



Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro em parâmetros estruturais e funcionais no sistema respiratório de cobaias

Thiago Brasileiro de Vasconcelos¹, Fernanda Yvelize Ramos de Araújo¹, João Paulo Melo de Pinho², Pedro Marcos Gomes Soares¹, Vasco Pinheiro Diógenes Bastos³

1. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza (CE) Brasil.
2. Hospital Dr. Carlos Alberto Studart Gomes, Fortaleza (CE) Brasil.
3. Centro Universitário Estácio do Ceará, Fortaleza (CE), Brasil.

Recebido: 16 janeiro 2016.

Aprovado: 31 julho 2016.

Trabalho realizado no Laboratório de Biofísica, Fisiologia e Farmacologia, Centro Universitário Estácio do Ceará, Fortaleza (CE) Brasil.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro no sistema respiratório de cobaias. **Métodos:** Foram utilizadas cobaias machos, divididas em dois grupos: controle e tabagismo passivo, esse último exposto à fumaça de dez cigarros por 20 min pela manhã, tarde e noite (30 cigarros/dia) por 5 dias. Após esse período, parâmetros inflamatórios foram estudados através da contagem de degranulação de mastócitos no mesentério e de estresse oxidativo a partir do LBA. Adicionalmente, foram verificadas PImáx, PEMáx, transporte mucociliar (in vivo) e contratilidade traqueal (in vitro). **Resultados:** Na comparação com o grupo controle, o grupo tabagismo passivo apresentou um aumento significativo na degranulação de mastócitos ($19,75 \pm 3,77\%$ vs. $42,53 \pm 0,42\%$; $p < 0,001$), nos níveis de glutatona reduzida ($293,9 \pm 19,21$ vs. $723,7 \pm 67,43$ nM/g de tecido; $p < 0,05$) e uma redução significativa no transporte mucociliar ($p < 0,05$), provocando alterações significativas na função pulmonar, tanto na PImáx como na PEMáx ($p < 0,05$ para ambas), e hiper-reatividade nas vias aéreas. **Conclusões:** A inalação passiva da fumaça de cigarro ocasionou aumentos significativos na degranulação de mastócitos e no estresse oxidativo. Esse processo inflamatório parece ter influenciado a diminuição do transporte mucociliar e causado alterações na função pulmonar, proporcionando um quadro de hiper-reatividade traqueal.

Descritores: Inflamação; Exposição por inalação; Poluição por fumaça de tabaco.

INTRODUÇÃO

O tabagismo constitui um fator de risco para as principais causas de morte em todo o mundo, incluindo doenças cardíacas e pulmonares.^(1,2) Não há limites seguros de exposição ao cigarro. O tabagismo passivo ou ativo está diretamente relacionado à irritação, inflamação e alteração da função pulmonar logo após as primeiras horas de exposição.^(3,4)

O contato das vias aéreas com a fumaça do cigarro induz alterações no sistema respiratório, tais como, hipersecreção de muco, déficit no transporte mucociliar, defeitos na árvore traqueobrônquica, restrição das pequenas vias aéreas acompanhada por aumento na capacidade de fechamento e tendência às mudanças na relação ventilação-perfusão.⁽⁵⁾

O fumante passivo corresponde àquele que inala a combustão de cigarro espalhada no ambiente. Entre os efeitos deletérios imediatos destacam-se irritação dos olhos, nariz e garganta; sibilos; aumento da frequência respiratória e cardíaca; dentre outros.⁽⁶⁾ Há também aumento das citocinas inflamatórias nas primeiras horas de inalação, principalmente em homens.⁽³⁾

A preocupação com a inalação passiva da fumaça de cigarro é recente, tendo início nos anos 80. Segundo a

Agência Nacional de Vigilância Sanitária, cerca de dois terços da fumaça produzida pelo cigarro (tabagismo passivo, exposição secundária, inalação passiva ou fumante involuntário) é lançada no ambiente através da ponta acesa do produto.⁽⁷⁾ Nos EUA, estima-se que 3.000 mortes/ano por câncer de pulmão foram ocasionadas pela inalação passiva da fumaça de cigarro.⁽⁸⁾ Em relação ao Brasil, a Pesquisa Nacional de Saúde realizada em 2013 destaca que a proporção de pessoas de 18 anos ou mais expostas ao tabagismo passivo foi de 10,7% em casa e de 13,5% no trabalho em ambientes fechados. Entre os gêneros, a proporção é maior entre as mulheres em casa (11,7%) e os homens no trabalho (16,9%).⁽⁹⁾

Alguns estudos destacam que os efeitos deletérios da inalação passiva da fumaça de cigarro podem ter início na infância, originando tosse,⁽¹⁰⁾ disfunção endotelial⁽¹¹⁾ e apneia expiratória prolongada.⁽¹²⁾

Atualmente, a incidência de casos de morte e de doenças causadas pelo cigarro continua elevada; no entanto, há poucos estudos que relacionam as possíveis mudanças estruturais e funcionais do sistema respiratório em fumantes passivos. Sendo assim, despertou-nos o interesse em desenvolver o presente estudo. Após a obtenção dos resultados, esperamos alertar e conscientizar a população sobre a prevenção de doenças causadas

Endereço para correspondência:

Thiago Brasileiro de Vasconcelos. Rua Avelado, 501. apto. 201, Torre 2, Messejana, CEP 60871-210, Fortaleza, CE, Brasil.

