutaciona total, oxidada e reduzida. Porém, no nosso estudo, o aumento significativo exclusivo da glutaciona oxidada nos animais expostos aos dois protocolos experimentais pode indicar uma saturação do sistema glutaciona. Esta saturação pode estar relacionada à intensificação do processo inflamatório pulmonar ocasionado pela associação entre a obesidade e a exposição à FC. Adicionalmente, observamos aumento da atividade da catalase nos animais expostos à FC e induzidos a obesidade. A catalase é uma das enzimas responsáveis por catalisar a redução do peróxido de hidrogênio em água ^{19; 20; 51}. Assim como observado anteriormente para a SOD, os processos inflamatórios oriundos da obesidade e da exposição à FC que foram, em conjunto, responsáveis pelo desequilíbrio da SOD, acarretaram também em desequilíbrio do sistema de regulação da glutaciona bem como da enzima catalase. Neste contexto, é possível que a catalase atue de forma inicial em processos inflamatórios agudos, de forma que o sistema glutaciona tenha maior atuação em processos mais intensos onde ocorra possível saturação da catalase.

O remodelamento da histoarquitetura dos pulmões é mediado por meio da oxidação de proteínas, peroxidação de lípidos da membrana, e quebra das fitas de DNA¹⁰⁷. Valença e colaboradores¹⁰³ afirmam que os neutrófilos e os macrófagos são alguns dos principais responsáveis pelo dano elastolítico e por este remodelamento da histoarquitetura pulmonar. Assim, as análises de estereologia do nosso estudo corroboram com os resultados obtidos no mesmo através da contagem de células no LBA. Desse modo, observamos aumento da densidade de volume alveolar e diminuição da densidade de volume de septo alveolar, características que indicam a presença de inflamação pulmonar aguda e podem estar relacionadas com a produção de metaloproteinases de matriz pelas células inflamatórias¹⁰⁸.

7. CONCLUSÕES

A administração de uma dieta com alto teor de carboidratos refinados alterou os parâmetros biométricos, bioquímicos e a associação com a exposição à FC potencializou a inflamação e o estresse oxidativo pulmonar.

8. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiopatologia Experimental (LAFEx-ICEB), Laboratório de Nutrição Experimental (LBNEX-ENUT), Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM-ICEB), Laboratório de Imunobiologia da Inflamação (LII-ICEB) e Laboratório Piloto de Análises Clínicas (LAPAC), todos pertencentes a UFOP, com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 894, p. i-xii, 1-253, 2000. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11234459> >.
- ² WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 916, p. i-viii, 1-149, backcover, 2003. ISSN 0512-3054. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12768890> >.
- ³ WHO. Obesity and overweight - Fact sheet 311. 2015. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> >.
- ⁴ IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008 - 2009. 2010. Disponível em: < <http://cod.ibge.gov.br/23BNJ> >.
- ⁵ MOKHTAR, N. et al. Diet culture and obesity in northern Africa. **J Nutr**, v. 131, n. 3, p. 887S-892S, Mar 2001. ISSN 0022-3166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238780> >.
- ⁶ ROSA, M. I. D. et al. Prevalência e fatores associados à obesidade em mulheres usuárias de serviços de pronto-atendimento do Sistema Único de Saúde no sul do Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 2559-2566, 2011. ISSN 1413-8123. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000500026&nrm=iso >.
- ⁷ BESKE, S. D. et al. Reduced cardiovagal baroreflex gain in visceral obesity: implications for the metabolic syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 2, p. H630-5, Feb 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11788412> >.
- ⁸ DUCIMETIERE, P.; RICHARD, J.; CAMBIEN, F. The pattern of subcutaneous fat distribution in middle-aged men and the risk of coronary heart disease: the Paris Prospective Study. **Int J Obes**, v. 10, n. 3, p. 229-40, 1986. ISSN 0307-0565. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3759330> >.
- ⁹ MUST, A. et al. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. **N Engl J Med**, v.

