

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ANA LUCIA BERNARDO DE CARVALHO MORSCH

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO SOBRE
O PROCESSO AUTOFÁGICO EM PULMÃO DE
CAMUNDONGOS SWISS**

**CRICIÚMA
DEZEMBRO DE 2016**

ANA LUCIA BERNARDO DE CARVALHO MORSCH

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO SOBRE
O PROCESSO AUTOFÁGICO EM PULMÃO DE
CAMUNDONGOS SWISS**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutora em Ciências da Saúde.
Orientador: Prof. Dr. Cláudio Teodoro
de Souza

CRICIÚMA

DEZEMBRO DE 2016.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M884e Morsch, Ana Lucia Bernardo de Carvalho.
Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre o
processo autofágico em pulmão de camundongos swiss /
Ana Lucia Bernardo de Carvalho Morsch. – 2016.
884 p. : il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul
Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde, Criciúma, SC, 2016.

Orientação: Cláudio Teodoro de Souza.

1. Fumaça de cigarro – Efeitos colaterais. 2. Fumo –
Efeito fisiopatológico. 3. Autofagia. 4. Espécies de
oxigênio reativas. 5. Pulmão – Doenças. I. Título.

CDD. 22^a ed. 616.865

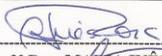


UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão
Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendada pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

ATA DA 62ª DEFESA DE TESE

Ata da Defesa Pública de Tese de Doutorado de Ana Lucia Bernardo de Carvalho Morsch. Aos cinco dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezesseis às 14h00, na Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC reuniram-se os membros da Banca Examinadora, composta pelos senhores professores: **Dra. Vanessa Moraes de Andrade** (Membro Relator - UNESC), **Dr. Ricardo Aurino de Pinho** (Membro Interno - UNESC), **Dr. Antonio José Grande** (Membro Externo - UNESC) e **Dra. Viviane de Menezes Caceres** (Membro Externo – UFSC), e designados pelo Colegiado de Coordenação, a fim de argüirem a tese de Doutorado de **Ana Lucia Bernardo de Carvalho Morsch**, subordinada ao título: **“EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO SOBRE O PROCESSO DE AUTOFAGIA EM PULMÃO DE CAMUNDONGOS SWISS”**. Aberta a sessão pelo Presidente da mesma, coube a candidata, de forma regimental, expor o tema de sua tese, findo o que, dentro do tempo regulamentar, foi questionada pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida, procedeu às explicações que se faziam necessárias. Após esse procedimento, a Banca Examinadora reuniu-se individualmente, para a avaliação final da candidata. Retornando à sessão, o Presidente, lendo o Termo de Apresentação de Tese, declarou **Ana Lucia Bernardo de Carvalho Morsch** Aprovada.

ALTERAÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª **Dra. MARIA INÊS DA ROSA** (Presidente do Colegiado de Coordenação)


Prof. Dr. **CLAUDÍO TEODORO DE SOUZA** (Orientador)

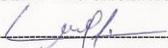
BANCA EXAMINADORA:


Prof.ª **Dra. VANESSA MORAES DE ANDRADE** (Membro Relator - UNESC)


Prof. Dr. **RICARDO AURINO DE PINHO** (Membro Interno - UNESC)


Prof. Dr. **ANTÔNIO JOSÉ GRANDE** (Membro Externo - UNESC)


Prof.ª **Dra. VIVIANE DE MENEZES CACERES** (Membro Externo – UFSC)

CANDIDATA: 
ANA LUCIA BERNARDO DE CARVALHO MORSCH

Criciúma, SC, 05 de dezembro de 2016.

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esta tese aos meus pais Carlos e Arlette, pois, sem vocês, a realização deste trabalho jamais seria possível! Serei eternamente grata por tudo o que fizeram por mim! Vocês são o meu melhor exemplo de vitória! Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Jorge por ter encarado este desafio ao meu lado, por todo apoio e compreensão durante esta longa jornada, pelas idas ao parquinho, ao cinema, a Passo Fundo para brincar com os tios e a vovó, pelas noites enquanto estive em Criciúma e escrevendo a tese na URI, enfim, por todo o carinho e atenção dados às nossas filhas enquanto estive ausente. Você é um pai muito amoroso e dedicado! Simplesmente: te amo!

Minha filha Giovana (Gigi), quando a mamãe iniciou o doutorado, você só tinha um ano e sete meses, era tão pequenina... Que aperto no coração a cada partida... O tempo passou e agora, com seis anos já entende que a mamãe vai para Criciúma estudar para terminar o trabalho e apresentar “aquela aula bem difícil”! Que dor no coração quando você fez aquela pergunta: “mamãe, depois que você apresentar a aula bem difícil, vai poder brincar com a gente?”. Durante todos esses anos, entre idas e vindas, olhava para o teu rostinho meigo e delicado e pensava: “vai valer a pena, que Deus me dê forças!”. E quando você souber ler, vai sentir que realmente valeu a pena todo o esforço da mamãe! Esses dias, você me surpreendeu no carro, quando leu a etiqueta colada na pasta de artigos da mamãe: “autofagia”.

Minha filha Amanda, quão grata surpresa quando você entrou em nossas vidas! Chegou de forma inesperada e, para a nossa alegria, completou a nossa família! Após um ano do início do doutorado, eu já te carregava comigo nessas longas viagens.

Você era muito comportada e deixou a mamãe viajar até o final da gestação! Quando nasceu, eu te levava comigo até a Unesc para te amamentar... E hoje, com três anos, você me pergunta: “mamãe, você vai estudar com a dinda Fer, lá em Criciúma?”. Eu só tenho a agradecer esses dois presentes de Deus, que me impulsionaram a continuar este percurso! Foi por vocês que a mamãe nunca desistiu!

O início desta jornada foi há quase cinco anos e lembro-me como se fosse hoje do medo do desconhecido, da angústia de não saber o caminho... Lembro-me das férias encurtadas para uma longa viagem à Criciúma, na qual se estabeleceria o primeiro contato com o orientador... Na chegada ao Lafibe, eu, Janesca e Elvis olhávamos apreensivos, aguardando a chegada no nosso “fabuloso” orientador professor Cláudio... Foram horas de conversa e, ao final, nos perguntávamos: será? Vamos encarar o desafio? Não foi fácil... nada fácil... mas, com muita persistência e determinação, o caminho foi trilhado, mesmo com muitos percalços e obstáculos ao longo desses anos. Quero agora agradecer, da forma mais profunda e verdadeira, ao tão “fantástico” professor Cláudio! Obrigada de coração pelas inúmeras vezes em que ouvi de ti para não desistir, obrigada por me incentivar, obrigada por ter sido meu mestre, amigo, talvez um “pai” em certos momentos! E quantas lágrimas tu presenciaste... Jamais esquecerei tua frase: “um dia, todo esforço será recompensado!” E hoje é, com imensa admiração, que te agradeço por ter sido meu orientador! Que a tua trajetória seja cheia de alunos e artigos “fabulosos”! O meu MUITO OBRIGADA!

Agradeço aos meus colegas do passado e amigos do presente e do futuro, parceiros de viagem, de cantoria, de risadas, de angústia, de choro, de desabafo, de alegria, de cafés, pastéis, paradas obrigatórias em Vacaria e São Francisco de Paula... Amizade que se consolidou para a vida toda! Ao longo dessas estradas, se pudéssemos ver as palavras que foram ditas durante todos esses anos, com certeza estariam lá: mitocôndria, ciclo de Krebs, estresse oxidativo, moléculas, proteínas, enzimas, antioxidantes, AMPK, mTOR, metaloproteinases, etc... palavras que não faziam parte do nosso cotidiano e que agora estão presentes em nossas vidas sem serem temidas! Queridos amigos e vitoriosos dessa odisseia, foram mais de cento e trinta mil quilômetros rodados entre Erechim e Criciúma! Somos heróis da nossa própria história! Meu eterno agradecimento! Não me esquecerei de que, quando me mudei para Porto Alegre, vocês continuaram torcendo por mim...Hoje faço parte novamente deste time com orgulho, “o grupo de Erechim”! Obrigada por tudo: Fernanda, Irany, Janesca, Mari, Márcia, Miriam, Wolnei e, em especial, ao Elvis, que contribuiu em grande parte na realização deste trabalho e, em todos os momentos em que precisei de auxílio, esteve sempre disposto a me ajudar e até me tranquilizar com o seu jeito sereno de ser.

Agradeço de coração à minha amiga “fada” Ana Laura, por todo apoio e impulso durante todos esses anos! Pelos artigos enviados, pelas correções, sugestões, dicas, desabafos, enfim, por tudo! Você foi uma pessoa que fez a diferença nesta minha longa jornada. Nossa amizade tornou-se uma parceria que deu certo. Com extrema admiração e gratidão: **MUITO OBRIGADA!**

Agradeço à minha sogra Ester, por tantas vezes que se deslocou de Passo Fundo para ficar com a Gigi enquanto eu viajava! Sua presença era tão importante e mágica ao mesmo tempo! Obrigada por ter suavizado minha angústia de estar longe e por ter tornado os dias da Gigi tão especiais, com suas brincadeiras, seu afeto e sua dedicação!

