

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

EDWIN TAMASHIRO

**Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a ciliogênese  
e formação de biofilmes bacterianos no epitélio respiratório**

Ribeirão Preto

2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDWIN TAMASHIRO

**Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a cilogênese  
e formação de biofilmes bacterianos no epitélio respiratório**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma T. Anselmo-Lima

Co-orientadores: James N. Palmer, M.D.  
Noam A. Cohen, M.D., Ph.D.

Ribeirão Preto  
2009

Tamashiro, Edwin.

Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a ciliogênese e a formação de biofilmes bacterianos no epitélio respiratório.

Ribeirão Preto, 2009.

82p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Programa: Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço – Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

Orientadora: Anselmo-Lima, Wilma T.

Co-orientadores: Cohen, N.A.

Palmer, J.N.

1. Rinossinusite crônica, 2. Fumaça de cigarro, 3. Biofilme bacteriano, 4. Ciliogênese, 5. Cultura de células epiteliais.



*Aos meus exemplares pais, Sueko e Roberto, que em todos os momentos da minha vida têm me dado todo apoio e incentivo para crescer na vida. Vossos legados são os melhores exemplos que um filho poderia receber como herança de seus pais.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha futura esposa Leticia Martins Faleiros, pelo amor e apoio inestimável. Mesmo na minha ausência, sempre esteve ao meu lado dando suporte e incentivos para que mais este sonho pudesse ser concluído.

Aos meus irmãos Douglas e Vivian, que graças à união familiar me apoiaram em múltiplos aspectos, inclusive financeiramente, durante todos momentos da minha formação acadêmica.

Ao Dr. Marcelo B. Antunes, pela grande amizade construída e pelo bom exemplo herdado dentro da Universidade da Pennsylvania, sem o qual não teria sido possível o meu estágio de doutoramento no exterior.

Aos colegas do departamento, professores, médicos assistentes, residentes e funcionários, pelo companheirismo e amizade dispendida durante os vários anos de convivência.

À Profa. Dra. Fabiana Cardoso Pereira Valera, pelo seu exemplo de educadora e incentivo à carreira acadêmica.

À Maria Rossato e à Maria Dolores Seabra Ferreira (Tuca), pela amizade e apoio técnico na execução da microscopia eletrônica de varredura.

Ao professor Benedito H. Machado e à Leni G. H. Bonagamba, por semearem desde o primeiro ano de faculdade o espírito e a beleza em busca de novos conhecimentos e, principalmente, pela primeira oportunidade para que tudo isso se iniciasse.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte e apoio financeiro concedido para a realização do estágio de doutoramento no exterior.

A todos os amigos do laboratório de Rinologia da Universidade da Pennsylvania (Bei Chen, Jennifer Kofonow, Bradford Woodworth, Geeta Bhargave, Anthony Prince, Michael Cohen, Caroline Banks, Laurel Dogrhamji, Adrianna Hekiert, Benjamin Bleir, Sri Kiran Chennupati, Diana Lim e Alexander Chiu) pela ótima convivência e laços de amizade criados na Philadelphia.

Um especial agradecimento aos professores Noam A. Cohen e James N. Palmer e suas famílias, que me acolheram como verdadeiro irmão dentro de suas casas, laboratório, consultórios e centro cirúrgico. Agradeço pela imensa hospitalidade recebida desde os primeiros dias, pela amizade e pela rica bagagem científica trazida do exterior.

Um especial agradecimento à professora Wilma, pelo exemplo ímpar de docência, com sua dedicação e preocupação com a formação técnica e moral de seus alunos. Minha eterna gratidão por todos seus ensinamentos e pela confiança em mim depositada.

## RESUMO

Tamashiro, E. **Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a ciliogênese e formação de biofilmes bacterianos no epitélio respiratório**. 2009. 82f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

**Introdução:** Recentes evidências têm demonstrado que a presença de biofilmes bacterianos e a exposição à fumaça de cigarro podem participar da fisiopatogenia da rinosinusite crônica (RSC). No entanto, não existem estudos demonstrando se a exposição à fumaça de cigarro favorece o desenvolvimento de RSC através do crescimento de biofilmes bacterianos sobre o epitélio respiratório. **Objetivos:** Avaliar os efeitos que a exposição à fumaça de cigarro exerce sobre o processo de ciliogênese e constituição da barreira epitelial, bem como avaliar os efeitos diretos e indiretos (mediado pelo epitélio respiratório) sobre o crescimento de biofilmes. **Materiais e Métodos:** Culturas de epitélio nasal de camundongos crescidas em interface-ar líquido foram expostas a diferentes concentrações de extrato de fumaça de cigarro (EFC) ou condensado de fumaça de cigarro (CFC) durante o processo de proliferação e diferenciação celular ao longo de 15 dias. No final do experimento, foram avaliados a resistência elétrica transepitelial e os aspectos morfológicos da superfície por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Um grupo de culturas foram infectadas com *P.aeruginosa* em sua superfície e avaliadas quanto à formação de biofilmes por meio de MEV. Paralelamente, amostras bacterianas coletadas de pacientes com RSC foram incubadas com

fumaça de cigarro e quantificadas a formação de biofilme pelo ensaio modificado de biofilme de Calgary. **Resultados:** A exposição ao EFC a diluições menores do que 1:100 e ao CFC a concentrações maiores do que 30µg/ml promoveram uma significativa redução tanto em porcentagem de área ciliada como em tamanho dos cílios. A incubação de bactérias com EFC diluídas a 1:10 promoveu um aumento significativo na formação biofilmes em 39% das bactérias. Entretanto, a exposição de culturas celulares ao EFC ou ao CFC não promoveu alterações significativas da formação de biofilmes em sua superfície. **Conclusões:** A exposição à fumaça de cigarro promoveu uma diminuição do processo de ciliogênese em caráter dose-dependente, sem causar alterações na confluência celular. A exposição direta das bactérias ao EFC a diluição de 1:10 promoveu um aumento significativo na formação de biofilme. No entanto, quando mediado pelo epitélio respiratório, não promoveu alterações significativas no crescimento de biofilmes.

**Palavras-chave:** fumaça de cigarro, biofilme bacteriano, ciliogênese, cultura de epitélio respiratório, rinosinusite crônica.

## ABSTRACT

Tamashiro, E. **Cigarette smoke exposure effects on ciliogenesis and bacterial biofilm formation on the respiratory epithelium.** 2009. 82f. Thesis (Doctoral) – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2009.

**Introduction:** Recent evidences demonstrate that bacterial biofilms and cigarette smoke exposure may play a role in the pathophysiology of chronic rhinosinusitis (CRS). However, there are no studies that demonstrate that cigarette smoke exposure predisposes to CRS through an increase of biofilm development.

**Objectives:** To evaluate the effects of cigarette smoke exposure on ciliogenesis and epithelial barrier as well as to evaluate the effects of cigarette smoke on biofilm growth directly and indirectly mediated by the respiratory epithelium. **Materials and**

**Methods:** Murine air-liquid interface nasal epithelial cultures were exposed to different concentrations of cigarette smoke extract (CSE) or to cigarette smoke condensate (CSC) during the proliferation and differentiation process throughout 15 days. In the end of the experiment, transepithelial electric resistance was measured and morphological aspects of the surface were evaluated by scanning electron microscopy (SEM). Some cultures were infected with *P. aeruginosa* on its surface and ultimately evaluated the biofilm growth by SEM. Human bacterial samples collected from CRS patients were incubated with cigarette smoke and quantified biofilm growth by modified Calgary biofilm assay. **Results:** CSE exposure to dilutions lower than 1:100 and CSC exposure to concentrations higher than

30µg/ml promoted a significant reduction on the overall ciliated area as well as development of shorter cilia. Incubation of bacteria with CSE 1:10 significantly increased biofilm formation in 39% of bacteria. However, epithelial cell cultures exposed either to CSE or CSC did not have biofilm formation altered on the surface. **Conclusions:** Cigarette smoke exposure promoted a decrease in the ciliogenesis process in a dose-dependent manner without changing cellular confluence. Direct exposure of bacteria to CSE 1:10 increased significantly biofilm growth. However, when mediated through the respiratory epithelium, cigarette smoke did not change biofilm formation.

**Key words:** cigarette smoke, bacterial biofilm, ciliogenesis, respiratory epithelial culture, chronic rhinosinusitis.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ciclo de vida dos biofilmes bacterianos: (I) Forma planctônica (II) Contato com uma superfície (III) Pontes de adesão (IV) Microcolônia (V) Desprendimento de células planctônicas ..... 22
- Figura 2: Esquema representativo das sequências realizadas no ensaio modificado de biofilme de Calgary ..... 41
- Figura 3: Representação dos controles positivo (PA01) e negativos (*sad31* e *sad36*) no ensaio modificado de biofilme de Calgary. (A) Coloração do etanol 100% após eluição da cristal violeta, com mensuração e representação gráfica da densidade óptica obtida. (B) Imagens de microscopia eletrônica de varredura de PA01, *sad31* e *sad36* após 20 horas de incubação ..... 43
- Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000x) obtidas de culturas de epitélio respiratório no 15º dia de crescimento após exposição a diferentes concentrações de CFC ..... 48
- Figura 5: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000x) obtidas de culturas de epitélio respiratório no 15º dia de crescimento após exposição a diferentes concentrações de EFC ..... 49



Figura 6: Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (10000x) demonstrando a diferença do tamanho ciliar entre os grupos de culturas expostas a concentrações variadas de EFC ao final de 15 dias .....	51
Figura 7: Imagens representativas em microscopia confocal a laser (20x) de culturas epiteliais expostas ao Extrato de Fumaça de Cigarro (EFC). Marcação por imunohistoquímica de anticorpos anti- $\beta$ tubulina do tipo IV (Verde), <i>Zona occludens-1</i> (Vermelho) e Hoescht (Azul) .....	52
Figura 8: Resistência elétrica transepitelial ( $\Omega\text{cm}^2$ ) medida 15 dias após o crescimento celular com exposição ao extrato de fumaça de cigarro (A) ou ao condensado de fumaça de cigarro (B) .....	53
Figura 9: Representação das densidades ópticas obtidas das formas planctônicas e dos biofilmes obtidos com o ensaio modificado de biofilme de Calgary em diferentes concentrações de EFC (amostra 1531, <i>P. aeruginosa</i> ). * $p=0,002$ ; $n=4$ em cada subgrupo .....	55
Figura 10: Imagem representativa de microscopia eletrônica de varredura (4000x) de um biofilme maduro de <i>P. aeruginosa</i> após 20 horas de crescimento sobre uma cultura epitelial de células ciliadas. (1) Matrix extracelular, (2) Poros aquosos, (3) Células ciliadas .....	57

Figura 11: Imagem de microscopia confocal de varredura a laser (63x) obtida após marcação com o kit Baclight Live-Dead<sup>®</sup>. Notar a presença de bactérias viáveis no biofilme, estando aderidas às células epiteliais viáveis. O encontro entre o eixo x e o eixo y centralmente representa um canal aquoso formado pelo biofilme ..... 58

Figura 12: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (150x) demonstrando a presença de biofilmes (setas escuras) no menisco de interface ar-líquido (setas claras), formado pela solução contendo as bactérias e o epitélio respiratório ..... 59

Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000-5000x) representativas da formação de biofilmes preferencialmente sobre áreas não ciliadas da cultura epitelial ..... 60

Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a presença de estruturas de ligação entre *P. aeruginosa* e os cílios (setas brancas) ..... 61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem de área ciliada ao final de 15 dias de crescimento das diferentes culturas celulares expostas ao extrato (EFC) ou ao condensado de fumaça de cigarro (CFC), assim como a análise estatística comparativa ao grupo controle através do teste ANOVA one-way seguido da aplicação do teste de Student-Newman-Keuls)..... 50

Tabela 2 - Valores médios da densidade óptica (DO) de biofilme através do ensaio modificado de biofilme de Calgary. DO=Densidade Óptica, média±desvios padrão, EFC=Extrato de fumaça de cigarro, n=4..... 54

## LISTA DE ABREVIATURAS

CFC	Condensado de fumaça de cigarro
DMEM	Dulbecco's modified essential media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EFC	Extrato de fumaça de cigarro
DO	Densidade óptica
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
FITC	Fluorescein isothiocyanate
MEM	Minimum essential media
i.e.	<i>id est</i> , isto é
MCVL	Microscopia confocal de varredura a laser
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
PBS	Phosphate buffered saline
RSC	Rinossinusite crônica
RPM	Rotações por minuto
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
WHO	World Health Organization

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
°	Graus
°C	Graus Celsius
Ω	Ohm

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1. Biofilme Bacteriano x Rinossinusite Crônica .....	21
2.2. Tabagismo x Rinossinusite Crônica .....	29
2.3. Defesa Inata do Epitélio Respiratório x Tabagismo.....	30
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
4.1. Cultura de Epitélio Respiratório Diferenciado.....	36
4.2. Avaliação dos Efeitos do Cigarro Sobre a Regeneração e Ciliogênese.....	37
4.3. Avaliação dos Efeitos Diretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes.....	40
4.4. Avaliação dos Efeitos Indiretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes, Mediados pelo Epitélio Respiratório.....	43
4.5. Análise Estatística .....	45
<b>5. RESULTADOS</b> .....	46
5.1. Efeitos de Fumaça de Cigarro sobre a Regeneração Celular e Ciliogênese.....	47
5.2. Efeitos Diretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes .....	53
5.3. Exposição do Epitélio Respiratório à Fumaça de Cigarro e seus Efeitos na Formação de Biofilme .....	55
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	62
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	72
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74
<b>ANEXO DE PUBLICAÇÃO</b>	

# **1 INTRODUÇÃO**

A Rinossinusite Crônica (RSC) é uma doença inflamatória de etiopatogenia ainda não totalmente elucidada. Em virtude do grande impacto social desta doença sobre o sistema de saúde, com grande número de consultas médicas, perdas de dias de serviço, gastos com medicamentos e exames complementares, iniciativas têm sido criadas com o intuito de se compreender mecanismos fisiopatogênicos desta afecção a fim de se direcionar condutas e tratamentos melhores aos pacientes com RSC.

Uma das teorias vigentes que poderia explicar alguns mecanismos fisiopatogênicos da RSC enquadra-se no paradigma de biofilme bacteriano. A adesão persistente do biofilme à superfície mucosa nasossinusal, aliada à grande resistência a antibióticos e mecanismos de defesa inata e adaptativa desenvolvidas por ele, poderiam explicar a manutenção e perpetuação de mecanismos inflamatórios presentes em pacientes com RSC (COSTERTON et al., 2003). Desde a primeira publicação feita por Cryer et al. em 2005, demonstrando a presença de biofilmes em RSC, outros investigadores também têm demonstrado a presença de biofilmes bacterianos por diferentes métodos. Alguns desses estudos mostram que a presença de biofilmes estão relacionados a uma evolução pós-operatória pior em pacientes com RSC (BENDOUAH et al., 2006; PSALTIS et al., 2008).

Outro fator que tem despertado interesse na gênese e manutenção da RSC é a exposição ao tabaco. Sabe-se que as diferentes toxinas presentes na fumaça de cigarro, entre elas acroleína, formaldeído, monóxido de carbono, nicotina, cotinina, acetaldeído, fenol e cianeto de potássio são altamente tóxicos para o epitélio respiratório (WALKER; KIEFER, 1966; DALHAMM, 1970; AGIUS et al., 1995). Entretanto, o papel que a exposição ao tabaco exerce na patogênese da



RSC ainda está para ser elucidado. Estudo de Ramadan e Hinerman (2002) demonstrou que crianças expostas ao tabaco necessitaram de cirurgia endoscópica mais freqüentes para rinosinusite persistente ou recorrente em relação a crianças não expostas à fumaça de cigarro. Além disso, segundo Kennedy (1992), o tabagismo é o pior fator prognóstico pós-operatório de pacientes com RSC submetidos a tratamento cirúrgico.

Considerando que fatores ambientais podem interferir nos sistemas de imunidade inata e adaptativa do aparelho respiratório, ainda não existem evidências demonstrando a associação de fatores ambientais no desenvolvimento e manutenção da RSC. Em virtude desta possibilidade, este estudo teve como objetivo avaliar se a exposição ao tabagismo interfere na fisiopatogenia da RSC por potencializar a formação de biofilmes bacterianos.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

## 2.1. Biofilme Bacteriano x Rinossinusite Crônica

As bactérias na natureza podem ser encontradas basicamente sob duas formas distintas: bactérias livres e flutuantes, denominadas de forma planctônica, e as bactérias firmemente aderidas a uma superfície, denominadas de biofilme. Analogamente, as bactérias planctônicas poderiam ser comparadas ao plânctons do oceano assim como os recife de corais são para os biofilmes.

Os biofilmes são uma forma adaptativa do ciclo de vida procariota que ocorre virtualmente com todas as bactérias, sendo inclusive a principal forma de sobrevivência e proliferação. Morfologicamente os biofilmes se caracterizam por um conjunto de bactérias agrupadas tridimensionalmente recoberto por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos, ácidos nucleicos e proteínas. Apesar da grande complexidade de diferentes estruturas moleculares, os biofilmes são formados predominantemente por água, em até 90% de seu volume total. A porção sólida é constituída por células (15%) e matriz extracelular (85%) (COSTERTON et al., 1995). Outra característica importante dos biofilmes é a presença de poros e canais aquosos. Esses meios de comunicação com o meio externo criam um microambiente peculiar em seu interior em função de mecanismos passivos e ativos de troca de nutrientes. O meio interno dos biofilmes apresenta-se com concentrações decrescentes de nutrientes e de oxigênio em comparação às da periferia, o que acaba gerando gradientes diferentes de metabolismo bacteriano nesta mesma direção. Em virtudes destas características metabólicas e estruturais, aliado à expressão de diferentes genes e proteínas específicas desta fase, os biofilmes adquirem características específicas que os distinguem das suas

contrapartes planctônicas. Entre elas destacam-se a elevada resistência aos mecanismos de defesa inata e adaptiva do hospedeiro, resistência aumentada a antibióticos e a atuação como fonte perpetuadora de bactérias livres e circulantes.

Baseado em estudos proteômicos de *Pseudomonas aeruginosa*, tem sido proposto que a formação dos biofilmes acontece basicamente em 5 etapas seqüenciais e dinâmicas (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004) (figura 1).

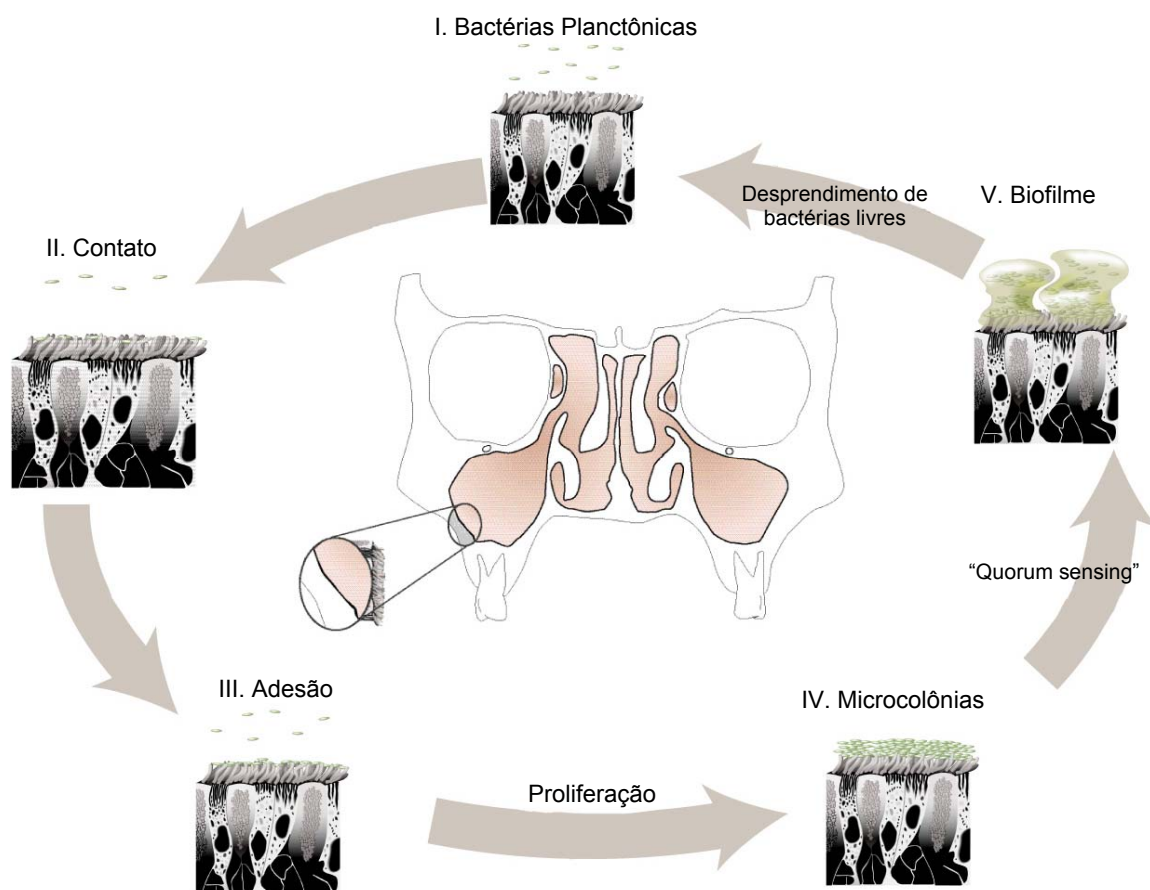


Figura 1. Ciclo de vida dos biofilmes bacterianos: (I) Forma planctônica (II) Contato com uma superfície (III) Pontes de adesão (IV) Microcolônia (V) Desprendimento de células planctônicas.

