

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
BRUNO THIZON MENEGALI

**EFEITOS TERAPÊUTICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO DANO
OXIDATIVO PULMONAR DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À
FUMAÇA DO CIGARRO**

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

BRUNO THIZON MENEGALI

**EFEITOS TERAPÊUTICOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NO DANO
OXIDATIVO PULMONAR DE CAMUNDONGOS EXPOSTOS À
FUMAÇA DO CIGARRO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aurino de Pinho

CRICIÚMA, JANEIRO DE 2009

AGRADECIMENTOS

A todos os colaboradores deste trabalho;

Deus por me iluminar todos os dias e colocar em meu caminho pessoas como:

O Professor Dr. Ricardo Aurino de Pinho, orientador e grande incentivador desta pesquisa, um exemplo não só de profissional, mas um ser humano que dispensa palavras, nos engajando em um ambiente familiar. Dentre a qual, está os colaboradores desse trabalho como o Paulo, Luciano, Renata, Priscila que aqui representam todos os integrantes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício, pela energia positiva, pelo comprometimento e apoio.

Os colegas, e agora, amigos, Diego e Luciano Daniel que tantos problemas e conversas, durante esse período, foram divididos.

Meus familiares em especial, meus pais Salete e Afonso, minha irmã, Talita, que mais uma vez não mediram esforços para me oportunizar, incentivar e dar o apoio necessário em momentos de angústia.

A minha companheira, amiga e namorada Diélly que está ao meu lado em mais uma conquista. Considero-me prova viva de que atrás de um grande homem sempre tem uma grande mulher!

Muito obrigado a todos!

Sumário

RESUMO.....	5
ABSTRACT	6
1 INTRODUÇÃO	7
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
2.1 Dados Epidemiológicos	9
2.2 Fumaça do Cigarro.....	10
2.3 Lesão pulmonar por exposição à fumaça de cigarro	13
2.4 Cigarro e Estresse Oxidativo	14
2.5 Danos em biomoléculas pelo cigarro.....	16
2.6 Exercício Físico e Estresse Oxidativo Pulmonar	17
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos.....	20
CAPÍTULO I	22
The effects of physical exercise on cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response	23
Figures e Legends.....	41
4 DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	51

RESUMO

Estudos relacionam o poder oxidativo do cigarro com a patogênese de diversas doenças pulmonares e sugerem que o exercício físico regular contribui, significativamente, para a redução dos efeitos deletérios da exposição à fumaça do cigarro. O objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos terapêuticos do exercício físico sobre os marcadores histológicos e de estresse oxidativo em animais expostos cronicamente à fumaça do cigarro. Para isso, 36 camundongos (C57BL-6) machos com idade entre 8 a 10 semanas foram divididos em quatro grupos (n=9): controle, exercício, cigarro e cigarro+exercício. Os grupos denominados CS foram submetidos à exposição passiva da fumaça do cigarro, 3 vezes/dia (4 cigarros/sessão), durante 60 dias consecutivos. Os grupos treinados foram submetidos a um programa de treinamento físico na água, 5 vezes/semana, durante 8 semanas. Vinte e quatro horas após a última sessão de exercício e exposição à fumaça do cigarro os animais foram sacrificados por tração cervical. O pulmão direito foi retirado cirurgicamente, processado e armazenado para posterior análise. Foram realizadas análises histológicas e morfométricas, conteúdo de colágeno (hidroxiprolina), produção de oxidantes (ânion superóxido) enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e catalase) e danos oxidativos em lipídios e proteínas (TBARS e formação de grupos carbonil). Os resultados mostraram que animais expostos ao cigarro apresentam um alargamento e destruição do septo alveolar, presença de macrófagos e neutrófilos, aumento no conteúdo de colágeno, redução na densidade do volume de fibras elásticas e um aumento na densidade do volume de espaços aéreos. Contudo, o exercício físico melhorou parcialmente esses marcadores. Adicionalmente o exercício físico reduziu a produção de oxidantes e aumentou o sistema de defesa antioxidante enzimático, mas não reverteu os danos oxidativos em lipídios e proteínas causados pela fumaça de cigarro. Os resultados sugerem que o treinamento físico melhora parcialmente os parâmetros histológicos e de estresse oxidativo em pulmão de animais expostos cronicamente a fumaça de cigarro e que o uso de outras terapias pode contribuir para potencializar esses efeitos.

Palavras-chave: cigarro, inflamação, estresse oxidativo, exercício físico.

ABSTRACT

Studies have showed that cigarette oxidative power is related with pathogenesis of several pulmonary diseases and the regular physical exercise contributes significantly to reduction of cigarette deleterious effect. The objective of present study is investigating the therapeutics effects of physical exercise on histological and oxidative stress markers in animals exposed to cigarette smoke. For this, Thirty six male C57BL-6 mice between 8 and 10 weeks old were separated in four groups (n=9): control, exercise, cigarette, and cigarette plus exercise. The groups CS named were exposed to cigarette smoke 3 times/day (4 cigarettes/session) for 60 consecutive days. The groups Ex named were submitted to swimming physical training 5 days/week for 8 weeks. Twenty four hours after last exercise and cigarette exposition session the animals were sacrificed for cervical traction. The right lung was removed, processed, and filed to analysis future. Were accomplish histological, morphological, collagen content (hydroxyproline), oxidant production (anion superoxide), antioxidants enzymes (SOD and CAT), and lipid and protein oxidative injury (TBARS and Carbonyl). The results showed the animals exposed to cigarette smoke showed an enlargement and destruction of alveolar septum and increase in macrophages, neutrophils and collagen content. Our results also showed a decrease in density of elastic fibers volume and increase in density of airspaces volume. However, the physical exercise improved partially these markers. Additionally the physical exercise decreased the oxidants production and increased the enzymatic antioxidant defense system, but not reverted lipid and protein oxidative damage induced by cigarette smoke. The results suggest that physical training improve partially the histological and oxidative stress parameters in lung of animals cigarette smoke exposed chronically and others therapy can to contribute to potentiate this effects.

Key-Words: Cigarette smoke, inflammation, oxidative stress, physical exercise.

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos induzidos pelo cigarro estão intimamente ligados a vários distúrbios cardiorrespiratórios como bronquite, enfisema, infarto do miocárdio, cânceres e outros (Panda et al., 2001). Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que a gravidade da doença está diretamente relacionada com a quantidade e o tempo de exposição (Carnevali et al., 2003).

A fumaça do cigarro é uma mistura complexa de aproximadamente 4.700 substâncias, incluindo elevadas concentrações de radicais livres (RL) e outros oxidantes que estão diretamente relacionados com a patogênese das doenças pulmonares (Rahman & Macnee, 1996). Devido a isso, o cigarro tem sido fortemente associado à redução dos sistemas de defesas antioxidantes e conseqüente estresse oxidativo (Boots et al., 2003).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) estão envolvidas em vários processos vitais do organismo aeróbio como a sinalização celular, estimulação de receptores, estimulação enzimática e em danos ou morte celular (Cabrera et al., 2006; Sachdev & Davies, 2008).

Estudos sugerem que os RL contidos no cigarro são responsáveis pelos efeitos adversos do tabagismo. Segundo Park et al. (1998), o cigarro leva ao estresse oxidativo pulmonar por causar peroxidação lipídica, oxidação de proteínas tióis e alterações em proteína carbonil e DNA. Esse fenômeno pode ser aumentado pelo maior recrutamento de células inflamatórias, capazes de liberar quantidades significativas de agentes reativos, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (Rahman & Macnee, 1996).

Diante das evidências de que ERO estão envolvidas na patogênese pulmonares induzidas pela fumaça do cigarro, acredita-se que o uso de terapias, como o exercício físico, possa exercer um efeito terapêutico minimizando a severidade dos danos pulmonares.

As terapias utilizadas para pacientes com danos causados pelo cigarro sugerem melhorar a qualidade e a duração de vida. As terapias têm como metas reduzir sintomas, preservar a função pulmonar, otimizar a troca de gases e diminuir a progressão da doença. Para isso, as estratégias mais utilizadas para a estabilização dos pacientes é a administração de medicamentos como broncodilatadores, antibióticos e corticosteróides, além de suplementação nutricional e de oxigênio, imunização, exercícios respiratórios (Celli et al., 2005) e exercícios físicos regulares (Pinho et al., 2007).

Os benefícios do exercício moderado praticado regularmente têm sido evidenciados na literatura. Há irrefutáveis evidências da efetividade do exercício na prevenção primária e secundária de diversas doenças crônicas (Warburton et al., 2006). Contudo, o tipo, a intensidade, a frequência e a duração do exercício são fatores determinantes para atingir os efeitos profiláticos e terapêuticos (Pinho et al., 2007). Deve-se destacar que exercícios intensos causam danos em estruturas celulares ou reações inflamatórias, sendo alguns desses danos mediados por radicais livres (Vinã et al., 2000), entretanto, exercícios físicos regulares, de leve a moderada intensidade, causam um aumento na capacidade de defesa do organismo contra a ação de oxidantes (Gomez-Cabrera et al., 2008).

Dado o potencial efeito oxidativo do cigarro e o potencial efeito do exercício físico regular sobre as funções pulmonares, o presente estudo teve

por objetivo avaliar as respostas terapêuticas do exercício físico regular em camundongos expostos cronicamente a fumaça do cigarro.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Dados Epidemiológicos

O cigarro é considerado, atualmente, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), um dos maiores desafios da saúde pública e está inserido na causalidade de aproximadamente 50 doenças, destacando-se doenças cardiovasculares, cânceres e respiratórias (Oliveira et al., 2008).

O cigarro mata uma pessoa a cada seis segundos. Sendo que um terço da metade de todas as pessoas que fumam, em média, morrem 15 anos prematuramente. Por isso, tem sido considerado o maior agente isolado e evitável de morbidade e mortalidade no mundo. Estima-se que haja em torno de 1 bilhão e 260 milhões de fumantes, e cerca de 2 bilhões de fumantes passivos. A expectativa é que o cigarro seja, em alguns anos, a maior causa de morte, vitimando mais que a tuberculose, AIDS, acidente de trânsito, homicídios, suicídios, drogas ilícitas e alcoolismo somados (Rosemberg, 2002; Falcão & Costa, 2008). Hoje é responsável por uma em cada dez mortes entre os adultos (OMS, 2008).

Em 2002, ocorreram, no mundo, cinco milhões de mortes prematuras atribuídas ao cigarro, equivalente a aproximadamente 10 mil mortes/dia (Spada et al., 2006). Se manter o padrão de consumo, projeta-se para 2030 um

aumento para 8 milhões de óbitos por ano e cerca de 500 milhões de pessoas vivas hoje morrerão como resultado do consumo do cigarro (OMS, 2008).

Atualmente, a mortalidade anual atribuída ao cigarro no Brasil é de 200 mil, o que significa 23 mortes a cada hora (Falcão & Costa, 2008).