Agradeço à querida Ema, que me auxiliou com a Gigi, nos momentos finais da gestação da Amanda e na partida para Porto Alegre. Sem você, tudo seria mais difícil! Muito obrigada!

Agradeço imensamente à Sabrina, mais um presente de Deus! Você entrou em nossas vidas no momento exato! Meu anjinho, obrigada por cuidar tão bem das minhas filhas enquanto eu estava trabalhando, estudando ou viajando! Você, sem dúvida, fez parte desta conquista! Obrigada também pelo carinho e pelas palavras de sempre: “Vai com Deus! Boa viagem! Fica tranquila! Vou cuidar delas como se fossem minhas. Bom estudo!” Muito obrigada!

Agradeço à funcionária Marini, do hotel Ibis – Criciúma, pela zelosa recepção de todas as chegadas no hotel. Você vivenciou conosco todo o estresse, a angústia e as alegrias conquistadas ao longo deste caminho! Obrigada por tornar a nossa estadia mais leve e agradável! Você é uma excelente profissional!

Agradeço aos tios e dindos, Fabiana e Baldur, Gabriela, Fernando e Krízia, por ficarem com minhas filhas, nesta etapa final para eu terminar de escrever a tese! Agradeço ao querido primo Rafael, por brincar e alegrar os dias das meninas! Muito obrigada pelo carinho de sempre, pelas brincadeiras, pelos mimos e pelas surpresas que, com certeza, suavizaram a minha ausência.

A todos os alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica (LAFIBE), pela colaboração e pelo apoio na realização deste grande projeto: Alessandra, Hemelin, Lara, Matheus, Vitor, João, Bruno, em especial para as queridas Thaís, Shérolin e Daniela, pois, além da colaboração, foi um grande prazer conviver com vocês durante esses anos.

À querida e prestativa Elizabet, pelas correções da ortografia e pelas doces palavras ouvidas nos últimos momentos da tese.

Aos professores do PPG da Unesc, pela receptividade e pelo carinho com que nos recebiam todas as vezes em que chegávamos em Criciúma.

À secretária do PPG, Diana, pela prontidão em responder e encaminhar tudo o que precisávamos, com agilidade e extrema competência.

À URI –Erechim, em especial à direção geral e acadêmica, coordenação da área da saúde e coordenação do curso de Fisioterapia, pelo apoio e pela oportunidade.

A todos os meus alunos, que participaram de todas as etapas, torcendo sempre para um final feliz!

Por fim, gostaria de agradecer à minha família e aos meus amigos de São Paulo, que torcem pelo meu sucesso!

*“Somos todos anjos de uma asa só, e só
podemos voar quando abraçados uns aos outros.”*

(Luciano de Crescenzo)

RESUMO

A fumaça de cigarro (FC) está envolvida na gênese de inúmeras doenças como o câncer, doenças pulmonares e cardiovasculares. Sabe-se que a elevada produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) está implicada nesses processos fisiopatológicos, e que pode resultar na ativação da AMPK e na diminuição da mTOR, induzindo assim a autofagia. No entanto, ainda não está bem estabelecida a alteração autofágica em condição de exposição à FC no tecido pulmonar. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da exposição à FC em diferentes tempos, nas moléculas envolvidas no processo autofágico, e a participação de SESN2, AMPK e mTOR na regulação e modulação da via autofágica. Analisar esses efeitos com a suplementação de N-acetilcisteína (NAC) e após a cessação da exposição à FC. Os experimentos foram conduzidos em três etapas. Com o objetivo de verificar as maiores alterações moleculares para a identificação do *time course*, na 1ª etapa, 60 camundongos *Swiss* foram divididos em 6 grupos (n=10), conforme o tempo de exposição à FC, sendo: 7, 15, 30, 45 e 60 dias, que foram expostos a 4 cigarros comerciais com filtro (alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg) por sessão, 3 sessões/dia, todos os dias da semana, e o grupo controle (CT): sem exposição. Devido aos grupos expostos apresentarem maiores alterações das moléculas autofágicas nos 45 dias, utilizou-se este tempo para as seguintes etapas do experimento. Na 2ª etapa, os animais foram suplementados com NAC por gavagem oral (60mg/Kg/dia) e divididos em 4 grupos a saber: CT, CT + NAC, FC/45 dias sem NAC e FC/45 dias + NAC. A 3ª etapa consistiu da cessação à FC na qual os animais foram divididos em 6 grupos: CT, FC/45 dias e FC/45 dias de exposição + os seguintes dias de cessação: 7, 15, 30 e 45. O tecido pulmonar foi coletado para análise das espécies reativas por DCFH e a detecção da fosforilação e dos níveis proteicos das moléculas foi realizada por *western blot*. Os resultados da 1ª etapa demonstraram que a exposição à FC aumentou significativamente a produção de ERO, a fosforilação de AMPK e ULK1, os níveis proteicos de SESN2, ATG12 e LC3B; e diminuiu a fosforilação de mTOR, nos 30, 45 e 60 dias de exposição. Na 2ª etapa com a suplementação de NAC, as alterações moleculares foram prevenidas, comprovando o envolvimento das ERO na indução da autofagia. Na 3ª etapa com a cessação da exposição à FC, ocorreu uma diminuição das ERO, da fosforilação de AMPK e ULK1, das moléculas autofágicas e

aumento da fosforilação de mTOR, compatível com a atenuação da autofagia. Tomado em conjunto, os resultados confirmaram que das ERO geradas pela exposição à FC induziu aumento da fosforilação de AMPK tornando-a ativa, levando à autofagia a partir da inibição da mTOR e/ou através da ativação da ULK1, e que esses eventos foram prevenidos com a suplementação de NAC e após a cessação da exposição à FC.

Palavras-chave: autofagia; espécies reativas de oxigênio; pulmão; tabagismo.

ABSTRACT

Cigarette smoking (CS) is involved in the pathogenesis of many disorders such as cancer, cardiovascular and pulmonary diseases. It is known that the increased production of reactive oxygen species (ROS) is involved in these pathophysiological processes and may result in AMPK activation and mTOR reduction thereby inducing autophagy. However the role of autophagy in condition of exposure to CS in lung tissue has not yet been well established. This study aimed to evaluate the molecular effects of exposure to CS at different times in the autophagic process and the participation of: SESN2, AMPK and mTOR in the regulation and modulation of the autophagic pathway; analyze these effects with supplementation with N-acetylcysteine (NAC) and after cessation of CS exposure. The experiments were conducted in three stages. In order to verify the greatest molecular changes for the identification of the time course, in the first stage 60 mice were divided into 6 groups (n = 10) as the exposure time to the CS being: 7, 15, 30, 45 and 60 days, they were exposed to 4 commercial cigarettes with filter (10mg tar, 0.8mg nicotine and 10mg carbon monoxide) per session, 3 sessions/day, daily for 7, 15, 30, 45, 60 days and control group (CG) without exposure. Inasmuch as the exposed groups exhibit major changes in autophagic molecules at 45 days, this time was determined for the following stages of the experiment. In the second stage the animals were supplemented with NAC by oral gavage (60 mg/kg/day) and divided into 4 groups, namely: CG, CG + NAC, CS/45 days without NAC and CS/45 days + NAC. The third stage consisted of the cessation of CS in which the animals were divided into 6 groups: CG, CS/45 days and CS/45 exposure days and the following days of cessation: 7, 15, 30 and 45. The lung tissue was collected for analysis of ROS by DCFH and detection of phosphorylation and protein levels of molecules was performed by western blotting. The results of the first stage have shown that exposure to CS significantly increased production of ROS, the AMPK and ULK1 phosphorylation, SENS2, ATG12 and LC3B protein levels and decreased mTOR phosphorylation in 30, 45 and 60 days exposure. In the second stage with NAC supplementation the molecular alterations were prevented proving the involvement of ROS in the induction of autophagy. In the third stage with cessation of CS exposure there was a decrease in ROS, AMPK and ULK1 phosphorylation, autophagic molecules and increased mTOR phosphorylation, compatible with autophagy attenuation. Taken together the results confirmed that ROS generated by CS exposure increased

AMPK phosphorylation turning it active leading to autophagy from mTOR inhibition and/or ULK1 activation, and that these events were prevented with NAC supplementation and after smoke exposure cessation.

Key words: autophagy; lung; smoke cigarette; reactive oxygen species.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Sinalização e regulação da autofagia.....	54
Figura 2 - Câmara de Inalação (40 cm X 30 cm X 25 cm).....	60
Figura 3 – Desenho experimental – Etapa 1.....	61
Figura 4 – Desenho experimental – Etapa 2.....	62
Figura 5 – Desenho experimental – Etapa 3.....	63
Figura 6A– Peso dos animais, DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à fumaça de cigarro.....	71
Figura 6B– Fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à fumaça de cigarro.....	72
Figura 7A – DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e suplementados com NAC.....	75
Figura 7B – Fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à fumaça de cigarro por 45 dias suplementados com NAC.....	76
Figura 8A– DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à	

fumaça de cigarro por 45 dias e cessados por 7, 15, 30 e 45 dias.....	78
Figura 8B– Fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos <i>Swiss</i> expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e cessados por 7, 15, 30 e 45 dias.....	79
Figura 9 – Conclusão esquemática.....	92
Quadro 1- Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP- Adenosina monofosfato, do inglês *Adenosine Monophosphate*.