Tel.: 55 85 3231-5125. E-mail: thiagobvasconcelos@hotmail.com

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro do Programa de Iniciação Científica do Centro Universitário Estácio do Ceará.

pelo tabagismo a fim de contribuir para a melhoria da saúde pública em geral.

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar aspectos estruturais e funcionais do sistema respiratório de cobaias após a inalação passiva da fumaça de cigarro.

MÉTODOS

Estudo de caráter exploratório, longitudinal e experimental, com estratégia de análise quantitativa dos resultados. Foram utilizadas cobaias machos (5-8 por grupo) da espécie *Cavia porcellus*, pesando em média $321,00 \pm 6,72$ g no início dos experimentos, provenientes do Biotério do Centro Universitário Estácio do Ceará, localizado na cidade de Fortaleza (CE). Os animais foram tratados com respeito às normas de cuidado e bem-estar animal preconizadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (protocolo nº 052/10).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofísica, Fisiologia e Farmacologia do Centro Universitário Estácio do Ceará, em cooperação com o Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, localizada na mesma cidade.

Inalação da fumaça de cigarro

O protocolo consistiu da inalação de dez cigarros comerciais com filtro (Derby Autêntico; Souza Cruz S.A., Rio de Janeiro, Brasil) contendo, por cigarro, 8 mg de alcatrão, 0,7 mg de nicotina e 7 mg de monóxido de carbono. Esses cigarros foram acesos concomitantemente por 20 min pela manhã, tarde e noite, somando 30 cigarros/dia, durante 5 dias.^(13,14) Durante a inalação, os animais foram colocados em uma caixa de acrílico (corpo inteiro; $n = 3$ por caixa) medindo $30,0 \times 16,6 \times 19,8$ cm.⁽¹⁵⁾ Na parte superior da caixa há uma tampa removível para introdução dos animais e, nas porções laterais, dois orifícios: um para a drenagem de ar, permitindo que a fumaça escape, e outro para a colocação dos cigarros (a fumaça dos cigarros foi inserida na caixa acrílica de forma passiva). O grupo controle não inalou nenhum tipo de substância tóxica e foram colocados nas caixas de acrílico do grupo controle (corpo inteiro, $n = 3$ por caixa) com o propósito de simular as mesmas condições dos grupos de inalação de fumaça de cigarro.

Nesse processo de inalação foram formados dois grupos: controle, composto por cobaias que não inalaram nenhuma substância tóxica e que foram eutanasiadas após 25 dias; e tabagismo passivo (TP), composto por cobaias que foram eutanasiadas após 25 dias do processo de inalação passiva de fumaça de cigarro (Figura 1).

Análise do processo inflamatório através da degranulação de mastócitos

Após anestesia (uretana, 1,2 g/kg; i.p.), o mesentério foi retirado e realizada cuidadosamente a inserção de um fio metálico por dentro do intestino delgado, deixando-o com o formato circular; em seguida, esse foi transferido para uma placa de Petri contendo solução de azul de toluidina (solubilizado em álcool 70% na concentração de 0,1 g/l, e posteriormente diluído em NaCl 1% na proporção de 1:10, resultando na concentração de 0,01 g/l) para coloração à temperatura ambiente. Posteriormente, a preparação foi lavada com solução de Tyrode (NaCl 136 mM; KCl 5 mM; $MgCl_2$ 0,98 mM; NaH_2PO_4 0,36 mM; $NaHCO_3$ 11,9 mM; $CaCl_2$ 2 mM; e glicose 5,5 mM) e colocada para secar sobre lâmina de vidro (por 10 min) à temperatura ambiente. Após secagem e retirada do excesso de tecido, foram contadas 100 células em diferentes campos através do microscópio óptico (aumento 200 \times), e, desse total, foi estimado o percentual de degranulação de mastócitos.

Avaliação do estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi medido pela quantificação indireta através do LBA. Para isso, os pulmões foram preenchidos inicialmente com 5 ml de solução salina a 37°C, instilada na cânula traqueal por meio de uma seringa. Após um período de 3 min, o fluido instilado foi lentamente recuperado por aspiração. Esse procedimento foi repetido com mais 5 mL de solução salina. O material foi armazenado em freezer (-70°C).⁽¹⁶⁾

Dosagem de nitrato

Para a realização do ensaio foram usados 100 μ l do reagente de Griess — N-(1-naftil)etilendiamina a 0,1% em água; e sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% — e adicionados 100 μ l do sobrenadante (centrifugado) do homogeneizado a 20% do LBA das cobaias ou 100 μ l dos padrões de várias concentrações. Para o branco foram usados 100 μ l do reagente de Griess e adicionados 100 μ l de solução salina (NaCl



Figura 1. Modelo de inalação passiva da fumaça de cigarro. No detalhe central, fotografia das cobaias durante o processo de inalação. M: manhã; T: tarde; e N: noite.

0,9%). A leitura de absorvância foi feita em 560 nm em leitor de placa.⁽¹⁷⁾ Os resultados foram expressos em $\mu\text{M/g}$ de tecido.