O Brasil é um dos principais produtores e exportadores de tabaco no mundo, tornando complexa qualquer estratégia de intervenção no setor fumageiro.

De acordo com dados do Ministério da Saúde (2004) e do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a maior prevalência do uso regular do cigarro é registrada na cidade de Porto Alegre (25,2%), seguida de Curitiba (21,5%), Belo Horizonte (20,4%) e São Paulo (19,9%). As menores prevalências são observadas em Aracaju (12,9%), Campo Grande (14,5%) e Natal (14,7%). De uma forma geral, as cidades mais urbanizadas apresentam maiores prevalências.

Outro dado importante relacionado ao tabagismo no Brasil é que o uso passivo ou ativo do cigarro custa aos cofres públicos ao menos R\$ 37,4 milhões anuais. Desses, R\$ 19,1 milhões são gastos com tratamentos e internações no SUS (Sistema Único de Saúde) e R\$ 18,3 milhões com o pagamento de benefícios e pensões as famílias das vítimas (Ministério da Saúde, 2004).

2.2 Fumaça do Cigarro

A fumaça do cigarro contém substâncias químicas e gases reativos, capazes de gerar radicais livres, as quais apresentam um papel central na

patogênese de danos pulmonares (Valença et al., 2004). É constituída por uma mistura de substâncias tóxicas diferentes, apresentando uma fase gasosa e outra particulada. A fase gasosa é composta, entre outros, por monóxido de carbono, amônio, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada contém nicotina, monóxido de carbono e alcatrão, que concentram 43 substâncias cancerígenas, dentre as quais estão o arsênico, níquel, benzo-pireno, cádmio e chumbo (Spada et al., 2006).

De acordo com Duarte (2006), três substâncias se destacam na composição química da fumaça do cigarro: nicotina, monóxido de carbono e alcatrão.

Nicotina - considerada pela OMS como uma droga psicoativa, é responsável pela dependência do fumante. Aumenta a liberação de catecolaminas, por acelerar a frequência cardíaca, conseqüentemente, leva a vasoconstrição e a hipertensão arterial. Provoca uma maior adesividade plaquetária e, juntamente com o monóxido de carbono leva à aterosclerose. Consubstancialmente, contribui para o surgimento de doenças cardiovasculares ao liberar substâncias quimiotáxicas, que vão atrair ao pulmão células polimorfonucleares, liberadoras de elastase responsável pela destruição da elastina e aceleração do dano pulmonar.

Monóxido de Carbono - tem afinidade com a hemoglobina, contida nos glóbulos vermelhos do sangue, que transportam oxigênio para os tecidos de todos os órgãos do corpo. A ligação do monóxido de carbono com a hemoglobina forma o composto chamado carboxihemoglobina, que dificulta a oxigenação do sangue e priva alguns órgãos do oxigênio e pode causar doenças, como a arterosclerose.

Alcatrão - composto de 43 substâncias comprovadamente carcinogênicas que incluem o arsênico, níquel, benzopireno e cádmio (Elsayed & Bendich, 2001; Vaart et al., 2004; Duarte, 2006).

O dano pulmonar pela fumaça do cigarro é caracterizado pela indução de proteínas inflamatórias incluindo citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Estas moléculas ativam potentes mediadores que alteram as vias aéreas brônquicas, danos no epitélio e acarretam em mudanças fundamentais na estrutura pulmonar (Foronjy & D'armiento, 2006). Por isso, a fumaça do cigarro é um potente fomentador inflamatório ligado com a severidade do dano pulmonar. Embora a inflamação seja essencial contra a patogênese, o recrutamento prolongado dessas células acarreta em uma inflamação crônica (Vassalo et al., 2008) devido a invasão e retenção de células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos, linfócitos T e B e células dendríticas (Barnes, 2004; Vassalo et al., 2008)

Os macrófagos fazem o papel central na resposta celular causada pela fumaça do cigarro. Quando ativados, os macrófagos liberam proteínas inflamatórias que são reguladas por fatores de transcrição, como NF- κ B (*nuclear factor - κ B*) (Barnes, 2004). Os macrófagos também secretam enzimas elastolíticas, incluindo matriz metaloproteinases (MMP)-2, MMP-9, MMP-12, catepsinas K, L e S e neutrófilo elastase (Barnes, 2004; Hora et al., 2005). A ativação destas enzimas causam a liberação de fatores de crescimento e de transcrição importantes na fibrogênese, tais como TGF- β 1 (*transforming growth factor- β 1*) e CTGF (*collagen tissue growth factor*) (Barnes, 2004).

As células epiteliais também podem ter um importante papel na resposta celular pela exposição à fumaça do cigarro. As mesmas são ativadas para

produzir mediadores inflamatórios como TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), IL-1 β , GM-CSF (*granulocytes macrophages – colony stimulator factor*) e IL-8 (Tuder et al., 2006; Kim et al., 2008). Além de ter um papel fundamental na defesa e reparo celular, secretando antioxidantes e antiproteínases, tal como inibidor de leucoprotease (SLPI) (Barnes, 2004).

2.3 Lesão pulmonar por exposição à fumaça de cigarro

O cigarro é considerado o maior e mais importante fator de risco para o desenvolvimento de danos pulmonares, principalmente a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Evidências mostram que o dano pulmonar causado pelo cigarro é gerado por um mecanismo complexo de desequilíbrio entre oxidante/antioxidante, pró-inflamatório/anti-inflamatório e protease/antiprotease (Barnes et al., 2003; Tuder et al., 2006; Kim et al., 2008).

De acordo com Soriano & Agustí (2008), o enfisema pulmonar é a principal desordem progressiva causada pela inalação da fumaça do cigarro, provocando inflamação crônica nos brônquios e bronquíolos e é ocasionada pela interferência nos mecanismos normais de proteção das vias aéreas. É definida como um alargamento anormal permanente dos espaços aéreos distais dos bronquíolos terminais acompanhada por destruição de suas paredes e sem fibrose aparente (Kim et al., 2008).

O enfisema pulmonar apresenta uma diminuição de α 1-antitripsina (α 1-AT), uma glicoproteína produzida principalmente pelos hepatócitos e liberada na circulação. A principal função da α 1-AT é inibir a elastase

neutrófila, uma protease de serina que tem a capacidade de hidrolisar as fibras de elastina no pulmão (Barnes et al., 2003). Várias proteases degradam componentes do tecido conectivo pulmonar, particularmente fibras de elastina, que compõe a maior parte da estrutura desse órgão, acarretando num desequilíbrio entre proteases e anti-proteases, a qual tem a função de defesa dos efeitos das proteases (Barnes, 2004).

Outras proteases como catepsina (Cat) B, G e proteinase 3 (Pr3) são liberadas a partir de neutrófilos e com propriedades similares a NE. Pr3 e CatG são fortemente expressados na superfície de neutrófilos depois da ativação de citocinas e também são inibidos por α 1-AT (Stocley, 1999; Barnes et al., 2003).

Os macrófagos também têm um papel importante na liberação de proteases. Várias enzimas elastolíticas são derivadas dessas células como Cat L, S, K, e matriz metaloproteases (MMP) 2, 9 e 12 (Barnes et al., 2003; Abboud & Vimalanathan, 2007). As MMPs são consideradas as maiores danificadoras do tecido pulmonar derivado dos macrófagos (Abboud & Vimalanathan, 2007) e são inutilizadas por inibidores específicos denominados TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteases*) e classificados de TIMP1 a TIMP4. Outra antiprotease importante é SLPI (*secretory leukoprotease inhibitor*) que é um grande inibidor de proteases, além de antimicrobiano e antiinflamatório (Stocley, 1999).

2.4 Cigarro e Estresse Oxidativo

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das ERO são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, pela qual 2-5% do oxigênio é desviado para a formação de RL (Halliwell & Gutteridge, 2007). Entretanto, as ERO podem ser

geradas em outros eventos bioquímicos celulares como processos inflamatórios, isquemia/reperfusão, oxidação de catecolaminas entre outros eventos oxidativos. Embora esses processos sejam normais para a vida das células, a produção excessiva de ERO, mais especificamente radicais livres (RL), pode induzir danos a biomoléculas, alterando o estado redox e morte celular (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A fumaça do cigarro contém diversas substâncias oxidantes que podem causar alteração na estrutura (Elsayed & Bendich, 2001) e no estado redox pulmonar (Gochman et al., 2007). Estima-se que a fumaça do cigarro tenha aproximadamente 10^{15} oxidantes na fase gasosa e 10^{18} na fase particulada, incluindo ERO como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e outros radicais orgânicos (Tuder et al., 2006).

Estudos demonstram que após a inalação contínua de fumaça de cigarro, macrófagos, neutrófilos e outras células migram para o interstício pulmonar, produzindo ERO, que lesam diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio (Garritsen et al., 2005; Sadowska et al., 2005). A produção de ERO por neutrófilos e células fagocitárias ocorre através da redução por um elétron do oxigênio na presença de NADPH, numa reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. A maior parte do O_2^- produzido é convertido a H_2O_2 , pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), iniciando a formação de vários outros agentes microbicidas oxidantes, como o ácido hipocloroso (HOCL), que se forma com a presença de H_2O_2 e Cl^- numa reação catalisada pela mieloperoxidase (MPO). O HOCL ainda reage com H_2O_2 formando oxigênio singlet (1O_2) ou formar radical hidroxil ($\cdot OH$) pela reação com ferro ($HOCL + Cu^+/Fe^2$).

2.5 Danos em biomoléculas pelo cigarro

As ERO pode iniciar a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados de tecidos biológicos, resultando em transformação desses ácidos em hidroperóxidos (Boots et al., 2003; Rahman, 2004; Pinho et al., 2007). Peroxidação lipídica é o resultado final de uma reação em cadeia que inicia com a abstração de uma molécula de hidrogênio de um ácido graxo insaturado, formando um radical lipídico (L[•]) que rapidamente é seqüestrado pelo oxigênio, ocasionando um radical peroxil lipídico (LOO[•]). Esse altamente instável, ao reagir com ácidos graxos vizinhos propaga uma reação em cadeia de peroxidação lipídica que leva ao dano celular (Sachdev et al., 2008). A LPO aumenta a permeabilidade celular. Caso a membrana mitocondrial interna seja afetada, acarreta num vazamento de íons, resultando em dano na função mitocondrial e, assim reduziria a produção energética (Boots et al., 2003). Segundo Morrison et al. (1999), a LPO prejudica receptores de membrana e enzimas de translocação, que tem sido implicado na etiogênese de diversos danos pulmonares.

Ação destes radicais torna a proteína mais suscetível à degradação proteolítica por modificação na cadeia de aminoácidos, formando agregados protéicos e quebrando a união peptídica (Boots et al., 2003). Estas reações conduzem para alterações em estruturas protéicas ou em funções enzimáticas (Finaud et al., 2006). Um exemplo pode ser a oxidação do grupo metionina em α 1-AT e a sua conseqüência já foram descrito anteriormente. Durante o processo de degradação das proteínas por RL, alguns resíduos de aminoácidos são convertidos para resíduos carbonil (Boots et al., 2003;

Rahman, 2004; Finaud et al., 2006). Esse processo pode modificar a estrutura e propriedades químicas das proteínas, deixando as células susceptíveis a proteinases ou desdobramento da proteína (Boots et al., 2003).