AMPK- Proteína quinase ativada por AMP, do inglês *AMP-activated Protein Kinase*.

AKT- Proteína quinase B, do inglês *Protein Kinase B*.

ATG - Proteína Relacionada à Autofagia, do inglês *Autophagy-related Protein*.

ATG1 / ULK1 - Proteína Relacionada à Autofagia 1/Quinase 1 Semelhante à Unc-51, do inglês *Autophagy-related Protein 1/Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*.

ATP- Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosine Triphosphate*.

BCL-2 - Célula-B de Linfoma 2, do inglês *B-cell Lymphoma 2*.

Beas 2b – Linha celular do epitélio brônquico humano, do inglês *Human bronquial epithelial cell line*.

CAT- Catalase.

DCFH- DA – Diacetato de Diclorofluoceína, do inglês *Dichlorofluorescin diacetate*

DPOC- Doença pulmonar Obstrutiva Crônica.

EFM – Extrato da fumaça de cigarro.

ERK- Proteína quinase regulada por sinal extracelular, do inglês *Extracellular Signal-Regulated Kinases*.

ERO- Espécies reativas de oxigênio.

FC – Fumaça de cigarro.

Foxo1/3 - Fatores de Transcrição Forkhead Box Sub-grupo O1 e 3, do inglês *Forkhead Box Protein Sub-group O1/3*.

GPx- Glutationa peroxidase.

JNK- c-jun quinase N-terminal, do inglês *c-Jun N-terminal Kinases*.

LC3 - Proteína Associada a Microtúbulos de Cadeia Leve 3, do inglês *Microtubule-Associated Protein Light Chain 3*.

MLST8 - Subunidade Semelhante à Proteína Gb/GbL, do inglês *Target of rapamycin complex subunit LST8*.

mTOR- Proteína alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*.

NAC – N- acetilcisteína.

NO – Óxido Nítrico, do inglês *Nitric Oxide*.

p70S6k- Proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDA, do inglês *Ribossomal Protein Kinase S6 of 70 kDA*.

PI3K (I à III)- Fosfatidilinositol 3-quinase (classe I à III), do inglês *Phosphoinositide 3-kinase*.

PRAS40 - Substrato 1 da Akt de 40 kDa Rico em Prolina, do inglês *Proline-rich Akt substrate of 40-kDa*.

SESN2 – Sestrina 2, do inglês *Sestrin 2*.

SOD- Superóxido dismutase.

TAK-1- Fator de crescimento transformante- β -quinase-1, do inglês *Transforming Growth Factor β Activated kinase-1*.

TBARS- Substâncias Reativas do Ácido 2-tiobarbitúrico, do inglês *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*.

TSC1/2- Proteínas de Esclerose Tuberosa 1e 2, do inglês *Tuberous Sclerosis Proteins 1 and 2*.

4EBP1- Fator Eucariótico de Início de Tradução 4E, do inglês *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-binding Protein 1*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	43
2 OBJETIVOS.....	55
2.1 OBJETIVO GERAL.....	55
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	58
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	58
3.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO.....	60
3.3.1 Etapa 1 - Exposição de camundongos à fumaça de cigarro em diferentes tempos (tempo-dependente).....	62
3.3.2 Etapa 2 – Exposição de camundongos à fumaça de cigarro por 45 dias (<i>time-course</i>) tratados com NAC.....	63
3.3.3 Etapa 3 – Cessação da exposição à fumaça de cigarro.....	64
3.4 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS POR DIACETATO DE DICLOROFLUORESCÉINA (DCFH-DA)	65
3.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS E DE FOSFORILAÇÃO POR WESTERN BLOTTING.....	66
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4 RESULTADOS.....	69
4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS À FUMAÇA DE CIGARRO (ETAPA 1).....	69

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS À FUMAÇA DE CIGARRO POR 45 DIAS E SUPLEMENTADOS COM NAC (ETAPA 2).....	73
4.3 EFEITOS DA CESSAÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS EM DIFERENTES TEMPOS (ETAPA 3).....	77
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
ANEXO 1.....	103

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), neste século, cem milhões de mortes serão atribuídas ao tabaco (WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2013). Há aproximadamente 1 bilhão de fumantes no mundo e o uso do tabaco parece estar aumentando (Rosenberg et al., 2015). De acordo com a última Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), de 2013, do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a prevalência de usuários atuais de produtos derivados de tabaco foi de 15,0%, ou seja, 21,9 milhões de pessoas (IBGE, 2013). Estudos têm mostrado uma forte associação das principais doenças crônicas não transmissíveis, tais como doenças cardiovasculares, oncológicas, pneumonias e doenças crônicas respiratórias, a fatores de risco com alta prevalência, como o tabagismo, sendo este o principal fator de risco no caso das doenças pulmonares (IBGE, 2013).

Os mecanismos moleculares que levam ao aparecimento das doenças pulmonares crônicas induzidas pela fumaça de cigarro ainda não estão completamente esclarecidos. Notavelmente, a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) é o distúrbio mais frequente desencadeado pela exposição à fumaça de cigarro, cuja composição pode apresentar uma mistura de mais de 5000 substâncias tóxicas, que contém altos níveis de oxidantes, as quais podem induzir a inflamação (Sangani e Ghio, 2011;Goldkorn et al., 2014; Itoh et al., 2014).

A DPOC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo e pode-se atribuir grande parte dos casos ao tabagismo, cuja eliminação seria suficiente para reduzir drasticamente o número de

casos da doença (Mascarenhas et al., 2011). É uma doença incurável, considerada um dos principais problemas de saúde global, sendo hoje responsável por 5% dos óbitos totais e que será a terceira causa de morte no mundo em 2020 (Vlahos e Bozinovski, 2014). No Brasil, 14.320 milhões de pessoas têm DPOC relacionada ao tabagismo, sendo esta a quinta causa de mortalidade, levando a 3 milhões de mortes a cada ano (Rabahi, 2013; Rufino, 2013). A fisiopatologia da DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo associada a uma exacerbada resposta inflamatória nos pulmões, relacionada a gases e partículas nocivas. Há evidências de fenótipos diferentes da doença como fibrose e obstrução de pequenas vias aéreas, enfisema com alargamento dos espaços aéreos e destruição do parênquima pulmonar, perda do recuo elástico e obstrução das vias aéreas de pequeno calibre, exigindo intervenções terapêuticas distintas (Mannino e Buist, 2007; Tudor e Petrache, 2012).

O incremento na taxa de mortalidade da DPOC contrasta com a expressiva redução observada em outras enfermidades, tais como câncer, doença coronariana, acidente vascular cerebral e síndrome da imunodeficiência adquirida. Essa redução é atribuída, em grande escala, a uma maior eficácia no diagnóstico e no tratamento dessas condições, parcialmente decorrente de avanços na compreensão dos seus mecanismos etiopatogênicos (Tudor e Petrache, 2012).

Modelos animais de exposição à fumaça que refletem a fisiopatologia da doença com precisão, têm sido desenvolvidos e têm alcançado um rápido progresso na identificação de mecanismos patogênicos e de novas terapias (Itoh et al., 2014). Não obstante, também há importância nos estudos que avaliem a primeira resposta da fumaça de cigarro em um pulmão hígido ou durante um período subcrônico, com

intuito de observar alterações relevantes que podem ter um papel importante nos primeiros eventos do desenvolvimento da DPOC (van der Vaart et al., 2004). A inalação da mesma contém inúmeros oxidantes, radicais livres e compostos químicos que podem levar ao estresse oxidativo nos pulmões e em vários outros tecidos, ocasionando morte celular e senescência tecidual (Shi et al., 2012). Aumento nos níveis de marcadores de estresse oxidativo produzidos nas vias aéreas é refletido nos espaços aéreos, no escarro, na exalação, nos pulmões e sangue de pacientes com doenças respiratórias (Rahman, 2003).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são mediadores derivados do metabolismo do oxigênio molecular (O_2) e são encontradas em todos os sistemas biológicos (Storz, 2011, Malaviya et al., 2014). Em condições fisiológicas, o O_2 sofre redução tetravalente na cadeia respiratória, resultando na formação de água. No entanto, o oxigênio pode receber apenas 1 elétron formando o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que ao ser catalizado pela enzima superóxido dismutase (SOD) gera intermediários com potencial nocivo como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Rahman, 2002; Rahman, 2003). Em adição, na presença de ferro, através de uma reação secundária não-enzimática, o H_2O_2 é convertido a radical hidroxila OH^{\cdot} , denominada reação de Fenton (Comhair e Erzurum, 2002).