O primeiro passo ocorre quando há o contato aleatório de bactérias contra uma superfície. O contato inicial das bactérias sofre influência de algumas características do meio ambiente como, por exemplo, a necessidade de forças mecânicas de cisalhamento ou a presença de uma interface ar-líquido (STEPANOVIC et al., 2001). Através de um sistema transmissor-receptor finamente regulado, as bactérias utilizam sinais ambientais para promover uma alteração fenotípica por meio da seleção e ativação de genes essenciais para o desenvolvimento inicial dos biofilmes. Nesta etapa, cada bactéria passa a produzir moléculas sinalizadoras que, dependendo da concentração atingida na vizinhança, vão desencadear as demais etapas de diferenciação em biofilme. Este processo de intensa comunicação intercelular é conhecido como *quorum sensing*, que é regulado por vários genes específicos de cada bactéria (DAVIES et al., 1998). Em um segundo momento, as bactérias passam a produzir matriz extracelular, criando verdadeiras pontes de adesão entre o complexo bacteriano e a superfície. Em uma terceira etapa, à medida em que ocorre um aumento local do número de bactérias aderidas em uma superfície, começam a se formar microcolônias com posterior maturação em torres, produção de matriz extracelular polimérica, surgimento de canais aquosos e crescimento tridimensional. A formação de estruturas tridimensionais em forma de torre, entretanto, é dependente das condições nutricionais do meio externo, que parecem exercer influência no crescimento clonal bacteriano, assim como na motilidade bacteriana para posterior rearranjo estrutural dentro do biofilme. Nesta quarta etapa, que consiste na maturação dos biofilmes, colonizadores secundários, como fungos e outras bactérias, podem se associar à estrutura do biofilme. Em uma quinta e última etapa, por motivos ainda não totalmente esclarecidos, ocorre o desprendimento de bactérias livres dos biofilmes

que, na realidade, restabelece a manutenção do ciclo bacteriano biofilme-bactéria planctônica.

Sob o ponto de vista evolutivo, o crescimento de bactérias aderidas a uma superfície confere inúmeras vantagens à sobrevivência e perpetuação procariota. Em primeiro lugar, a adesão a uma superfície confere às bactérias um certo grau de estabilidade para seu crescimento, com possibilidade de interação e cooperação de funções catalíticas com outras células em sua proximidade. Outra vantagem é que, sob a forma de biofilme, as bactérias apresentam menor possibilidade de sofrer agressões ambientais como exposição a raios ultra-violeta, toxicidade por metais, desidratação e à variações de pH e osmolaridade (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004).

Entretanto, os biofilmes bacterianos só começaram a ganhar importância no contexto médico após o conhecimento de sua grande resistência à ação de antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (VUONG et al., 2004), como por exemplo menor susceptibilidade à fagocitose (LEID et al., 2002). Os biofilmes bacterianos apresentam resistência a antibióticos quando comparados os níveis de concentração mínima inibitória em até 1000 vezes maior do que a sua forma planctônica (COSTERTON et al., 2003). Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a alta resistência dos biofilmes a agentes biocidas (MAH; O'TOOLE, 2001; STEWART; COSTERTON, 2001). Um dos mecanismos de resistência deve-se às características de barreira conferida pela matriz extracelular que recobre o biofilme, principalmente para os agentes reativos (como álcalis ou superóxidos), substâncias carregadas ionicamente (como alguns antibióticos e metais) e para os grandes agentes bactericidas (imunoglobulinas). Os exopolissacarídeos contidos na matriz extracelular atuam neutralizando ou

bloqueando a passagem dos agentes biocidas, de forma que ao penetrar no interior do biofilme não apresentam atividade ou concentração suficiente para eliminar as bactérias presentes no interior do biofilme. Um exemplo típico deste mecanismo é a atividade  $\beta$ -lactâmica encontrada na matriz extracelular de *Pseudomonas aeruginosa* (GALLANT et al., 1995). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que muitos antibióticos têm a capacidade de atravessar livremente a matriz exopolissacarídea, como a tobramicina e ciprofloxacina, mas não possuem atividade bactericida esperada dentro do biofilme (WALTERS et al., 2003). Tal resistência pode ser explicada pelo estado fisiológico dos biofilmes, com um gradiente decrescente de metabolismo existente em seu interior. Como a maioria dos antibióticos atuam apenas em bactérias que estão em plena atividade metabólica, como é o caso dos  $\beta$ -lactâmicos, não teriam portanto nenhum efeito nas bactérias localizadas nas porções mais centrais ou “dormentes” dentro do biofilme. Zonas de inatividade metabólica poderiam explicar a alta resistência e permanência dos biofilmes mesmo após tratamento com antibióticos em altas doses (SPOERING; LEWIS, 2001). Outra hipótese poderia ser explicada pela possibilidade dos canais aquosos atuarem como bombas ativas expulsando os antibióticos que porventura entrassem no interior do biofilme (GILLIS et al., 2005). Uma outra hipótese é a de que poderia haver bactérias naturalmente resistentes a um determinado antibiótico e que, por estarem em proximidade no interior no biofilme, poderiam atuar como um modo facilitador de transmissão horizontal de genes de resistência.

Muitas doenças que apresentam um caráter indolente e crônico, com dificuldade de se recuperar o agente causal através de métodos de cultura, alta resistência a tratamento com antibióticos e períodos de exacerbações aguda, têm

sido relacionadas ao modelo patogênico de biofilmes (POTERA, 1999). Uma das razões da dificuldade de se obter culturas positivas em doenças relacionadas a biofilmes explica-se pois, além de estarem encapsulados por uma matriz exopolissacarídea e aderidos à uma superfície, em geral esses pacientes são tratados previamente com antibióticos, o que elimina as formas planctônicas livres e cultiváveis. Entretanto, pelo fato do biofilme persistir como uma fonte perpetuadora de bactérias livres, esses pacientes logo acabam sofrendo recaída mesmo após o tratamento com antibióticos apropriados ao perfil de sensibilidade das bactérias planctônicas. Além disso, a persistência de biofilmes poderiam explicar a perpetuação de mecanismos inflamatórios no hospedeiro e a persistência de sintomas cronicamente (PALMER, 2005). Dessa forma, diversos estudos têm demonstrado uma relação estreita entre biofilmes bacterianos e diferentes doenças crônicas infecciosas, entre elas as cáries dentárias, periodontites, endocardites, infecções em próteses ortopédicas e em catéteres implantáveis, osteomielites, infecções urinárias, pneumonia em fibrose cística, infecções em implante coclear, otite média crônica e, mais recentemente, em rinosinusites crônicas (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; POST et al., 2004).

O primeiro estudo descritivo de biofilmes em rinosinusites foi publicado por Cryer et al. em 2004, no qual foi identificado biofilmes bacterianos na mucosa de 4 dos 16 pacientes com rinosinusite crônica através de microscopia eletrônica de varredura (MEV). Em outro trabalho do mesmo laboratório, Perloff e Palmer (2004) avaliaram a presença de biofilmes em sondas posicionadas no recesso do seio frontal e que foram removidas no pós-operatório de pacientes com rinosinusite



crônica. Neste estudo, todas as sondas dos 6 pacientes apresentaram estruturas morfológicas compatíveis com biofilme bacteriano.

Utilizando-se de microscopia eletrônica de transmissão, Ferguson e Stolz (2005) demonstraram a presença de biofilmes bacterianos em 2 de 4 pacientes com RSC. Também utilizando MEV e de transmissão, Sanclement et al. (2005) demonstrou uma incidência de 80% (24/30) de biofilmes observados em biópsia de mucosa de pacientes com rinosinusite crônica. Nenhum dos 4 pacientes saudáveis tomados como controle apresentou achado positivo.

Em crianças, Zuliani et al. (2006) compararam a presença de biofilmes bacterianos através de MEV entre adenóides de crianças com RSC e apnéia obstrutiva do sono, verificando que em 94,9% da superfície adenoidiana dos casos de RSC havia a presença de biofilmes, em contraste com apenas 1,9% da superfície nos casos de apnéia obstrutiva do sono. Os autores concluíram que a presença de biofilmes na nasofaringe de crianças com rinosinusite crônica poderia servir como um reservatório de bactérias resistentes ao tratamento clínico e que a eliminação da fonte perpetuadora através da adenoidectomia poderia explicar a melhora clínica nessa população de pacientes.

Através de microscopia confocal de varredura a laser (MCVL), Sanderson, Leid e Hunsaker (2006), utilizando marcadores de 4 diferentes bactérias de hibridização fluorescente *in situ* (FISH), demonstraram a presença de biofilmes bacterianos em 14 dos 18 pacientes com rinosinusite crônica, inclusive com algumas amostras apresentando marcação polimicrobiana. Entretanto, 2 das 5 amostras controles apresentaram marcação positiva compatível com biofilmes. Pelo fato dos biofilmes encontrados nos pacientes controles serem significativamente menores em tamanho, estes autores sugerem ser apenas

simples colonizadores. Psaltis et al. (2007), utilizando MCVL associado à marcação de suas amostras com o kit BacLight Live/Dead<sup>®</sup>, que diferencia células viáveis de células mortas, demonstraram que em 17 de 38 pacientes (44,7%) com RSC apresentaram achados compatíveis com biofilmes em biópsia da mucosa, sendo que nenhum dos 9 pacientes controle apresentaram achados positivos.

Além dessas evidências de estudos em mucosa nasossinusal, um estudo *in vitro* utilizando o ensaio modificado de biofilme de Calgary demonstrou uma prevalência de 28,6% de formação de biofilmes em culturas obtidas de pacientes com RSC (PRINCE et al., 2008).

Apesar das diversas evidências descritivas envolvendo a presença de biofilmes na mucosa nasossinusal de pacientes com RSC, não se conhece ainda o verdadeiro papel que esses biofilmes exercem na fisiopatologia da mesma. Entretanto, dois estudos demonstram um possível efeito deletério dos biofilmes na evolução de pacientes com RSC. Bendouah et al. (2006) têm demonstrado que pacientes com cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa* que apresentam capacidade formadora de biofilme *in vitro* estão associados à uma evolução desfavorável no pós-operatório de rinossinusite crônica e polipose nasossinusal. Da mesma maneira, Psaltis et al. (2008) demonstraram que a presença de biofilmes na mucosa de pacientes com RSC estão associados a sintomas piores e à inflamação mais intensa na mucosa nasal durante a evolução pós-operatória.

## 2.2. Tabagismo x Rinossinusite Crônica

Em sua última publicação sobre tabagismo, a Organização Mundial da Saúde aponta que entre as oito principais causas de morte que ocorrem no mundo, seis delas envolvem o consumo e a exposição ao tabaco, entre elas as doenças inflamatórias e as doenças infecciosas do trato respiratório (WHO, 2008).

Sabe-se que a fumaça gerada pela combustão do cigarro produz uma mistura de mais de 4000 substâncias nocivas (EPA, 1992), entre os quais encontram-se a nicotina, cotinina, acetaldeído, acroleína, formaldeído, fenol e cianeto de potássio, que são altamente tóxicos para o epitélio respiratório (WALKER; KIEFER, 1966; DALHAMM, 1970; AGIUS et al., 1995).

A exposição à fumaça de cigarro tem sido sugerido como um fator de “agravamento de prolongamento da sinusite” desde 1964, publicado no relatório sobre tabagismo do Departamento de Saúde dos Estados Unidos (US Public Health, 1964). Desde então, algumas evidências associando RSC e tabagismo têm sido apontada.

Lieu e Feinstein (2000) demonstraram que a prevalência de rinossinusite crônica e recorrente era maior em pacientes tabagistas quando comparados aos não-tabagistas. Um outro estudo epidemiológico realizado no Canadá também confirmou uma maior prevalência de rinossinusites em pacientes tabagistas (CHEN; DALES; LIN, 2003). Mais recentemente, um levantamento realizado entre comissários de vôo observou uma significativa associação entre horas de exposição ao tabaco nas cabines e quadros de sinusite relatada pelos próprios comissários. (EBBERT et al., 2007). Além desses estudo, outros pesquisadores

têm avaliado o papel da exposição à fumaça de cigarro nos resultados pós-operatórios de cirurgias endoscópicas funcionais dos seios paranasais. Em um estudo com seguimento de longo prazo, Kennedy (1992) demonstrou que o tabagismo foi o fator mais importante que levava à necessidade de cirurgia revisional. Ramadan e Hinerman (2002) demonstraram que crianças submetidas à exposição passiva ao tabaco necessitaram de cirurgias revisionais para rinossinusite recorrente ou persistente mais frequentemente do que crianças não expostas à fumaça de cigarro. Smith et al. (2005) publicaram que o tabagismo diminui a melhora endoscópica pós-operatória quando comparada aos não-fumantes, enquanto que Briggs et al. (2004) demonstraram que o tabagismo está associado a resultados piores a longo prazo (52 meses) relacionados aos sintomas pós-operatórios. Apesar dessas diversas evidências apontando uma relação causal entre exposição à fumaça de cigarro e RSC, os mecanismos fisiopatológicos inerentes desta associação ainda não estão totalmente elucidados.

### 2.3. Defesa Inata do Epitélio Respiratório x Tabagismo

O transporte mucociliar é considerado o principal mecanismo de imunidade inata das vias respiratórias superiores e inferiores, eliminando milhares de partículas poluentes, alérgenos e patógenos presentes no ar inspirado. A efetividade deste transporte depende da integridade de três fatores funcionais: da atividade ciliar normal, da produção apropriada de muco e da superfície líquida nas vias aéreas (ELIEZER et al., 1970; MALL, 2008). O epitélio respiratório ciliado

transporta o muco e os debris de sua superfície através de um batimento rítmico, coordenado e orientado em direção ao trato gastrointestinal. O movimento das partículas da sua superfície em uma única direção é garantido por um movimento de rápida propulsão em um sentido, seguido de uma fase lenta de recuperação. Conforme os cílios iniciam o movimento de recuperação para a posição habitual, há a estimulação de cílios adjacentes a se contraírem, propagando um movimento coordenado denominado de onda metacrônica (SANDERSON; SLEIGH, 1981).

Outro fator importante para a defesa inata do hospedeiro é a capacidade de regeneração epitelial e formação de cílios. Sob condições normais o epitélio respiratório encontra-se em constante ciclo de perda e de regeneração da sua superfície, em torno de 1% da população epitelial (AYERS; JEFFERY, 1988). Entretanto, este processo torna-se pronunciadamente acelerado em cerca de 20 vezes em casos de infecção ou após injúria mecânica (GORDON; LANE, 1980; ERJEFALT et al., 1995). Após injúria mecânica na traquéia de ratos ou em infecções virais das vias respiratórias de camundongos o reestabelecimento do epitélio respiratório requer aproximadamente 2-4 semanas (SHIMIZU et al., 1994; LOOK et al., 2001), enquanto que em humanos o recuperação completa do transporte mucociliar após cirurgia endoscópica dos seios paranasais ocorre mais gradualmente e pode levar até 6 meses de duração (IKEDA et al., 1997; ASAI et al., 2000; HAFNER et al., 1997; INANLI et al., 2000).

A ciliogênese é um resultado de um processo extremamente coordenado e complexo de cascatas de moléculas sinalizadoras e junções de proteínas, e que pode ser dividido em quatro grandes estágios de formação: (1) geração dos centríolos, (2) migração dos centríolos duplicados, (3) formação das estruturas associadas ao corpo basal e (4) alongamento dos cílios (HAGIWARA; OHWADA;

TAKATA, 2004). Após o término dessas etapas, cada célula epitelial ciliada respiratória expressa aproximadamente 200 cílios com capacidade contrátil sincrônica.

Desta forma, qualquer distúrbio que prejudique o transporte mucociliar, seja ela diminuindo o batimento ciliar, o processo de ciliogênese ou de regeneração epitelial a fim de repor células envelhecidas ou para se recuperar de insultos infecciosos ou cirúrgicos, acaba por reduzir a força propulsora das secreções resultando em estase de muco nas vias aéreas respiratórias.

**3 OBJETIVOS**

Este estudo teve como objetivo central avaliar se a exposição à fumaça de cigarro está envolvido na fisiopatogenia da RSC por potencializar a formação de biofilmes bacterianos.

Em função desta hipótese, tivemos como objetivos específicos:

- 1) Avaliar se a fumaça de cigarro atenua a função de barreira inata do epitélio respiratório interferindo na regeneração epitelial e/ou ciliogênese.
- 2) Avaliar se a fumaça de cigarro induz a formação de biofilme:
  - 2.1.) Através de efeitos diretos sobre a bactéria;
  - 2.2.) Através de efeitos indiretos sobre o epitélio respiratório.



## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### 4.1. Cultura de Epitélio Respiratório Diferenciado

Camundongos geneticamente idênticos C57BL/6 foram sacrificados em uma câmara de CO<sub>2</sub>, sendo obtido por dissecação o septo nasal. O tecido septal foi mantido em meio de cultura celular (MEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) contendo 70mg/ml de pronase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100UI penicilina e 100mg/ml estreptomicina por 1 hora em incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Logo após a adição de FBS 10% (HyClone, Logan, UT, USA) para bloqueio da atividade enzimática da protease, as amostras foram gentilmente invertidas para dissociação celular e levadas para centrifugação a 1000 RPM (120 g) por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado e o centrifugado celular ressuspendido em meio de cultura e levado novamente para incubação em placas de petri para adesão de fibroblastos durante 2 horas. Após esta etapa, a amostra coletada do sobrenadante das placas de petri foram centrifugadas e levadas para quantificação de concentração celular. Utilizamos suportes de cultura celular com interface ar-líquido, com membrana de poliestireno porosa de 0,4µm e 6,5mm de diâmetro (Costar®), revestidas previamente com 100 µl de colágeno placentário humano a 50µg/ml (tipo VI, Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, PA, USA). As culturas foram semeadas com cerca de 4x10<sup>5</sup> células, sendo nutridas nos 5 primeiros dias com meio de cultura 1:1 DMEM-HamF12, suprimento de cultura universal ITS® (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), Penicilina 60UI e Estreptomicina 60µg/ml tanto no compartimento basolateral como no apical. Após o 5° dia de crescimento, as células foram mantidas apenas com nutrição basolateral, expondo a superfície das células a ar, substituindo o meio de cultura por um meio de diferenciação

celular composta por DMEM-HamF12, NuSerum 2% (BD Bioscience), 100UI de Penicilina e 100µg/ml de Estreptomicina. O meio de cultura foi trocado 3 vezes por semana, e as células foram utilizadas para experimentação habitualmente após 10-14 dias de exposição a ar, quando foi visualizado a presença de batimento ciliar por um microscópio invertido (estágio terminal de diferenciação celular) e consolidação da confluência celular, medida indiretamente por resistência transepitelial  $>500\Omega/\text{cm}^2$ .

#### 4.2. Avaliação dos Efeitos do Cigarro Sobre a Regeneração e Ciliogênese

Em nosso estudo, utilizamos 2 modelos de fumaça de cigarro: Condensado de Fumaça de Cigarro e Extrato de Fumaça de Cigarro.

O Condensado de Fumaça de Cigarro (CFC) é obtido a partir da filtragem da fumaça produzida durante o processo de combustão do cigarro, retendo particulados da fumaça de cigarro. Após a combustão de cigarros padrões (Stantard Research Cigarette, 1R3F, University of Kentucky, KY), o filtro é então pesado e a quantidade obtida de condensado de fumaça de cigarro corresponde ao aumento do peso do filtro. As partículas retidas no filtro são então dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), gerando uma solução de 4% (peso/volume), ou de 40mg/ml (Murty Pharmaceuticals, Lexington KY). Utilizamos concentrações entre 3µg/ml a 100µg/ml, sob as mesmas concentrações de DMSO nas diferentes diluições.