ERO são também conhecidos por causar quebra das fitas de bases de DNA. Todas as partes do DNA são suscetíveis aos ataques da ERO, conseqüentemente, dano oxidativo que pode provocar metagênese, contribuindo para câncer e envelhecimento celular (Ciencewicky et al., 2008).

Como descrito anteriormente, a fumaça do cigarro é um facilitador do estresse oxidativo, pois contém e estimula a produção de ERO, além de conter ferro. O ferro estimula a produção do radical hidroxil (OH^\cdot) a partir da reação com O_2^- e H_2O_2 (Jackson et al., 1987; Rahman & Macnee, 1996; Liu et al., 2005;). O radical hidroxil é considerado o radical mais potente e o maior responsável pelos ataques em fitas de DNA (Liu et al., 2005; 2008).

Em resposta ao dano no DNA, múltiplos processos celulares, que inclui mecanismos de reparo e apoptose, são iniciados para manter a integridade genômica. Caso ocorra um desequilíbrio na ativação desses processos o resultado seria a instabilidade genômica, mutação, transformação fenotípica e alteração funcional (Liu et al., 2005).

2.6 Exercício Físico e Estresse Oxidativo Pulmonar

Espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em alguns processos vitais a vida humana e também são fundamentais nos efeitos de danos e na adaptação que acompanham o exercício físico (Sachdev et al., 2008).

Durante o exercício físico, as taxas metabólicas são elevadas e podem aumentar drasticamente o consumo de oxigênio (VO_2 máx) em 20 vezes com relação aos valores de repouso (Carmeli et al., 2000) e em 100 vezes na fibra muscular (Halliwell & Gutteridge, 2007), concomitantemente, eleva a produção de RL (Alessio & Goldfarb, 1988). Entretanto, estudos têm demonstrado que o treinamento físico de intensidade moderada aumenta as defesas antioxidantes e a resistência do tecido (Alessio & Goldfarb, 1988; Radák et al., 1999; Gomez-Cabrera et al., 2006, Pinho et al., 2006).

Vários mecanismos de produção de ERO estão diretamente relacionados com exercício físico, dentre os quais se destacam o aumento da produção de ânion superóxido na cadeia transportadora de elétrons, a ativação de células polimorfonucleares e em processos de isquemia/reperfusão (Gomez-Cabrera et al., 2006; Sachdev, 2008).

O exercício leva o recrutamento de várias células do sistema imune, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são capazes de produzir ERO para destruir agentes invasores e remover tecidos danificados. Entre essas células, os neutrófilos são a maior fonte de ERO (O_2^-/H_2O_2) pela reação NADPH-oxidase, já descrito. A neutrofilia, embora seja uma reação desejável, quando não bem regulada, pode ser uma das causas de inflamações agudas devido ao aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) e prostaglandinas, levando à indução e à intensificação de processo inflamatório adicional, aumentando a produção de ERO que são ativadores de fator transcrição NF-kB (Mastaloudis et al., 2004).

Entretanto, mesmo que o exercício intenso induza a uma alteração significativa na produção de ERO, estudos mostram que o exercício físico

regular de endurance pode tornar mais eficiente o sistema de defesa antioxidante e melhorar a capacidade oxidativa dos sistemas orgânicos, estabelecendo um equilíbrio entre os danos induzidos pelas ERO e os sistemas de reparos antioxidantes (Alessio & Goldfarb, 1988; Radák et al., 1999; Carmeli et al., 2000).

Vários mecanismos de sinalização são ativados para a manutenção do equilíbrio celular entre oxidante/antioxidante em resposta ao exercício físico. Um dos mais importantes envolve fatores de transcrição, como NF- κ B, pois várias enzimas contêm sítios de ligação em seu gene. Assim sendo, a produção de ERO pelo exercício inicia uma cascata de eventos intracelulares que pode ser a abertura para a expressão gênica de enzimas antioxidantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as respostas terapêuticas do exercício físico regular em camundongos expostos cronicamente à fumaça do cigarro.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do exercício físico regular nas alterações fisiopatológicas de camundongos expostos a fumaça do cigarro.
- Avaliar os efeitos do exercício físico regular no recrutamento de células inflamatórias no pulmão de camundongos expostos a fumaça do cigarro.
- Avaliar os efeitos do exercício físico regular no dano oxidativo pulmonar de camundongos expostos a fumaça do cigarro.
- Avaliar os efeitos do exercício físico regular em duas enzimas antioxidantes SOD e CAT pulmonar em camundongos expostos a fumaça do cigarro.

PARTE II

CAPÍTULO I

The effects of physical exercise on cigarette smoke-induced pulmonary
oxidative response

Artigo submetido ao European Respiratory Journal

The effects of physical exercise on cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response

Bruno T. Menegali, MSc^a; Renata T. Nesi, BSc^b; Priscila Soares, BSc^a; Luciano A. Silva, MSc^a; Paulo C. L. Silveira, MSc^a; Samuel Valença, PhD^b; Ricardo A. Pinho, PhD^a

^aLaboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/PPGCS/UNESC

^bLaboratório de Morfologia/UERJ

Address:

Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/UNESC

Av. Universitária, 1105 – Bairro Universitário

88806-000 - Criciúma – SC/Brasil

e-mail: pinho@unesc.net

Abstract

Studies have showed that cigarette oxidative power is related with pathogenesis of several pulmonary diseases and the regular physical exercise contributes significantly to reduction of cigarette deleterious effect. The objective of present study is investigating the therapeutics effects of physical exercise on histological and oxidative stress markers in animals exposed to cigarette smoke. For this, Thirty six male C57BL-6 mice between 8 and 10 weeks old were separated in four groups (n=9): control, exercise, cigarette, and cigarette plus exercise. The groups CS named were exposed to cigarette smoke 3 times/day (4 cigarettes/session) for 60 consecutive days. The groups Ex named were submitted to swimming physical training 5 days/week for 8 weeks. Twenty four hours after last exercise and cigarette exposition session the animals were sacrificed for cervical traction. The right lung was removed, processed, and filed to analysis future. Were accomplish histological, morphological, collagen content (hydroxyproline), oxidant production (anion superoxide), antioxidants enzymes (SOD and CAT), and lipid and protein oxidative injury (TBARS and Carbonyl). The results showed the animals exposed to cigarette smoke showed an enlargement and destruction of alveolar septum and increase in macrophages, neutrophils and collagen content. Our results also showed a decrease in density of elastic fibers volume and increase in density of airspaces volume. However, the physical exercise improved partially these markers. Additionally the physical exercise decreased the oxidants production and increased the enzymatic antioxidant defense system, but not reverted lipid and protein oxidative damage induced by cigarette smoke. The results suggest that physical training improve partially the histological and oxidative stress parameters in lung of animals cigarette smoke exposed chronically and others therapy can to contribute to potentiate this effects.

Key-Words: Cigarette smoke, inflammation, oxidative stress, physical exercise

Introduction

Cigarette smoke (CS) has been implicated in various degenerative pulmonary and cardiovascular diseases like bronchitis, emphysema, myocardial infarction as well as lung cancer and other malignancies [1]. In the West, the disease is almost always caused by CS, which induces chronic airway inflammation associated with irreversible airflow limitation and progressive decline in lung function [2]. Many health debilitating effects of CS have been associated with Reactive Oxygen Species (ROS) and Nitrogen (RNS) [3].

ROS, and carbon-centered radicals are constituents in both the tar and gas phases of smoke and more can be readily produced by the reactive compounds present in smoke, which includes reactive aldehydes, quinones and benzo(a)pyrene. These agents induce an oxidative burden by disturbing the oxidant/antioxidant balance and can lead to cellular damage in the lungs [4]. This process is known as oxidative stress, but may be reversed by an efficient defence system with the activation of antioxidant enzymes, endogenous antioxidants or by the action of antioxidant supplementation [5]. In addition, the regular physical exercise can be a mechanism also important for to improvement of the defence system against excessive ROS production in pulmonary disease [6].

CS contains a variety of oxidants that can directly and indirectly cause alternations in the structure and function of different biological macromolecules. Direct delivery of oxidants and the subsequent platelets and polymorphonuclear cells activation triggers oxidative stress, which is a crucial step in the pathogenesis of smoking induced tissue injury [1,7,8].

A number of studies have shown that the parameters of oxidative stress on pulmonary function are altered following inhalation of cigarette smoke [9,10,11,12,13] and other studies show several mechanisms are preventive or therapeutic in reducing the harmful effects of cigarettes [14,15,16,17]. However, the effect of therapeutic exercise on protection against cigarette smoke-induced pulmonary oxidative stress and morphological alterations is only partially known.

Thus, in the present study we hypothesis that the physical training can decrease the effects of cigarette smoke in histological and oxidative stress parameters in the lungs of mice after cigarette smoke exposure.

Material and Methods

Sample: thirty six male C57BL-6 mice, weighing 30-35g, 2 months old, were used and cared for according to the European Communities Council Directive of November 24th of 1986. Food (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and water were available ad libitum. The room was kept at 70% humidity/20±2°C on a 12 h light/dark cycle with lights on for 06.00 h. The mice were periodically checked to verify their pathogen-free condition. For histological study the animals were randomly divided into tree groups (n=3): exercise, cigarette smoke and cigarette smoke plus exercise, and for biochemistry assays into four groups (n= 9): untrained, cigarette smoke, exercise, and cigarette smoke plus exercise. The group of the untrained mice was considered the control group.

Cigarette smoke exposure: The animals were exposed to 6 commercial filtered cigarettes (tar 8 mg and nicotine 0.6 mg) per day, 7 days/week for 60

days according Valença et al. [17]. Briefly, animals were placed in the inhalation chamber (40cm long, 30cm wide, and 25cm high), inside an exhaustion chapel. A cigarette was coupled to a plastic 60-mL syringe so that puffs could be drawn in and subsequently expelled into the exposure chamber. One liter of smoke from one cigarette was aspirated with this syringe (20 puffs of 50 mL), and the puff was immediately injected into the chamber. The animals were maintained in this smoke-air condition (73%) for 6 min. Then the cover was removed from the inhalation chamber, and by turning on the exhaust fan of the chapel, the smoke was evacuated within 1 min. The mice were then immediately exposed to CS from a second cigarette for 6 min, and such two-cigarette treatments were performed three times per day (morning, noon, and afternoon) resulting in 36 min of cigarette-smoke exposure from six cigarettes.