A produção de ERO é parte integrante do metabolismo e está presente em condições normais, notadamente nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias, tais como hormônios e enzimas (Rahman e Adcock, 2006). A ativação dessas células resulta na formação de $O_2^{\cdot-}$, que é rapidamente convertido a H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD).

As ERO em sistemas biológicos são geralmente produzidas através de reações enzimáticas e não enzimáticas de transferência de elétrons (Comhair e Erzurum, 2002). Os principais sítios e processos celulares geradores de oxidantes são a mitocôndria, os microsossomos, os sistemas enzimáticos xantina/xantina oxidase e a NADPH oxidase (Droge, 2002; Henze e Martin, 2003; Andrade Júnior et al., 2005; Valko et al., 2007; Bouzid et al., 2015). No sistema respiratório, as principais fontes endógenas de oxidantes são os macrófagos alveolares, as células epiteliais, as células endoteliais e as células inflamatórias tais como neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos (Nakahira et al., 2014).

As espécies reativas produzidas pelos fagócitos são a principal causa de dano tissular associado a doenças pulmonares inflamatórias crônicas (Rahman, 2002; Rahman, 2003). Poluentes atmosféricos, tais como ozônio, dióxido de nitrogênio, dióxido de enxofre e em especial a fumaça de cigarro, contribuem para a presença de oxidantes no organismo o que potencializa o estado de oxidação das células (Droge, 2002). A fumaça de cigarro contém compostos tóxicos, incluindo oxidantes potentes (aproximadamente 10^{14} radicais livres por inalação), tais como acroleína, H_2O_2 , OH^* e radicais orgânicos (Rahman, 2003). A exposição pulmonar a esses componentes tóxicos causa dano tissular o que culmina uma resposta inflamatória imediata quando caracterizada por oxidantes adicionais (Malaviya et al., 2014). Várias doenças pulmonares estão associadas ao estresse oxidativo pelo aumento da produção de ERO e de espécies reativas de nitrogênio (ERN) no sistema respiratório, e/ou diminuição dos níveis de antioxidantes (Andrade Júnior et al., 2005; Hu et al., 2007).

As vias de sinalização induzidas por ERO incluem uma variedade de proteínas da cascata das quinases ativadas por mitógenos (MAPK), envolvendo a c-Jun-quinase N-terminal (JNK) e p38 MAP quinase. A JNK pertence à família da proteína quinase ativada por estresse (SAPK) e foi originalmente identificada pela sua capacidade de fosforilar o resíduo N-terminal do fator de transcrição c-Jun. Sua sinalização regula diversas funções biológicas, incluindo apoptose, proteção celular, metabolismo e homeostase epitelial em resposta a diversos estressores ambientais, tais como irradiação ultravioleta, citocinas, bem como ERO (Cui et al., 2007). Em adição, o estresse oxidativo pode estar relacionado à indução da necrose e apoptose, sendo o foco de intensivas investigações (Storz, 2011). No entanto, pouco se sabe sobre as moléculas sinalizadoras sensíveis às ERO, que intercedem na sobrevivência celular ou proteção, sob condições de níveis moderados de estresse oxidativo.

Há relatos de que as ERO podem induzir as proteínas sestrinas 1 e 2 (Heidler et al., 2013). As sestrinas (SESN) são proteínas que pertencem à família das proteínas antioxidantes, que podem suprimir o estresse oxidativo e regular a sinalização da AMPK (proteína quinase ativada por níveis de AMP) e mTOR (molécula alvo da rapamicina em mamíferos, do inglês *mammalian target of rapamicin*) (Lee et al., 2013). Feng et al. (2005) observaram que as sestrinas estão envolvidas no processo de ativação da AMPK (Greer et al., 2007). Estudos mostraram que as SESN1/2 tem expressões aumentadas sob estresse oxidativo (Budanov et al., 2004). Budanov e Karin (2008) demonstraram que as SESN1/2 são reguladoras negativas da via mTOR e que elas executam esta função dependente do estado redox via fosforilação da AMPK e,

consequentemente, da TSC2. As ERO ativam as SESN 1 e 2, que ativam a AMPK e, desta forma, diminuem a sinalização de mTORC1 (Budanov e Karin, 2008). Em contrapartida, a SESN 2 parece bloquear o acúmulo de ERO e a ativação da mTOR, cujo papel tem efeitos opostos na patogênese da DPOC (Heidler et al., 2013).

A AMPK tem um papel multifuncional independente de regulação de energia e, portanto, tem sido implicada em diversas doenças (Shang e Wang, 2011; Barbosa et al., 2013; Perng et al., 2013). Estudos recentes indicam que a ativação da AMPK pode modular a inflamação, podendo ser ativada por níveis intracelulares aumentados de ERO em diversos tipos celulares, como no tecido pulmonar, após a exposição à fumaça de cigarro (Steinberg e Kemp, 2009; Shirwany e Zou, 2014). A AMPK, uma heterotrimérica serina/treonina quinase, que contém uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) e duas subunidades regulatórias (β e γ), com as seguintes isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$), foi inicialmente conhecida como uma crítica reguladora da homeostase energética e descrita pela primeira vez, em 1973, como uma proteína induzida por AMP (Hardie, 2003; Carling, 2004). AMPK pode ser ativada alostericamente por um aumento intracelular da razão AMP/ATP sob diversas condições fisiológicas, tais como exercício extenuante, ou patológicas, como privação de glicose e isquemia com depleção de energia celular (Hardie, 2003).

A AMPK exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídeos, expressão gênica e síntese proteica (Zhou et al., 2001). Ela atua em diversos órgãos, incluindo músculo, tecido adiposo, pulmão e hipotálamo. Seu maior efeito é desligar vias metabólicas anabólicas que consumam ATP, ao mesmo tempo em que estimula vias metabólicas que

produzam ATP (por exemplo, as vias catabólicas de oxidação de glicose e de ácidos graxos) (Hardie, 2003; Carling, 2004). Para realizar esses efeitos, a AMPK fosforila diretamente enzimas regulatórias envolvidas nessas vias e também atua indiretamente sobre a expressão gênica (Zhou et al., 2001; Hardie, 2003). Por causa de seus efeitos metabólicos, AMPK é considerada um possível alvo terapêutico para prevenção e tratamento de algumas doenças (Viollet et al., 2010).

O balanço energético é mantido por um sistema homeostático complexo envolvendo vias sinalizadoras em múltiplos tecidos e órgãos. A AMPK parece ser enzima chave nesta função. No entanto, a AMPK também está envolvida em vários outros processos que não puramente energéticos, tais como síntese proteica, proliferação e crescimento celular. Parece que a AMPK desempenha essas funções, principalmente, por inibir uma molécula alvo, a mTOR (Guertin e Sabatini, 2005).

A mTOR é uma evolucionária e conservada proteína (280 kDa) que pertence à família das quinases associadas às fosfatidilinositol quinases (Wullschleger et al., 2006). A proteína mTOR regula processos celulares críticos tais como oncogênese, metabolismo, crescimento e diferenciação celular (Guertin e Sabatini, 2005). Ela possui dois complexos nas células: mTORC1 (complexo 1) e mTORC2 (complexo 2). O mTORC1 está envolvido com aumento da síntese proteica e crescimento celular através da ativação da proteína S6 quinase (proteína ribossomal p70S6k) e inativação da proteína 1 ligadora do fator de iniciação em eucarioto 4E - eIF4E (4E-BP1). O mTORC1 em mamíferos consiste de Raptor (proteína regulatória da mTOR), PRAS40 (substrato 1 da Akt rico em prolina) e mLST8 (subunidade semelhante à proteína G β /G β L) (Guertin e Sabatini, 2005; Yang e Guan, 2007). O complexo 2,

que controla o citoesqueleto e a divisão celular, consiste de Rictor, PROTOR e mLST8 (Astrinidis et al., 2002). Em adição, a rapamicina, um inibidor do crescimento celular, rapidamente inibe o mTORC1 (Sarbasov et al., 2004). A atividade do mTORC1 é positivamente regulada e ativada pelos fatores de crescimento, vias PI3K/Akt, Wnt/GSK3 e ERK/RSK (Wullschleger et al., 2006; Yang e Guan, 2007). O controle positivo e negativo da atividade do complexo mTORC1 é exercido pela TSC2, uma GTPase, que, por sua vez, é inibida por Rheb (Hay e Sonenberg, 2004; Corradetti e Guan, 2006). A atividade da TSC2 é regulada por várias quinases, incluindo a AMPK (Kwiatkowski e Manning, 2005; Corradetti e Guan, 2006). Em adição, recentes trabalhos demonstram que a mTOR também está envolvida com a modulação do sistema imune (Ellisen, 2010; Fielhaber et al., 2012; Fredriksson et al., 2012).