- 327, n. 19, p. 1350-5, Nov 1992. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1406836> >.
- ¹⁰ WOLF, A. M.; COLDITZ, G. A. Current estimates of the economic cost of obesity in the United States. **Obes Res**, v. 6, n. 2, p. 97-106, Mar 1998. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9545015> >.
- ¹¹ PINTO, M. T.; PICHON-RIVIERE, A.; BARDACH, A. Estimativa da carga do tabagismo no Brasil: mortalidade, morbidade e custos. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 31, p. 1283-1297, 2015. ISSN 0102-311X. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2015000601283&nrm=iso >.
- ¹² MONS, U. et al. Effect of smoking reduction and cessation on the plasma levels of the oxidative stress biomarker glutathione - Post-hoc analysis of data from a smoking cessation trial. **Free Radic Biol Med**, v. 91, p. 172-7, Feb 2016. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.018> >.
- ¹³ BECKETT, E. L. et al. A new short-term mouse model of chronic obstructive pulmonary disease identifies a role for mast cell tryptase in pathogenesis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 131, n. 3, p. 752-62, 2013. ISSN 1097-6825 (Electronic) 0091-6749 (Linking).
- ¹⁴ HASSELBALCH, H. C. Smoking as a contributing factor for development of polycythemia vera and related neoplasms. **Leukemia Research**, v. 39, n. 11, p. 1137-1145, 2015. ISSN 0145-2126. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212615303738> >.
- ¹⁵ WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2010: Description of the global burden of NCDs, their risk factors and determinants**. p.176. 2011
- ¹⁶ WHO. Report on the global tobacco epidemic. 2008. Disponível em: < http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.pdf >.
- ¹⁷ SA, M. D. **A situação do tabagismo no Brasil: Dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância do Tabagismo da OMS realizados no Brasil entre 2002 e 2009**: Ministério da Saúde 2011.
- ¹⁸ HOFFMANN, D.; HOFFMANN, I.; EL-BAYOUMY, K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. **Chem Res Toxicol**, v. 14, n. 7, p. 767-90, Jul 2001. ISSN 0893-228X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11453723> >.

- 19 BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9-19, Jan 2012. ISSN 1939-4551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465> >.
- 20 BINDOLI, A.; RIGOBELLO, M. P. Principles in redox signaling: from chemistry to functional significance. **Antioxid Redox Signal** **2013**, v. 18, n. 13, p. 1557-93. doi: 10.1089/ars.2012.4655. Epub 2013 Feb 19., ISSN 1557-7716 (Electronic) 1523-0864 (Linking).
- 21 FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radic Biol Med**, v. 34, n. 12, p. 1507-16, Jun 15 2003. ISSN 0891-5849 (Print)0891-5849. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 22 PERLSTEIN, T. S.; LEE, R. T. Smoking, metalloproteinases, and vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 26, n. 2, p. 250-6, Feb 2006. ISSN 1524-4636. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339501> >.
- 23 HALLIWELL, B. Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. **Br J Exp Pathol**, v. 70, n. 6, p. 737-57, Dec 1989. ISSN 0007-1021 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 24 YU, B. P. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. **Physiol Rev**, v. 74, n. 1, p. 139-62, Jan 1994. ISSN 0031-9333 (Print)0031-9333. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 25 MARINOU, K. et al. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. **Int J Cardiol**, v. 138, n. 1, p. 3-8, 2010. ISSN 1874-1754 (Electronic) 0167-5273 (Linking).
- 26 ZHU, B.; YANG, C.; HUA, F. Leptin disturbance probably involved in the pathogenesis of obesity-induced depressive symptoms. **Maturitas**, v. 80, n. 3, p. 335, Mar 2015. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25596812> >.
- 27 FRANCISCHI, R. P. P. D. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 17-28, 2000. ISSN 1415-5273. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732000000100003&nrm=iso >.