Exercise protocol and sacrifice: Twenty four hours after the last smoke cigarette exposure, all groups were habituated on swimming pool 10 min/day during one week to reduce their stress caused by the new environment. Water temperature was set at 32°C. The exercise groups performed a swimming program 5 days/week during 8 weeks. Swimming duration was 2x30 min with a 5 min interval. The untrained animals were put in the swimming pool without water during the same 8 weeks as the exercise-trained groups. Twenty four hours after the last training session the mice were killed by cervical dislocation. The right lungs were immediately removed, processed, aliquoted and stored and frozen at -80°C until analysis. The lungs were weighed and processed separately for biochemical assay and histological as indicated below.

Physical exercise intensity: Blood Lactate (BL) level was defined after the last session of exercise from 50 μL of tail capillary blood, using a commercial kit according to the manufacturer's instructions (Roche, Germany). The blood was only collected from the control and exercise groups. The untrained animals (control group) made adaptation and swam only the last session of exercise to achieve a BL level. The blood sample was put onto a glass fiber fleece where the erythrocytes were retained. BL was determined by reflectance photometry at a wave length of 657 nm via a colorimetric lactate-oxidase mediator reaction.

Histological assessment: For histological studies the right ventricle was perfused with sterile saline (0.9%) to remove blood from the lung. The right lung was fixated by a gentle infusion of 4% phosphate buffered formalin (pH 7.2) at 25 cm H_2O pressure for 2 min through tracheal catheter and then removed, and weighed. Inflated lungs were fixed during 48h before embedding in paraffin. Serial sagittal 5- μm sections were obtained for histological and morphometrical analyses.

Macrophages and neutrophils were quantified in the alveoli. Thirty fields of 26.000 μm^2 (10 random fields of 3 different sections) of the right lung, from each group were analyzed. The number of macrophages and neutrophils (cells/ mm^2) were counted with the 40x objective microscopic field image of an Olympus BH-2 equipped with an eyepiece.

Pulmonary emphysema was quantified based on the degree of alveolar destruction, as determined by measuring the mean linear intercept (L_m , mean alveolar diameter) in micrometers. To that end, 16 fields of each slide were

counted and observed at a magnification of 200x through a reticulum attached to the monitor.

To obtain uniform and proportionate lung samples, 10 fields (six non overlapping fields in three different sections) were randomly analyzed using a video microscope (Zeiss-Axioplan – 20 objective lens and JVC color video camera linked to a Sony Trinitron color video monitor; Carl Zeiss, Germany), and a cycloid test-system superimposed on the monitor screen. The reference in volume was estimated by point counting using the points system test (PT). The points hitting the airspaces (PP) were counted to estimate the volume density (Vv) of these structures ($Vv = PP/PT$). A total area of 1.3 mm² was analyzed to determine the volume density of alveoli (Vv[air]) and elastic fibers (Vv[elastic fibers]) in sections stained with haematoxylin and eosin (H/E) and, Orcein. Two investigators that performed all the measurements counted the non-identified sections.

Biochemical Assays

Hydroxyproline assay: The hydroxyproline contents in lung samples were determined by a colorimetric method as previously described by Woessner [18]. Initially, the sample was homogenized in buffer specific and 250mL of homogenate were incubated with 500 mL of 0.05M chloramine-T for 20 min at room temperature in test tubes. The mixture was then incubated with 500 mL of 3.17M perchloric acid for 5 min at room temperature. Finally, the mixture was incubated with 500 mL of 20% dimethylbenzaldehyde for 20 min at 60 °C. The color developed by reaction was read spectrophotometrically at 557 nm and the results were expressed as µg hydroxyproline per gram of tissue.

Anion Superoxide assay: Anion superoxide was measured by the method proposed by Poderoso et al [19] and were expressed in nmol/min/mg protein. These were determined in submitochondrial pulmonary particles through the rate of oxidation of the adrenaline read from the absorbance at 780 nm.

Superoxide Dismutase (SOD) and Catalase (Cat) activities assay: SOD activity of lung was determined according to the method proposed by Bannister and Calabrese [20]. The enzymatic activity estimation occurs by adrenaline auto-oxidation inhibition read at 480 nm in a spectrophotometer. To determine CAT activity, the lung was sonicated in a 50mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 3000g for 10 minutes. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide absorbance at 240 nm [21]. Enzymes activities were expressed as U/mg protein.

Lipid peroxidation and protein carbonilation assay: The 2-thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) levels were measured by Draper and Hadley's method [22]. Briefly, lung tissue was mixed with 1 ml 10% trichloroacetic acid and 1 ml of 0.67% thiobarbituric acid, subsequently; they were heated in boiling water bath for 15 min. The TBARS were determined by measuring absorbance at 532 nm and the results were given in nmol TBARS/mg protein. The protein carbonilation was determined according to Levine et al. [23]. The protein carbonyl content was measured by first forming labeled protein hydrazone derivatives using 2,4-dinitrophenylhydrazide (DNPH). These derivates were sequentially extracted with 10% (vol/vol) trichloroacetic acid followed by treatment with ethanol/ethylacetate, 1:1 (vol/vol) and reextraction with 10%

trichloroacetic acid. The resulting precipitate was dissolved in 6 M urea hydrochloride. The difference spectrum between a 2,4-dinitrophenylhydrazideprotein blank was used to calculate nmol of 2,4-dinitrophenylhydrazide incorporated per mg of protein. Results are reported for each sample read at 370 nm in a spectrophotometer.

Protein content: Protein concentration was estimated by the method of Lowry et al. [24], using bovine serum albumin as standard.

Statistical analyses: Mean \pm SEM were calculated, and multiple comparisons were performed by using one-way ANOVA with Tukey post hoc tests. A P value <0.01 and <0.05 was considered significant. The software used for data analysis was Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) version 16.0 for Microsoft Windows.

Reagents and animals: Thiobarbituric acid, adrenaline, trichloroacetic acid, dinitrophenylhydrazide, and phenazine methosulphate, were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA). Chloramine-T, p-dimethylbenzaldehyde, and hydroxyproline were purchased from Merck (Damstadt, Germany). C57BL/6 male mice were purchased from Biotery – Universidade do Extremo Sul Catarinense (Criciúma, Santa Catarina, Brazil).

Results

Effects of physical exercise: Our results showed baseline levels of BL of 1.7 \pm 0.3 mmol/L blood and of 4.7 \pm 0.7 mmol/l in the untrained control group and 2.6 \pm 0.5 mmol/l in trained group in the final stage of the last day of exercise.

Histological effect of cigarette (CS) smoke exposure and or physical exercise on lung: The lung histology of mice exposed to ambient air and exercised exhibited thin alveolar septa and normal alveoli whereas mice exposed to CS show alveolar septa destruction, enlargement of alveoli, and presence of alveolar macrophages. However, the cigarette smoke plus exercise group showed similar results to the exercise group (Figure 1).

According to figure 2, the number of macrophages and neutrophils in the smoke cigarette group (cell/mm²) was increased when compared to the exercise group ($p < 0.001$) and these values were reduced after treatment with exercise ($p < 0.01$). But this number of neutrophils in cigarette smoke plus exercise was still high when compared to the exercise group ($p < 0.05$).

We performed lung morphometry analysis to quantify histology changes through mean linear intercept (Lm - μm). The Lm increased ($p < 0.001$) in cigarette smoke group in relation to exercise group and the treatment with exercise reduced these values ($p < 0.01$). The volume density of alveolar air spaces (Vv[alveoli]) of mice cigarette smoke exposure was increased in relation to the exercise group ($p < 0.01$) and in relation to cigarette smoke plus exercise these results were not statistically different. The volume density of alveolar elastic fibers Vv[elastic fibers] of cigarette smoke group was decreased ($p < 0.01$) when compared with the exercise group and these values increased when the animals were exposed to cigarette smoke plus exercise. (Figure 3).

Effect of cigarette smoke (CS) exposure and or physical exercise on lung

Hidroxyproline content: The comparison of hydroxyproline contents among the four groups was shown in Figure 4. Cigarette smoke exposure produced a

significant increase in the hydroxyproline levels when compared to the control group ($p < 0.05$) and the physical training did not alter the values.

Effect of cigarette smoke (CS) exposure and or physical exercise on lung superoxide production: According Figure 5 the cigarette smoke exposure produced a significant increase in the superoxide production as compared to the control group ($p < 0.05$) and the physical training reduced these values significantly ($p < 0.05$).

Effect of CS exposure and or physical exercise on lung antioxidant enzymes (SOD and CAT): As shown in Figure 6, the SOD activity was higher in the lung homogenates ($p < 0.05$) in the CS group when compared to the control group, whereas the exercise group and exercise plus CS group increased the SOD production in relation to control and when compared with the CS group ($p < 0.05$). The CAT activity also was increased significantly in the both trained groups ($p < 0.05$).

Effect of CS exposure and or physical exercise on oxidative damage markers: According Figure 7 CS group show an elevated TBARS level and when compared to the control group ($p < 0.05$) and these values did not reduce with physical training ($p < 0.05$). The protein oxidation did not show significant alterations ($p < 0.05$) in any of the groups.

Discussion

Several studies show evidences of the presence of increased oxidative stress in respiratory disease [1,2,9,25] and others studies have shown exercise as part of the treatment of these diseases [15,16,17]. Further, no investigation

has verified the therapeutic effects of physical training after cigarette smoke exposure.

The effects of physical training are associated among other factors, with the intensity of exercise. Anaerobic threshold is a term that refers to the oxygen consumption during high-intensity exercise above which the rate of lactate production exceeds the rate of lactate removal, thus causing increased blood lactate levels in tissues [26]. After exercise session when the blood lactate content is reduced, it suggests an improvement in the oxidative metabolism of the muscular and in the level of physical conditioning. The data indicated a significantly higher blood lactate content ($p < 0.05$) in untrained animals than in the exercise group, an evidence of exercise-induced muscle adaptation.

Because of our interest in the pathophysiological mechanisms leading to emphysema, the interference in the time course of lung injury in exercised mice were analyzed using histology and morphometrical tools. Initially, the alveolar septa destruction, enlargement of alveoli and presence of alveolar macrophages and neutrophils, and still collagen content were the most frequently observed alterations after cigarette smoke exposure. However, the physical training seems to have reduced some of these effects. The smoke of cigarettes is a potent inflammatory agents that activates inflammatory proteins such as cytokines, growth factors, and adhesion molecules, which causes changes in lung function and structure [27]. The positive effect of physical exercise on histological alterations and inflammatory responses may be associated with the mechanisms involved in the inflammatory protein liberation. According to Wolach et al. [28] the response of physical exercise on

polymorphonuclear cell migration is possibly associated with the inhibitory response of membrane receptors, and also with a defect in the polarization of neutrophil, induced by exercise. In addition, the increase in the antioxidant defense system induced by physical exercise, observed also in several studies [6,29], may be associated with the observed alterations, because some studies have shown that ROS are principal mediators of these process [9, 25,30]. The increase in SOD activity observed in the cigarette plus exercise group may directly attenuate lung injury by reducing superoxide concentrations in the extracellular space and this reduction may decrease stimulation of fibroblasts, and diminish inflammatory cell recruitment [31].