Dosagem de GSH

O reagente foi preparado utilizando 0,02 M de EDTA e ácido tricloroacético 50%. Após esse processo, ocorreu a centrifugação (5000 rpm por 15 min a 4°C); em seguida, o sobrenadante foi recolhido e homogeneizado. As amostras foram misturadas com tampão de 0,4 M Tris-HCl; pH = 8, e 0,01 M de ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzoico). O material permaneceu resfriado durante todo o ensaio. A atividade da enzima foi medida em 412 nm em leitor de placa. Os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

Mensuração do transporte mucociliar

Inicialmente, as cobaias foram anestesiadas com uretana (1,2 g/kg; i.p.) fixadas na posição horizontal em decúbito dorsal; em seguida, foram injetados por meio de uma microseringa, em um ponto da traqueia, 2 μl de uma solução gelatinosa a 0,3 g/ml contendo 0,5% do corante azul de Evans. Decorridos dois minutos, as traqueias foram abertas e, a partir do ponto de injeção, foi medido o transporte mucociliar através de um paquímetro.^(15,18)

Medidas das pressões pulmonares

Os animais foram anestesiados (uretana; 1,2 g/kg; i.p.); em seguida, a traqueia foi canulada e conectada em sistema fechado a um transdutor de pressão, ao final da inspiração, não permitindo escape de fluxo aéreo. A conexão foi mantida até que o animal apresentasse tiragem intercostal (aproximadamente 20 segundos). As mensurações de PImáx e PEMáx foram realizadas três vezes em cada animal, e o tempo de intervalo ocorreu de acordo com a normalização do padrão e ritmo respiratórios.⁽¹⁹⁾ Para o registro dos parâmetros ventilatórios foi utilizado o sistema de aquisição PowerLab/8sp (ADInstruments Pty Ltd., Bela Vista, Austrália).

Registros isométricos dos anéis traqueais

Após anestesia (uretana; 1,2 g/kg; i.p.), e posteriormente, eutanásia por exsanguinação (através da artéria carótida esquerda), foi realizada uma incisão mediana ventral, sendo a traqueia rapidamente cortada em segmento único de aproximadamente 10-12 mm.⁽¹⁹⁾ A seguir, o segmento cortado foi transportado rapidamente para uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit (NaCl 118; KCl 4,7; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,2; NaHCO₃ 25,0; KH₂PO₄ 1,2; e glicose 10; todos em nmol/l). Após a remoção dos tecidos adjacentes, a traqueia foi cortada em quatro segmentos sob a forma de anéis, que foram transferidos para câmaras de banho para órgão isolado contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit, aerada continuamente em mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂); o pH da solução foi ajustado manualmente para 7,4 à temperatura de 37°C, mantida constante pela circulação de água

proveniente de banho-maria com propulsão. A luz dos anéis traqueais foi atravessada por duas peças metálicas confeccionadas em fino aço inoxidável, as quais foram atadas a dois pontos: um fixo na câmara e outro conectado à unidade transdutora de força (ML870B60/C-V; ADInstruments), apropriada para o registro das contrações isométricas. Os sinais gerados pelo transdutor de força foram registrados em um sistema de aquisição computadorizado (PowerLab™ 8/30; ADInstruments). A tensão aplicada a cada segmento traqueal foi ajustada em 1 gf. O período de equilíbrio foi de 1 h com troca do líquido de incubação a cada 15 min.⁽²⁰⁾ Após o período de estabilização, foram confeccionadas curvas de concentração-efeito para potássio (10-120 mM) e carbacol (0,001-10 μM), com intervalo em cada concentração de 5 min. Após o término do protocolo, as traqueias foram retiradas e submetidas à secagem em temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por um período de 2 h; em seguida, foi mensurado o peso de cada tecido.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média, com a representação do número de observações experimentais (n). Para a comparação entre os grupos, foram utilizados ANOVA de um ou dois fatores, assim como os testes t de Student, de Holm-Sidak, de Kruskal-Wallis e de Mann-Whitney, de acordo com o teste de normalidade. Para todos os testes o valor de $p < 0,05$ foi considerado com significância estatística.

RESULTADOS

Degranulação de mastócitos

A degranulação de mastócitos em mesentério de cobaias foi de $19,75 \pm 3,77\%$ (n = 5); porém, nas cobaias que inalaram fumaça de cigarro em curto período (25 dias), a degranulação de mastócitos foi de $42,53 \pm 0,42\%$ (n = 5), sendo significativamente superior ao grupo controle ($p < 0,001$; teste t de Student; Figura 2).

Níveis de nitrito e GSH

Nas dosagens de nitrito (grupo controle = $0,073 \pm 0,007 \mu\text{M/g}$ de tecido vs. grupo TP = $0,065 \pm 0,004 \mu\text{M/g}$ de tecido) e GSH (grupo controle = $293,9 \pm 19,21 \text{ nM/g}$ de tecido vs. grupo TP = $723,7 \pm 67,43 \text{ nM/g}$ de tecido) em LBA de cobaias, foi evidenciado uma diferença significativa ($p < 0,05$; teste t de Student) apenas nos valores de GSH (Figura 3).

Transporte mucociliar e pressões pulmonares

Na análise do transporte mucociliar, o grupo controle apresentou um percurso de $0,65 \pm 0,08 \text{ cm}$; entretanto, essa distância foi reduzida significativamente ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Kruskal-Wallis) para $0,30 \pm 0,03 \text{ cm}$ no grupo TP (n = 6; Figura 4A).

Em relação à mensuração das pressões pulmonares, a média da PImáx nos animais controle (n = 5) foi

de $-9,93 \pm 0,94$ cmH₂O, enquanto, no grupo TP (n = 6), essa foi de $-40,44 \pm 9,26$ cmH₂O, ocorrendo, portanto, uma diminuição significativa ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak) quando comparada com o grupo controle (Figura 4B).