- 28 BLÜMEL, J. E. et al. Obesity and its relation to depressive symptoms and sedentary lifestyle in middle-aged women. **Maturitas**, v. 80, n. 1, p. 100-5, Jan 2015. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25459364> >.
- 29 WAKI, H.; TONTONOZ, P. Endocrine functions of adipose tissue. **Annu Rev Pathol**, v. 2, p. 31-56, 2007. ISSN 1553-4006. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18039092> >.
- 30 ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425-32, Dec 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7984236> >.
- 31 LEITE, R. D. et al. Effects of ovariectomy and resistance training on lipid content in skeletal muscle, liver, and heart; fat depots; and lipid profile. **Appl Physiol Nutr Metab**, v. 34, n. 6, p. 1079-86, Dec 2009. ISSN 1715-5312. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029517> >.
- 32 OHASHI, K. et al. Role of anti-inflammatory adipokines in obesity-related diseases. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 7, p. 348-55, Jul 2014. ISSN 1879-3061. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24746980> >.
- 33 OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21252989> >.
- 34 SPERETTA, G. F. F.; LEITE, R. Obesidade, inflamação e exercício: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 13, n. 1, p. 61-69, 2014. ISSN 1516-8530. Disponível em: < revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=464 >.
- 35 JAMES, P. T. et al. The worldwide obesity epidemic. **Obes Res**, v. 9 Suppl 4, p. 228S-233S, Nov 2001. ISSN 1071-7323. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707546> >.
- 36 BARRIOS, C. et al. Anthropometry and body composition profile of girls with nonsurgically treated adolescent idiopathic scoliosis. **Spine (Phila Pa 1976)**, v. 36, n. 18, p. 1470-7, Aug 2011. ISSN 1528-1159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242873> >.
- 37 HARROLD, J. A. et al. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.

- 279, n. 2, p. E340-7, Aug 2000. ISSN 0193-1849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10913034> >.
- 38 SAWAYA, A. L.; FILGUEIRAS, A. "Abra a felicidade"? Implicações para o vício alimentar. **Estudos Avançados**, v. 27, p. 53-70, 2013. ISSN 0103-4014. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142013000200005&nrm=iso >.
- 39 BOUSTANY, C. M. et al. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 289, n. 1, p. R181-6, Jul 2005. ISSN 0363-6119. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15774768> >.
- 40 CARROLL, J. F.; ZENEBE, W. J.; STRANGE, T. B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 65-72, Jul 2006. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16702491> >.
- 41 DU TOIT, E. F.; NABBEN, M.; LOCHNER, A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. **Basic Res Cardiol**, v. 100, n. 4, p. 346-54, Jul 2005. ISSN 0300-8428. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15821998> >.
- 42 OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013. ISSN 1930-739X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696431> >.
- 43 WANG, J. et al. Overfeeding rapidly induces leptin and insulin resistance. **Diabetes**, v. 50, n. 12, p. 2786-91, Dec 2001. ISSN 0012-1797. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723062> >.
- 44 BENHAMED, F.; POUPEAU, A.; POSTIC, C. [The transcription factor ChREBP: a key modulator of insulin sensitivity?]. **Med Sci**, v. 29, n. 8-9, p. 765-71, 2013. ISSN 0767-0974 (Print) 0767-0974 (Linking).
- 45 TSCHÖP, M.; HEIMAN, M. L. Rodent obesity models: an overview. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v. 109, n. 6, p. 307-19, 2001. ISSN 0947-7349. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11571668> >.
- 46 STEVENS, A. L., J. S. **Histologia**. Editora Manole, 1995.

- 47 GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. 2ª edição. Guanabara Koogan, 2007.
- 48 GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Atlas colorido de Histologia**. 5ª edição. 2009. ISBN 978-85-277-1646-8.
- 49 FREDERIC H. MARTINI, E. F. B. **Essentials of Anatomy & Physiology**. 4ª Ed. Pearson Education, 2007.
- 50 WESTRA, J. W. et al. A modular cell-type focused inflammatory process network model for non-diseased pulmonary tissue. **Bioinform Biol Insights**, v. 7, p. 167-92, 2013. ISSN 1177-9322. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23843693> >.
- 51 CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette smoke-induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. **Curr Mol Med**, v. 12, n. 7, p. 836-49, Aug 2012. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22697342> >.
- 52 VAN DER TOORN, M. et al. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. **Respir Res**, v. 14, p. 45, 2013. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23594194> >.
- 53 MISHARIN, A. V. et al. Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 49, n. 4, p. 503-10, Oct 2013. ISSN 1535-4989. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672262> >.
- 54 YAO, H.; RAHMAN, I. Current concepts on oxidative/carbonyl stress, inflammation and epigenetics in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 254, n. 2, p. 72-85, Jul 2011. ISSN 1096-0333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296096> >.
- 55 DECRAMER, M.; JANSSENS, W.; MIRAVITLLES, M. Chronic obstructive pulmonary disease. **Lancet**, v. 379, n. 9823, p. 1341-51, Apr 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22314182> >.
- 56 VIEGAS, C. A. D. A. **Tabagismo do Diagnóstico á Saúde Pública**. 2007. ISBN 978-85-7379-910-1.
- 57 BOUTTEN, A. et al. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. **Expert Opin Ther Targets**, v. 14, n. 3, p. 329-46, Mar