O Extrato de Fumaça de Cigarro (EFC) é composta por compostos solúveis em água presentes na fumaça de cigarro. O EFC foi obtido por processo semelhante, mas ao invés de se filtrar a fumaça gerada pela combustão do cigarro, esta foi bombeada em direção a um reservatório contendo o próprio meio a ser estudado. A combustão de 8 cigarros em 10ml do meio de cultura foi padronizada como sendo a solução 100%, e a partir dessa solução matriz foram criadas diluições crescentes de 1:30, 1:100, 1:300 e 1:1000.

Para avaliar o crescimento, maturação e diferenciação de células epiteliais respiratórias, culturas celulares foram submetidas à nutrição basolateral, à qual foram adicionadas diferentes concentrações de CFC ou de EFC. Para se avaliar maturação e diferenciação, as células foram expostas à fumaça de cigarro a partir do primeiro dia de cultivo, trocando-se o meio de diferenciação a cada dois dias, três vezes por semana. As culturas foram acompanhadas periodicamente com mensuração de resistência transepitelial e avaliação da presença de batimento ciliar. Assim que se detectou batimento ciliar nas culturas controles, mostrando diferenciação terminal das células, as culturas foram fixadas e processadas para análise em microscopia eletrônica de varredura e/ou imunohistoquímica para detecção da presença de tubulina tipo IV e *zona occludens* tipo 1. O dia final do experimento foi tomado como o 15º dia após a semeadura, quando as culturas controles obtiveram batimento ciliar presente com resistência transepitelial acima de  $500\Omega/\text{cm}^2$ .

Para processamento de MEV, as amostras foram lavadas 3x com solução salina tamponada e fixadas com a solução modificada de Karnovsky (Electron Microscope Sciences - 2% paraformaldeído, 2.5% glutaraldeído, solução tampão de Sorensen). Após fixadas, as amostras foram desidratadas com concentrações

crescentes de etanol até etanol 100% e em seguida processadas para desidratação pelo ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Logo após, as amostras foram colocadas em suportes metálicos, banhadas com precipitado de ouro e levadas ao microscópio eletrônico de varredura ARM-1400 Philips em uma voltagem de aceleração de 20kV. Imagens representativas das amostras foram analisadas e capturadas em TIFF.

Para processamento de imunohistoquímica, as amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% a 4°C por 30 minutos e lavadas após com solução salina tamponada (PBS) por 3 vezes. Em seguida as amostras foram permeabilizadas com Triton X<sup>®</sup> 0,3% e incubadas com soro albumina bovina 1% e soro de cabra a 5% por 1 hora. Após nova lavagem com PBS por 3 vezes, foram utilizados anticorpos monoclonais primários de camundongos anti- $\beta$  tubulina tipo IV diluídos a 1:500 e anticorpos policlonais anti-zona occludens-1 de coelhos diluídos a 1:100 (Invitrogen) e deixados em incubação noturna a 4°C. Após lavagem com PBS, as culturas foram incubadas sequencialmente em temperatura ambiente por 90 minutos cada com imunoglobulina G anti-camundongos (1:500) marcada com fluoresceína isotiocianato (FITC) e imunoglobulina G anti-coelho (1:500) marcada com rodamina. Após marcação com anticorpos, as culturas foram incubadas com Hoechst 33342 para contra-marcação nuclear na concentração de 2 $\mu$ g/ml por 20 minutos em temperatura ambiente. Após 3 lavagens com PBS, as amostras foram montadas em lâminas de vidro com solução aquosa Gel Mount<sup>®</sup> (Sigma-Aldrich), sendo então analisadas no microscópio confocal a laser Zeiss LSM510META.

Para análise da porcentagem da área ciliada das figuras representativas de MEV foi utilizado o programa de processamento de imagens ImageJ (National Institute of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), com mensuração da área ciliada e

análise percentual das imagens representativas. Foram tomadas pelo menos 3 medidas representativas das culturas expostas à fumaça de cigarro, com dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.3. Avaliação dos Efeitos Diretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes

Para avaliação de formação de biofilmes utilizamos o ensaio de biofilme de Calgary [CERI et al., 1999], modificado por Moskowitz et al. (2004).

As amostras bacterianas foram colhidas de pacientes com RSC por meio de esfregaço nasal, guiado por endoscopia. O diagnóstico de RSC foi determinado segundo Lanza e Kennedy (1997). Cada amostra de esfregaço foi alocada individualmente em tubos de ensaio de cultura com meio Luria Bertani (Fisher, Fairlawn, NJ) e cultivados por 16 horas em uma incubadora com rotação translacional a 37°C para atingir a fase *log* de crescimento. As amostras foram então diluídas para leitura de absorbância em um espectrofotômetro (Genesys 2, Thermo Spectronic Corp, USA) em 600nm em meio Luria-Bertani para aquisição de uma quantidade padrão de densidade óptica de 0,1 e então diluídas 1:100 no mesmo meio Luria-Bertani. Após essa padronização, 125  $\mu$ l de cada amostra foi transferida em quadruplicata para um poço de uma placa de microtitulação de 96-poços (Nalgene Nunc International, Rochester NY, número de catálogo 269787). A fim de testarmos a influência da exposição à fumaça de cigarro na formação de biofilmes, diluímos o EFC em diferentes concentrações (controle, 1:10, 1:100,

1:1000 e 1:10000) no mesmo meio de cultura bacteriano. A seguir, uma tampa modificada de poliestireno com 96 projeções (Nunc TSP system, número de catálogo 445497) foi colocada sobre a placa de crescimento bacteriano e então incubado para crescimento de biofilmes em 37°C por 20 horas. Não utilizamos neste ensaio o CFC a fim de minimizarmos qualquer influência que solventes como o DMSO poderiam ter sobre o crescimento bacteriano.

Após incubação, a tampa com as projeções foi lavada gentilmente por três vezes em água estéril e introduzida em solução de violeta cristal a 2% (Remel Inc., Lenexa KS) por 30 minutos para corar os biofilmes aderentes nas projeções. Novamente, a tampa foi lavada com água estéril por 3 vezes e deixada para secar em temperatura ambiente por 45 minutos. A seguir, a tampa foi colocada sobre uma nova placa contendo etanol 100% por 15 minutos. A tampa foi então desprezada e a violeta cristal eluída foi levada para leitura espectrofotométrica a 600nm ( $DO_{600}$ ) (Microplate Reader 680, Bio-Rad Hercules, Califórnia) (figura 2).

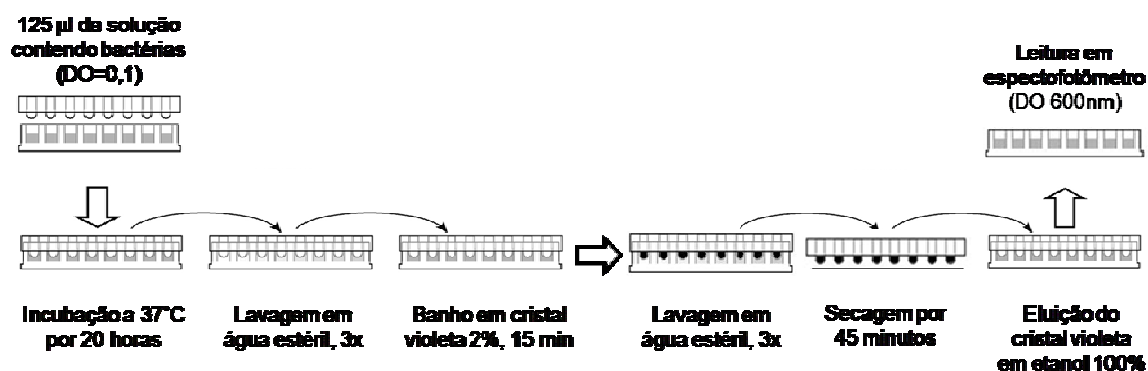


Figura 2: Esquema representativo das seqüências realizadas no ensaio modificado de biofilme de Calgary.

A fim de aumentarmos a confiabilidade deste teste, utilizamos em todos os ensaios 3 cepas bacterianas com propriedade de formação de biofilme conhecida. Como controle positivo utilizamos PA01, uma cepa de *P. aeruginosa* com capacidade formadora de biofilmes. Como controles negativos, utilizamos a cepa *sad31*, uma *P. aeruginosa* carreadora de mutação do gene flagela K, incapaz de formar um flagelo completo e portanto sem capacidade de aderir a superfícies. Outro controle negativo utilizado foi o *sad36*, uma *P. aeruginosa* mutante do gene pili tipo IV, com incapacidade de autoagregação e formação de torres e biofilmes maduros. Este mutante, portanto, é capaz apenas de formar microcolônias monofilamentares (figura 3). Cada amostra controle foi cultivada e padronizada em um processo semelhante às amostras bacterianas obtidas de pacientes. Entretanto, a fim de minimizar possíveis contaminações nas cepas controles, cada uma delas foi incubada com antibiótico de seleção apropriada. PA01 expressa resistência contra gentamicina e portanto foi incubada com gentamicina (100 µg/ml), enquanto que *sad31* e *sad36* são resistentes a tetraciclina e foram incubadas com este antibiótico na concentração de 15 µg/ml.



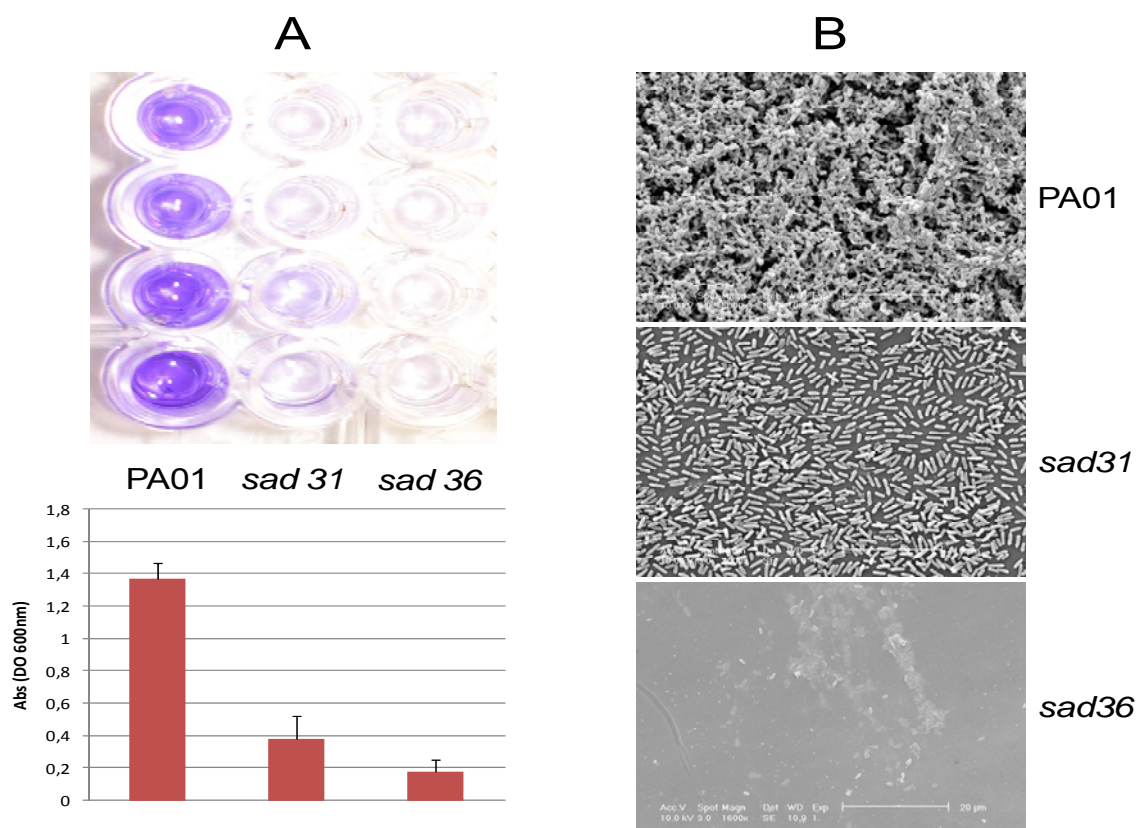


Figura 3: Representação dos controles positivo (PA01) e negativos (*sad31* e *sad36*) no ensaio modificado de biofilme de Calgary. (A) Coloração do etanol 100% após eluição da cristal violeta, com mensuração e representação gráfica da densidade óptica obtida. (B) Imagens de microscopia eletrônica de varredura de PA01, *sad31* e *sad36* após 20 horas de incubação.

#### 4.4. Avaliação dos Efeitos Indiretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes, Mediados pelo Epitélio Respiratório

A fim de se avaliar os efeitos da exposição de culturas epiteliais à fumaça de cigarro sobre a formação de biofilmes, adicionamos CFC ou EFC no meio basolateral durante os 15 dias de crescimento e diferenciação celular e, nas últimas 24 horas, adicionamos PA01 na superfície da cultura.

As condições de infecção das culturas celulares com *P. aeruginosa* foram otimizadas de forma que houvesse quantidade suficiente de biofilmes para ser analisada e sem que prejudicasse a viabilidade das células presentes na cultura. As condições otimizadas para formação de biofilmes em cultura celular foram: crescimento em incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, densidade óptica de PA01 = 1x10<sup>-5</sup> diluídas em solução salina tamponada (PBS), crescimento sobre a cultura celular formando um nível de interface ar-líquido deixando as culturas anguladas em 45° e remoção completa de antibióticos do meio de cultura no compartimento basolateral (Woodworth et al., 2008). Para se avaliar a viabilidade celular das culturas epiteliais após a o período de infecção com *P. aeruginosa*, realizamos em um grupo de cultura a marcação com o kit BacLight Live-Dead<sup>®</sup>, com diluições e período de incubação de acordo com o manual do fabricante. Após a marcação, as membranas de poliestireno contendo as culturas foram colocadas em lâminas de vidro, encobertas com meio de montagem aquoso Gelmount (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e levados para leitura ao microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM510META. As imagens capturadas foram salvas em extensão mdb e analisadas no programa Zeiss LSM Image Browser.

Após o período de infecção, as culturas foram levadas para análise de frequência de batimento ciliar basal e em seguida lavadas gentilmente por 3 vezes a sua superfície com 200µl de PBS, sendo fixadas por 4 horas com a solução modificada de Karnovsky. Após fixadas, as amostras foram processadas de acordo com o protocolo descrito anteriormente para serem avaliadas sob microscopia eletrônica de varredura.

#### 4.5. Análise Estatística

Foi utilizado o teste ANOVA one-way seguido da análise do teste de Student-Newman-Keuls para múltiplas comparações pareadas, tomando como nível de significância  $p < 0.05$ .

## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Efeitos de Fumaça de Cigarro sobre a Regeneração Celular e Ciliogênese

A exposição de culturas celulares tanto ao CFC como ao EFC durante o processo de crescimento e diferenciação epitelial geraram resultados semelhantes.

A exposição a concentrações crescentes de CFC, principalmente em concentrações iguais ou maiores a 30µg/ml, mostrou que há um distúrbio no processo de diferenciação celular (figura 4). De maneira semelhante, exposição a concentrações crescentes de EFC também diminuiu o processo de maturação e diferenciação das culturas epiteliais (figura 5). Esses dados estão melhor representados na Tabela 1.

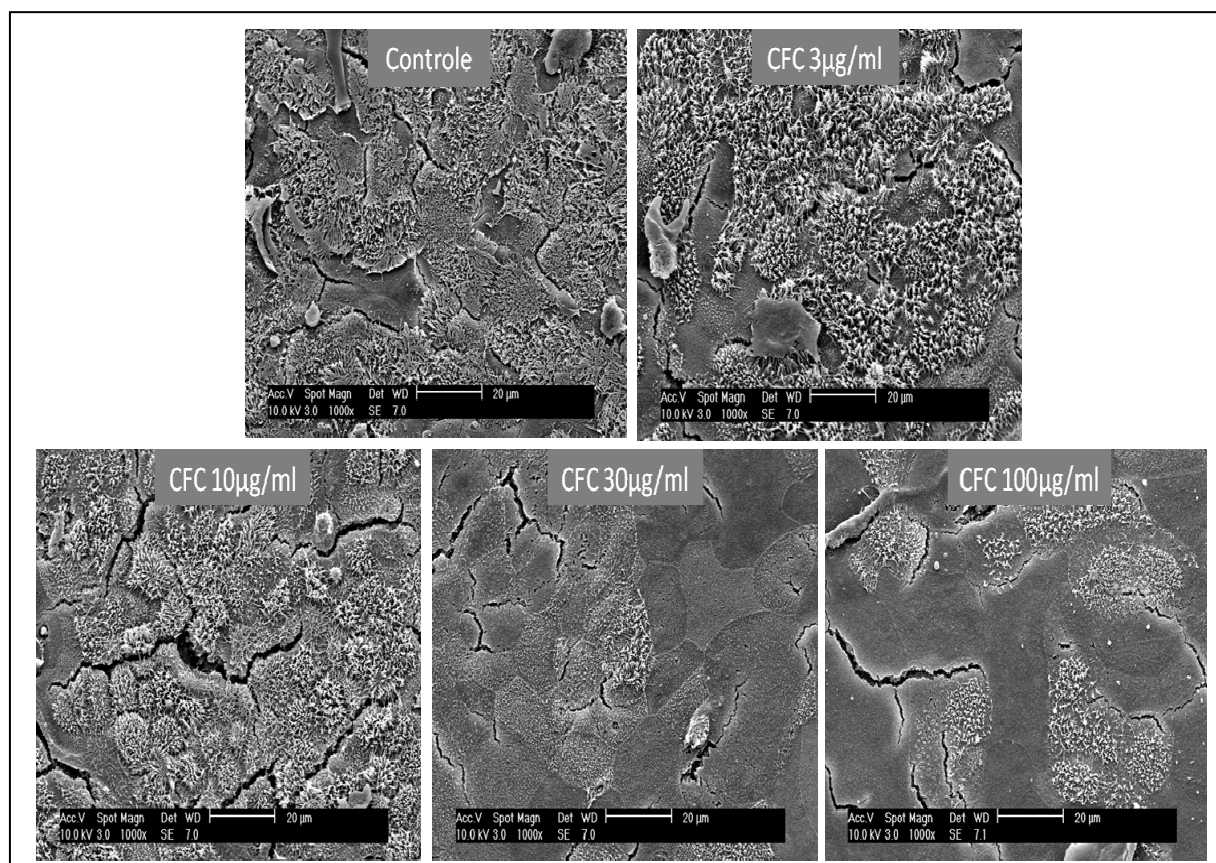


Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000x) obtidas de culturas de epitélio respiratório no 15º dia de crescimento após exposição a diferentes concentrações de CFC.

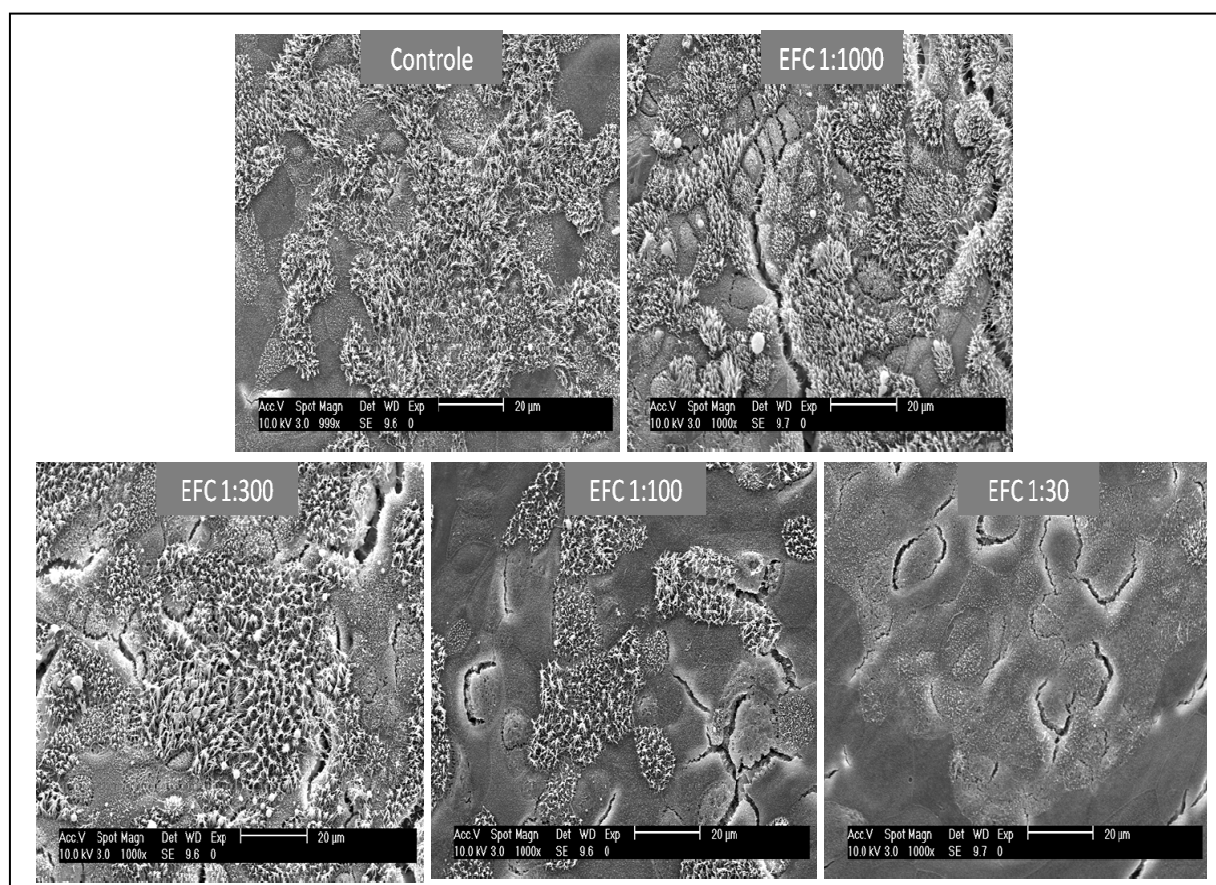


Figura 5: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000x) obtidas de culturas de epitélio respiratório no 15º dia de crescimento após exposição a diferentes concentrações de EFC.