The increase in Vv[alveoli] concomitant with Lm in the cigarette smoke group was reduced in the cigarette smoke exercised group. These morphometrical data are consistent with the photomicrographs presented in the results section. In addition, cigarette smoke group presented more inflammatory cells and lower Vv[elastic fibers] the than cigarette smoke exercised group. We suggest a possible role of exercise in lung extracellular matrix and remodeling during cigarette smoke exposure. Activation and proliferation of fibroblasts may be responsible for lung extracellular remodeling and repair [32,33,34], but others factors as increased in antioxidant enzymes production [17] and reduction in free radicals [35] should not be discarded.

The mechanism involved in the development of pulmonary damage after cigarette smoke exposure and the therapeutic effects of physical exercise is not well defined. It has been hypothesized that activated inflammatory cells which accumulate in the lower airways release a harmful amount of ROS that results

in parenchymal injury. As observed, cigarette smoke-induced pulmonary alterations appear to be the consequence of a primary inflammatory lesion characterized by an accumulation of alveolar macrophages and neutrophils in the lower respiratory tract. It is possible that ROS plays an important role in these processes. According with Rahman et al. [11], the oxidative stress is involved in the progression of lung tissue injury induced by smoke cigarette, and altering the role of airway/airspace epithelium in the progression of pulmonary disease. Therefore, to reduce lung injury provoked by cigarette smoke, it seems to be important to reduce the oxidative stress. Therefore, the use of physical exercise seems to be important in the therapy against pulmonary damages caused by cigarette smoke because of the antioxidant system developed by this method [36] and consequent reduction of pulmonary oxidative stress [6].

Besides the effects of physical exercise on the antioxidant defense system, discussed later, according Stevenson & Koch [4], physical training response in the production of superoxide can be associated with improvement in mitochondrial oxidative function. Miró et al. [37], suggested that cigarette smoke decreases the complexes activities of the mitochondrial respiratory chain producing of additional ROS. However, according to Fusco et al. [38], the aerobic physical training improved the electron flux in the respiratory chain and this may decrease the leakage of electrons into the free radicals formation. Therefore, this improvement in the mitochondrial function suggests a minor cellular susceptibility to consequent damage mediate by cigarette smoke [4].

The ROS production after cigarette smoke exposure can activate some reactive molecules such as hypochlorous acid, *4-Hydroxynonenal*, and

hydroxyl. The presence of these molecules increased the damage by oxidants after cigarette exposure, generating additional ROS [39]. Another factor is, animals after exposure to cigarette smoke show larger susceptibility to oxidative damage due to the slow antioxidant presence [40]. Therefore, changes in these markers of oxidative damage are most frequent evidence observed in lung tissue after cigarette smoke exposure [1,40,41] and in the response to physical training [6,42].

SOD and CAT activities were increased after physical training, but that increase was not enough to decrease the oxidative damages induced by the cigarette smoke. The increase in activity of both enzymes after physical training is in accordance with others studies, which suggests that the physical training increased the expression and activity of lung antioxidants enzymes [6,44]. However, since there was no reduction in the oxidative damage after physical training, this suggests that others therapies such as the use of antioxidants can contribute to reduction of the oxidative effects induced by cigarette smoke.

In summary, the results suggest that physical training improves the histological markers, and partially the oxidative stress parameters possibly by a decrease in free radicals production and concomitant increased in the antioxidants enzymes activities, after lung injury induced by cigarette. However, the lack of reduction of the oxidative damage suggests that the use of antioxidant therapy can enhance the positive effects of physical exercise in the lungs after cigarette smoke exposure.

Acknowledgments

This research was supported by CNPq/MCT (Brazil), CAPES/MEC (Brazil) and UNESCO (Brazil).

References

1. Panda K, Chattopadhyay R, Chattopadhyay D, Chatterjee IB. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C. *Toxic Lett* 2001; 123: 21–32.
2. Vassallo R, Kroening Pr, Parambil J, Kita H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. *Mol Immun* 2008; 45: 3321–3329.
3. Kroening, P. R; Barnes, T. W; Pease, L; Limper, A; Kita, H; Vassallo, R. Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress Suppresses Generation of Dendritic Cell IL-12 and IL-23 through ERK-Dependent Pathways. *The J of Immun* 2008; 181: 1536–1547.
4. Stevenson CS, Docx C, Webster R, Battram C, Hynx D, Giddings J, Cooper PR, Chakravarty P, Rahman I, Marwick JA, Kirkham PA, Charman C, Richardson DL, Nirmala NR, Whittaker P, Butler K. Comprehensive gene expression profiling of rat lung reveals distinct acute and chronic responses to cigarette smoke inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: 1183-1193.
5. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Rad in Biol and Med*. Oxford: University Press. 2007.
6. Pinho RA, Chiesa D, Mezzomo KM, Andrades ME, Bonatto F, Gelain D, Dal Pizzol F, Knorst MM, Moreira JC. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respir Med* 2007; 101: 1830-1835.
7. Lavigne MC, Eppihimer MJ. Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. *Biochem and Bioph Res Com* 2005; 330: 194–203.
8. Gochman E, Reznick AZ, Avizohar O, Ben-Amotz A, Levy Y. Exhaustive Exercise Modifies Oxidative Stress in Smoking Subjects. *Am J Med Sci* 2007; 333: 346–353.
9. Rahman I, Macnee W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Rad Biol & Med* 1996; 21: 669-681.
10. Moodie FM, Marwick JA, Anderson CS, Szulakowski P, Biswas SK, Bauter MR, Kilty I, Rahman I. Oxidative stress and cigarette smoke alter chromatin remodeling but differentially regulate NF-kappaB activation and proinflammatory cytokine release in alveolar epithelial cells. *FASEB J* 2004; 18: 1897-1899.
11. Rahman, I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28: 219–242.
12. Kode A, Rajendrasozhan S, Caito S, Yang SR, Megson IL, Rahman I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294: 478-88.
13. Valença SS, Porto LC. Immunohistochemical study of lung remodeling in mice exposed to cigarette smoke. *J Bras Pneumol* 2008; 34: 787-95.

14. Sohn HO, Lim HB, Lee YG, Lee DW, Kim YT. Effect of subchronic administration of antioxidants against cigarette smoke exposure in rats. *Arch Toxicol* 1993; 67:667-673.
15. Sadowska AM, Keenoy BM, Backer WA. Antioxidant and anti-inflammatory efficacy of NAC in the treatment of COPD: Discordant in vitro and in vivo dose-effects: A review. *Pulm Pharm & Ther* 2007; 20: 9–22.
16. Kirkham P, Rahman I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. *Pharm & Ther* 2006; 111: 476 – 494.
17. Valenca SS, Bezerra FS, Romana-Souza B, Paiva RO, Costa AM, Porto LC. Supplementation with vitamins C and E improves mice lung repair. *J Nutr Biochem* 2008;19: 604-11.
18. Woessner JF. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid. *Arch Biochem Biophys* 1961; 93: 440-447.
19. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero CI. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328: 85-92.
20. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Meth Biochem Anal* 1987; 32: 279-312.
21. Aebi U, Fowler WE, Buhle EL Jr, Smith PR. Electron microscopy and image processing applied to the study of protein structure and protein-protein interactions. *J Ultrastruct Res* 1984;88: 143-176.
22. Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xen* 1990; 20: 901-907.
23. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186: 464-478.
24. Lowry OH, Rosebough NG, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
25. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Resp J* 2003; 22: 672-688.
26. Voltarelli FA, Gobatto CA, de Mello MA. Determination of anaerobic threshold in rats using the lactate minimum test. *Braz J Med Biol Res.* 2002; 11:1389-1394.
27. Foronjy R, D'armiento J. The effect of cigarette smoke-derived oxidants on the inflammatory response of the lung. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2006; 6: 53–72.
28. Wolach B, Gavrieli R, Ben-Dror SG, Zigel L, Eliakim A, Falk B. Transient Decrease Of Neutrophil Chemotaxis Following Aerobic Exercise. *Med & Sci In Sport & Exerc* 2005; 37: 949-954.
29. Pinho RA, Silveira PC, Piazza M, Tuon T, Silva G, Dal-Pizzol F, Moreira J. Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. *Rev Bras Med Esporte* 2006; 12.
30. D'hulst AI, Vermaelen KY, Brusselle GG, Joos GF, Pauwels RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. *Eur Respir J* 2005; 26: 204–213.
31. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 15: 38-43.
32. Togo S, Holz O, Liu X, Sugiura H, Kamio K, Wang X, Kawasaki S, Ahn Y, Fredriksson K, Skold CM, Mueller KC, Branscheid D, Welker L, Watz H, Magnussen H, Rennard SI. Lung fibroblast repair functions in patients with

- chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178: 2482-60.
33. Torday JS, Torres E, Rehan VK. The role of fibroblast transdifferentiation in lung epithelial cell proliferation, differentiation, and repair in vitro. *Pediatr Pathol Mol Med* 2003;22: 189-200.
 34. Warburton D, Tefft D, Mailleux A, Bellusci S, Thiery JP, Zhao J, Buckley S, Shi W, Driscoll B. Do lung remodeling, repair, and regeneration recapitulate respiratory ontogeny? *Am J Respir Crit Care Med* 2001;15:59-62.
 35. Nakashima JM, Hyde DM, Giri SN. Epithelial injury, inflammation, and repair in the hamster lung following intratracheal instillation of enzyme-generated oxidants. *Exp Lung Res* 1991; 17: 569-587
 36. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Ji LL, Viña J. Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. *Sci & Sports* 2006; 21: 85–89
 37. Miró O, Jiménez S, González J, De Caralt TM, Ordi J. Highly effective compensatory mechanisms in a 76-year-old man with a coarctation of the aorta. *Cardiol* 1999; 92: 284-286.
 38. Fusco S, Borzacchiello A, Miccio L, Pesce G, Rusciano G, Sasso A, Netti PA. High frequency viscoelastic behaviour of low molecular weight hyaluronic acid water solutions. *Biol* 2007; 44: 403-18.
 39. Luchese C, Brandão R, de Oliveira R, Nogueira CW, Santos FW. Efficacy of diphenyl diselenide against cerebral and pulmonary damage induced by cadmium in mice. *Toxicol Lett* 2007; 173:181-190.
 40. Repine JE, Bast B, Lankhorst I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Car Med* 199; 71: 341–357.
 41. Halliwell B, Poulsen HE. *Cigarette Smoke and Oxidative Stress*. Springer, 2006.
 42. Navarro A, Gomez C, López-Cepero JM, Boveris A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. *Am J Physiol Reg Integ Comp Physi* 2004; 286: 505–511.
 43. Hatao H, Oh-ishi S, Itoh M, Leeuwenburgh C, Ohno H, Ookawara T, Kishi K, Yagyu H, Nakamura H, Matsuoka T. Effects of acute exercise on lung antioxidant enzymes in young and old rats. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 384-390.