O estudo de Yoshida e colaboradores (2010) mostraram que camundongos *knockout* de RTP801 ou REDD1 (regulated in development and DNA damage response-1), proteína associada ao estresse oxidativo celular e que tem um papel crucial na inibição da sinalização de mTORC1 durante o estresse hipóxico (Katiyar et al., 2009), não apresentaram dano pulmonar induzido pela fumaça de cigarro. Esses mesmos autores observaram que a superexpressão dessa proteína aumenta marcadamente o dano celular em pulmão de camundongos expostos a fumaça de cigarro. Interessantemente, esses pesquisadores observaram que em camundongos superexpressando RTP801 (no pulmão) os danos pulmonares ocorreram mesmo sem fumaça. Isso demonstra a relevância do estresse oxidativo na gênese de danos

pulmonares. O mTORC1 também tem sido estudado por sua ação reguladora da autofagia.

A autofagia é um processo catabólico altamente conservado, pelo qual o material citoplasmático danificado (como proteínas, lipídeos e organelas) é transportado para o lisossomo para degradação por meio de vesículas chamadas autofagossomas (Mizushima e Komatsu, 2011). A autofagia atua como um mecanismo de sobrevivência sob condições de estresse e manutenção da integridade celular através da regeneração de metabólitos precursores da limpeza das células. A autofagia atua principalmente como um mecanismo protetor que pode prevenir a morte celular. A interação entre os elementos regulatórios de autofagia e apoptose sugerem, todavia, mecanismos complexos ainda não elucidados (Choi et al., 2013).

O passo inicial na autofagia é o isolamento e invólucro de materiais marcados para degradação, incluindo organelas danificadas, substratos ubiquitinados ou agregados de proteínas não dobradas ou mal dobradas, em uma membrana chamada de fagóforo (Ryter et al., 2010). O alongamento e a maturação do mesmo levam à formação de uma vesícula de dupla membrana chamada autofagossoma, cuja função é transportar as cargas para serem degradadas nos lisossomos. A membrana exterior do autofagossoma une-se então à membrana lisossomal formando o autofagolisossoma. O conteúdo do autofagolisossoma é subsequentemente degradado por proteases lisossomais (Choi et al., 2013). Diversos complexos multiproteicos têm sido identificados na mediação da autofagia. A primeira proteína ativada é a homóloga de Atg1 em mamíferos: proteína relacionada à autofagia 1/ quinase semelhante à Unc-51 (ULK1), Atg101, quinase de adesão focal (FAK), proteína de

interação (FIP200) e Atg13. Estas proteínas estão predominantemente localizadas no citosol e mantêm-se unidas como um complexo em condições de abundância de nutrientes (Choi et al., 2013).

Sob condições homeostáticas, mTORC1 interage com o complexo ULK1(ULK1–Atg101–FIP200–Atg13) para inibir sua função. No caso de estresse celular, mTORC1 se dissocia do complexo ULK1, permitindo sua associação com a membrana do retículo endoplasmático para iniciar a formação do autofagossoma. O complexo ULK1, por sua vez, controla a atividade e localização de um outro complexo multiproteico, o qual consiste de proteína autofágica beclin-1 (Atg6), proteína de triagem vacuolar 34 (VPS34) Atg14, que é responsável pela iniciação do isolamento da membrana e nucleação do fagóforo. A atividade de beclin-1 é negativamente regulada pela proteína antiapoptótica Bcl-2, que, sob condições homeostáticas, existe em um complexo inibitório. A indução da autofagia resulta na dissociação de beclin-1 de Bcl-2, sendo que beclin-1 então forma um complexo com VPS-34. VPS possui a atividade de fosfatidilinositol 3 quinase, que induz alterações físicas na membrana, facilitando a formação do fagóforo e o recrutamento de proteínas de ligação requeridas para a maturação do autofagossoma (Choi et al., 2013). Este complexo macromolecular (VPS-34–Atg14–beclin-1) tem a habilidade de integrar múltiplas proteínas que podem regular a autofagia positivamente (Ambra, UVRAG, BIF-1) ou negativamente (Rubicon, Bcl-2, Bcl-xL). Os próximos passos são regulados por duas reações semelhantes à ubiquitina (Patel et al., 2013).

A primeira reação envolve a conjugação covalente de Atg5 a Atg12 via Atg7 e Atg10. O complexo Atg5/Atg12 conjuga-se subsequentemente à proteína Atg16L1, o que é essencial para o

alongamento do fagóforo. O complexo Atg16L1/Atg5/Atg12 também pode mediar a conversão da proteína associada a microtúbulos de cadeia leve 3 (LC3 I) ou Atg8 em LC3II, uma fosfatidiletanolamina em forma lipídica (PE). Atg4 participa na conversão através da facilitação da exposição C-terminal do resíduo de glicina em LC3, o sítio de conjugação de PE. LC3-II associa-se com a membrana interna e externa do autofagossoma e ajusta sua expansão. Ocorre então a fusão do autofagossoma ao lisossoma, cuja membrana interna associada a LC3-II é degradada por hidrolases, enquanto que a membrana externa é reciclada via Atg4 (Malaviya et al., 2014).

A autofagia pode ser regulada negativamente através de fatores de crescimento e positivamente a partir da ativação da AMPK. A AMPK é uma molécula que tem uma importância particular na viabilidade celular, pois sua ativação sob baixos níveis de ATP/AMP inibe a mTOR e induz a autofagia (Patel et al., 2013; Malaviya et al., 2014). Estudos demonstram que a SESN2 tem expressão aumentada sob estresse oxidativo (Budanov et al., 2004) e que isso pode estar relacionado em partes na ativação da autofagia via fosforilação da AMPK que participa desse processo também a partir da fosforilação direta de ULK1, dando início à cascata autofágica. (Figura1).

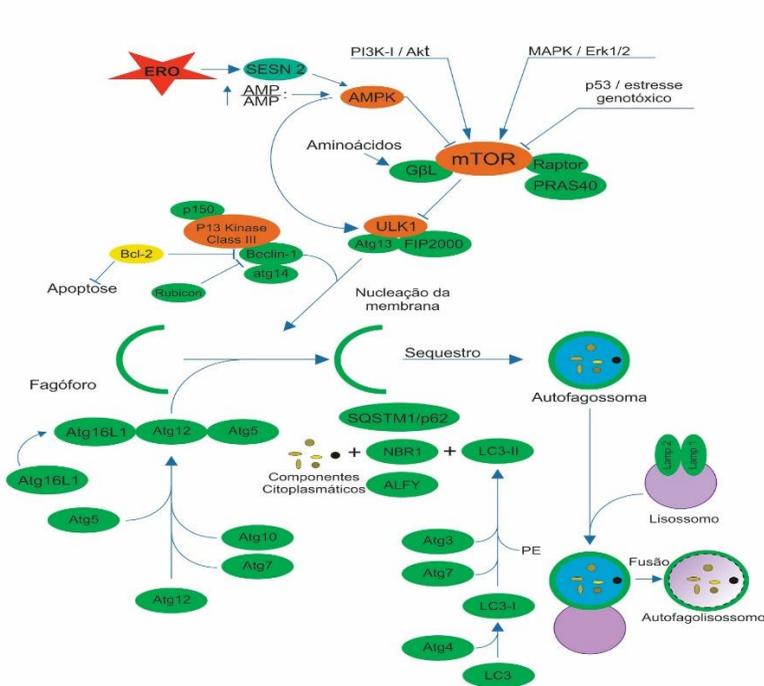


Figura 1. Sinalização e regulação da autofagia. A autofagia pode ser regulada negativamente por diferentes estímulos por fatores de crescimento e positivamente através da ativação da AMPK via SESN2 induzida por ERO, que inibe a mTOR tornando o complexo ULK1-Atg13-FIP200 ativo, iniciando a autofagia. O complexo formado por ULK1 une-se a um segundo complexo: PI3KCIII-p150-beclin-1, que se encontra associado à Atg14 e dá início ao alongamento da membrana do fagóforo. As proteínas Atg12 e Atg5 facilitadas por Atg7 e Atg10, formam um complexo e ligam-se à Atg16; este complexo resultante é incorporado à membrana externa do fagóforo, isolando-o para possibilitar seu alongamento. Após, LC3 é submetido a clivagem proteolítica ativada por Atg4, formando LC3I, que terá seu domínio glicina ligado à Atg7 e posteriormente à Atg3, que realiza a conjugação de LC3I com PE, formando LC3II, incorporando-se à membrana do autofagossoma, levando ao seu alongamento e sequestro dos componentes celulares. As proteínas LAMP1, LAMP2 e Rab7 medeiam a fusão do autofagossoma maduro com os lisossomos citosólicos, formando o autofagolisossomo, hidrolisando os componentes celulares sequestrados. Adaptado de Cell Signaling Technology (2013).