Ao mensurar a média da PEmáx, os animais controle (n = 6) apresentaram uma pressão de $0,58 \pm 0,05$ cmH₂O, enquanto, no grupo TP (n = 6), essa foi de $3,60 \pm 0,60$ cmH₂O, demonstrando um aumento significativo ($p < 0,05$; ANOVA seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak) em relação ao grupo controle (Figura 4C).

Contratilidade traqueal

A adição de concentrações crescentes e cumulativas de K⁺ (10-120 mM) no grupo controle (n = 6) promoveu uma contração de amplitude igual a $0,05 \pm 0,00$ gf/mg de tecido. Após a inalação passiva da fumaça de cigarro, o grupo TP (n = 8) apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$; ANOVA de dois fatores seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak) na força de contração traqueal, com valores correspondentes a $0,10 \pm 0,01$ gf/mg de tecido (Figura 5A).

Também foram realizadas curvas de concentração-efeito para o estímulo contraturante de carbacol

(0,001-10 μM): os animais do grupo controle (n = 6) apresentaram valores médios de $0,09 \pm 0,02$ gf/mg de tecido; tais valores contráteis foram aumentados de forma significativa ($p < 0,05$; ANOVA de dois fatores seguida pelo pós-teste de Holm-Sidak) no grupo de animais submetidos ao processo de inalação ($0,23 \pm 0,03$ gf/mg de tecido; n = 8; Figura 5B).

DISCUSSÃO

Os dados encontrados no presente estudo revelam que a inalação passiva da fumaça de cigarro em curto período de exposição promove alterações estruturais e funcionais no sistema respiratório; tais efeitos foram comprovados pelo déficit no tecido pulmonar, aumento de células inflamatórias, com consequente acúmulo de muco, e comprometimento da função pulmonar provocada pela hiper-reatividade traqueal. Apesar de alguns modelos de inalação^(13,14,21,22) fazerem referência aos danos provocados pelo uso constante e prolongado de cigarro, podemos centrar a relevância do presente estudo sobre as alterações ocasionadas pela inalação passiva da fumaça do cigarro em um curto período de tempo (5 dias), com alteração da quantidade e do tempo de exposição à fumaça de cigarro, em comparação a estudos anteriores.⁽²³⁻²⁵⁾ O estudo de Hernandez et al.⁽²³⁾ também optou por analisar os efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro por um curto período; para tanto, os animais foram expostos ao protocolo de três exposições a um cigarro por 10 min, separadas por um intervalo de 30 min, por dia, durante 4 dias, e observou-se que a exposição de cobaias à fumaça de cigarro provocou hiper-reatividade das vias aéreas à histamina e recrutamento de células inflamatórias.

Ressalta-se que nos últimos anos o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos relacionados a essa inalação vem proporcionando abordagens cada vez mais particularizadas, com a utilização de metodologias concisas e reprodutíveis para a investigação das repercussões contráteis e inflamatórias decorrentes desse processo de inalação.

Os animais que inalaram fumaça de cigarro apresentaram perda da arquitetura tecidual pulmonar, acompanhada por migração de células pró-inflamatórias

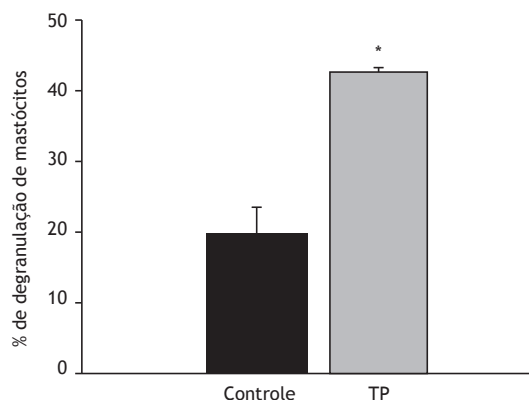


Figura 2. Comparação da proporção de degranulação de mastócitos entre os grupos controle e tabagismo passivo (TP). Dados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

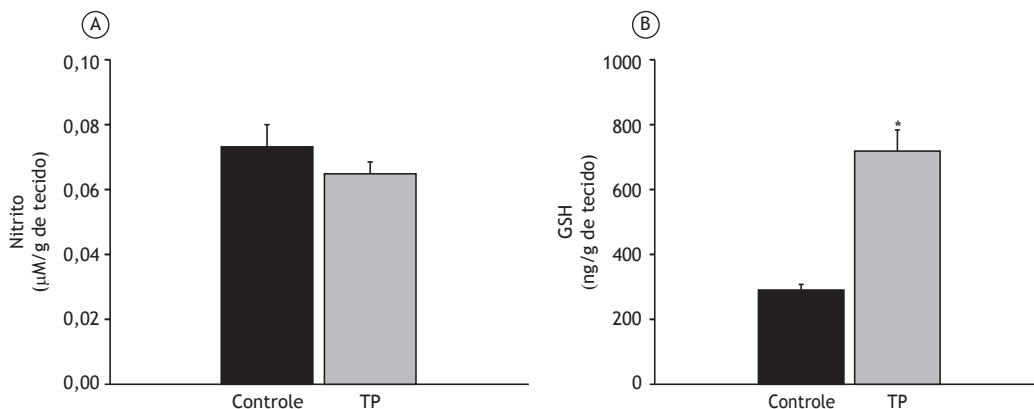


Figura 3. Comparação entre os grupos controle e tabagismo passivo (TP) em relação aos níveis de nitrito (em A) e de glutatona reduzida (GSH; em B) nos tecidos. Dados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; teste t de Student.