2010. ISSN 1744-7631. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148719> >.
- 58 SILVA BEZERRA, F. et al. Alpha-tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11-12, p. 1192-201, 2006 Nov-Dec 2006. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17095405> >.
- 59 LANZETTI, M. et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 375-81, Apr 2008. ISSN 0899-9007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18281194> >.
- 60 BARNES, P. J. New treatments for chronic obstructive pulmonary disease. **Ann Ist Super Sanita**, v. 39, n. 4, p. 573-82, 2003. ISSN 0021-2571. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15098577> >.
- 61 BONOMINI, F.; RODELLA, L. F.; REZZANI, R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. **Aging Dis**, v. 6, n. 2, p. 109-20, 2015. ISSN 2152-5250 (Electronic) 2152-5250 (Linking).
- 62 CHANG, H. P. et al. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. **Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 463-70, 2011. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking).
- 63 CAMPOS, K. K. D. et al. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cellular Immunology**, v. 284, n. 1-2, p. 29-36, 2013. ISSN 0008-8749. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008874913001172> >. Acesso em: 2013/8//.
- 64 MENEZES-GARCIA, Z. et al. Lack of platelet-activating factor receptor protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. **Obesity (Silver Spring)**, v. 22, n. 3, p. 663-72, Mar 2014. ISSN 1930-7381. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/oby.20142> >.
- 65 COUNCIL, N. R. **Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition, 1995.** 2014. Disponível em: < http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=4758 >.
- 66 BEZERRA, F. S. et al. Long-term exposure to cigarette smoke impairs lung function and increases HMGB-1 expression in mice. **Respiratory Physiology &**

- Neurobiology**, v. 177, n. 2, p. 120-126, 2011. ISSN 1569-9048. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1569904811001054> >.
- 67 VALENCA, S. S. et al. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. **Toxicol Pathol**, v. 32, n. 3, p. 351-6, 2004 May-Jun 2004. ISSN 0192-6233. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15204978> >.
- 68 CAMPOS, K. K. et al. Temporal analysis of oxidative effects on the pulmonary inflammatory response in mice exposed to cigarette smoke. **Cell Immunol**, v. 284, n. 1-2, p. 29-36, 2013 Jul-Aug 2013. ISSN 1090-2163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921078> >.
- 69 CAMPOS, K. K. et al. Exposure to cigarette smoke during pregnancy causes redox imbalance and histological damage in lung tissue of neonatal mice. **Exp Lung Res**, v. 40, n. 4, p. 164-71, Apr 2014. ISSN 1521-0499. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24669879> >.
- 70 VALENCA, S. S. et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and Nf-kappaB activation in mouse lung. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 5, p. 373-81, Oct 2006. ISSN 0959-9673 (Print)0959-9673. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2613.2006.00492.x> >.
- 71 IMAI, K.; D'ARMIENTO, J. Activation of an Embryonic Gene Product in Pulmonary Emphysema: Identification of the Secreted Frizzled-Related Protein. **CHEST Journal**, v. 117, n. 5_suppl_1, p. 229S-229S, 2000/05/01 2000. ISSN 0012-3692. Disponível em: < <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21946/229S.pdf> >.
- 72 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> >.
- 73 LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 233, p. 346-57, 1994. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8015469> >.
- 74 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 1976. ISSN 0003-2697. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051> >.
- 75 MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide

- dismutase. **Eur J Biochem**, v. 47, n. 3, p. 469-74, Sep 16 1974. ISSN 0014-2956 (Print)0014-2956. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.
- 76 AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121-6, 1984. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6727660> >.
- 77 AKERBOOM, T. P.; SIES, H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 373-82, 1981. ISSN 0076-6879. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7329314> >.
- 78 CARNEVALE SCHIANCA, G. P. et al. Oral glucose tolerance test-based calculation identifies different glucose intolerance phenotypes within the impaired fasting glucose range. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 5, p. 533-538, 2014. ISSN 2040-1124. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/jdi.12185> >.
- 79 SILVA, K. M. F. D. **Obesidade induzida por dieta em diferentes tempos: Efeitos sobre análises murinométricas, hematológicas e imunológicas de ratas**. 2014. 87 Tese de Doutorado Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- 80 BOGL, L. H. et al. Abdominal obesity and circulating metabolites: A twin study approach. **Metabolism - Clinical and Experimental**, v. 65, n. 3, p. 111-121, ISSN 0026-0495. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.10.027> >. Acesso em: 2016/02/13.
- 81 ROM, O. et al. Cigarette smoking and inflammation revisited. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 187, n. 1, p. 5-10, 2013. ISSN 1878-1519 (Electronic) 1569-9048 (Linking).
- 82 DOURADO, L. P. et al. Experimental food allergy leads to adipose tissue inflammation, systemic metabolic alterations and weight loss in mice. **Cell Immunol**, v. 270, n. 2, p. 198-206, 2011. ISSN 1090-2163 (Electronic) 0008-8749 (Linking).
- 83 MEHTA, N. N. et al. Experimental endotoxemia induces adipose inflammation and insulin resistance in humans. **Diabetes**, v. 59, n. 1, p. 172-81, 2010. ISSN 1939-327X (Electronic) 0012-1797 (Linking).
- 84 OBERMAN, B. et al. Relationship between obesity, diabetes and the risk of thyroid cancer. **Am J Otolaryngol**, v. 36, n. 4, p. 535-41, 2015. ISSN 1532-818X (Electronic) 0196-0709 (Linking).

- 85 XUE, J.; IDERAABDULLAH, F. Y. An assessment of molecular pathways of obesity susceptible to nutrient, toxicant and genetically induced epigenetic perturbation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 30, p. 1-13, 2016. ISSN 0955-2863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.002> >. Acesso em: 2016/02/13.
- 86 ENOS, R. T. et al. Influence of dietary saturated fat content on adiposity, macrophage behavior, inflammation, and metabolism: composition matters. **J Lipid Res**, v. 54, n. 1, p. 152-63, 2013. ISSN 0022-2275 (Print) 0022-2275 (Linking).
- 87 KAKIMOTO, P. A.; KOWALTOWSKI, A. J. Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. **Redox Biology**, v. 8, p. 216-225, 2016. ISSN 2213-2317. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221323171630009X> >.
- 88 HAO, Q. et al. High-glycemic index carbohydrates abrogate the antiobesity effect of fish oil in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab** 2012, v. 302, n. 9, p. E1097-112. doi: 10.1152/ajpendo.00524.2011. Epub 2012 Feb 14., ISSN 1522-1555 (Electronic) 0193-1849 (Linking).
- 89 OISHI, K. et al. Wheat alkylresorcinols suppress high-fat, high-sucrose diet-induced obesity and glucose intolerance by increasing insulin sensitivity and cholesterol excretion in male mice. **J Nutr**, v. 145, n. 2, p. 199-206, 2015. ISSN 1541-6100 (Electronic) 0022-3166 (Linking).
- 90 SHAH, B. et al. The effects of cigarette smoking on hemoglobin levels compared between smokers and non-smokers. 2013, v. 1, n. 1, p. 3, 2013-04-26 2013. ISSN 2091-2102. Disponível em: < <http://www.nepjol.info/index.php/STCJ/article/view/7985> >.
- 91 WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6^a ed. Wiley-Blackwell, 2010.
- 92 ARAÚJO, F. T. M. **Estabelecimento de valores de referência para parâmetros hematológicos e bioquímicos e avaliação do perfil imunológico de linhagens de camundongos produzidas nos biotérios do Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ - Minas e do Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ**. 2012. 157 Dissertação de Mestrado Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte.