Há relatos de papéis divergentes da autofagia em doenças pulmonares (Nakahira et al., 2014). Notavelmente, um aumento da autofagia tem sido associado ao fenótipo pró-patogênico e pró-apoptótico na DPOC que resulta da exposição crônica à fumaça de cigarro. A expressão de LC3B-II e a formação do autofagossoma estão aumentadas em tecido pulmonar de pacientes com DPOC. Em animais submetidos à inalação de fumaça de cigarro a longo prazo, uma deficiência genética em LC3B foi associada à resistência ao desenvolvimento do enfisema (Chen et al., 2008). No entanto, estudos comprovaram uma insuficiente autofagia, através do acúmulo de p62 e proteínas ubiquitinadas em homogeneizados de pacientes com DPOC, que está envolvida na aceleração da senescência induzida pela fumaça de cigarro associada à secreção de interleucina 8 (IL-8) (Fujii et al., 2012).

Estudos prévios têm sugerido interação entre elevados níveis de ERO na ativação da autofagia, e isso pode estar relacionado em parte à regulação de sestrina 2 (SESN2). O aumento de SESN2 pode ativar a AMPK e conseqüentemente inibir a mTOR gerando um aumento da autofagia (Kiffin et al., 2006; Scherz-Shouval et al., 2007; Chen et al., 2008).

Baseado nestes estudos, a utilização de antioxidantes torna-se interessante e pode ser uma alternativa na prevenção e recuperação dos danos causados pela fumaça de cigarro no pulmão. Dentre os compostos com alta ação antioxidante, encontra-se a N-acetilcisteína (NAC). A N-acetilcisteína ($C_5H_9NO_3S$) é formada pelo aminoácido L-cisteína ($C_3H_7NO_2S$), adicionado de um grupo acetil ($-CO-CH_3$), que torna mais rápida sua absorção e distribuição por via oral (Tsei et al., 2013). Durante muitos anos, ela foi utilizada como antídoto na intoxicação por

paracetamol e é comumente administrada no tratamento de doenças respiratórias por suas propriedades mucolíticas e anti-inflamatórias (Cai et al., 2009). Atualmente, continua sendo muito estudada como antioxidante, atuando como molécula precursora da glutatona reduzida (GSH) (Asevedo et al., 2014; Sanguinetti, 2015). A proteção antioxidante nos tecidos do trato respiratório é garantida pela GSH, uma molécula redox sensível com um grupo tiol presente no tecido de revestimento epitelial, que, através da transformação da forma reduzida para a forma oxidada, exerce um potente efeito antioxidante, sendo então convertida novamente à forma reduzida pela enzima glutatona redutase (Tse e Tseng, 2014).

A NAC, quando administrada por via oral, é desacetilada à cisteína, com consequente aumento na concentração de glutatona reduzida no plasma e, em vias aéreas, é demonstrada pelo aumento de GSH no lavado broncoalveolar pela captação ativa da glutatona no plasma pelos pulmões, que é o principal sítio da síntese de GSH juntamente com o fígado (Bridgeman et al., 1991). Foi demonstrado, em animais expostos à fumaça de cigarro, um novo mecanismo de ação da NAC, acerca do efeito positivo no fator de transcrição Nrf2 (nuclear erythroid 2 –related fator-2), que é um regulador crucial do estado redox (Reddy et al., 2008), bem como em pacientes com DPOC, que foi revelado estar diminuído (Boutten et al., 2010).

Enquanto exacerbado aumento da mTOR no pulmão está relacionado ao câncer (Ekman et al., 2012), a redução demasiada dessa proteína relaciona-se com descontrole da proliferação, crescimento e reparo celular, bem como aumento inflamatório e autofagia (Budanov e Karin, 2008; Ellisen, 2010; Yoshida et al., 2010; Choi et al., 2013). Diante

disso, parece sensato imaginar que a fumaça de cigarro pode aumentar a atividade da sestrina induzida por ERO. A sestrina, por sua vez, aumenta a atividade da AMPK. Elevada fosforilação da AMPK inibe ativação da mTOR, que, em última instância, deixa de inibir moléculas inflamatórias e reparo das células, ou seja, as moléculas inflamatórias apresentam liberação aumentada ou mesmo descontrolada. Diversos autores demonstraram que as ERO regulam a autofagia, e que a fumaça de cigarro aumenta as ERO. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o aumento das ERO induzido pela fumaça de cigarro pode culminar em maior atividade autofágica e se esses efeitos podem ser revertidos com o uso de antioxidante e o cessar da exposição à fumaça.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das espécies reativas de oxigênio sobre o processo autofágico no tecido pulmonar de camundongos *Swiss* expostos à fumaça de cigarro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Observar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro na produção de espécies reativas, na fosforilação da AMPK e da mTOR, nos níveis proteicos de SESN2 e no processo autofágico a partir da fosforilação de ULK1 e dos níveis proteicos de LC3-II;

b) Determinar o *time course* para as análises moleculares das próximas etapas do estudo a partir da exposição à fumaça de cigarro de camundongos Swiss em 7, 15, 30 45 e 60 dias;

c) Avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro concomitante à administração de NAC sobre a produção de espécies reativas, na fosforilação da AMPK e da mTOR, nos níveis proteicos de SESN2 e no processo autofágico a partir da fosforilação de ULK1 e dos níveis proteicos de LC3-II;

d) Analisar os efeitos da cessação da exposição à fumaça de cigarro sobre a produção de espécies reativas, na fosforilação da AMPK e da mTOR, nos níveis proteicos de SESN2 e o processo autofágico a partir da fosforilação de ULK1 e dos níveis proteicos de LC3-II.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A metodologia do presente estudo seguiu os princípios éticos para o uso de animais de laboratório determinados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, sob o protocolo número 01/2013-2 (Anexo 1), e respeitou estritamente os princípios éticos na experimentação animal. Após os experimentos, os restos mortais dos animais foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade. Após isso, foram coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e, posteriormente, encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 160 camundongos machos *Swiss*, recebidos com quatro semanas de vida provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC), pesando entre 30-40g. Os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas claro e 12 horas

escuro, em ambiente com 70% de umidade e com temperatura entre 20°C e 22°C, alojados em gaiolas de poliuretano com cobertura metálica (dez animais por caixa), alimentados com ração padrão para roedores e água *ad libitum*.

3.3 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

Os animais foram expostos à fumaça de 4 cigarros comerciais com filtro contendo alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg (Marlboro, Philip Morris) por sessão, 3 sessões/dia (8:30, 13:30 e 17:30), todos os dias da semana, por 7, 15, 30, 45 e 60 dias de acordo com o protocolo adaptado de Valença et al., 2004 e Menegali et al., 2009 (Quadro 1).

	Manhã (8:30)	Tarde (13:30)	Noite (17:30)	Tempo cigarro	Tempo exaustão
Domingo	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min.	1 min.
Segunda	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Terça	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quarta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quinta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sexta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sábado	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.

Quadro 1 - Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.

Os animais foram mantidos em exposição à fumaça de cada cigarro durante 6 minutos, em uma câmara de inalação de acrílico com

divisórias (40cm x 30cm x 25cm), cuja capacidade total foi de 30 litros (Figura 2).

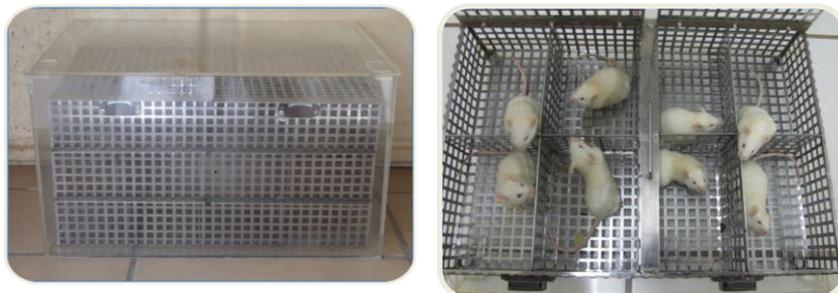


Figura 2 - Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).

Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60 mL com a qual se injetou a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa foi finalizado com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Decorridos os 6 minutos, a cobertura superior da caixa foi retirada e, ligando o exaustor da capela, a fumaça foi evacuada durante 1 minuto, e os animais entraram em contato com o ar ambiente. O procedimento foi repetido com os demais cigarros. Durante o período de exposição, a concentração média de monóxido de carbono no interior da caixa variou de 499-732 ppm (avaliado com medidor de monóxido de carbono digital portátil da marca Instrutherm®). Os animais que permaneceram ventilando em ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle (Valença et al., 2004; Menegali et al., 2009). Cada cigarro gerou aproximadamente 1 L de fumaça que foi distribuído na câmara (capacidade da câmara: 30 L). A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% durante a exposição. O referido protocolo foi escolhido

visto dispor de uma concentração importante da fumaça de cigarro sem causar a morte dos animais.

Após a última exposição, os animais sofreram eutanásia e as amostras do tecido pulmonar foram coletadas para posterior análise molecular e bioquímica.