FIGURES AND LEGENDS

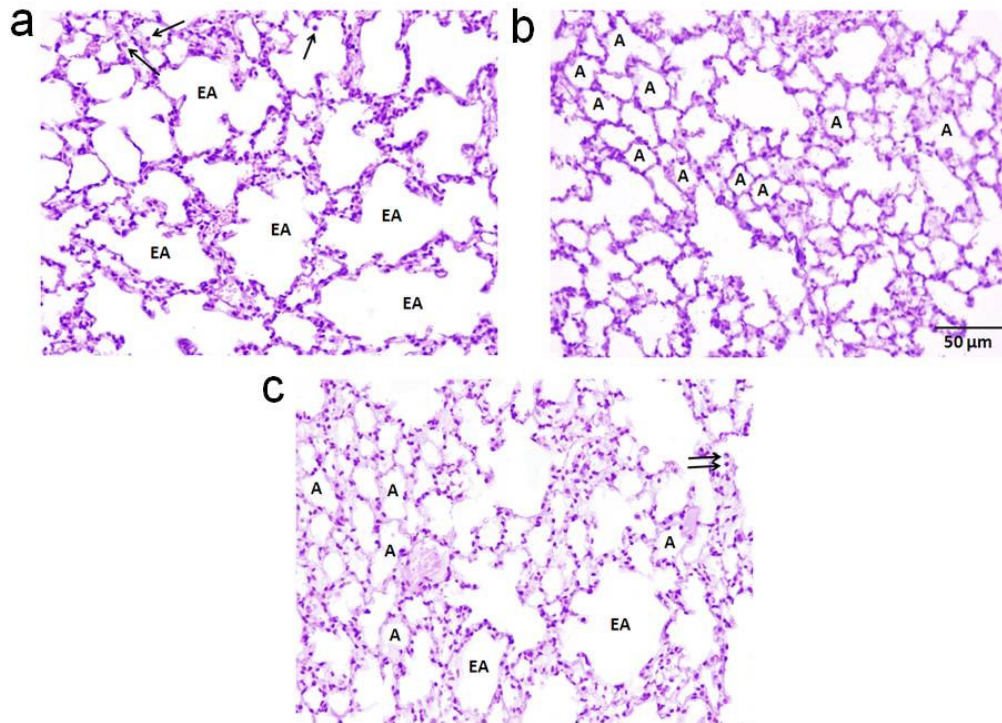


Figure 1 – Photomicrograph of mice lung exposed cigarette smoke (**a**), mice lung submitted to regular exercise and exposed to environment air (**b**) and mice lung exposed to cigarette smoke and after regular exercise (**c**). **EA** – airspace increased as result of alveolus confluence in emphysema process. **ARROW** – alveolar macrophages. **A** – Alveolus and intact alveolar septum. Zoom of 400x, H&E

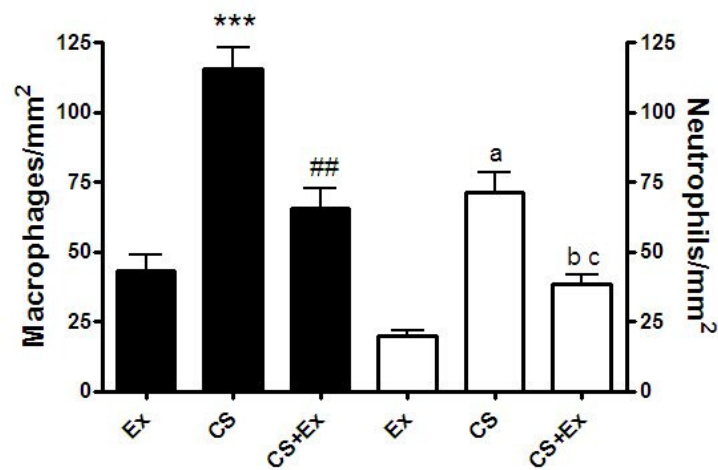


Figure 2 – Macrophages/neutrophils = cell morphometric/mm². The group CS showed a increase in macrophages number in relationship to group EX ([***) p<0.001). The group CS+EX showed a decrease in macrophages number in relationship CS ([##] p<0.01) and was not

different to group EX. The group CS showed a increase in neutrophils number in relationship to group EX ([a] $p < 0.001$). The group CS+EX showed a decrease in neutrophils number in relationship to group CS ([b] $p < 0.01$) and increased compared to group EX ([c] $p < 0.05$).

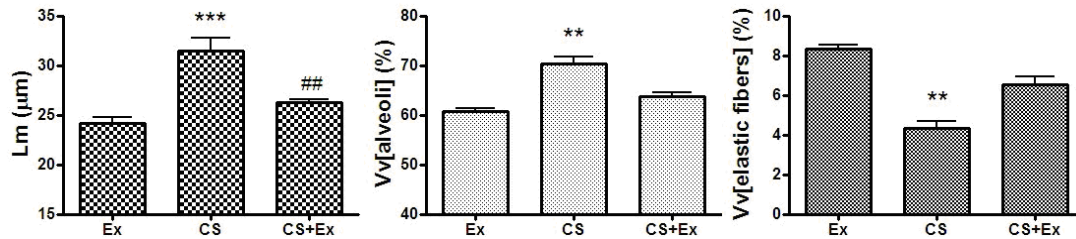


Figure 3 – Lm – Mean alveolar diameter. The CS group showed increase in the Lm in relationship to Ex group ([***] $p < 0.001$). The Lm in CS+Ex group showed a decrease in relationship to CS group ([##] $P < 0.01$) and was not different to Ex group.

Vva – Density of airspace volume. The CS group showed an increase in the density of airspace volume in relationship to Ex group ([**] $p < 0.01$). The density of airspace volume in CS+Ex group was not different to Ex group.

Vve – Density of elastics fibers volume. The CS group showed a decrease in the density of elastics fibers volume in relationship to Ex group ([**] $p < 0.01$). The density of elastics fibers volume in CS+Ex group was not different to Ex group.

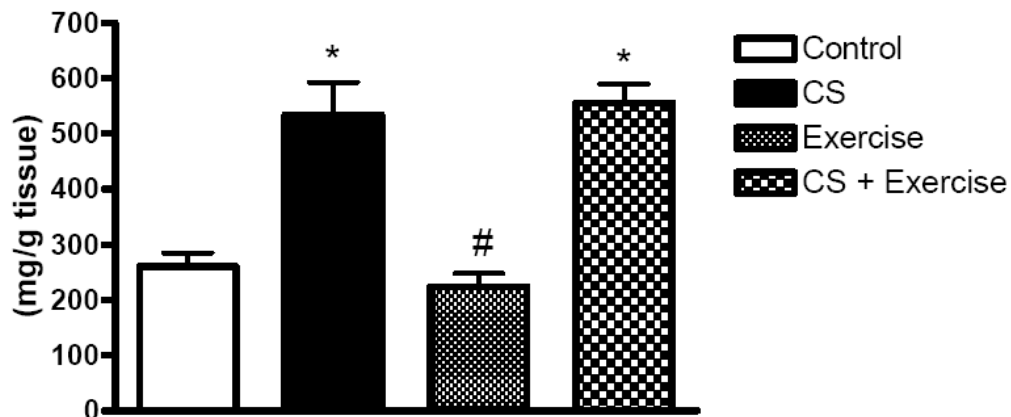


Figure 4: Effects of regular exercise in hidroxyproline after mice were exposed cigarette smoke. Values are expressed as mean \pm SEM and the results expressed in Hidroxyproline/mg of tissue. The significant difference used in relation to respect control group (*) and in relation to cigarette group (#) was from $p < 0.05$.

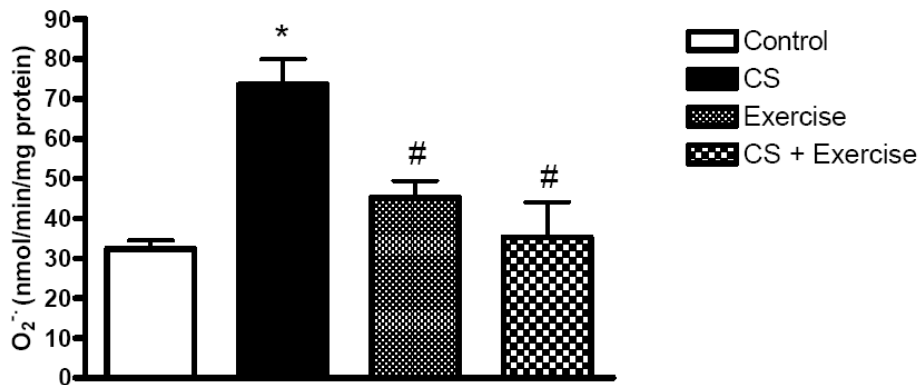


Figure 5: Effects of regular exercise in anion superoxide production after mice were exposed cigarette smoke. Values are expressed as mean \pm SEM and the results expressed in nmol/min/mg of protein. The significant difference used in relation to respect control group (*) and in relation to cigarette group (#) was from $p < 0.05$.

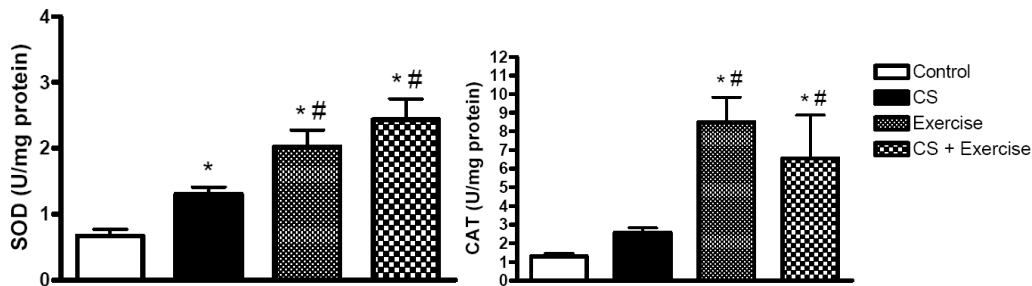


Figure 6: Effects of regular exercise in superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) activities after mice were exposed cigarette smoke. Values are expressed as mean \pm SEM and the results expressed in U SOD/mg of protein. The significant difference used in relation to respect control group (*) and in relation to cigarette group (#) was from $p < 0.05$.

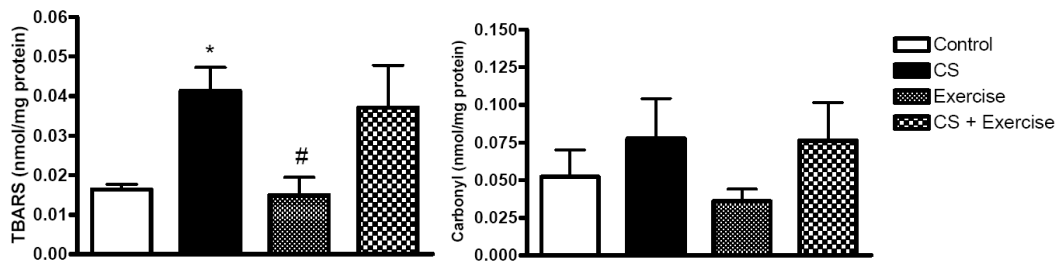


Figure 7: Effects of regular exercise in lipid peroxidation and protein carbonilation after mice were exposed cigarette smoke. Values are expressed as mean \pm SEM and the results expressed in nmol TBARS/mg of protein. The significant difference used in relation to respect control group (*) and in relation to cigarette group (#) was from $p < 0.05$.