Tabela 1 - Porcentagem de área ciliada ao final de 15 dias de crescimento das diferentes culturas celulares expostas ao extrato (EFC) ou ao condensado de fumaça de cigarro (CFC), assim como a análise estatística comparativa ao grupo controle através do teste ANOVA one-way seguido da aplicação do teste de Student-Newman-Keuls.

EFC		
% Área ciliada ± Desvio padrão		
Controle	71 ± 8	
1:1000	82 ± 13	
1:300	61 ± 14	
1:100	29 ± 9	<i>p</i> <0,05
1:30	16 ± 16	<i>p</i> <0,05

CFC		
% Área ciliada ± Desvio Padrão		
Controle	90 ± 8	
3 µg/ml	70 ± 20	
10 µg/ml	72 ± 4	
30 µg/ml	49 ± 10	<i>p</i> <0,05
100µg/ml	37 ± 12	<i>p</i> <0,05



As mesmas concentrações que interferiram na ciliogênese também influenciaram negativamente no tamanho ciliar quando comparados com o controle (figura 6). A avaliação por imunohistoquímica confirma os achados encontrados na MEV e das medidas da resistência transepitelial, com menor porcentagem de formação de cílios e a permanência da confluência celular e das *tight junctions* (figura 7). Apesar das alterações observadas na diferenciação celular, não houve alterações significativas das medidas das resistências transepitelial (figura 8).

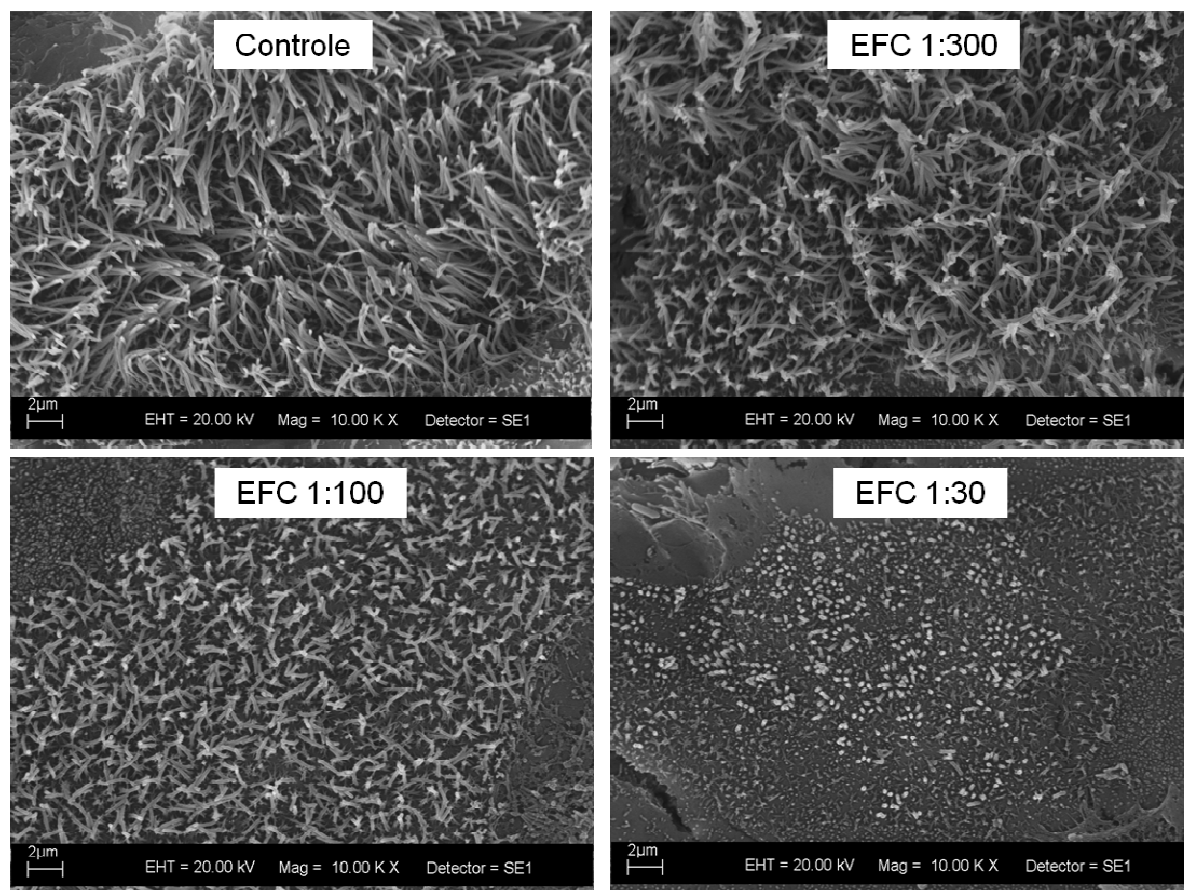


Figura 6: Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura (10000x) demonstrando a diferença do tamanho ciliar entre os grupos de culturas expostas a concentrações variadas de EFC ao final de 15 dias.

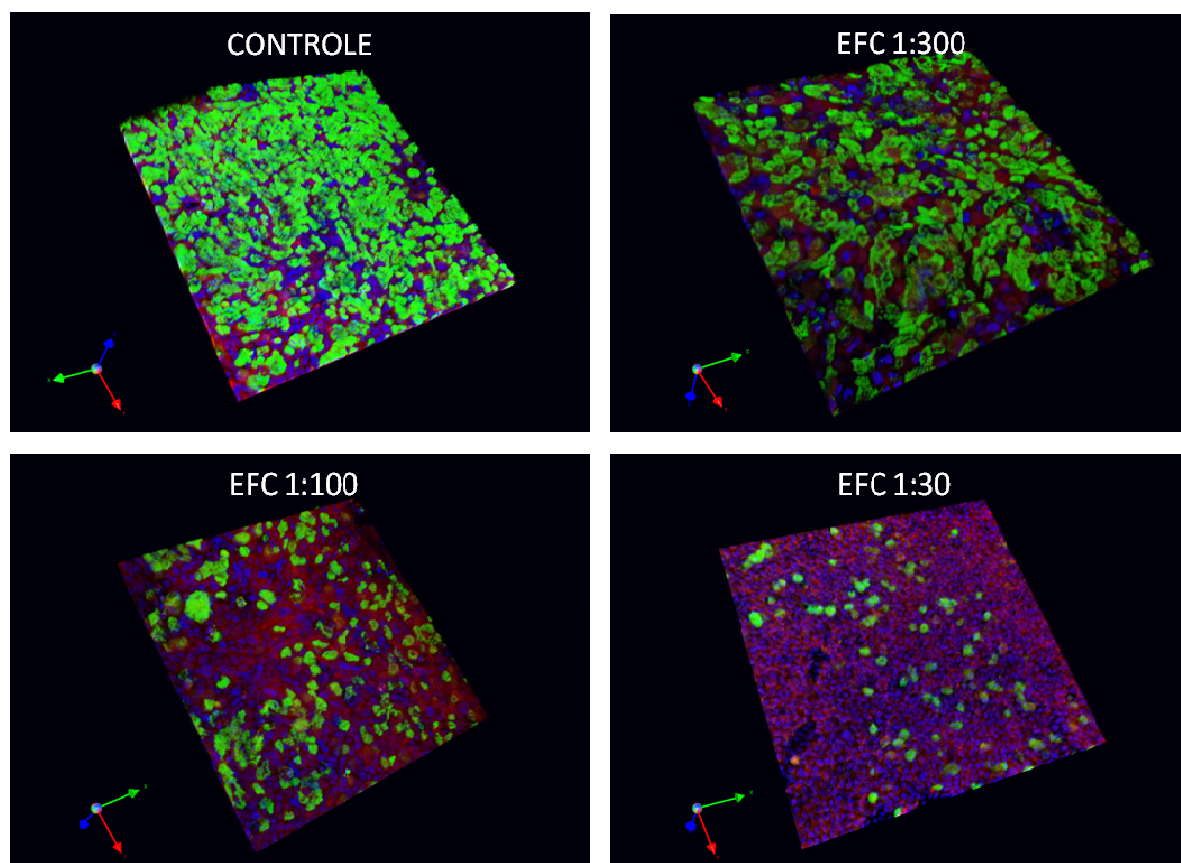


Figura 7: Imagens representativas em microscopia confocal a laser (20x) de culturas epiteliais expostas ao Extrato de Fumaça de Cigarro (EFC). Marcação por imunohistoquímica de anticorpos anti- $\beta$  tubulina do tipo IV (Verde), *Zona occludens-1* (Vermelho) e Hoescht (Azul).

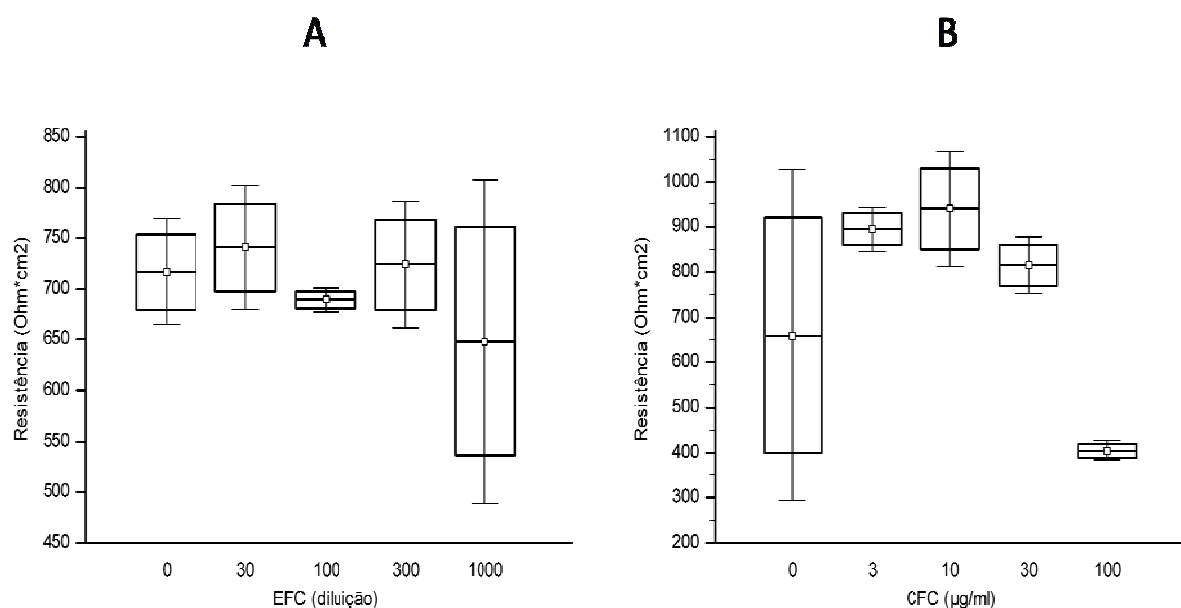


Figura 8: Resistência elétrica transepitelial ( $\Omega\text{cm}^2$ ) medida 15 dias após o crescimento celular com exposição ao extrato de fumaça de cigarro (A) ou ao condensado de fumaça de cigarro (B).

## 5.2. Efeitos Diretos da Fumaça de Cigarro sobre a Formação de Biofilmes

Avaliamos 8 amostras de bactérias gram-negativas e 10 amostras de gram-positivas. Entre elas, 7 das 18 bactérias avaliadas (39%) apresentaram um aumento significativo na formação de biofilmes quando expostas à diluições de EFC a 1:10 (tabela 2). Dentre elas, 4 foram identificadas como *Staphylococcus aureus* e 3 como *Pseudomonas aeruginosa*. A figura 9 ilustra um exemplo típico de *P.aeruginosa* (amostra 1531), que teve um aumento da formação de biofilme quando exposta à concentração de EFC a 1:10.

Tabela 2 – Valores médios da densidade óptica (DO) de biofilme através do ensaio modificado de biofilme de Calgary. DO=Densidade Óptica, média±desvios padrão, EFC=Extrato de fumaça de cigarro, n=4.

Amostra	Bactéria	DO	DO	$p$	Resultado
		Controle	EFC (1:10)		
1526	<i>S.aureus</i>	0,05±0,001	0,05±0,003	0,14	
1531	<i>S.aureus</i>	2,09±0,60	3,46±0,04	0,03	Aumento em 1:10
1535	<i>S.aureus</i>	0,34±0,03	0,87±0,004	<0,001	Aumento em 1:10
1680	<i>Coccus gram +</i>	0,04±0,002	0,05±0,002	0,63	
1700	<i>S. coagulase</i>	1,22±0,38	1,48±0,26	0,32	
1721	<i>S.aureus</i>	0,44±0,04	0,53±0,02	0,003	Aumento em 1:10
1746	<i>S. coagulase</i>	2,14±0,38	1,58±0,45	0,19	
1757	<i>S.aureus</i>	0,27±0,05	0,37±0,03	0,03	Aumento em 1:10
1791	<i>S. coagulase</i>	0,30±0,03	0,25±0,06	0,58	
1821	<i>S. coagulase</i>	0,09±0,02	0,06±0,06	0,17	
1579	<i>P.aeruginosa</i>	0,38±0,04	0,49±0,15	0,38	
1580	<i>P.aeruginosa</i>	0,55±0,1	1,74±0,27	<0,001	Aumento em 1:10
1601	<i>P.aeruginosa</i>	0,59±0,07	0,30±0,04	0,001	Controle aumentado
1613	<i>P.aeruginosa</i>	0,47±0,06	0,76±0,10	0,014	Aumento em 1:10
1616	<i>P.aeruginosa</i>	0,40±0,12	0,36±0,12	0,45	
5003	<i>M.catarrhalis</i>	1,13±0,78	0,44±0,27	0,21	
ATCC	<i>P.aeruginosa</i>	0,73±0,66	2,30±0,28*	0,007	*Aumento em 1:100
PA01	<i>P.aeruginosa</i>	0,71±0,62	0,77±0,22	0,16	

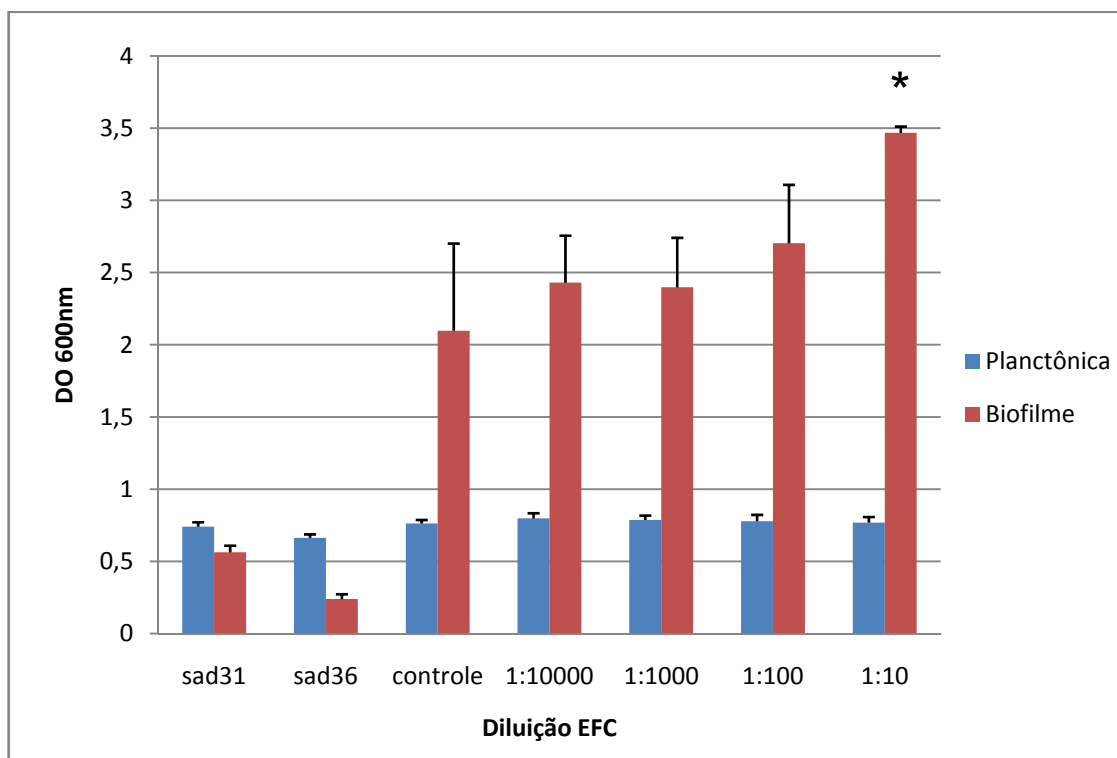


Figura 9: Representação das densidades ópticas obtidas das formas planctônicas e dos biofilmes obtidos com o ensaio modificado de biofilme de Calgary em diferentes concentrações de EFC (amostra 1531, *P. aeruginosa*). \* $p=0,002$ ;  $n=4$  em cada subgrupo.

### 5.3. Exposição do Epitélio Respiratório à Fumaça de Cigarro e seus Efeitos na Formação de Biofilme

O modelo utilizado neste estudo foi capaz de produzir biofilmes maduros e de fácil identificação à MEV, muitas vezes com matriz exopolissacarídea, formação de estruturas tridimensionais e canais aquosos (figura 10), mantendo as células subjacentes viáveis (figura 11).

Através dele, observamos alguns achados relevantes devem ser ressaltados: (a) Uma significativa parcela dos biofilmes formaram preferencialmente na interface ar-líquido criado na superfície das culturas em

função da angulação a que as culturas eram submetidas (45°) durante o período de infecção da superfície (figura 12); (b) A grande maioria dos biofilmes formados estavam localizados preferencialmente em áreas desnudas ou com poucos cílios (figura 13); (c) Algumas bactérias localizadas sobre os cílios apresentavam partículas de adesão entre elas e os cílios (figura 14).

No entanto, não foi possível observar diferenças significativas na formação de biofilmes de *P. aeruginosa* após a exposição das culturas celulares a diferentes concentrações de EFC ou CFC, seja na quantidade como no tamanho dos mesmos.