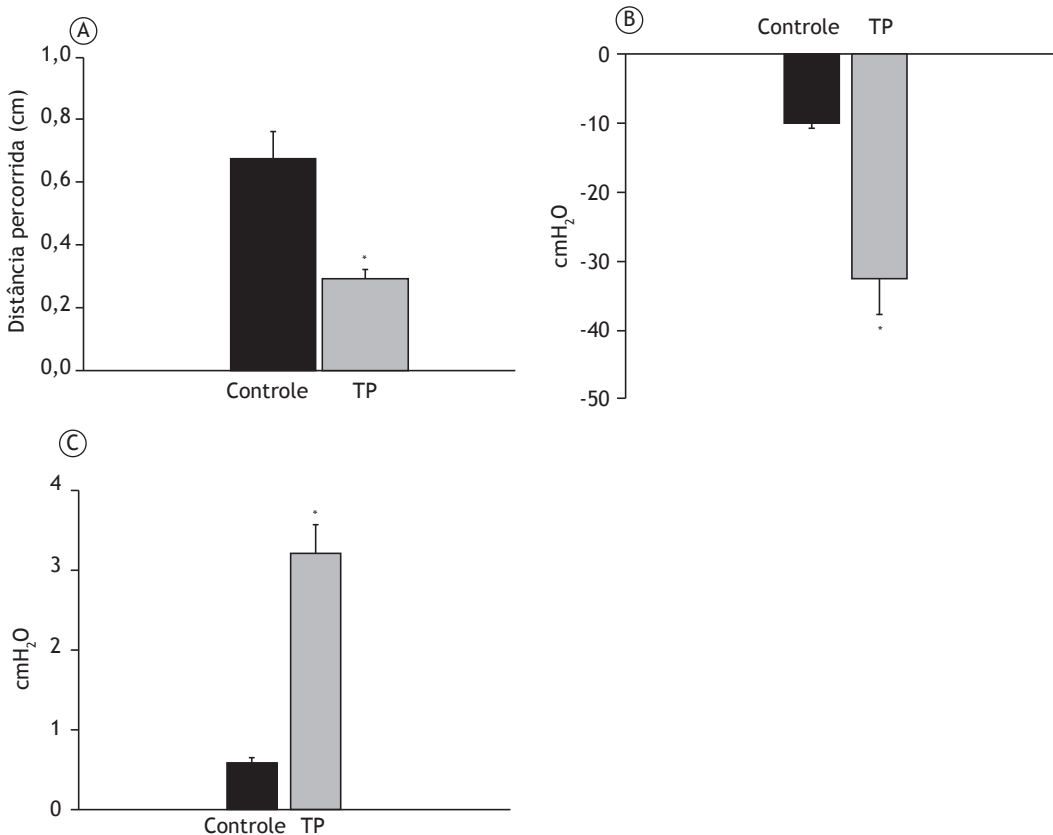


Figura 4. Comparação entre os grupos controle e tabagismo passivo (TP) em relação ao transporte mucociliar (em A), PImáx (em B) e PEmáx (em C). Dados apresentados em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$ para todos.

(dados não mostrados), o que corrobora outros modelos experimentais de inalação da fumaça de cigarro.⁽²³⁻²⁷⁾ Tais alterações foram destacadas pelo estudo de Banerjee et al.,⁽²⁸⁾ no qual as cobaias que inalaram fumaça de cigarro apresentaram inflamação e apoptose, o que induz a destruição das membranas alveolares e de células septais, provocando um aumento do espaço aéreo pulmonar, o que pode ter influenciado as alterações das pressões pulmonares no presente estudo. Page et al.⁽²⁹⁾ acrescentam que, após a exposição dos nervos sensoriais das vias aéreas pela fumaça do cigarro, ocorre um dano à camada do epitélio ciliar por mediadores citotóxicos, aumento da secreção de muco, hiper-responsividade e vasodilatação, dados que vão ao encontro do presente estudo.

Nesse sentido, Valença e Porto⁽²¹⁾ ressaltam a participação do macrófago na destruição da matriz pulmonar extracelular de animais expostos à fumaça de cigarro, com progressão temporal; em contrapartida, o grupo controle (animais expostos ao ar ambiente) apresentou alvéolos preservados e ocasionais macrófagos alveolares. O estudo de Zhong et al.,⁽³⁰⁾ no qual as cobaias foram expostas por 20 min à inalação de 10 cigarros, duas vezes por dia durante 14 dias, estabelece que os animais expostos à fumaça do cigarro tiveram aumento nos níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-8), incremento das células inflamatórias e espessura traqueal.

Outro importante efeito deletério observado no presente estudo foi a diminuição do transporte mucociliar nas cobaias submetidas à inalação passiva da fumaça de cigarro, dados confirmados por Furtado,⁽⁵⁾ quando afirma que o tabagismo leva a uma diminuição no transporte mucociliar devido a várias substâncias tóxicas encontradas no cigarro que possuem propriedades ciliostáticas e ciliotóxicas. Vasconcelos et al.⁽¹⁵⁾ também observaram déficit no transporte mucociliar em cobaias que mimetizavam um quadro asmático, corroborando o presente estudo quando afirmam que doenças inflamatórias causam alteração na função dos cílios e na quantidade de muco secretado, o que influencia de forma direta a proteção do sistema respiratório.