- 93 WANG, C. Y.; LIAO, J. K. A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. **Methods Mol Biol**, v. 821, p. 421-33, 2012. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking).
- 94 HAMBERG, O. Regulation of urea synthesis by diet protein and carbohydrate in normal man and in patients with cirrhosis. Relationship to glucagon and insulin. **Dan Med Bull**, v. 44, n. 3, p. 225-41, 1997. ISSN 0907-8916 (Print) 0907-8916 (Linking).
- 95 DE OLIVEIRA, T. H. et al. Influence of sexual dimorphism on pulmonary inflammatory response in adult mice exposed to chloroform. **Int J Toxicol**, v. 34, n. 3, p. 250-7, 2015. ISSN 1092-874X (Electronic) 1091-5818 (Linking).
- 96 HACKSTEIN, H. et al. Heterogeneity of respiratory dendritic cell subsets and lymphocyte populations in inbred mouse strains. **Respir Res**, v. 13, p. 94, 2012. ISSN 1465-993X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23066782>>.
- 97 BAINES, K. J.; SIMPSON, J. L.; GIBSON, P. G. Innate immune responses are increased in chronic obstructive pulmonary disease. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. 0018426, 2011. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).
- 98 WILLIAMS AS, M. J., KASAHARA DI, CHEN L, WURMBRAND AP, SI H, SHORE SA. Augmented Pulmonary Responses to Acute Ozone Exposure in Obese Mice: Roles of TNFR2 and IL-13. **Environ Health Perspect**, v. 121, p. 551-557, 2013.
- 99 MILNER, J. J. et al. Diet-induced obese mice exhibit altered heterologous immunity during a secondary 2009 pandemic H1N1 infection. **J Immunol**, v. 191, n. 5, p. 2474-85, 2013. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking).
- 100 CALIXTO, M. C. et al. Obesity enhances eosinophilic inflammation in a murine model of allergic asthma. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 3, p. 617-625, 2010. ISSN 1476-5381. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00560.x>>.
- 101 KARALIS, K. P. et al. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. **Febs J**, v. 276, n. 20, p. 5747-54, 2009. ISSN 1742-4658 (Electronic) 1742-464X (Linking).
- 102 BERTGES, T. A. B. S. **Estudo comparativo dos efeitos do laser de baixa intensidade e do ultrassom terapêutico no reparo tecidual de feridas cirúrgicas cutâneas em ratos *Wistar*: avaliação histopatológica e produção**

- in situ* de mediadores inflamatórios. 2015. 73 Dissertação de Mestrado Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.
- 103 VALENÇA, S. S.; PORTO, L. C. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, p. 787-795, 2008. ISSN 1806-3713. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-37132008001000006&nrm=iso>.
- 104 ELMASRY, S. A. et al. Role of oxidant–antioxidant imbalance in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. **Egyptian Journal of Chest Diseases and Tuberculosis**, v. 64, n. 4, p. 813-820, 2015. ISSN 0422-7638. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0422763815300534>>.
- 105 FRANÇA, B. K. et al. Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **GE Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 20, n. 5, p. 199-206, 2013. ISSN 0872-8178. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0872817813000507>>. Acesso em: 2013/10//.
- 106 RODRIGUES, K. K. D. C. **Estudo dos efeitos oxidantes sobre a resposta inflamatória pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro**. 2013. 73 (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- 107 CAMPOS, K. K. D. et al. Long-term exposure to ultrasonically nebulized distilled water and saline causes cellular influx and oxidative stress in lung tissue of rats. **Experimental Lung Research**, v. 41, n. 10, p. 546-553, 2015/11/26 2015. ISSN 0190-2148. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3109/01902148.2015.1109736>>.
- 108 MURTA, G. L. et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde. **Environmental Pollution**, v. 211, p. 206-213, 2016. ISSN 0269-7491. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749115302682>>.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO I – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



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

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro – ICEB-II, Sala 29

35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil

Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370

Email: ceua@propp.ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2014/06, intitulado "*Estudo dos efeitos da obesidade no processo inflamatório pulmonar de camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro*", que tem como responsável o Prof. Dr. Frank Silva Bezerra, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP.

Este certificado expira em 26/02/2018.

Ouro Preto, 30 de setembro de 2014.

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima

Coordenador da CEUA/UFOP

10.2. ANEXO II – Parâmetros hematológicos e bioquímicos no sangue**Tabela 11:** Parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue de camundongos C57BL/6.

| Parâmetros | Valores de Referência |
|--|------------------------------|
| Eritrócito ($\times 10^6/\text{mm}^3$) | 6,4 – 9,8 |
| Hematócrito (%) | 30,4 – 46,6 |
| Hemoglobina (g/dL) | 10,5 – 15,2 |
| AST (U/L) | 68,0 – 332,0 |
| ALT (U/L) | 37,0 – 210,0 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,2 – 0,7 |
| Ureia (mg/dL) | 51,0 – 83,0 |

Fonte: Fundação Oswaldo Cruz ⁹⁰.