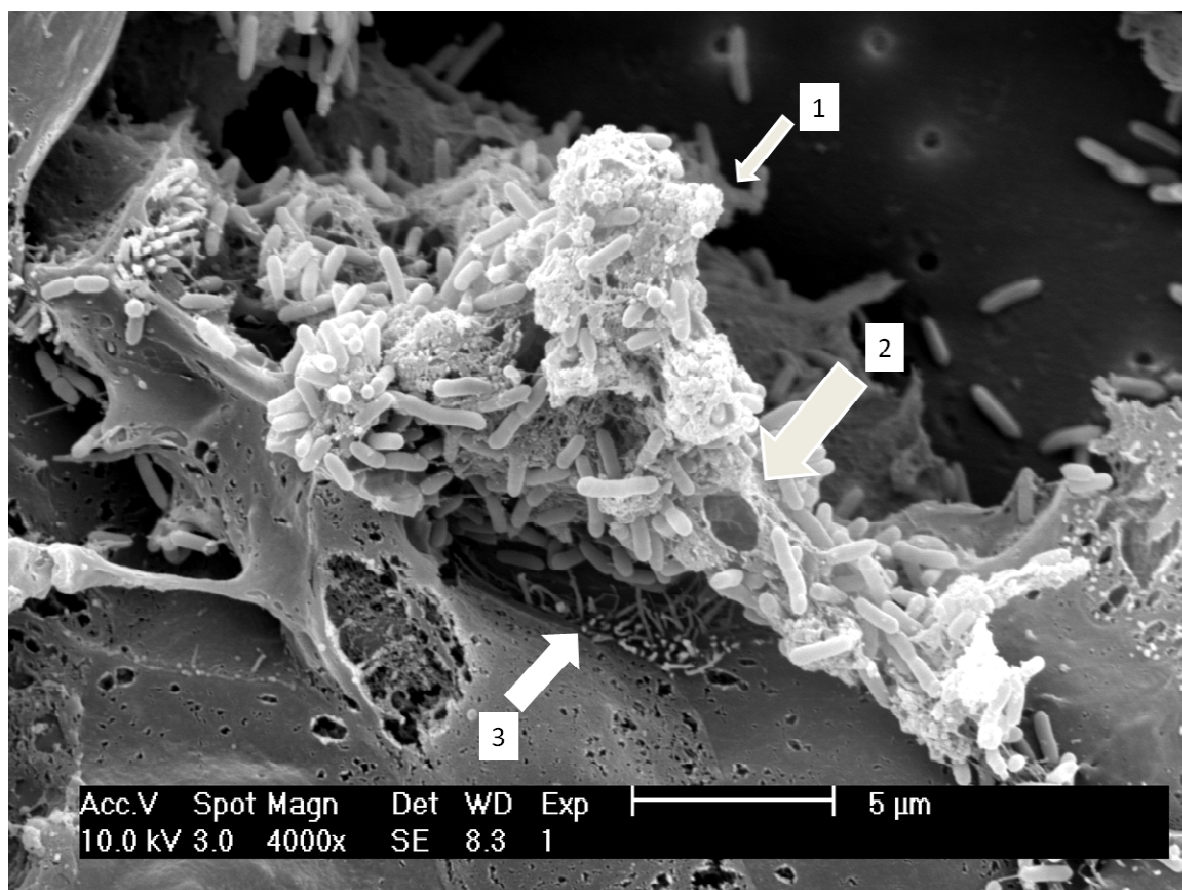


Figura 10: Imagem representativa de microscopia eletrônica de varredura (4000x) de um biofilme maduro de *P. aeruginosa* após 20 horas de crescimento sobre uma cultura epitelial de células ciliadas. (1) Matriz extracelular, (2) Poros aquosos, (3) Células ciliadas.



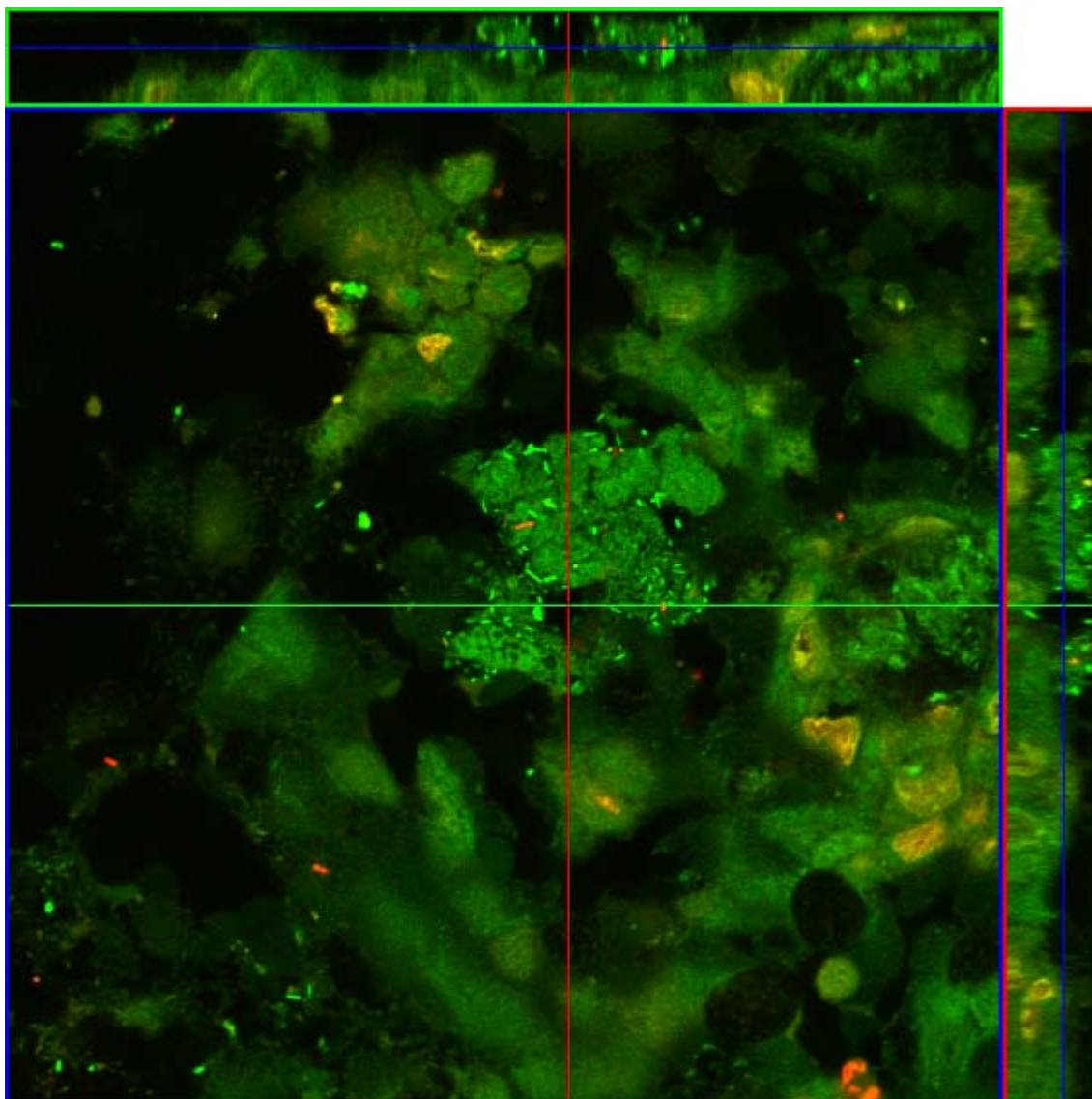


Figura 11: Imagem de microscopia confocal de varredura a laser (63x) obtida após marcação com o kit BacLight Live-Dead®. Notar a presença de bactérias viáveis no biofilme, estando aderidas às células epiteliais viáveis. O encontro entre o eixo x e o eixo y centralmente representa um canal aquoso formado pelo biofilme.



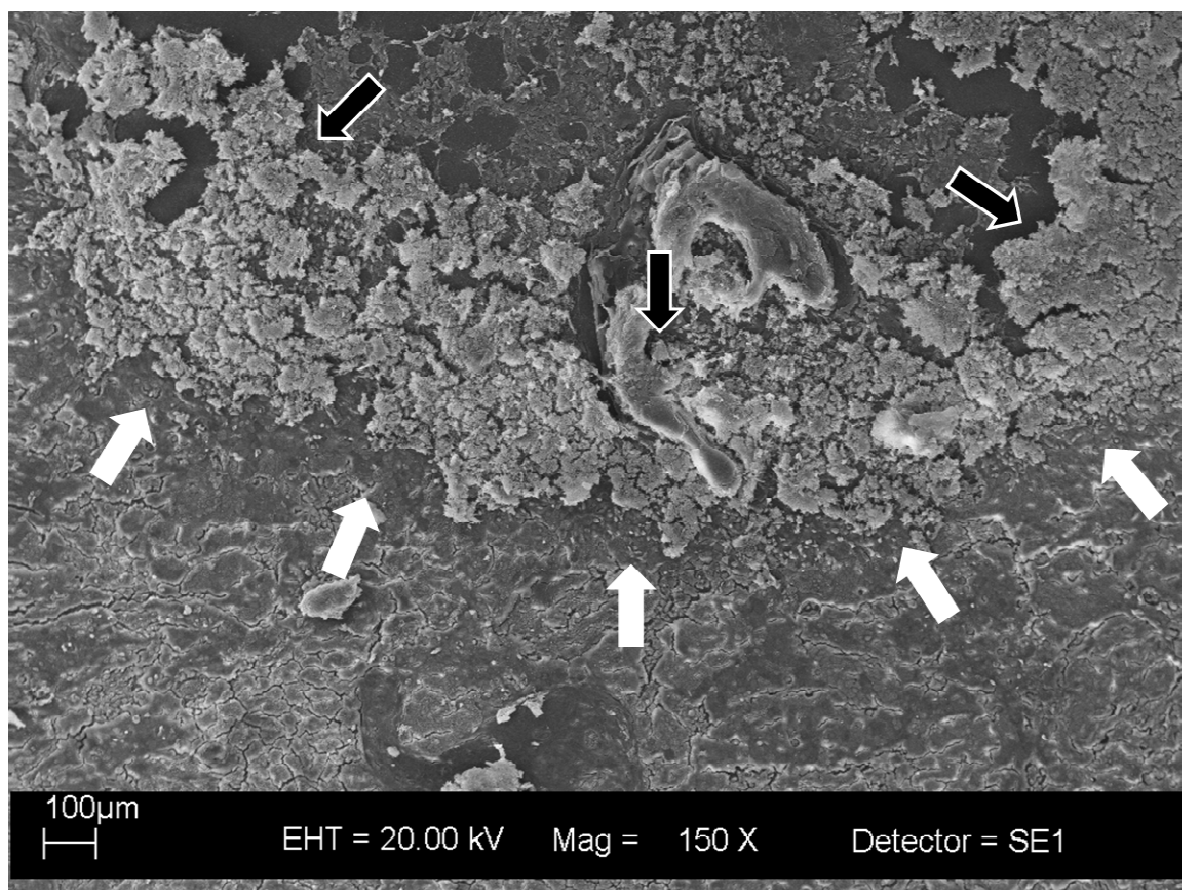


Figura 12: Imagem de microscopia eletrônica de varredura (150x) demonstrando a presença de biofilmes (setas escuras) aderidos no menisco de interface ar-líquido (setas claras) formado pela solução contendo as bactérias e o epitélio respiratório.

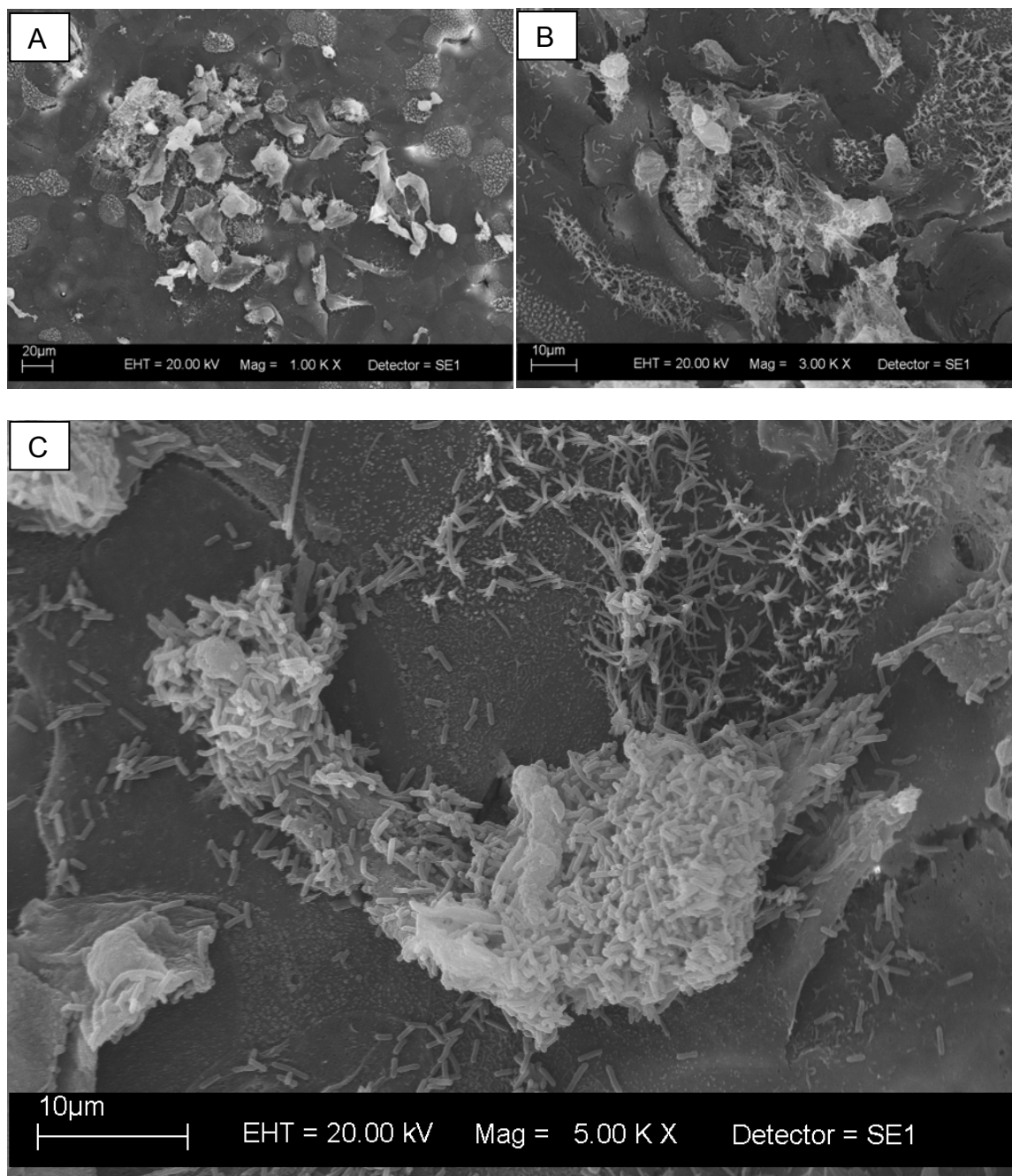


Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura (1000-5000x) representativas da formação de biofilmes preferencialmente sobre áreas não ciliadas da cultura epitelial.

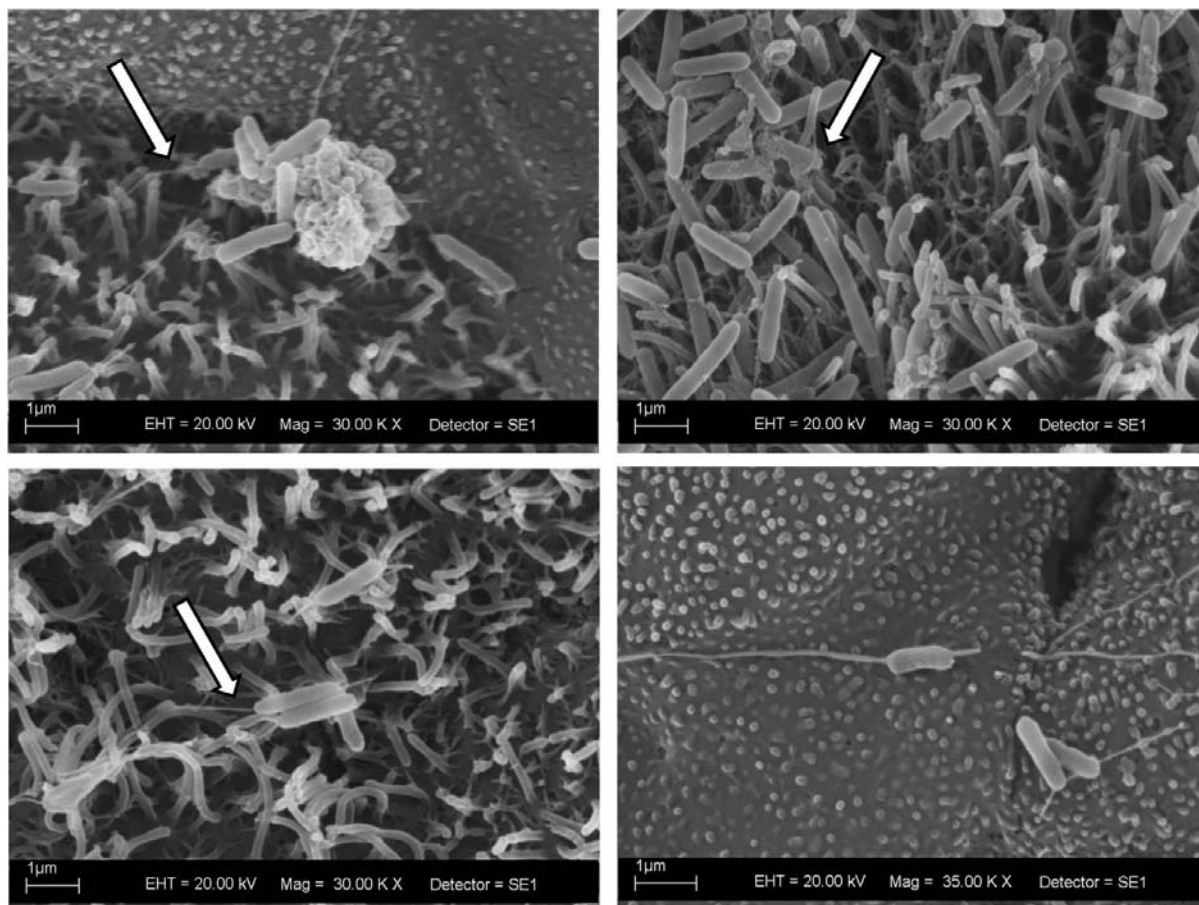


Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura demonstrando a presença de estruturas de ligação entre *P. aeruginosa* e os cílios (setas brancas).

## **6. DISCUSSÃO**

Apesar da fisiopatologia da RSC não estar ainda totalmente elucidada, sabe-se que um dos eventos terminais pelos quais os pacientes com RSC apresentam sintomas é a estase de secreções nasossinusais secundária à diminuição do transporte mucociliar exercido pelo epitélio respiratório. O objetivo de qualquer intervenção terapêutica para esses pacientes, seja ela abordagem clínica ou cirúrgica, é o de reestabelecer a função normal da mucosa nasossinusal. Com o intuito de se compreender possíveis efeitos que fatores ambientais poderiam atuar sobre a fisiopatogenia da RSC, neste estudo procuramos avaliar se a exposição à fumaça de cigarro altera mecanismos epiteliais promovendo ou mantendo a RSC através da formação de biofilmes.

Embora haja diversas evidências apontando uma relação entre biofilmes bacterianos e RSC em humanos, ainda não se sabe com clareza qual é a verdadeira contribuição dos biofilmes em sua fisiopatogenia. Ainda não existem estudos que demonstrem claramente quais os fatores do hospedeiro que determinam a persistência de biofilmes na mucosa nasossinusal, nem como fatores ambientais poderiam contribuir nesse processo. Poucos pesquisadores têm conseguido aprofundar as relações entre biofilmes e hospedeiro, como a interação de mecanismos inflamatórios e de defesa inata e especializada, principalmente em virtude das dificuldades de se induzir biofilmes bacterianos *in vivo* ou em culturas de tecidos. Neste estudo, conseguimos criar um modelo *in vitro* de infecção bacteriana com formação de biofilmes sobre uma cultura viável de tecido respiratório, possibilitando ainda a combinação da exposição à fumaça de cigarro por meio do compartimento basolateral das culturas celulares (WOODWORTH et al., 2008). Em nosso modelo experimental para a obtenção de biofilmes sobre o epitélio respiratório, padronizamos a utilização de *P. aeruginosa* em virtude de se

tratar de uma bactéria comumente encontrada em RSC e em processos infecciosos crônicos em que há um comprometimento das defesas do hospedeiro. Procuramos mimetizar ao máximo as condições de crescimento bacteriano sobre uma superfície epitelial no qual as bactérias retirariam todos os seus suprimentos do próprio epitélio, sem o uso de meios otimizados para crescimento. Em função disto, diluímos as bactérias em PBS ao invés de meio de cultura para crescimento bacteriano. Além disso, em virtude das *P. aeruginosa* formarem biofilmes primordialmente em interfaces ar-líquido, tivemos que adaptar as condições de crescimento bacteriano para que houvesse a criação de um menisco ar-líquido sobre a superfície da cultura epitelial. A utilização de culturas celulares de camundongos tem a vantagem de proporcionar uma maior homogeneidade entre as culturas celulares, com obtenção de células geneticamente idênticas e portanto com menor variabilidade e maior reprodutibilidade dos resultados (ANTUNES et al., 2007).