Sendo assim, para proteger-se, o organismo possui um sistema de defesa intracelular que pode atuar de duas maneiras: seja reduzindo as substâncias tóxicas do organismo antes que causem lesão, através de GSH, superóxido dismutase, catalase, vitamina E, dentre outros antioxidantes; seja inibindo a lesão ocorrida, através do ácido ascórbico, glutatona redutase e glutatona peroxidase, entre outros.⁽³¹⁾ De forma indireta, a mensuração das enzimas antioxidantes e a concentração de tripeptídeos são os métodos mais utilizados para a avaliação do estresse oxidativo.⁽³²⁾ Esse grupo de autores⁽³²⁾ complementa destacando o importante efeito antioxidante do GSH no trato respiratório, com a capacidade de reduzir o estresse oxidativo.

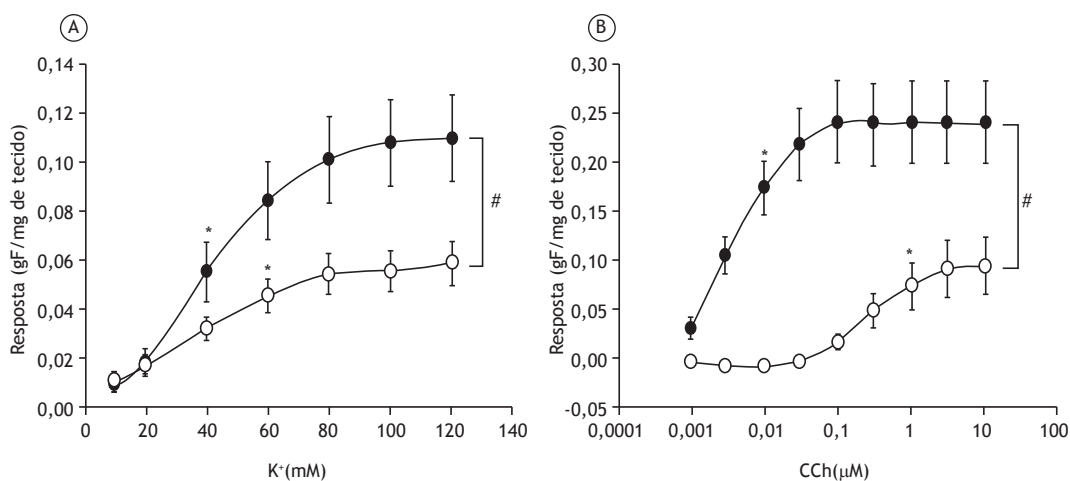


Figura 5. Hiper-reatividade traqueal ao estímulo contrátil com K^+ , em A, e com carbachol (CCh), em B, nos grupos controle (círculos brancos) e tabagismo passivo (círculos pretos). Dados expressos em média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; primeiro efeito significativo (ANOVA de um fator, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak). # $p < 0,05$ (ANOVA de dois fatores, seguido pelo pós-teste de Holm-Sidak).

As dosagens de GSH, uma das principais enzimas antioxidantes do trato respiratório, após a inalação da fumaça de cigarro, estavam significativamente mais elevadas em comparação com as do grupo controle, demonstrando uma resposta adaptativa do organismo a uma lesão, porém sem alterações nos níveis de nitrito. MacNee e Rahman⁽³³⁾ acrescentam que inicialmente há uma diminuição dos níveis de GSH, mas com o passar do tempo, esses níveis são elevados como forma de proteção aos danos tóxicos ocasionados pela inalação da fumaça de cigarro. Entretanto, esse aumento de GSH pode não ser suficiente para neutralizar a excessiva carga de oxidantes durante a fase aguda do tabagismo.

Nesse sentido, diversos estudos corroboram a relação entre a inalação da fumaça de cigarro e a produção de estresse oxidativo,⁽³³⁻³⁵⁾ pois é sabido que o cigarro é um potencial indutor de efeitos adversos em estruturas biológicas e nos tecidos, além de influenciar a perda de peso, o aumento de células inflamatórias e a fadiga muscular.^(26,35) O estudo de Carlos et al.,⁽²⁶⁾ no qual camundongos machos (C57BL/6) foram expostos à fumaça emitida pela queima de 12 cigarros ao dia por 7, 15, 30, 45 e 60 dias, identificaram que o estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro ocasionou alterações tanto nos pulmões como no diafragma; também acrescentaram que o dano oxidativo causado pela exposição à fumaça de cigarro ocorre primeiro no músculo esquelético e posteriormente no tecido pulmonar. Em relação ao déficit de força muscular, Camargo Filho et al.⁽³⁶⁾ destacam que a fumaça de cigarro pode originar atrofia muscular como forma de adaptação do organismo à limitação de oxigênio, ocasionando perda da atividade e desorganização das fibras musculares.

Os animais que inalaram fumaça de cigarro também apresentaram um quadro de hiper-reatividade traqueal, tanto para estímulos contráteis eletromecânicos (K^+) quanto farmacomecânicos (carbachol), possivelmente

pela diminuição da proteção epitelial após a inalação da fumaça de cigarro.⁽³⁷⁾ Os resultados aqui apresentados dão suporte à hipótese de que o processo de inalação da fumaça de cigarro tanto favorece um aumento das respostas nos canais de Ca^{2+} mediados por voltagem como nos canais de Ca^{2+} operados por receptor.^(38,39)

O quadro de hiper-reatividade apresentado no presente modelo de inalação passiva da fumaça de cigarro é semelhante ao encontrado em modelos de asma e doença broncoconstritora inflamatória crônica.^(22,23,37)

James et al.⁽⁴⁰⁾ destacaram que a inalação da fumaça de cigarro promove efeitos deletérios no sistema respiratório de cobaias, como o aumento da resistência das vias aéreas; porém, tais efeitos não promoveram aumento da espessura da parede das vias respiratórias. Já Omini et al.⁽⁴¹⁾ acrescentam que a exposição passiva à fumaça de cigarro promove um aumento significativo do número de macrófagos e eosinófilos no LBA, o que adicionalmente corrobora a hiper-reatividade traqueal; no entanto, sem hipersecreção de muco.