PARTE III

4 DISCUSSÃO

A fumaça do cigarro é uma complexa mistura de substâncias tóxicas capazes de danificar a estrutura e a função pulmonar (Valença et al., 2008). Contudo, as intervenções terapêuticas de rotina, especialmente as ações farmacológicas, têm contribuído significativamente para a diminuição da gravidade do problema, mas apresentam limitações. Acredita-se que o exercício físico regular, além de melhorar a capacidade cardiorrespiratória (Mereles et al., 2006) exerça ainda um efeito positivo sobre a resposta bioquímica pulmonar.

Os resultados histológicos pulmonares encontrados nesse estudo mostram uma redução na densidade de fibras elásticas e um aumento na densidade de volume dos espaços aéreos, além de um diâmetro alveolar médio maior no grupo exposto à fumaça do cigarro comparado ao grupo submetido ao exercício regular. No grupo exposto à fumaça do cigarro e exercício físico regular houve uma diminuição significativa no diâmetro alveolar médio comparado ao grupo exposto somente a fumaça do cigarro. Adicionalmente, os animais expostos a fumaça do cigarro tiveram alargamento dos espaços aéreos e o recrutamento de macrófagos alveolares. A fumaça do cigarro é um potente fomentador inflamatório que induz proteínas inflamatórias incluindo citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão que ativam potentes mediadores, os quais causam mudanças na estrutura pulmonar (Foronjy & D'armiento, 2006).

O recrutamento prolongado de proteínas inflamatórias, incluindo citocinas, acarreta em uma inflamação crônica (Vassalo et al., 2008) com a

invasão e retenção de células inflamatórias como macrófagos e neutrófilos (Barnes, 2004; Vassalo et al., 2008). Nossos resultados mostraram aumento de macrófagos e neutrófilos no grupo exposto à fumaça de cigarro e uma redução significativa quando submetido ao exercício físico.

Boots et al. (2003) sugerem que componentes oxidantes na fumaça do cigarro estimulam macrófagos que liberam mediadores inflamatórios, os quais atraem neutrófilos, tal como IL-8 e GM-CSF (granulocyte-machophage colony stimulating factor). Outra via para a ativação de neutrófilos é o estresse oxidativo gerado pelo cigarro que pode refletir na ativação de NF- κ B e induzir inflamação neutrofílica via aumento de expressão de IL-8 (Barnes et al., 2003; Barnes, 2004). Adicionalmente, segundo Sasaki et al. (2000) IL-1 β regula MMPs e proliferação de fibroblastos, características que são associadas à inflamação crônica e as mudanças estruturais no pulmão. Resultados encontrados por Castro et al. (2004) demonstraram que a inativação de IL-1 β resultou em redução da infiltração de macrófagos em camundongos expostos a fumaça do cigarro sugerindo que a inibição desta substância pode ter benefícios terapêuticos em doenças pulmonares crônicas.

Um dos fatores que possam justificar os efeitos positivos do exercício sobre a migração de macrófagos e neutrófilos podem estar associados aos mecanismos envolvidos na liberação de proteínas inflamatórias. Wolach et al. (2005) sugerem que a resposta do exercício físico sobre a migração de células polimorfonucleares está possivelmente associada com resposta inibitória de receptores de membrana e também a um defeito na polarização dos neutrófilos induzido pelo exercício. Adicionalmente, a melhora do sistema de defesa antioxidante induzida pelo exercício, observado em diversos estudos (Vina et

al., 2000; Pinho et al., 2006, 2007; Gomez-Cabrera et al., 2006), também pode estar associada com a referida redução de neutrófilos e macrófagos, pois estudos têm indicado que ERO são mediadores principais desse processo (Rahman & Macnee, 1996; Barnes et al. 2003; D'hulst et al., 2005).

Muitas proteínas do sistema fibrinolítico têm sido consideradas importantes marcadores na progressão de doenças pulmonares (Valença et al., 2004). A hidroxiprolina é aminoácido utilizado como marcador bioquímico de síntese de colágeno e seus níveis elevados podem sugerir um processo fibrinogênico sobre o parênquima pulmonar.

Nossos resultados mostram que a exposição à fumaça do cigarro elevou significativamente os níveis de hidroxiprolina no tecido pulmonar. Entretanto, quando submetidos ao programa de exercício físico, os animais apresentaram níveis de hidroxiprolina similares. A resposta do cigarro sobre os níveis de hidroxiprolina pode estar associada à presença de ERO. Rahman et al. (1997) mostraram que as alterações morfológicas no parênquima pulmonar estão correlacionadas com a presença de 4-hydroxy-2-nonenal nas células epiteliais das vias aéreas sugerindo que o processo de fibrinogênese seja mediado por radicais livres. Portanto, o dano oxidativo tem papel relevante na patogênese da fibrose, até mesmo no aumento da concentração de oxidantes, resultado primário do tecido. O fato do exercício físico não ter revertido os níveis elevados de hidroxiprolina sugere que outros mecanismos podem estar envolvidos. Dhimi et al. (1999) mostraram que neutrófilo elastase (NE) também causam danos em colágenos e, no presente estudo, mostramos que o exercício físico não diminuiu totalmente o recrutamento de neutrófilos, liberadores de NE, em camundongos expostos ao exercício após a inalação

passiva do cigarro.

Nesse estudo, hipotetizamos que a prática regular e contínua de exercícios físicos aeróbios possa ser um agente capaz de reduzir a produção de oxidantes, melhorar o sistema de defesa antioxidante pulmonar e concomitantemente amenizar os danos em proteínas e lipídios de membrana causados pela exposição ao carvão mineral.

Nossos resultados mostram um aumento significativo na produção de ânion superóxido nos animais expostos à fumaça de cigarro. Porém, quando os animais são expostos ao treinamento físico após a exposição à fumaça de cigarro, os valores de ânion superóxido são significativamente reduzidos, próximos aos níveis de controle.

O aumento na produção de ânion superóxido no tecido pulmonar é possivelmente responsável pelo mecanismo de inativação da alfa α 1-AT, um inibidor de proteases, encontrada na fisiologia do enfisema pulmonar. (Valença et al., 2004).

Além do efeito do exercício físico sobre o sistema de defesa antioxidante, discutido posteriormente, a resposta do treinamento físico sobre a produção de ânion superóxido está associado possivelmente com a melhora da função oxidativa mitocondrial (Stevenson & Koch, 2006). Segundo Miró et al., (1999), a fumaça do cigarro diminui a atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial levando a um desequilíbrio da cadeia respiratória e gerando ERO adicionais. Entretanto, segundo Fusco et al., (2007) o treinamento físico aeróbio melhora o fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Isso pode diminuir o extravasamento de elétrons para formação de radicais livres, reduzindo a produção de ânion superóxido. Portanto, essa melhora na

função mitocondrial sugere uma menor suscetibilidade às conseqüências do dano mediado pela fumaça do cigarro (Stevenson & Koch, 2006).

Em relação às defesas antioxidantes, os resultados mostram uma baixa atividade da SOD e CAT após a exposição crônica a fumaça de cigarro. E, ainda, um aumento significativo na atividade de ambas as enzimas após o treinamento físico. A SOD é a primeira enzima na linha de defesa contra a formação de RL catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e a CAT é uma enzima que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio formando oxigênio e água (Halliwell & Gutteridge, 2007). O aumento na atividade de ambas as enzimas após o treinamento físico é um resultado esperado, e está em conformidade com diversos outros estudos que sugerem que o treinamento físico moderado aumenta a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes no tecido pulmonar (Ji, 2000; Liu et al., 2000, Gomez-Cabrera et al., 2006).

Os danos em lipídios e proteínas, a partir da oxidação, resultam da reação de radicais livres com ácidos graxos poliinsaturados presentes em lipoproteínas de membranas e com aminoácidos através de agregados de proteínas suscetíveis a degradações proteolíticas, os quais são convertidos em derivados de carbonil (Halliwell e Guteridge, et al., 2007). De acordo com Luchese et al. (2007), os radicais livres formados após a exposição de cigarro, podem ativar algumas cascatas de formação de moléculas altamente reativas como o ácido hipocloroso, a 4-hidroxi-nonenal e o radical hidroxil. A presença dessas moléculas aumenta o dano mediado por oxidantes que é iniciado pela exposição à fumaça de cigarro, formando ERO adicionais. Outro fator a se considerar é que os animais expostos a fumaça de cigarro apresentam uma

maior suscetibilidade aos danos oxidativos devido à baixa presença de antioxidantes (Repine et al., 1997). Portanto, mudanças nesses marcadores de danos oxidativos são evidências mais freqüentes observadas no tecido pulmonar, após exposição à fumaça de cigarro (Repine et al., 1997; Uchida et al., 1999; Panda et al., 2001; Halliwell & Poulsen, 2006) e na resposta ao exercício físico (Navarro et al., 2004; Pinho et al., 2007).

Como esperado, os resultados obtidos no presente estudo mostram um aumento significativo nos níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas em animais expostos a fumaça de cigarro. É possível que esse aumento observado esteja diretamente relacionado com a baixa atividade de enzimas antioxidantes e o aumento de oxidantes liberados por células inflamatórias que são recrutadas via substâncias da fumaça do cigarro. Entretanto, surpreendentemente, o exercício físico regular não reduziu os níveis de lipoperoxidação e carbonilação de proteínas pulmonar em animais expostos a fumaça de cigarro. É possível que mesmo com a melhora no sistema de defesa antioxidante induzida pelo exercício físico, como citado anteriormente, esse sistema não seja suficientemente capaz de impedir que os danos oxidativos ocorram. Isso sugere que terapias adicionais com antioxidantes possam contribuir para minimizar os efeitos oxidativos gerados pela fumaça de cigarro.

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que o exercício físico regular exerça um efeito importante sobre a resposta histológica e inflamatória. Da mesma forma, sobre a produção de radicais livres e atividade de enzimas antioxidantes. Porém esses efeitos não são suficientemente capazes de impedir os danos oxidativos gerados pela exposição crônica à fumaça de cigarro.

REFERÊNCIAS

ABBOUD RT, VIMALANATHAN S. Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema. **International Journal Tuberclose Lung Disease** 12: 361–367. 2007.

ALESSIO HM; GOLDFARB AH. Lipid Peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptative response to training. **Journal of Applied Physiology** 64: 1333-1336. 1988.

BARNES PJ. Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Pharmacology Review** 56:515–548. 2004.

BARNES PJ, SHAPIRO SD, PAUWELS RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. **European Respiratory Journal** 22: 672-688. 2003.