Diversos grupos têm estudado a influência que a exposição do cigarro têm sobre o transporte mucociliar de epitélio respiratório. Estudos realizados em fumantes têm demonstrado que o epitélio respiratório nesses indivíduos apresentam diversas anormalidades, como diminuição de células ciliadas (WANNER; SALATHE; O'RIORDAN, 1996) e aumento de anormalidades ultraestruturais (VERRA et al., 1995). Além disso, tem sido demonstrado que a exposição à fumaça de cigarro que prejudica o transporte mucociliar em humanos tanto em exposições agudas (BASCUM et al., 1995) como em exposições crônicas (STANLEY et al., 1986). Apesar dos diferentes estudos apontarem para alterações estruturais consistentes e modificações no batimento ciliar, nenhum artigo até

então demonstrou os efeitos que a exposição à fumaça de cigarro tem sobre o processo de regeneração epitelial e ciliogênese.

Neste estudo verificamos que a exposição à fumaça de cigarro não interferiu sobre o crescimento e proliferação celular quando avaliamos a marcação da quantidade de núcleos marcados por Hoescht. Ainda, não observamos marcação significativa distinta entre os diferentes grupos expostos à fumaça de cigarro quanto à formação de *tight junctions* através da marcação de *Zona occludens-1* também por imunohistoquímica. A ausência de diferença de resistência elétrica transepitelial entre os diferentes grupos confirmam esses achados morfológicos.

Por outro lado, ao avaliar os efeitos citotóxicos da fumaça de cigarro sobre células epiteliais nasais, investigando viabilidade celular através da marcação com o reagente de proliferação celular WST-1 e diferenciação entre apoptose e necrose através da marcação de anexina-V, iodeto de propídeo e da marcação *in situ* das extremidades nicada de DNA (TUNEL), Lan et al. (2007) demonstraram efeitos dose- e tempo-dependentes da exposição ao EFC com redução da viabilidade e indução de apoptose nessas células. Ainda, alguns estudos demonstram que a exposição ao cigarro prejudica a regeneração do epitélio respiratório frente a injúrias (VAN WINKLE et al., 2001) ou mesmo ainda tendo efeitos opostos mitogênicos ou pró-apoptóticos dependendo da concentração local da fumaça de cigarro (LUPPI et al., 2005).

Os resultados obtidos em nosso estudo também demonstram que a exposição tanto à fase particulada da fumaça de cigarro (CFC) assim como à fase solúvel (EFC) interfere negativamente e de maneira dose-dependente no processo de diferenciação celular e ciliogênese. Ainda, a exposição à fumaça de cigarro inibe a fase terminal da ciliogênese, isto é, o enlogamento dos cílios, resultando

em cílios curtos e não-funcionais. É importante ressaltar que, por meio do nosso desenho experimental utilizado, não foi possível determinar se houve bloqueio completo da ciliogênese ou apenas um retardo no processo de diferenciação celular. Estudos subsequentes deverão elucidar esta questão.

Esses distúrbios que a exposição à fumaça de cigarro causam ao processo de ciliogênese poderiam afetar o reestabelecimento normal do transporte mucociliar, pois em condições normais existe uma constante substituição de células senis, proliferação e diferenciação em células ciliadas em torno de 1% da população epitelial (AYERS; JEFFERY, 1988), e ele está em até vinte vezes mais acelerado em situações de estresse infeccioso ou mecânico (GORDON; LANE, 1980; ERJEFALT et al., 1995). Dessa maneira, esses distúrbios sobre o aparelho mucociliar poderiam predispor o hospedeiro a infecções oportunistas bacterianas.

Drannik et al. (2004) demonstraram que a exposição crônica à fumaça de cigarro em camundongos (2 cigarros por dia, 5x/semana por 6-8 semanas) leva a uma diminuição da depuração mucociliar de *P. aeruginosa* e a um aumento de reação inflamatória em infecções de vias aéreas inferiores causadas por essa bactéria. Ozlu et al. (1999) também demonstraram em ratos que a exposição intermitente à fumaça de cigarro por 10 dias (5 exposições de 10 minutos por dia, combustão de um cigarro por exposição) aumentou a chance de colonização de bactérias instiladas no lumen traqueal.

Da mesma forma, os resultados de nosso estudo também corroboram com os achados de alguns estudos sobre prevalência de RSC e evolução pós-operatória. Chen, Dales e Lin (2003) realizaram um estudo transversal entre os anos de 1996 e 1997 na população canadense, avaliando 73364 indivíduos. Neste estudo, observaram que a baixa renda e o tabagismo estavam associados a uma



maior prevalência de rinosinusites tanto no sexo masculino como no sexo feminino. Da mesma maneira, Lieu e Feinstein (2000), ao realizarem um levantamento por questionário entre 1988 a 1994, observaram que indivíduos expostos passivamente à fumaça de cigarro não apresentaram risco significativo de apresentarem rinosinusites, ao passo que indivíduos ativamente tabagistas apresentaram um risco 20% maior.

Da mesma maneira, outros trabalhos demonstram que o tabagismo é o pior fator prognóstico de pacientes com RSC submetidos a cirurgia endoscópica funcional dos seios paranasais (KENNEDY, 1992; BRIGGS et al., 2004). Na população pediátrica, Kim et al. (2005) avaliando retrospectivamente 97 crianças submetidas à CESP demonstraram que as crianças expostas à fumaça de cigarro tiveram evolução pós-operatória pior baseada em análise endoscópica ( $p=0,044$ ). Ainda, Ramadan e Hinerman (2002) avaliaram 118 crianças submetidas à CESP e verificaram que as crianças não expostas ao cigarro tiveram sucesso cirúrgico em 90% dos casos, ao contrário de 70% das crianças com exposição à fumaça de cigarro ( $p=0,007$ ).

Os efeitos da fumaça de cigarro sobre o epitélio respiratório são mediados principalmente pela difusão de toxinas da superfície apical para o interior das células. Tentativas anteriores em nosso laboratório de mimetizar esta condição mais comum, bombeando a fumaça de cigarro sobre as culturas, trouxeram resultados variáveis e de difícil controle. Em nosso estudo, mimetizamos a liberação de toxinas via hematogênica, com a vantagem de proporcionar uma exposição contínua com resultados mais controlados e reproduzíveis. Além disso, a correlação *in vitro* de CFC e EFC com a exposição em humanos tem sido difícil de se determinar. A máxima concentração de EFC utilizada em nosso estudo (1:30)

contêm partículas solúveis provenientes da queima de 0,026 cigarros/ml, ou ainda 0,015 cigarros/cultura. As concentrações utilizadas em nosso estudo se correlacionam com outros como o de Kriendler et al. (2005) ou em até 13 vezes menor em relação aos estudos de Lan et al. (2007), no qual demonstraram efeitos inibitórios na secreção de cloreto e efeitos tóxicos sobre o epitélio respiratório promovidos pela exposição ao EFC respectivamente.

O retardo ou mesmo bloqueio do processo de regeneração e/ou diferenciação celular deste epitélio podem comprometer as funções normais do epitélio respiratório, principalmente no transporte mucociliar, facilitando a colonização e infecção de bactérias patogênicas. Além disso, alterações no transporte mucociliar poderiam modificar condições locais como retenção de secreções, diminuição no pH, redução da concentração de nutrientes e de oxigênio e que poderiam favorecer a transformação do fenótipo bacteriano planctônico em direção ao biofilme. Por este motivo, procuramos investigar se a exposição à fumaça de cigarro altera a formação de biofilmes bacterianos de *P. aeruginosa* tanto por efeitos diretos como indiretos mediados pelo epitélio respiratório.

Na investigação sobre os efeitos diretos da fumaça de cigarro sobre a formação de biofilmes, nossos resultados demonstram que exposições de EFC diluído a 1:10 (i.e., 10% ou 0,08 cigarros/poço de cultura bacteriana) promove um aumento significativo na capacidade das bactérias em formarem biofilmes, avaliado através do ensaio de biofilme de Calgary. Nenhum estudo até então tinha avaliado este efeito que a fumaça de cigarro exerce sobre a formação de biofilmes. Alguns estudos na literatura procuraram avaliar os efeitos que a fumaça de cigarro exerce sobre a proliferação e adesão bacteriana, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Ertel, Eng e Smith (1991), ao recuperar bactérias da cavidade oral de 15 fumantes e de 15 não fumantes, verificaram que os fumantes tinham uma propensão a terem colonização por bacilos gram negativos. Além disso, ao exporem essas bactérias à extrato de fumaça de cigarro, verificaram que em geral os cocos gram-positivos são mais susceptíveis à inibição de crescimento promovida pela fumaça de cigarro em relação às bactérias gram-negativas. Dessa forma, indivíduos expostos à fumaça de cigarro poderiam apresentar colonização maciça por bacilos gram-negativos resistentes à fumaça de cigarro.

Por outro lado El-Ahmer et al. (1999) demonstraram por citometria de fluxo que a exposição à fumaça de cigarro aumenta de maneira significativa a capacidade de adesão de bactérias patogênicas a células bucais epiteliais, entre elas o *S. pneumoniae*, o *H. influenza* e a *M. catarrhalis*. Para fins comparativos, as variações de concentrações de extrato de fumaça de cigarro que produziram efeitos potencializadores de adesão bacteriana no estudo de El-Ahmer et al. (1999) foram equivalentes às diluições entre 1:1 a 1:2560 em relação ao nosso estudo. Ainda nesse estudo, os autores demonstraram que o aumento da adesão não é devida a hiperexpressão de receptores do hospedeiro que sabidamente são ligantes de bactérias (Lewis<sup>a</sup>, Lewis<sup>b</sup>, Lewis<sup>c</sup>, CD14, CD18, H tipo 2). Assim, concluem que a exposição à fumaça de cigarro poderia alterar características da superfície mucosa potencializando a ligação de bactérias patogênicas.

Experimentos em ratos utilizando fumaça de cigarro presente no ar demonstram que a exposição aguda não altera a adesão de *S. pneumoniae* a células bucais epiteliais *in vivo*. Entretanto, a exposição crônica (>3 semanas) e principalmente em concentrações elevadas (13% de fumaça de cigarro, exposição

de 1 hora a cada 4 horas) aumenta a capacidade de adesão dessas mesmas bactérias (OZLU et al., 2008).

Considerado que a adesão bacteriana é a primeira etapa de formação de biofilmes, é de se esperar que um aumento da capacidade de ligação entre a bactéria e a superfície também poderia aumentar a quantidade de bactérias sob a forma de biofilme. Dessa maneira, verificamos em nosso estudo que a exposição das bactérias em concentrações de EFC a 1:10 aumentou a capacidade de 7 das 18 bactérias avaliadas em formarem biofilmes. É interessante notar que entre as bactérias que tiveram efeito potencializador na formação de biofilmes, apenas os *Staphylococcus aureus* e as *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram esse efeito, justamente as mesmas bactérias encontradas por Bendouah et al. (2006) que apresentam relação com evolução de mau prognóstico quando apresentam a capacidade de formarem biofilmes em pacientes pós-cirúrgicos de CESP.

Ainda neste estudo investigamos se a exposição de culturas epiteliais ao cigarro também potencializaria indiretamente a formação de biofilmes em sua superfície. Em nosso estudo não verificamos diferenças significativas entre os diferentes grupos de cultura celular expostos às concentrações crescentes de EFC ou CFC quanto à formação de biofilmes. No entanto, verificamos que a *P.aeruginosa* tem uma predisposição a formar biofilmes em áreas não ciliadas e preferencialmente na interface ar-líquido. Plotkowski et al. (1992, 1999) também demonstraram que *P. aeruginosa* raramente invade o epitélio respiratório íntegro, localizando-se preferencialmente em células pouco diferenciadas e polarizadas e com distúrbios da integridade de complexo juncional. As células do epitélio respiratório em processo de reparo e migração expressam durante essa fase receptores de superfície nos quais as bactérias podem se aderir (PLOTKOWSKI et

al., 1993). Os achados de nosso estudo nos permitem concluir que a formação de biofilmes sobre a mucosa respiratória não é homogênea, mas ocorre de uma maneira dispersa com focos de maior concentração dependendo dessas condições locais mais favoráveis. Extrapolando esses achados para estudos realizados em humanos, a coleta de materiais para estudo de biofilmes em RSC estaria sujeito a erros de amostragem, o que em parte poderia explicar a grande variabilidade da prevalência de biofilmes encontrada nos diferentes estudos descritivos (25-80%) (CRYER et al., 2004; SANCLEMENT et al., 2005; RAMADAN; SANCLEMENT; THOMAS, 2005; SANDERSON; LEID; HUNSAKER, 2006; PSALTIS et al., 2007; HEALY et al., 2008).

Finalmente, em nosso estudo também verificamos a presença de pontes de ligação entre bactérias e os cílios. A adesão bacteriana aos cílios pode promover diversos efeitos nocivos sobre a mucosa respiratória, como a disfunção ou perda ciliar, morte de células e até mesmo a perda de integridade do epitélio (PLOTKOWSKI et al., 1992). A ligação entre as bactérias e o epitélio respiratório se dá através de diferentes estruturas denominadas de adesinas, como por exemplo as lectinas I e II de *P. aeruginosa*, que inclusive apresentam atividade ciliostática (MEWE et al., 2005). Assim, outros estudos ainda são necessários para investigar se a tendência da formação de biofilmes em áreas desprovidas de cílios não seria também uma consequência dos efeitos nocivos sobre o epitélio ciliado subjacente.

## **7. CONCLUSÕES**

1. A exposição de culturas de epitélio respiratório à fumaça de cigarro promove uma significativa diminuição do processo de ciliogênese de caráter dose-dependente, com redução da porcentagem de área ciliada e formação de cílios mais curtos. Por outro lado, a exposição à fumaça de cigarro não promove alterações na confluência celular e formação de *tight junctions*.

2. O crescimento de bactérias em contato com o extrato de fumaça de cigarro em diluição de 1:10 aumenta de maneira significativa a capacidade de determinadas bactérias patogênicas em formarem mais biofilmes.

3. A exposição de culturas epiteliais à fumaça de cigarro não promove alterações indiretas na formação de biofilmes bacterianos de *P. aeruginosa* em sua superfície.

O conjunto de dados obtidos neste estudo justificam a importância do tabagismo na fisiopatogenia da RSC e reforçam o papel do combate ao tabagismo na prevenção e melhoria do prognóstico dessa doença.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



AGIUS AM, WAKE M, PAHOR AL, SMALLMAN LA. The effects of cotinine on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol* 1995; 20:465-469.

ANTUNES MB, FELDMAN MD, COHEN NA, CHIU AG. Dose-dependent effects of topical tobramycin in an animal model of *Pseudomonas* sinusitis. *Am J Rhinol* 2007; 21(4):423-7.

ASAI K, HARUNA S, OTORIN N, YANAGI K, FUKAMI M, MORIYAMA H. Saccharin test of maxillary sinus mucociliary function after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 2000; 110:117-22.

AYERS MM, JEFFERY PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J* 1988; 1:58-80.

BASCOM R, KSEAVANATHAN J, FITZGERALD TK, CHENG KH, SWIFT DL. Sidestream tobacco smoke exposure acutely alters human nasal mucociliary clearance. *Environ Health Perspect* 1995; 103:1026-30.

BENDOUAH Z, BARBEAU J, HAMAD WA, DESROSIERS M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an unfavorable evolution after surgery for chronic sinusitis and nasal polyposis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2006; 134(6):991-6.

BENDOUEH Z, BARBEAU J, HAMAD WA, DESROSIERS M. Use of an *in vitro* assay for determination of biofilm-forming capacity of bacteria in chronic rhinosinusitis *Am J Rhinol* 2006; 20:434-438.

BRIGGS RD, WRIGHT ST, CORDES S, CALHOUN KH. Smoking in chronic rhinosinusitis: a predictor of poor long-term outcome after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 2004; 114:126-8.

CERI H, OLSON ME, STREMICK C, READ RR, MORCK D, BURET A. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *J Clin Microbiol* Jun 1999; 37(6):1771-1776.

CHEN Y, DALES R, LIN M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. *Laryngoscope* 2003; 113:1199-205.

COSTERTON JW, LEWANDOWSKI Z, CALDWELL DE, KORBER DR, LAPPING-SCOTT HM. Microbial biofilms. *Annual Rev Microbiol* 1995; 49:711-745.

COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22.

COSTERTON JW, VEEH R, SHIRTILIFF M, PASMORE M, POST C, EHRLICH G. The application of biofilm science to the study of and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest* 2003; 112:1446-1477.

CRYER J, SCHIPOR I, PERLOFF JR, PALMER JN. Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004; 66(3):155-8.

DALHAMM T. In vivo and in vitro ciliotoxic effects of tobacco smoke. *Arch Environ Health* 1970; 21:633-634.

DAVIES DG, PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilms. *Science* 1998; 280:295-298.

DONLAN RM, COSTERTON JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93.

DRANNIK AG, POULADI MA, ROBBINS CS, GONCHAROVA SI, KIANPOUR S, STÄMPFLI MR. Impact of cigarette smoke on clearance and inflammation after *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:1164-1171.

EBBERT JO, CROGHAN IT, SCHROEDER DR, MURAWSKI J, HURT RD. Association between respiratory tract diseases and secondhand smoke exposure among never smoking flight attendants: a cross-sectional survey. *Environ Health* 2007; 6:28.

EL-AHMER OR, ESSERY SD, SAADI AT, RAZA MW, OGILVIE MM, WEIR DM, BLACKWELL CC. The effect of cigarette smoke on adherence of respiratory pathogens to buccal epithelial cells. *FESS Immunol Med Microbiol* 1999; 23:27-36.

ELIEZER N, SADE J, SILBERG A, NEVO AC. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 1970; 102:48-52.

EPA. EPA Report/600/6-90/006F: respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington, DC, 1992.

ERJEFALT JS, ERJEFALT I, SUNDLER F, PERSSON CG. In vivo restitution of airway epithelium. *Cell Tissue Res* 1995; 281:305-16.

ERTEL A, ENG R, SMITH SM. The differential effect of cigarette smoke on the growth of bacteria found in humans. *Chest* 1991; 100:628-30.

FERGUSON BJ, STOLZ DB. Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2005; 19(5):452-7.

GALLANT CV, DANIELS C, LEUNG JM, GHOSH AS, YOUNG KD, KOTRA LP, BURROWS LL. Common beta-lactamases inhibit bacterial biofilm formation. *Mol Microbiol* 1995; 58(4):1012-24.

GILLIS RJ, WHITE KG, CHOI KH, WAGNER VE, SCHWEIZER HP, IGLEWSKI BH. Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3858-67.

GORDON RE, LANE BP. Wound repair in rat tracheal epithelium. Division of G1 and G2-arrested cells following injury. *Lab Invest* 1980; 42: 616-21.

HAFNER B, DAVRIS S, RIECHELMANN H, MANN WJ, AMEDEE RG. Endonasal sinus surgery improves mucociliary transport in severe chronic sinusitis. *Am J Rhinol* 1997; 11:271-4.

HAGIWARA H, OHWADA N, TAKATA K. Cell biology of normal and abnormal ciliogenesis in the ciliated epithelium. *Int Rev Cytol* 2004; 234:101-41.

HALL-STOODLEY L, COSTERTON JW, STOODLEY P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(2):95-108.

HEALY DY, LEID JG, SANDERSON AR, HUNSAKER DH. Biofilms with fungi in chronic rhinosinusitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138(5):641-7.

IKEDA K, OSHIMA T, FURUKAWA M, KATORI Y, SHIMOMURA A, TAKASAKA T, MARUOKA S. Restoration of the mucociliary clearance of the maxillary sinus after endoscopic sinus surgery. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99:48-52.

INANLI S, TUTKUN A, BATMAN C, OKAR I, UNERI C, SEHITOGLU MA. The effect of endoscopic sinus surgery on mucociliary activity and healing of maxillary sinus mucosa. *Rhinology* 2000; 38:120-3.

KENNEDY DW. Prognostic factors, outcomes and staging in ethmoid sinus surgery. *Laryngoscope* 1992; 102:1-18.

KIM HY, DHONG HJ, CHUNG SK, CHUNG YJ, MIN JY. Prognostic factors of pediatric endoscopic sinus surgery. *Int J Ped Otorhinol* 2005; 69:1535-1539.

KRIENDLER JL, JACKSON AD, KEMP PA, BRIDGES RJ, DANAHAY H. Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288:L894-902.

LAN MY, HO CY, LEE TC, YANG AH. Cigarette smoke extract induces cytotoxicity on human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 2007; 21:218-23.