Hernandez et al.⁽²³⁾ realizaram um estudo com o objetivo de investigar a capacidade de um composto mucoativo (CO 1408) para modular o desenvolvimento de hiper-reatividade das vias aéreas induzida pela inalação passiva da fumaça de cigarro em curto período. Os autores identificaram que a inalação passiva de fumaça de cigarro provoca hiper-reatividade das vias aéreas associada com o incremento de células inflamatórias, e que o composto CO 1408 foi capaz de reverter esses efeitos deletérios.

Dentre as limitações do presente estudo, pode-se destacar que o modelo experimental de inalação passiva da fumaça de cigarro foi realizado em um curto período, não sendo avaliados os efeitos de longo prazo após a inalação. Nesse sentido, novas abordagens que contemplem esses questionamentos, como também

a inserção de formas de prevenção ou tratamento, podem ser realizadas.

Em conclusão, o protocolo de inalação passiva da fumaça de cigarro utilizado foi eficaz, pois mimetizou alterações estruturais e funcionais no sistema respiratório de cobaias que caracterizam os danos ocasionados pela fumaça de cigarro.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Professor Doutor Rodrigo José Bezerra Siqueira os comentários durante a escrita do manuscrito e ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará o suporte estrutural.

REFERÊNCIAS

- Burns DM. Epidemiology of smoking-induced cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis.* 2003;46(1):11-29. [http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620\(03\)00079-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0033-0620(03)00079-3)
- Almeida AF, Mussi FC. Smoking: knowledge, attitudes, habits and degree of dependence of young adults in Salvador [Article in Portuguese]. *Rev Esc Enferm USP.* 2006;40(4):456-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S0080-62342006000400002>
- Flouris AD, Metsios GS, Carrillo AE, Jamurtas AZ, Gourgoulis K, Kiroopoulos T, et al. Acute and short-term effects of secondhand smoke on lung function and cytokine production. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(11):1029-33. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200812-1920OC>
- Rufino R, Costa CH. Etiopathogenesis of COPD [Article in Portuguese]. *Pulmao RJ.* 2013;22(2):9-14.
- Furtado RD. Smoking and anesthetic implications [Article in Portuguese]. *Rev Bras Anestesiol.* 2002;52(3):354-67.
- Coelho SA, Rocha SA, Jong LC. Consequências do tabagismo passivo em crianças. *Cien Cuid Saude.* 2012;11(2):294-301. <http://dx.doi.org/10.4025/ciencucidsaude.v11i2.10281>
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência de Produtos Derivados do Tabaco. A ANVISA na redução à exposição involuntária à fumaça do tabaco. Brasília: GPDTA/ANVISA; 2009.
- Office on Smoking and Health (US). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2006. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK44324/>
- Malta DC, Andrade SS, Stopa SR, Pereira CA, Szwarcwald CL, Silva-Júnior JB, et al. Brazilian lifestyles: National Health Survey results, 2013. *Epidemiol Serv Saude.* 2015;24(2): 217-26. <http://dx.doi.org/10.5123/S1679-49742015000200004>
- Ekwo EE, Weinberger MM, Lachenbruch PA, Huntley WH. Relationship of parental smoking and gas cooking to respiratory disease in children. *Chest.* 1983;84(6):662-8. <http://dx.doi.org/10.1378/chest.84.6.662>
- Hashemi M, Afshani MR, Mansourian M, Poursafa P, Kelishadi R. Association of particulate air pollution and secondhand smoke on endothelium-dependent brachial artery dilation in healthy children. *J Res Med Sci.* 2012;17(4):317-21.
- Mutoh T, Joad JP, Bonham AC. Chronic passive cigarette smoke exposure augments bronchopulmonary C-fibre inputs to nucleus tractus solitarius neurons and reflex output in young guinea-pigs. *J Physiol.* 2000;523 Pt 1:223-33. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.00223.x>
- Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohnikoff M, Pereira PM, Conceição GM, et al. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res.* 1997;30(10):1241-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997001000017>
- Duarte JL, Faria FA, Ceolin DS, Cestari TM, Assis GF. Effects of passive smoke inhalation on the vocal cords of rats. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2006;72(2):210-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992006000200010>
- Vasconcelos TB, Andrade KR, Castro CF, Bastos VP. Evaluation of mucociliary transport in trachea of guinea pigs chemically hydrolyzed challenged and sensitized to ovalbumin [Article in Portuguese]. *Rev Biocienc.* 2015;21(1):109-17.
- Bastos VP, Gomes AS, Lima FJ, Brito TS, Soares PM, Pinho JP, et al. Inhaled 1,8-cineole reduces inflammatory parameters in airways of ovalbumin-challenged Guinea pigs. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2011;108(1):34-9. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00622.x>
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannerbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982;126(1):131-8. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Kimoto A, Saitou M, Hirano Y, Iwai T, Tomioka K, Miyata K, et al. A new, simple method for measuring mucociliary clearance in guinea-pigs. *Pulm Pharmacol Ther.* 1999;12(1):49-54. <http://dx.doi.org/10.1006/pupt.1999.0169>
- Bastos VP. Ação broncodilatadora e anti-inflamatória do 1,8 cineol em modelo experimental de asma em cobaias [thesis]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará; 2009.
- Vasconcelos TB, Ribeiro-Filho HV, Lucetti LT, Magalhães PJ. Citronellol, an alcoholic monoterpene with inhibitory properties on the contractility of rat trachea. *Braz J Med Biol Res.* 2016;49(2):e4800. <http://dx.doi.org/10.1590/1414-431x20154800>
- Valença SS, Porto LC. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke. *J Bras Pneumol.* 2008;34(10):787-95. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132008001000006>
- Iwasaki S, Yamakage M, Satoh J, Namiki A. Different inhibitory effects of sevoflurane on hyperreactive airway smooth muscle contractility in ovalbumin-sensitized and chronic cigarette-smoking guinea pig models. *Anesthesiology.* 2006;105(4):753-63. <http://dx.doi.org/10.1097/00000542-200610000-00022>
- Hernandez A, Daffonchio L, Brandolini L, Zuccari G. Effect of a mucoactive compound (CO 1408) on airway hyperreactivity and inflammation induced by passive cigarette smoke exposure in guinea-pigs. *Eur Respir J.* 1994;7(4):693-7. <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.94.07040693>
- Campos ML, Corrêa MG, Júnior FH, Casati MZ, Sallum EA, Sallum AW. Cigarette smoke inhalation increases the alveolar bone loss caused by primary occlusal trauma in a rat model. *J Periodontol Res.* 2014;49(2):179-85. <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12091>
- Cuzic S, Bosnar M, Kramarić MD, Ferencić Z, Marković D, Glojnaric I, et al. Claudin-3 and Clara cell 10 kDa protein as early signals of cigarette smoke-induced epithelial injury along alveolar ducts. *Toxicol Pathol.* 2012;40(8):1169-87. <http://dx.doi.org/10.1177/0192623312448937>
- Carlos SP, Dias AS, Forgiarini Júnior LA, Patricio PD, Graciano T, Nesi RT, et al. Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. *J Bras Pneumol.* 2014;40(4):411-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132014000400009>
- Kozma Rde H, Alves EM, Barbosa-de-Oliveira VA, Lopes FD, Guardia RC, Buzo HV, et al. A new experimental model of cigarette smoke-induced emphysema in Wistar rats. *J Bras Pneumol.* 2014;40(1):46-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132014000100007>
- Banerjee S, Maity P, Mukherjee S, Sil AK, Panda K, Chattopadhyay D, et al. Black tea prevents cigarette smoke-induced apoptosis and lung damage. *J Inflamm (Lond).* 2007;4:3. <http://dx.doi.org/10.1186/1476-9255-4-3>
- Page C, Curtis M, Sutter M, Walker M, Hoffman B. *Farmacologia Integrada.* 2nd ed. São Paulo: Manole; 2004.
- Zhong S, Nie YC, Gan ZY, Liu XD, Fang ZF, Zhong BN, et al. Effects of Schisandra chinensis extracts on cough and pulmonary inflammation in a cough hypersensitivity guinea pig model induced by cigarette smoke exposure. *J Ethnopharmacol.* 2015;165:73-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.009>
- Ferreira AL, Matsubara LS. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress [Article in Portuguese]. *Rev Assoc Med Bras (1992).* 1997;43(1):61-8.
- Vasconcelos TB, Cardoso AR, Josino JB, Macena RH, Bastos VP. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? *UNOPAR Cient Cienc Biol Saude.* 2014;16(3):213-9.