BOOTS AW, HAENEN GRMM, BAST A. Oxidant metabolism in chronic obstructive pulmonary disease. **European Respiratory Journal** 22: 14 – 27. 2003.

CARMELI E; LAVIAM G; REZNICK A.Z. The role of antioxidant nutrition in exercise and aging. In: Radák Z, editor. **Free radicals in exercise and aging**. Champaign: Human Kinetics, 73-115. 2000.

CARNEVALI S, PETRUZZELLI S, LONGONI BI. Cigarette smoke extract induces oxidative stress and apoptosis in human lung fibroblasts. **American Journal of Physiology Lung Cell Molecular** 284: 955–963. 2003.

CASTRO P, LEGORA-MACHADO A, CARDILO-REIS L, VALENCA S, PORTO LC, WALKER C, ZUANY-AMORIM C, KOATZ VLC. Inhibition of interleukin-1h reduces mice lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. **European Journal of Pharmacology** 498: 279–286. 2004.

CELLI B, GOLDSTEIN R, JARDIM J, KNOBIL K. Future perspectives in COPD. **Respiratory Medicine** 99: S1–S48. 2005.

DUARTE JL. Efeitos da inalação passiva da fumaça de cigarro sobre as pregas vocais de ratos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologista** 72: 2. 2006.

D'HULST AI, VERMAELEN KY, BRUSSELLE GG, JOOS GF, PAUWELS RA. Time course of cigarette smoke-induced pulmonary inflammation in mice. **European Respiratory Journal** 26: 204–213. 2005.

ELSAIED NM, BENDICH A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. **Nutrition Research** 21: 551-567. 2001.

FALCÃO TJO, COSTA ICC. Smoking in a small city: an ethnographic study to serve as a base for the creation of a public health program. **Brazilian Journal of Lung** 34: 91-97. 2008.

FINAUD J, LAC G, FILAIRE E. Oxidative Stress – Relationship with Exercise and Training. **Sports Medicine** 36: 327-358. 2006.

FORONJY R, D'ARMIENTO J. The effect of cigarette smoke–derived oxidants on the inflammatory response of the lung. **Clinical and Applied Immunology Reviews** 6: 53–72. 2006.

GERRITSEN WBM, ASIN J, ZANEN P, VAN DEN BOSCH JMM, HAAS FJLM. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. **Respiratory Medicine** 99: 84-90. 2005.

GOCHMAN E, REZNICK AZ, AVIZOHAR O, BEM-AMOTZ A, LEVY Y. Exhaustive exercise modifies oxidative stress in smoking subjects. **American Journal Medicine Science** 333: 346-353. 2007.

GOMEZ-CABRERA MC, DOMENECH E, JI LL, VIÑA J. Exercise as an antioxidant: it up-regulates important enzymes for cell adaptations to exercise. **Science & Sports** 21: 85–89. 2006.

GOMEZ-CABRERA MC, DOMENECH E, VIÑA J. Moderate exercise is an antioxidant: Upregulation of antioxidant genes by training. **Free Radical Biology & Medicine** 44: 126-131. 2008.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free Radical in Biology and Medicine**. Oxford: University Press. 2007.

HALLIWELL B, POULSEN HE. Cigarette Smoke and Oxidative Stress. **Springer**. 2006.

JACKSON JH, SCHRAUFSTATTER U, HYSLOP PA, VOSBECK K, SAUERHEBER R, WEITZMAN SA, COCHRANE CG. Role of Oxidants in DNA Damage: Hydroxyl Radical Mediates the Synergistic DNA Damaging Effects of Asbestos and Cigarette Smoke. **Journal of Clinical Investigation** 80: 1090-1095. 1987.

JL LL. Antioxidants and Oxidative Stress in Exercise. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 222: 283-292. 1999.

KIM V, ROGERS TJ, CRINER GJ. New concepts in the pathobiology of chronic obstructive pulmonary disease. **Proceedings American Thoracic Society** 5: 478-485. 2008.

LIU J, YEO HC, VERVIK-DOUKI EO, HAGEN T, DONIGER SJ, CHU DW, BROOKS GA, AMES BN. Chronically and acutely exercised rats: biomarkers of

oxidative stress and endogenous antioxidants. **Journal of Apply Physiology** 89: 21–28. 2000.

LIU X, TOGO S, AL-MUGOTIR M, KIM H, FANG Q, KOBAYASHI T, WANG X, MAO L, BITTERMAN P, RENNARD S. NF-kappaB mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. **Respiratory Research** 9: 66. 2008.

LIU X , CONNER H, KOBAYASHI T, KIM H, WEN F, ABE S, FANG Q, WANG X, HASHIMOTO M, BITTERMAN P, RENNARD SI. Cigarette Smoke Extract Induces DNA Damage but Not Apoptosis in Human Bronchial Epithelial Cells. **American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology** 33: 121–129. 2005.

MASTALOUDIS A, MORROW JD, HOPKINS DW, DEVARAJ S & TRABER MG. Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. **Free Radical Biology and Medicine** 36: 1329-1341. 2004.

MCBRIDE JM, KRAEMER WJ. Free Radicals, Exercise, and Antioxidants. **Journal of Strength and Conditioning Research** 13: 175-183. 1999.

MERCKEN EM, HAGEMAN GJ, SCHOLS AMWJ, AKKERMANS MA, BAST A, WOUTERS EFM. Rehabilitation Decreases Exercise-induced Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 172: 994–1001. 2005.

MERELES D, EHLKEN N, KREUSCHER S, GHOFrani S, HOEPER MM, HALANK M, MEYER FJ, KARGER G, BUSS J, JUENGER J, HOLZAPFEL N, OPITZ C, WINKLER J, HERTH FJF, WILKENS H, KATUS HA, OLSCHESKI H, GRÜNIG E. Exercise and Respiratory Training Improve Exercise Capacity and Quality of Life in Patients With Severe Chronic Pulmonary Hypertension. **Circulation** 114: 1482-1489. 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE E INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Prevalência de tabagismo no Brasil - **Inquérito epidemiológico em capitais brasileiras**. Rio de Janeiro, 2004

MORRISON D, RAHMAN I, LANNAN S, MACNEE W. Epithelial permeability, inflammation and oxidative stress in the airspace of smokers. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 159: 473-479. 1999.

NAVARRO A, GOMEZ C, LÓPEZ-CEPERO JM, BOVERIS A. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **American Journal of Physiology Regular Integral Composition Physiology** 286: 505–511. 2004.

OLIVEIRA AF, VALENTE JG, LEITE IC. Aspects of tobacco attributable mortality: systematic review. **Revista de Saúde Pública**, 2008.

PANDA K, CHATTOPADHYAY R, CHATTOPADHYAY D, CHATTERJEE IB. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C. **Toxicology Letters** 123: 21–32. 2001.

PARK EM, PARK YM, GWAK YS. Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. **Free Radical Biology & Medicine** 25, 79–86. 1998.

PINHO RA, SILVEIRA PC, PIAZZA M, TUON T, SILVA G, DAL-PIZZOL F E MOREIRA J. Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 12: 355-360. 2006.

PINHO RA, CHIESA D, MEZZOMO KM, ANDRADES ME, BONATTO F, GELAIN D, DAL PIZZOL F, KNORST MM, MOREIRA JCF. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. **Respiratory Medicine** 101: 1830–1835. 2007.

RADÁK Z; KANEKO T; TAHARA S; NAKAMOTO H; OHNO H; SASVÁRI M; NYAKAS C; GOTO, S. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and dna in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcome. **Free Radical Biology & Medicine** 27: 69 – 74. 1999.

RAHMAN I, MACNEE W. Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. **Free Radical Biology & Medicine** 21: 669-681. 1996.

RAHMAN I, SKWARSKA E, MACNEE W. Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. **Thorax** 52: 565-568. 1997.

REPINE JE, BAST B, LANKHORST I. Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 156: 341–357. 1997.

ROSEMBERG J. Pandemia do tabagismo - enfoques históricos e atuais. São Paulo: **Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo** 184. 2002.

SACHDEV S, DAVIES KJA. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. **Free Radical Biology & Medicine** 44: 215-223. 2008.

SADOWSKA AM, VAN OVERVELD FJ, GÓRECKA D, ZDRAL A, FILEWSKA M, DEMKOW UA, LUYTEN C, SAENEN E, ZIELINSKI J, BCKER WA. The interrelationship between markers of inflammation and oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease: modulation by inhaled steroids and antioxidant. **Respiratory Medicine** 99: 241-249. 2005.

Soriano JB, Agustí A. The of COPD: or balancing repair (yang) and inflammation (yin). **European Respiratory Journal**. 32: 1426-1427. 2008.

SPADA C, TREITINGER A, SOUZA MA. Prevalência do tabagismo em doadores de sangue da região serrana de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Hematologia** 28: 9-23. 2006

SASAKI M, KASHIMA M, ITO T, WATANABE A, IZUMIYAMA N, SANO M, KAGAYA M, SHIOYA T, MIURA M. Differential regulation of metalloproteinase production, proliferation and chemotaxis of human lung fibroblasts by PDGF, interleukin 1-beta and TNF-alpha. **Mediator Inflammatory** 9: 155– 160. 2000.

STOCKLEY RA. Neutrophils and Protease/Antiprotease Imbalance. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine** 160: 49–52. 1999.

TUDER RM, YOSHIDA T, ARAP W, PASQUALINI R, PETRACHE I. Cellular and molecular mechanisms of alveolar destruction in Emphysema. **Procedure of American Thoracic Society** 3: 503-511. 2006.

VAART HV, POSTMA DS, TIMES W, HACKEN NHT. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. **Thorax** 59: 713-721. 2004.

VALENÇA SS, HORA K, CASTRO P, MORAES VG, CARVALHO L, PORTO LCMS. Emphysema and Metalloelastase Expression in mice lung induced by cigarette smoke. **Toxicology Pathology** 32: 351-356. 2004.

VASSALLO R, KROENING PR, PARAMBIL J, KITA H. Nicotine and oxidative cigarette smoke constituents induce immune-modulatory and pro-inflammatory dendritic cell responses. **Molecular Immunology** 45: 3321–3329. 2008.

VINA J, GOMEZ-CABRERA MC, LLORET A, MARQUEZ R, MINANA JB, PALLARDO FV, SASTRE J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. **IUBMB Life** 50: 271–277. 2000.

WARBURTON DE, NICOL CW, BREDIN SS. Health benefits of physical activity: the evidence. **Canadian Medicine Association Journal** 174: 801–809. 2006.

WOLACH B, GAVRIELI R, BEN-DROR SG, ZIGEL L, ELIAKIM A, FALK B. Transient Decrease Of Neutrophil Chemotaxis Following Aerobic Exercise. **Medicine & Science In Sports & Exercise**, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, REPORT ON THE GLOBAL TOBACCO EPIDEMIC, 2008. <http://www.who.int/tobacco/mpower/en/> - acessado em 01/11/2008.

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](#)