LANZA DC, KENNEDY DW. Kennedy DW. Adult rhinosinusitis defined. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;117:S1-7.

LEID JG, SHIRTLIFF ME, COSTERTON JW, STOODLEY P. Human leukocytes adhere, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun* 2002; 70:6339-6345.

LIEU JE, FEINSTEIN AR. Confirmations and surprises in the association of tobacco use with sinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 126:940-6.

LOOK DC, WALTER MJ, WILLIAMSON MR, PANG L, YOU Y, SRESHTA JN, JOHNSON JE, ZANDER DS, BRODY SL. Effects of paramyxoviral infection on airway epithelial cell Foxj1 expression, ciliogenesis, and mucociliary function. *Am J Pathol* 2001; 159:2055-69.

LUPPI F, AARBIOU J, VAN WETERING S, RAHMAN I, DE BOER WI, RABE KF, HIEMSTRA PS. Effects of cigarette smoke condensate on proliferation and wound closure of bronchial epithelial cells *in vitro*: role of glutathione. *Resp Res* 2005; 6:140.

MAH TC, O'TOOLE GA. Mechanisms of biofilms resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 2001; 9(1):34-39.

MALL MA. Role of cilia, mucus, and airway surface liquid in mucociliary dysfunction: lessons from mouse models. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2008; 21(1):13-24.

MEWE M, TIELKER D, SCHÖNBERG R, SCHACHNER M, JAEGER KE, SCHUMAMCHER U. *Pseudomonas aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. *J Laryngol Otol* 2005; 119(8):595-9.

MOSKOWITZ SM, FOSTER JM, EMERSON J, BURNS JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004; 42:1915-22.

OZLU T, CAY M, AKBULUT A, YEKELER H, NAZIROGLU M, AKSAKAL M. The facilitating effect of cigarette smoke on the colonization of instilled bacteria into the tracheal lumen in rats and the improving influence of supplementary vitamin E on this process. *Respirology* 1999, 4:245-248.

OZLU T, CELIK I, OZTUNA F, BÜLBÜL Y, OZSU S. *Streptococcus pneumoniae* adherence in rats under different degrees and durations of cigarette smoke. *Respiration* 2008; 75:339-344.

PALMER JN. Bacterial Biofilms: Do They Play a Role in Chronic Sinusitis? *Otolaryngol Clin North Am* 2005; 38(6):1131-1140.

PERLOFF JR, PALMER JN. Evidence of bacterial biofilms on frontal recess stents in patients with chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2004; 18(6):377-80.

PLOTKOWSKI MC, BAJOLET-LAUDINAT O, PUCHELLE E. Cellular and molecular mechanisms of bacterial adhesion to respiratory mucosa. *Eur Respir J* 1993; 6(6):903-16.

PLOTKOWSKI MC, DE BERTZMANN S, PEREIRA SH, ZAHM JM, BAJOLET-LAUDINAT O, ROGER P, PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 20(5):880-90.

PLOTKOWSKI MC, ZAHM JM, TOURNIER JM, PUCHELLE E. *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to normal and injured respiratory mucosa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 Suppl 5:61-8.

POST JC, STOODLEY P, HALL-STOODLEY L, EHRLICH GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12:185-190.

POTERA C. Forging a link between biofilm and disease. *Science* 1999; 283:1837-1839.

PRINCE AA, STEIGER JD, KHALID AN, DOGHRAMJI L, REGER G, EAU CLAIRE S, CHIU AG, KENNEDY DW, PALMER JN, COHEN NA. Prevalence of Biofilm forming bacteria in Chronic Rhinosinusitis. *Am J Rhinol* 2008; 22(3):239-45.

PSALTIS AJ, HA KR, BEULE AG, TAN LW, WORMALD PJ. Confocal Scanning Laser Microscopy Evidence of Biofilms in Patients with Chronic Rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2007; 117(7):1302-6.

PSALTIS AJ, WEITZEL EK, HA KR, WORMALD PJ. The effect of bacterial biofilms on post-sinus surgical outcomes. *Am J Rhinol* 2008; 22(1):1-6.

RAMADAN HH, HINERMAN RA. Smoke exposure and outcome of endoscopic sinus surgery in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127:546-548.

RAMADAN HH, SANCLEMENT JA, THOMAS JG. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132:414-7.

SANCLEMENT JA, WEBSTER P, THOMAS J, RAMADAN HH. Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115(4):578-82.

SANDERSON AR, LEID JG, HUNSAKER D. Bacterial biofilms on the sinus mucosa of human subjects with chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2006; 116(7):1121-6.

SANDERSON MJ, SLEIGH MA. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J Cell Sci* 1981; 47:331-47.

SHIMIZU T, NISHIHARA M, KAWAGUCHI S, SAKAKURA Y. Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11:85-94.

SMITH TL, MENDOLIA-LOFFREDO S, LOEHRL TA, SPARAPANI R, LAUD PW, NATTINGER AB. Predictive factors and outcomes in endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2005; 115: 2199-205.

Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service. (ed. US Department of Health, E.A.W., US Public Health Service. Washington DC, 1964).

SPOERING AL, LEWIS K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001; 183(23):6746-6751.

STANLEY PJ, WILSON R, GREENSTONE MA, MACWILLIAM L, COLE PJ. Effect of cigarette smoking on nasal mucociliary clearance and ciliary beat frequency. *Thorax* 1986; 41:519-523.

STEPANOVIC S, VUKOVIC D, JEZEK P, PAVLOVIC M, SVABIC-VLAHOVIC M. Influence of dynamic conditions on biofilm formation by Staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20:502-504.

STEWART PS, COSTERTON JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358:135-138.

VAN WINKLE LS, EVANS MJ, BROWN CD, WILLITS NH, PINKERTON KE, PLOPPER CG. Prior exposure to aged and diluted sidestream cigarette smoke impairs bronchiolar injury and repair. *Toxicol Sci* 2001; 60(1): 152-64.

VERRA F, ESCUDIER E, LEBARGY F, BERNAUDIN JF, DE CREMOUX H, BIGNON J. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:630-634.

VUONG C, VOYICH JM, FISCHER ER, BRAUGHTON KR, WHITNEY AR, DELEO FR, OTTO M. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol* 2004; 6(3): 269-75.

WALKER T, KIEFER J. Ciliastatic components in the gas phase of cigarette smoke. *Science* 1966; 153:1248-1250.

WALTERS MC, ROE F, BUGNICOURT A, FRANKLIN MJ, STEWART PS. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:317-323.

WANNER A, SALATHE M, O'RIORDAN TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:1868-902.

WHO report on global tobacco epidemic, 2008. World Health Organization.

WOODWORTH BA, TAMASHIRO E, BHARGAVE G, COHEN NA, PALMER JN. An *in vitro* model of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on viable airway epithelial cell monolayers. *Am J Rhinol* 2008; 22:235-238.

ZULIANI G, CARRON M, GURROLA J, COLEMAN C, HAUPERT M, BERK R, COTICCHIA J. Identification of adenoid biofilms in chronic rhinosinusitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70(9):1613-7.



## **ANEXO DE PUBLICAÇÃO**

# Cigarette smoke exposure impairs respiratory epithelial ciliogenesis

Edwin Tamashiro, M.D.,\* Guoxiang Xiong, Ph.D.# Wilma T. Anselmo-Lima, M.D., Ph.D.,\* James L. Kreindler, M.D.,# James N. Palmer, M.D.¶ and Noam A. Cohen, M.D., Ph.D.¶¶

## ABSTRACT

**Background:** Cigarette smoke exposure is considered an important negative prognostic factor for chronic rhinosinusitis (CRS) patients. However, there is no clear mechanistic evidence implicating cigarette smoke exposure in the poor clinical evolution of the disease or in the maintenance of the inflammatory state characterizing CRS. This study aimed to evaluate the effects of cigarette smoke exposure on respiratory cilia differentiation.

**Methods:** Mouse nasal septal epithelium cultures at an air-liquid interface were used as a model of respiratory epithelium. After 5 days of cell growth, cultures were exposed to air on the apical surface. Additionally, cigarette smoke condensate (CSC; the particulate phase of tobacco smoke) or cigarette smoke extract (CSE; the volatile phase) were diluted in the basolateral compartment in different concentrations. After 15 days of continuous exposure, scanning electron microscopy and immunofluorescence for type IV tubulin were used to determine presence and maturation of cilia. Transepithelial resistance was also recorded to evaluate confluence and physiological barrier integrity.

**Results:** CSC and CSE impair ciliogenesis in a dose-dependent manner with notable effects in concentrations higher than 30 µg/mL, yielding >70% nonciliation and shorter cilia compared with control. No statistical difference on transepithelial resistance was evident.

**Conclusion:** CSC and CSE exposure negatively impacts ciliogenesis of respiratory cells at concentrations not effecting transepithelial resistance. The impairment on ciliogenesis reduces the mucociliary clearance apparatus after injury and/or infection and may explain the poor response to therapy for CRS patients exposed to tobacco smoke.

(Am J Rhinol Allergy 23, 1–00, 2009; doi: 10.2500/ajra.2009.23.3280)

**Key words:** Cigarette, cilia, ciliogenesis, concentrate, rhinosinusitis, tobacco, transepithelial resistance

Rhinosinusitis represents a number of distinct entities, which, clinically, are indistinguishable. It is one of the most common medical complaints, affecting up to 16% of the population, responsible for an estimated 13 million yearly physician visits in the United States and an estimated aggregated cost of \$6 billion annually.<sup>1–4</sup> The ultimate pathophysiology leading to rhinosinusitis is stasis of sinonasal secretions secondary to diminished function of the sinonasal ciliated mucosa, with subsequent bacterial overgrowth and frank infection. Any additional insults to the homeostasis of the mucociliary clearance would thus exaggerate the pathophysiology of the disease.

During normal breathing, humans inspire between 10,000 and 20,000 L of environmental air into the lungs per day. Unfortunately, this air is frequently contaminated with a va-

riety of pollutants, particles, and bacteria that become deposited in the airways. Because the airway is constantly exposed to and damaged by inhaled factors (microbes and pollutants), the surface epithelium is required to continually regenerate and repopulate aged and damaged cells to maintain adequate mucociliary clearance.<sup>5,6</sup> Ciliogenesis is a terminal differentiation event in the maturation of the respiratory epithelium resulting in expression of nearly 200 individual cilia beating in a synchronous rhythmic fashion generating the propulsive force driving mucociliary clearance. Thus, as mentioned previously, even minor impairment of this process, whether during normal replacement of aging cells or after injury, would over time, in an additive manner, decrease the propulsive force required to clear debris-laden mucus resulting in mucostasis.

In 1964 the Surgeons General's report on smoking suggested that tobacco exposure contributed to the chronic rhinosinusitis (CRS).<sup>7</sup> Since then, several epidemiologic studies have confirmed this warning<sup>8,9</sup> while several other studies have reported that patients with tobacco exposure have a protracted recovery from sinus surgery as well as higher surgical revision rate.<sup>10–13</sup> Attempts to understand the pathophysiological relationship between tobacco smoke exposure and rhinosinusitis have resulted in several findings: (1) physiological alterations in cilia function,<sup>14–17</sup> (2) morphological alterations of cilia,<sup>18,19</sup> (3) decreased mucociliary clearance,<sup>20</sup> (4) increased and altered production of airway mucin,<sup>21–23</sup> (5) immunosuppression of human sinonasal epithelial cells,<sup>24</sup> and (6) at high concentrations, cytotoxicity of primary human nasal epithelial cells.<sup>25</sup> To specifically address the effects of tobacco smoke exposure on the terminal differentiation of the ciliated epithelial cell, we used the air-liquid interface (ALI)

From the \*Department of Ophthalmology, Otorhinolaryngology, and Head and Neck Surgery, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, #Department of Pediatrics, University of Pennsylvania Health System, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, Pennsylvania, §Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Pennsylvania Health System, Philadelphia, Pennsylvania, and ¶¶Department of Surgery, Philadelphia Veterans Affairs Medical Center, Philadelphia, Pennsylvania

To be presented at the fall meeting of the American Rhinologic Society, Chicago, Illinois, September 20, 2008

Funded by The Flight Attendant's Medical Research Institute Young Investigator Award (53367; to N.A.C.) and Clinical Innovator Award (52414; to J.N.P.) and a Research Fellowship grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES no. 4321-06-5; to E.T.)

Address correspondence and reprint requests to Noam A. Cohen, M.D., Ph.D., Division of Rhinology, Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, University of Pennsylvania Medical Center, 5th Floor Ravdin Building, 3400 Spruce Street, Philadelphia, PA 19104

E-mail address: cohen@uphs.upenn.edu

Copyright © 2009, OceanSide Publications, Inc., U.S.A.

culture system with continuous exposure to cigarette smoke concentrate (CSC) or cigarette smoke extract (CSE) and assessed transepithelial resistance and ciliogenesis after 15 days.

## METHODS

### ALI Cultures

AQ:2 Culture of mouse nasal septal epithelium at an ALI has been described in our prior studies.<sup>26,27</sup> Briefly, mouse septal epithelial cells were harvested and grown on Costar 6.5-mm-diameter permeable filter supports submerged in culture medium. The apical medium was removed from the surface of the monolayers on day 5 after reaching confluence and the cells were fed *via* the basal chamber. Under normal conditions differentiation and ciliogenesis occurs within 10–14 days.

### Tobacco Smoke Exposure

Two different forms of cigarette smoke were used in our study. CSC (Murty Pharmaceuticals, Lexington, KY) was diluted to the desired concentrations (3, 10, 30, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) in the basal medium. Briefly, CSC is prepared from the filter pad of the University of Kentucky Reference Cigarette 1R4F (9 mg of tar and 0.8 mg of nicotine/cigarette) generated by using a smoking machine set to a 35-mL puff volume with 2 seconds duration. The smoke particulate matter was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at 40 mg/mL and stored frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .<sup>28</sup> DMSO was used at the similar dilutions in the control samples. CSE was prepared on the day of the initiation of the experiment by filtering eight University of Kentucky Research Cigarettes through 10 mL of basal media.<sup>23</sup> This solution, considered CSE 100%, was then diluted to 1:30, 1:100, 1:300, and 1:1000 in basal medium and added into the basolateral compartment. Cells were fed with fresh basal media containing the designated concentration of tobacco preparation every other day during the experiment at the initiation of apical air exposure for an additional 10 days.

### Transepithelial Electric Resistance

Transepithelial electric resistance (TEER) was measured using the EVOM handheld module (World Precision Instruments, Sarasota, FL) per the manufacturer's guidelines. Briefly, the apical compartment of the Costar transwell was filled with the same culture medium as the basolateral compartment, the electrodes were inserted into the two compartments, and the TEER was taken after reaching the steady state and washed with PBS to continue the following measurements.

### Scanning Electron Microscopy (SEM)

AQ:3 One-half of the transwell was removed and processed for immunostaining as described later. The remaining one-half membranes, intact in the costar transwell support, were dehydrated in a progression of increasing ethanol concentrations, up to 100% ethanol as described previously.<sup>26</sup> The specimens were then critical-point dried in  $\text{CO}_2$ , mounted on SEM stubs, and sputter coated with gold palladium to a depth of 12 nm. The surface of transwell membrane was then examined with an AMR-1400 SEM at an accelerating voltage of 20 kV (Phillips). Representative photomicrographs were taken at various angles to effectively display the specimen so that any

error in assessment is minimized due to the tilt of the specimen or other artifact.

### Quantification of Ciliated Coverage

To determine the proportion of sinus mucosa that was ciliated, the SEM digitized images were stored in the Tagged Image File (TIF) format. Images were then loaded into Image J software and the ciliated areas were delimited, measured, and compared with the total area. Representative SEM images were collected from each ALI cultures and the average values and SDs of percent ciliation for each concentration of CSC or dilution of CSE were calculated.

### Immunostaining

To demonstrate cilia and tight junctions in the ALI cultures, double immunofluorescence was performed. After fixation with 4% paraformaldehyde at  $4^{\circ}\text{C}$  for 20 minutes, the transwells were treated with 0.3% Triton X-100 in PBS (0.01 M, pH 7.4) to raise permeability and then a mixture solution of 5% normal donkey serum and 1% bovine serum albumin to block nonspecific staining. Two primary antibodies raised from different hosts were chosen for the double immunostaining: mouse monoclonal anti- $\beta$ -tubulin IV (1:250; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and rabbit polyclonal anti-ZO1 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA). Visualization was performed with Alex Fluora 488 (green)-conjugated goat anti-mouse IgG for tubulin IV and Alex Fluora 594 (red)-conjugated goat anti-mouse IgG (1:500; Invitrogen) for ZO1. The incubation time for primary antibodies was 90 minutes at room temperature and then overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  and 90 minutes at room temperature for secondary antibodies. The membranes were washed three times in PBS  $1\times$ , counterstained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) for 30 minutes, rinsed with PBS  $1\times$ , and then cut from the plastic support mold. Stained membranes were then mounted with Gelmount aqueous mounting medium (Sigma-Aldrich) on a glass slide. The slides were then imaged on a confocal microscope (Zeiss LSM510META, ■). AQ:4

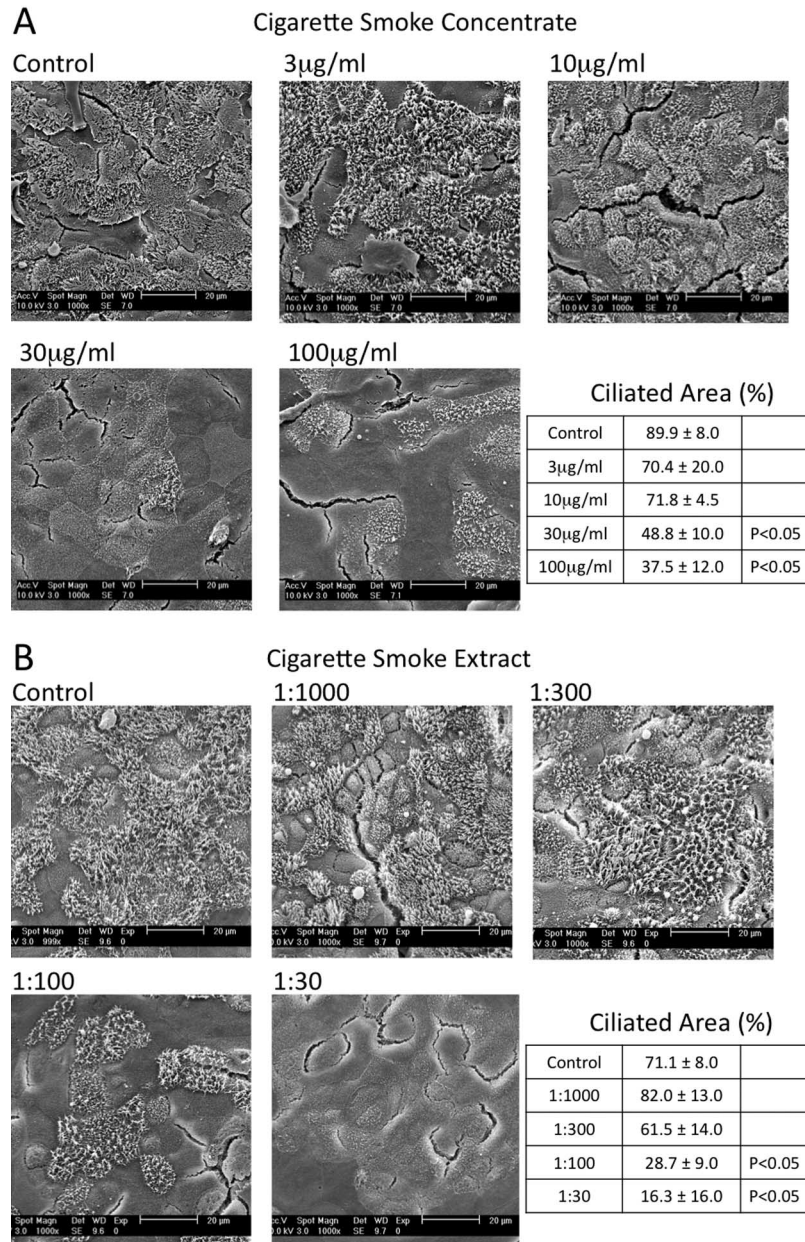
### Statistics

Results are expressed as means  $\pm$  SD and tested for significance using ANOVA followed by Student-Newman-Keuls test for pairwise comparisons. A value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS

### Ciliary Coverage

Primary airway epithelial cells, when grown at an ALI, will differentiate into ciliated cells over a 2-week period. Addition of both the particulate component (CSC; Fig. 1 A) as well as the gas phase of cigarette smoke (CSE; Fig. 1 B) during the first 15 days of air exposure shows a dose-dependent inhibition of cilia formation by SEM. At CSC concentrations above 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and CSE dilutions less than 1:100, significant inhibition of ciliogenesis is shown by evidence of denuded epithelial cells. Additionally, CSC concentrations of  $>30 \mu\text{g}/\text{mL}$  appeared to result in shortened cilia. Dual-labeling immunofluorescence with anti- $\beta$ -tubulin type IV to identify cilia, and anti-ZO1 to identify tight junction, followed by nuclear staining with DAPI of cultures treated with increasing concentra- F1



**Figure 1.** Representative scanning electron micrographs of murine nasal septal air-liquid interface cultures with chronic exposure (10 days) of (A) cigarette smoke concentrate or (B) cigarette smoke extract (B). Each condition was duplicated with a minimum of three cultures per condition. Average surface area coverage is reported for each condition in the bottom right table.