33. MacNee W, Rahman I. Is oxidative stress central to the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Trends Mol Med.* 2001;7(2):55-62. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)01912-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4914(01)01912-8)
34. MacNee W. Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest.* 2000;117(5 Suppl 1):303S-17S. http://dx.doi.org/10.1378/chest.117.5_suppl_1.303S-a
35. Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sánchez F, et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(4):477-88. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200908-1220OC>
36. Camargo Filho JC, Garcia BC, Kodama FY, Bonfim MR, Vanderlei LC, Ramos EM, et al. Effects of aerobic exercise on the skeletal muscle of rats exposed to cigarette smoke. *Rev Bras Med Esporte.* 2011;17(6):416-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-86922011000600010>
37. Bastos VP, Brito TS, Lima FJ, Pinho JP, Lahlou S, Abreu Matos FJ, et al. Inhibitory effect of 1,8-cineole on guinea-pig airway challenged with ovalbumin involves a preferential action on electromechanical coupling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2009;36(11):1120-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1440-1681.2009.05189.x>
38. Somlyo AV, Somlyo AP. Electromechanical and pharmacomechanical coupling in vascular smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968;159(1):129-45.
39. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ.* 2003;27(1-4):201-6.
40. James AL, Pare PD, Hogg JC. Effects of lung volume, bronchoconstriction, and cigarette smoke on morphometric airway dimensions. *J Appl Physiol* (1985). 1988;64(3):913-9.
41. Omini C, Hernandez A, Zuccari G, Clavenna G, Daffonchio L. Passive cigarette smoke exposure induces airway hyperreactivity to histamine but not to acetylcholine in guinea-pigs. *Pulm Pharmacol.* 1990;3(3):145-50. [http://dx.doi.org/10.1016/0952-0600\(90\)90045-K](http://dx.doi.org/10.1016/0952-0600(90)90045-K)