3.3.1 Etapa 1 – Exposição de camundongos à fumaça de cigarro em diferentes tempos (*tempo-dependente*)

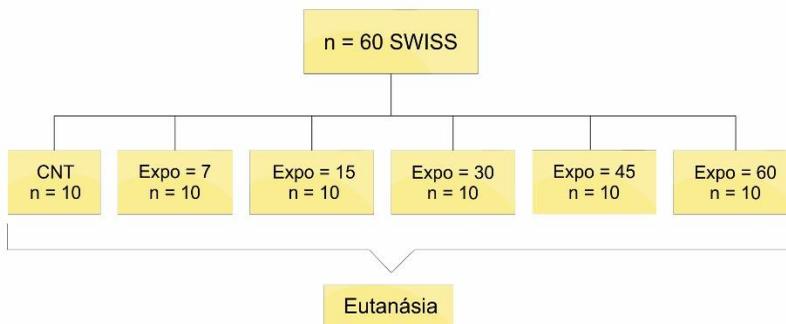


Figura 3: Desenho experimental – Etapa 1

Nesta etapa, foi determinado o *time-course* de 45 dias de exposição à fumaça de cigarro, devido às maiores alterações moleculares observadas neste período. Para isso, foram utilizados 60 camundongos *Swiss* machos, que inicialmente foram divididos aleatoriamente em 6 grupos (n=10). Após, os camundongos foram expostos à fumaça de cigarro por diferentes tempos, a saber: i) controle (sem exposição); ii) 7; iii) 15; iv) 30; v) 45; vi) 60 dias. Após 12 horas dos decorridos tempos de exposição, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para

coleta de material biológico, sendo retirados fragmentos do pulmão direito para realização do *Western blot* e Diacetato de Diclorofluoresceína (DCFH).

3.3.2 Etapa 2 – Exposição de camundongos à fumaça de cigarro por 45 dias (*time-course*) tratados com NAC

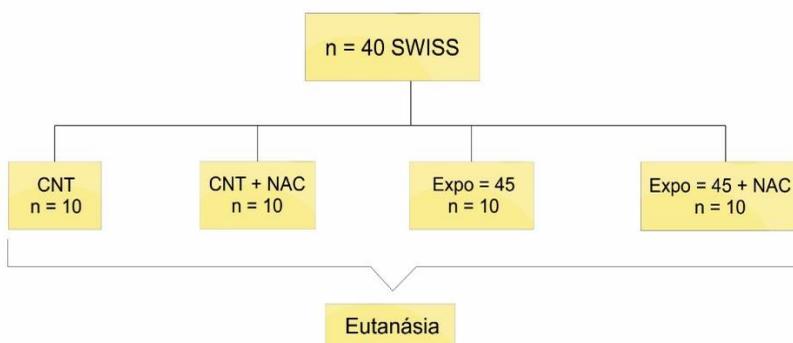


Figura 4: Desenho experimental – Etapa2

Baseado na etapa anterior, foi utilizado o *time-course* de 45 dias para exposição de camundongos à fumaça de cigarro e suplementados com NAC (N-acetilcisteína). Dessa forma, para analisar os efeitos do antioxidante sobre o tecido pulmonar após a exposição à fumaça de cigarro, quatro grupos de camundongos foram estabelecidos (40 animais): i) controle (não expostos); ii) controle suplementado com NAC (não expostos); iii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro; iv) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro com suplementação concomitante da NAC. A suplementação com o antioxidante foi realizada diariamente através de gavagem oral com a utilização de uma cânula com dimensão

suficiente para alcançar a orofaringe. A NAC (Zanbon Brasil, São Paulo) foi administrada na concentração de 60 mg/kg por dia, em um volume total de 0,5mL em dose única diária (Farombi et al., 2008) que de acordo com estudos prévios (dados ainda não publicados) realizados em colaboração com outros laboratórios de nosso PPG, não apresentou toxicidade.

Após 12 horas dos decorridos tempos de exposição, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de material biológico, sendo retirados fragmentos do pulmão direito para realização do *Western blot* e DCFH.

3.3.3 Etapa 3 – Cessação da exposição à fumaça de cigarro

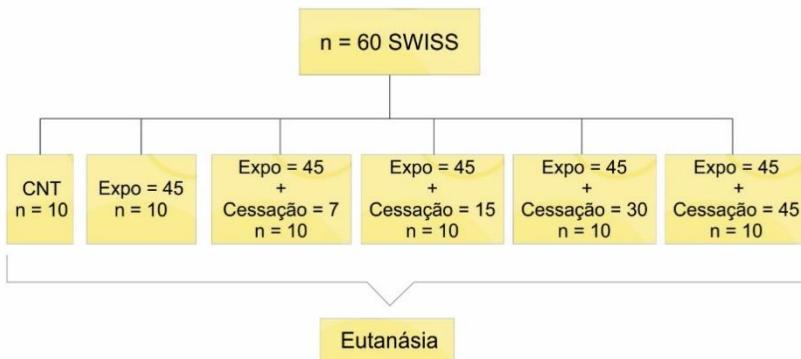


Figura 5: Desenho experimental – Etapa3

Para avaliar os efeitos da cessação da fumaça de cigarro sobre o tecido pulmonar, seis grupos de camundongos (n=60) foram organizados: i) controle (não expostos); ii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro;

iii) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 7 dias de cessação; iv) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 15 dias de cessação; v) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 30 dias de cessação; vi) 45 dias de exposição à fumaça de cigarro e 45 dias de cessação. Após 12 horas dos decorridos tempos de exposição, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para coleta de material biológico, sendo retirados fragmentos do pulmão direito para realização do *Western blot* e DCFH.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS POR DIACETATO DE DICLOROFLUORESCEÍNA (DCFH-DA)

DCFH-DA é uma técnica bastante utilizada como meio de detecção da produção de ERO (Kalyanaraman et al., 2012). A oxidação do DCFH causa a fluorescência da difluoresceína, que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 μL de água e 75 μL de DCFH-DA foram adicionados a 25 μL de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C, ao abrigo da luz, por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração, utilizando-se como padrão o DCF 0,1 μM , diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4, em diferentes concentrações. Tanto as amostras quanto a curva de calibração foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos, foram feitas as leituras no fluorímetro (488 nm de emissão e 525 nm excitação). Os resultados foram expressos em mmol de DCF por mg de proteínas (Wang e Joseph, 1999).

3.5 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE PROTEÍNAS E DE FOSFORILAÇÃO POR *WESTERN BLOT*

Doze horas após a última sessão de exposição à fumaça de cigarro, os animais sofreram eutanásia por guilhotina, um fragmento do tecido pulmonar foi extraído e imediatamente homogeneizado em tampão específico, contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ácido etilendiaminotetracético (EDTA), 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C com Polytron MR 2100 (Kinematica, Suíça). O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm, por 30 minutos, a 4°C. No sobrenadante, determinou-se a concentração de proteínas totais (por teste colorimétrico), utilizando-se para isso o método de Lowry et al. (1951). As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT (Laemmli, 1970) e, posteriormente, realizada a determinação do *immunoblotting* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América), com solução tampão para eletroforese. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América). As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, à temperatura ambiente, para diminuir as ligações proteicas inespecíficas. A seguir, as membranas

foram incubadas com anticorpos primários específicos: anti-Sesn2, anti-AMPK, anti-pAMPK, anti-mTOR, anti-pmTOR, anti-ULK1, anti-pULK1, anti-Atg12 e anti-LC3-II, adquiridos da Cell Signaling Biotechnology (Beverly, Estados Unidos da América), sob agitação constante e *overnight* à 4°C. As membranas originais foram reblotadas com α -tubulina como proteína controle. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas, à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos com substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação, para marcação radiográfica. As bandas foram escaneadas e a intensidade das bandas foi determinada através de densitometria ótica, utilizando o programa ImageJ 1.50i (Wayne Rasband National Institute of Health, USA).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média (média \pm EPM). As variáveis foram analisadas quanto à normalidade de distribuição, usando o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade de variância foi avaliada por meio do teste de Levene. As diferenças entre os grupos foram determinadas a partir da análise de variância (ANOVA) one-way para a etapa 1 e two-way *para as etapas 2 e 3*, seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$. O software utilizado para a análise dos dados foi o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 22 para Windows. 4

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS À FUMAÇA DE CIGARRO (ETAPA 1)

O presente estudo teve como objetivo avaliar as maiores alterações das moléculas envolvidas na via da autofagia em camundongos através da exposição à fumaça de cigarro em diferentes tempos e para isso, os mesmos foram expostos à fumaça durante 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Considerando que a diminuição do peso corporal é uma das consequências do tabagismo, teve-se interesse em avaliar o peso dos animais nos diferentes tempos de exposição. Com a exposição à fumaça de cigarro observou-se redução do peso corporal dos camundongos nos tempos 7, 15, 30, 45 e 60 dias quando comparado ao grupo controle (Fig 6a).

Para avaliar as espécies reativas induzidas pela fumaça de cigarro, a oxidação do DCFH foi analisada. Observou-se que a oxidação do DCFH (DCF) foi maior nos tempos 30, 45 e 60 dias, quando comparado ao grupo não exposto à fumaça de cigarro (Fig 6b). Sabendo-se que as espécies reativas podem ativar e modular moléculas antioxidantes, primeiramente os níveis proteicos de SESN2 foram avaliados. Pode-se observar um aumento significativo dos níveis proteicos de SESN2 nos tempos 30, 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro quando comparado ao grupo controle (Fig 6c). Ao analisar a fosforilação da AMPK, notou-se um aumento que foi significativamente maior nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias. Por outro lado, a fosforilação da

mTOR foi menor nos tempos 15, 30, 45 e 60 dias, demonstrando uma relação inversa entre as duas moléculas (Fig 6d).