F2 tions of CSE (Fig. 2) confirm the findings noted by SEM. Significant reduction in  $\beta$ -tubulin type IV staining (green channel) is noted in a dose-dependent manner. The tight junction expression (red channel) does not appear altered with increasing concentrations of CSE. Furthermore, the CSE concentrations used in the experiment do not appear to induce nuclear fragmentation as the DAPI staining is unchanged (blue channel).

### Transepithelial Electric Resistance

In addition to generating the propulsive force for mucociliary clearance, the ciliated cells also establishes a barrier function. To assess for this function, TEER was recorded on the

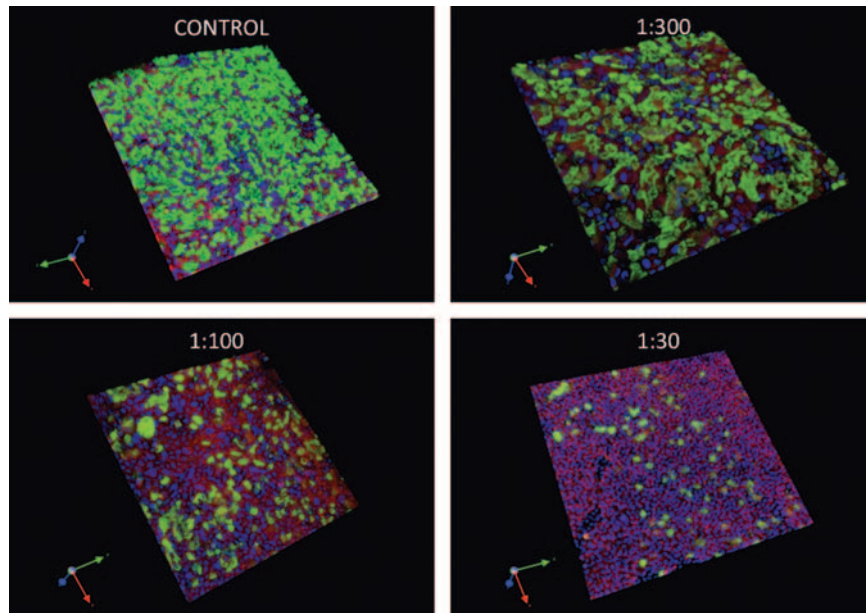
last day (day 15) of tobacco exposure. No significant change in the TEER of the ALI cultures is noted at any of the exposure concentrations with CSC ( $p = 0.132$ ) or CSE ( $p = 0.825$ ; Fig. 3, A and B) tobacco treatments (CSC or CSE).

F3  
AQ: 5

### DISCUSSION

Using the murine nasal septal ALI culture system,<sup>26</sup> we investigated the effects of both the particulate and the volatile fractions of tobacco smoke on sinonasal respiratory epithelial *in vitro* differentiation. Our results indicate that in a dose-dependent manner both the particulate and the gas phase of tobacco smoke (CSC and CSE) significantly inhibit ciliogenesis. Furthermore, exposure of differentiating respiratory ep-





**Figure 2.** Confocal scanning laser microscopy (20 $\times$ ) of air-liquid interface cultures exposed to different dilutions of cigarette smoke extract (CSE). Immunohistochemistry for type IV  $\beta$ -tubulin (green), ZO-1 (red), and 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue) shows a significant decrease of ciliated areas when the cells are exposed to increasing concentrations of CSE. Tight junctions and confluence among the monolayer of cells were not affected by the CSE exposure.

ithelium to the particulate phase of tobacco smoke appears to blunt the terminal phase of ciliogenesis, *i.e.*, cilia elongation, resulting in shortened cilia. Interestingly, the barrier function of the epithelium did not appear to be diminished. It must be stressed that we can not conclude that tobacco smoke blocks cilia formation but may simply slow down the process.

Under normal conditions there is continual shedding and regeneration of airway epithelial cells accounting for  $\sim$ 1% of the epithelial population.<sup>29</sup> However, this process is markedly accelerated to greater than 17% following mechanical injury.<sup>30,31</sup> Additionally, after mechanical injury in the rat, trachea restoration of a highly differentiated epithelium requires  $\sim$ 2-4 weeks.<sup>32,33</sup> Thus, inhibition or blunting of ciliogenesis, both in the normal state as well as after mechanical injury, would result in an additive detrimental effect on mucociliary clearance.

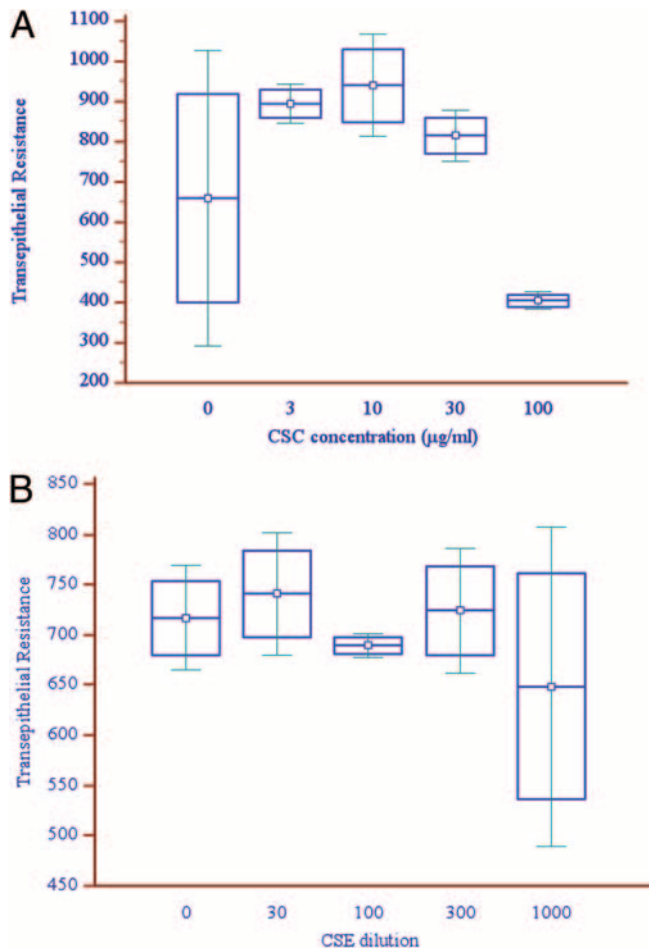
Tobacco smoke exposure has been suggested as a risk factor for the "aggravation and prolongation of sinusitis" as far back as 1964 in the Surgeon General's report on smoking.<sup>7</sup> More recently, the Third National Health and Nutrition Examination Survey performed between the years of 1988 and 1994 established a higher prevalence of recurrent and chronic sinusitis in cigarette smokers when compared with nonsmokers.<sup>8</sup> This was confirmed by an epidemiologic study of CRS in Canada, which also found a higher prevalence of rhinosinusitis in cigarette smokers.<sup>9</sup> More recently, a survey evaluation of nonsmoking flight attendants (working before the tobacco ban on flights) observed a significant association between hours of smoky cabin exposure and self-reported sinusitis.<sup>34</sup>

Several studies have evaluated the role of tobacco smoke exposure on outcomes of functional endoscopic sinus surgery. In a long-term follow-up study, Kennedy reported that smoking was the most significant factor leading to a need for revision surgery<sup>10</sup> and Ramadan *et al.* showed that children

exposed to second-hand tobacco smoke require revision sinus surgery for persistent or recurrent rhinosinusitis substantially more often than children not exposed to tobacco smoke.<sup>12</sup> Smith *et al.* reported that smoking diminished the postoperative endoscopic improvement noted in nonsmokers<sup>35</sup> while Briggs *et al.* showed that smoking was associated with worse long-term outcomes (52 months) based on patient-reported symptoms (Sino-Nasal Outcome Test 16).<sup>13</sup> Interestingly, tobacco exposure does not appear to effect short-term (3.1 months) outcome of sinus surgery as assessed by the Sino-Nasal Outcome Test 20 and it was actually reported that smokers had a statistically significant improvement compared with nonsmokers in this time frame.<sup>36</sup>

The ultimate pathophysiology leading to rhinosinusitis is stasis of sinonasal secretions secondary to diminished function of the sinonasal ciliated mucosa. Thus, the goal of both medical and surgical intervention in this disease process is restoration of function. Effective mucociliary clearance requires both appropriate mucus production and normal ciliary activity.<sup>37</sup> The effects of tobacco smoke on both of these components of the respiratory epithelia have been of interest for more than 40 years.<sup>38</sup> Although studies reporting the effects of cigarette smoke on ciliary beating have produced confounding results from decreased beating to mildly increased beating,<sup>15-17</sup> histological studies of cilia from the airways of smokers consistently indicate decreased cilia number.<sup>18,19</sup> Additionally, cigarette smoke increases the production of airway mucin by epithelial cells,<sup>21-23</sup> implying that an already damaged epithelium would need to increase MCC to maintain homeostasis.

No clear etiology has been presented to explain the decreased number of cilia noted in smokers.<sup>18</sup> Tobacco smoke is composed of a complex mixture of over 5000 substances.<sup>39</sup> Various chemicals in cigarette smoke, including acrolein, formaldehyde, carbon monoxide, nicotine, cotinine, acetalde-



**Figure 3.** Trans epithelial electric resistance (TEER,  $\Omega * cm^2$ ) measured after 15 days of cell growth with 10 days of terminal exposure to (A) cigarette smoke concentrate (CSC) or (B) cigarette smoke extract (CSE). TEER was not significantly altered by exposure to the varying concentrations of cigarette smoke fractions (CSE,  $p = 0.825$ ; CSC,  $p = 0.132$ ).

hyde, phenol, and potassium cyanide, have been identified as having high toxicity to respiratory cilia.<sup>14,40,41</sup> Additionally, tobacco smoke exposure has been shown to increase several proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ <sup>42,43</sup> contributing to both epithelial and/or cilia shedding. However, our data suggest that compounds found within both the particulate and the gas fractions of tobacco smoke inhibit ciliogenesis. The effects of cigarette smoke exposure on the respiratory tract are mainly mediated by diffusion of toxins from the apical surface into the cells. Previous attempts in our laboratory to recapitulate this habitual condition by pumping cigarette smoke onto the culture showed that the amount of smoke was very difficult to control and gave spurious results. In our current experimental setup, we mimicked a delivery of toxins *via* the blood, with the advantage of a continuous delivery and more controlled and reproducible effects.

Furthermore, correlating *in vitro* CSC and CSE concentrations with *in vivo* human exposure has been difficult to determine. The highest concentration of CSE used in our study (1:30) contains particles from the burn of 0.026 cigarette/mL

or 0.015 cigarette/culture (*i.e.*, 1.5% of the cigarette). The concentrations used in our study correlate with other studies<sup>23,44</sup> and is at least 15 times less than the toxic doses used by Lan *et al.*<sup>25</sup>

Ciliogenesis results from an extremely complex coordination of molecular signaling cascades and protein assembly that can be broadly divided into four stages: (1) generation of centrioles, (2) migration of duplicated centrioles, (3) formation of the basal body-associated structures, and (4) elongation of the cilia.<sup>45</sup> Thus, there are many potential molecular targets that may be susceptible to tobacco smoke components. Our future experiments will attempt to dissect which components of ciliogenesis CSC and CSE affect. A more complete understanding of the environmentally susceptible steps of ciliogenesis may ultimately result in novel postsurgical therapies with improved outcomes.

## CONCLUSION

In summary, our results indicate that the exposure to cigarette smoke fractions (particulate and gas) disrupts in a dose-dependent manner the development of cilia during the differentiation process of ciliated respiratory cell. At the concentrations tested, this impairment does not seem to alter the formation of cell-to-cell interaction mediated by tight junctions formation. The ciliogenesis impairment mediated by cigarette smoke exposure might explain the higher prevalence and worse outcomes in recurrent and CRS patients.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Bei Chen, M.D., for help with the ALI cultures.

## REFERENCES

- Blackwell D, Collins J, and Coles R. Summary health statistics for U.S. adults: National Health Interview Survey, 1997. National Center for Health Statistics. Vital Health Stat 10-15, 2002. AQ: 10
- Cherry DK, and Woodwell DA. National Ambulatory Medical Care Survey: 2000 summary. Adv Data 1-32, 2002. AQ: 11
- Ly N, and McCaig LF. National Hospital Ambulatory Medical Care Survey: 2000 outpatient department summary. Adv Data 1-27, 2002. AQ: 12
- Ray NF, et al. Healthcare expenditures for sinusitis in 1996: Contributions of asthma, rhinitis, and other airway disorders. J Allergy Clin Immunol 103:408-414, 1999. AQ: 13
- Ostrowski LE, et al. Cloning and characterization of KPL2, a novel gene induced during ciliogenesis of tracheal epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 20:675-683, 1999. AQ: 14
- Calderon-Garciduenas L, et al. Ultrastructural nasal pathology in children chronically and sequentially exposed to air pollutants. Am J Respir Cell Mol Biol 24:132-138, 2001. AQ: 15
- Smoking and Health: Report of the Advisory Committee to the Surgeon General of the Public Health Service. U.S. Department of Health, E.a.W., US Public Health Service, Washington, D.C., 1964. AQ: 16
- Lieu JE, and Feinstein AR. Confirmations and surprises in the association of tobacco use with sinusitis. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 126:940-946, 2000.
- Chen Y, Dales R, and Lin M. The epidemiology of chronic rhinosinusitis in Canadians. Laryngoscope 113:1199-1205, 2003.
- Kennedy DW. Prognostic factors, outcomes and staging in ethmoid sinus surgery. Laryngoscope 102:1-18, 1992.

11. Sobol SE, Wright ED, and Frenkiel S. One-year outcome analysis of functional endoscopic sinus surgery for chronic sinusitis. *J Otolaryngol* 27:252–257, 1998.
12. Ramadan HH, and Hinerman RA. Smoke exposure and outcome of endoscopic sinus surgery in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 127:546–548, 2002.
13. Briggs RD, Wright ST, Cordes S, and Calhoun KH. Smoking in chronic rhinosinusitis: A predictor of poor long-term outcome after endoscopic sinus surgery. *Laryngoscope* 114:126–128, 2004.
14. Walker TR, and Kiefer JE. Ciliastatic components in the gas phase of cigarette smoke. *Science* 153:1248–1250, 1966.
15. Hybbinette JC. A pharmacological evaluation of the short-term effect of cigarette smoke on mucociliary activity. *Acta Otolaryngol* 94:351–359, 1982.
16. Pettersson B, Curvall M, and Enzell C. The inhibitory effect of tobacco smoke compound on ciliary activity. *Eur J Respir Dis Suppl* 139:89–92, 1985.
17. Wyatt TA, Gentry-Nielsen MJ, Pavlik JA, and Sisson JH. Desensitization of PKA-stimulated ciliary beat frequency in an ethanol-fed rat model of cigarette smoke exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 28:998–1004, 2004.
18. Wanner A, Salathe M, and O’Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1868–1902, 1996.
- AQ: 17 19. Verra F, et al. Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers, ex-smokers, and nonsmokers. *Am J Respir Crit Care Med* 151:630–634, 1995.
20. Goodman RM, Yergin BM, Landa JF, et al. Relationship of smoking history and pulmonary function tests to tracheal mucous velocity in nonsmokers, young smokers, ex-smokers, and patients with chronic bronchitis. *Am Rev Respir Dis* 117:205–214, 1978.
- AQ: 18 21. Gensch E, et al. Tobacco smoke control of mucin production in lung cells requires oxygen radicals AP-1 and JNK. *J Biol Chem* 279:39085–39093, 2004.
- AQ: 19 22. Takeyama K, et al. Activation of epidermal growth factor receptors is responsible for mucin synthesis induced by cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280: L165–L172, 2001.
23. Kreindler JL, Jackson AD, Kemp PA, et al. Inhibition of chloride secretion in human bronchial epithelial cells by cigarette smoke extract. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L894–L902, 2005.
24. Lee WK, Ramanathan M Jr, Spannhake EW, and Lane AP. The cigarette smoke component acrolein inhibits expression of the innate immune components IL-8 and human beta-defensin 2 by sinonasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 21:658–663, 2007.
25. Lan MY, Ho CY, Lee TC, and Yang AH. Cigarette smoke extract induces cytotoxicity on human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol* 21:218–223, 2007.
26. Antunes MB, et al. Murine nasal septa for respiratory epithelial air–liquid interface cultures. *Biotechniques* 43:195–204, 2007.
27. Woodworth BA, Antunes MB, Bhargava G, et al. Murine tracheal and nasal septal epithelium for air–liquid interface cultures: A comparative study. *Am J Rhinol* 21:533–537, 2007.
28. Anto RJ, Mukhopadhyay A, Shishodia S, et al. Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of I-kappaB(alpha): Correlation with induction of cyclooxygenase-2. *Carcinogenesis* 23:1511–1518, 2002.
29. Ayers MM, and Jeffery PK. Proliferation and differentiation in mammalian airway epithelium. *Eur Respir J* 1:58–80, 1988.
30. Lane BP, and Gordon R. Regeneration of rat tracheal epithelium after mechanical injury. I. The relationship between mitotic activity and cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 145:1139–1144, 1974.
31. Gordon RE, and Lane BP. Wound repair in rat tracheal epithelium. Division of G1 and G2-arrested cells following injury. *Lab Invest* 42:616–621, 1980.
32. Battista SP, Denine EP, and Kensler CJ. Restoration of tracheal mucosa and ciliary particle transport activity after mechanical denudation in the chicken. *Toxicol Appl Pharmacol* 22:59–69, 1972.
33. Shimizu T, Nishihara M, Kawaguchi S, and Sakakura Y. Expression of phenotypic markers during regeneration of rat tracheal epithelium following mechanical injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11:85–94, 1994.
34. Ebbert JO, Croghan IT, Schroeder DR, et al. Association between respiratory tract diseases and secondhand smoke exposure among never smoking flight attendants: A cross-sectional survey. *Environ Health* 6:28, 2007.
35. Smith TL, et al. Predictive factors and outcomes in endoscopic sinus surgery for chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 115:2199–2205, 2005.
36. Das S, Becker AM, Perakis H, et al. The effects of smoking on short-term quality of life outcomes in sinus surgery. *Laryngoscope* 117:2229–2232, 2007.
37. Eliezer N, Sade J, Silberberg A, and Nevo AC. The role of mucus in transport by cilia. *Am Rev Respir Dis* 102:48–52, 1970.
38. Falk HL, Tremer HM, and Kotin P. Effect of cigarette smoke and its constituents on ciliated mucus-secreting epithelium. *J Natl Cancer Inst* 23:999–1012, 1959.
39. Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 68:153–207, 1968.
40. Dalhamn T, and Rylander R. Ciliotoxicity of cigar and cigarette smoke. *Arch Environ Health* 20:252–253, 1970.
41. Agius AM, Wake M, Pahor AL, and Smallman A. The effects of in vitro cotinine on nasal ciliary beat frequency. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 20:465–469, 1995.
42. Churg A, Dai J, Tai H, et al. Tumor necrosis factor-alpha is central to acute cigarette smoke-induced inflammation and connective tissue breakdown. *Am J Respir Crit Care Med* 166:849–854, 2002.
43. Gustafsson A, Asman B, and Bergstrom K. Cigarette smoking as an aggravating factor in inflammatory tissue-destructive diseases. Increase in tumor necrosis Factor-alpha priming of peripheral neutrophils measured as generation of oxygen radicals. *Int J Clin Lab Res* 30, 187–190 2000.
44. Pace, E, et al. Cigarette smoke increases Toll-like receptor 4 and modifies lipopolysaccharide-mediated responses in airway epithelial cells. *Immunology* 124:401–411, 2008.
45. Hagiwara H, Ohwada N, and Takata K. Cell biology of normal and abnormal ciliogenesis in the ciliated epithelium. *Int Rev Cytol* 234:101–141, 2004. □

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)