A seguir avaliou-se a fosforilação da ULK1 e constatou-se um aumento significativo da fosforilação de ULK1 em 30, 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro, comparado ao grupo não exposto (Fig 6e). Quanto aos níveis proteicos de ATG12, observou-se um aumento significativo em 30, 45 e 60 dias comparado ao grupo controle (Fig 6f). Em adição, identificou-se um aumento dos níveis proteicos de LC3B que foi marcadamente significativo nos 30, 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro em comparação aos animais não expostos e aos expostos por 7 dias (Fig 6g).

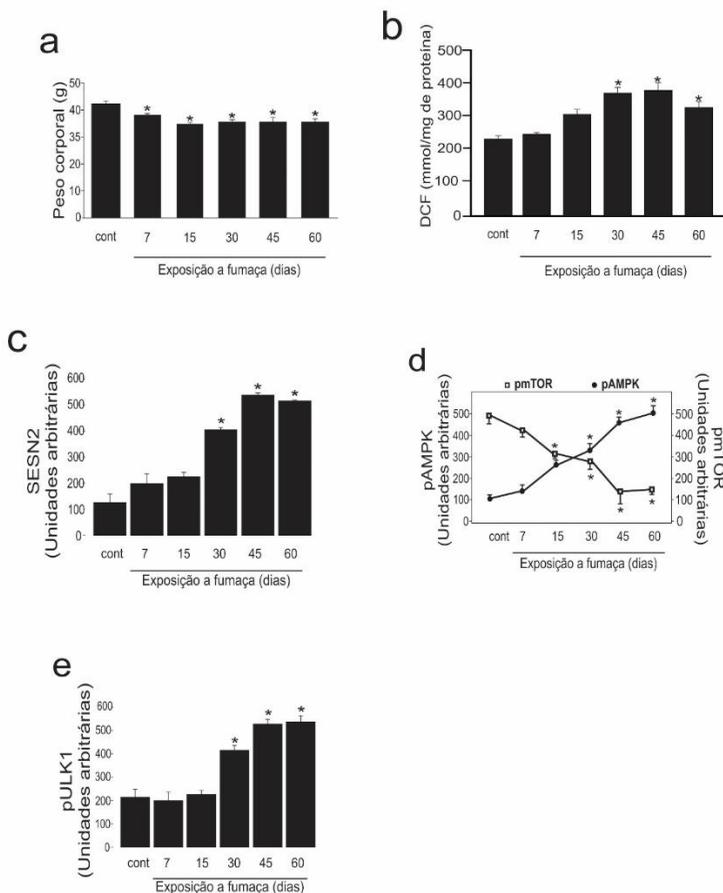


Figura 6A. *Peso dos animais, DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro.* Determinação do peso corporal (a), níveis de dicloro fluoresceína – DCF (b), níveis proteicos de SESN2 (c), fosforilação da AMPK^{thr172} (eixo y) e mTOR^{Ser2448} (eixo z) (d), fosforilação da ULK^{Ser317} (e). As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para peso corporal e para DCF, e 5 amostras (pool de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça).

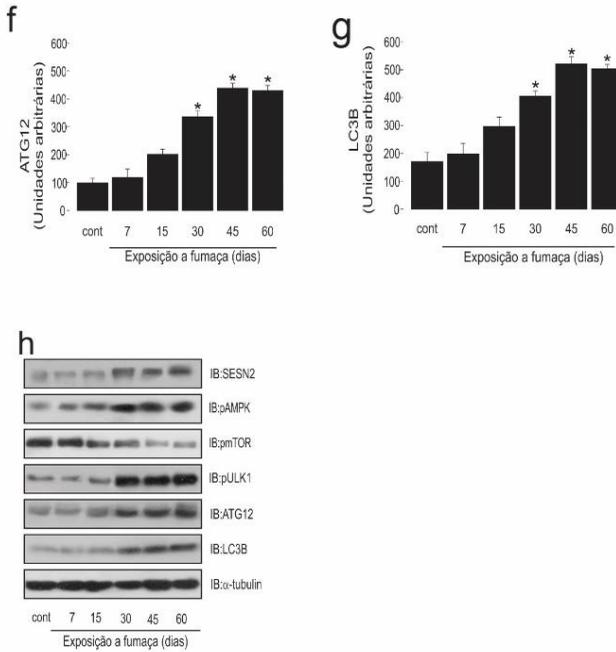


Figura 6B. Fosforilação e níveis proteicos das moléculas analisadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro. Níveis proteicos de Atg12 (**f**), níveis proteicos de LC3 II (**g**) e bandas representativas das moléculas (**h**). A membrana foi estripada e re-blotada com α -tubulina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para peso corporal e para DCF, e 5 amostras (*pool* de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça)

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE CAMUNDONGOS À FUMAÇA DE CIGARRO POR 45 DIAS E SUPLEMENTADOS COM NAC (ETAPA 2)

A partir das alterações moleculares mais expressivas na exposição à fumaça de cigarro durante os 45 dias da etapa 1, determinou-se o *time-course* e deu-se seguimento à etapa 2.

Com relação às espécies reativas induzidas pela fumaça de cigarro, o grupo suplementado com NAC apresentou uma redução significativa dos níveis de DCF quando comparado ao grupo exposto a 45 dias sem suplementação (Fig 7a). Ao avaliar a SESN2 que é uma das proteínas moduladas por ERO, verificou-se que após a suplementação com NAC, houve uma diminuição significativa dos níveis proteicos dessa molécula em comparação ao grupo não suplementado, confirmando a sua ativação e importância na diminuição das ERO e na modulação da via autofágica (Fig 7b).

Com relação a fosforilação de AMPK no grupo suplementado com NAC, houve uma redução significativa em comparação ao grupo não suplementado. Contrariamente, observou-se um aumento significativo da fosforilação da mTOR com a suplementação de NAC, em comparação ao grupo exposto sem suplementação (Fig 7c e 7d, respectivamente). Ao analisar a fosforilação de ULK1 observou-se diminuição significativa da fosforilação com a suplementação de NAC em comparação com o grupo não suplementado (Fig 7e).

Com o intuito de avaliar o comportamento das moléculas iniciadoras da autofagia com a suplementação de NAC, detectou-se uma diminuição significativa dos níveis proteicos de ATG12 e LC3B nos 45

dias de exposição com a suplementação de NAC, em comparação ao grupo 45 dias não suplementado (Fig 7f e 7g, respectivamente).

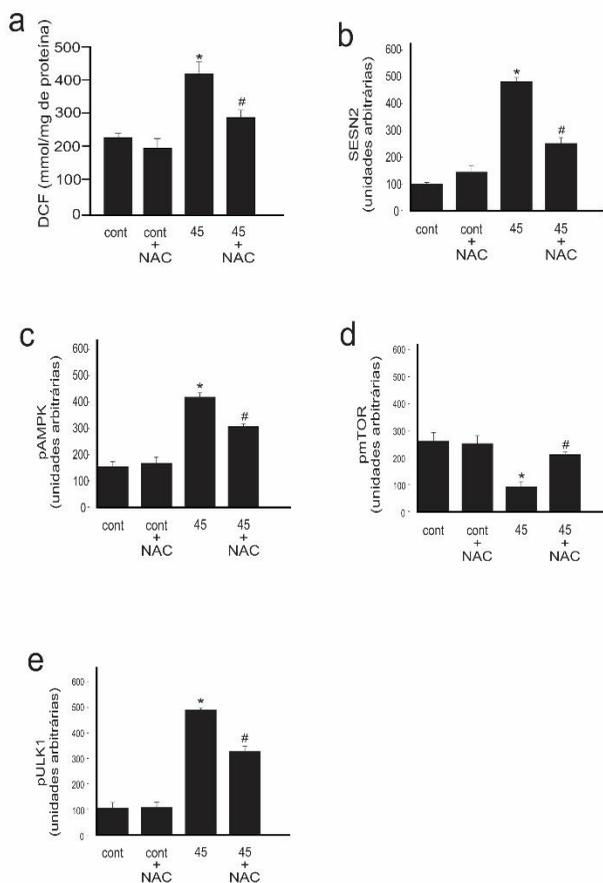


Figura 7A. DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas estudadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e suplementados com NAC. Níveis de dicloro fluoresceína – DCF (a), níveis proteicos de SESN2 (b), fosforilação da AMPK^{Thr172} (c), fosforilação da mTOR^{Ser2448} (d), fosforilação da ULK^{Ser317} (e). A membrana foi estripada e re-blotada com α -tubulina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para peso úmido do pulmão e DCF, e 5 amostras (pool de pulmão de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça). # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 45 dias (45).

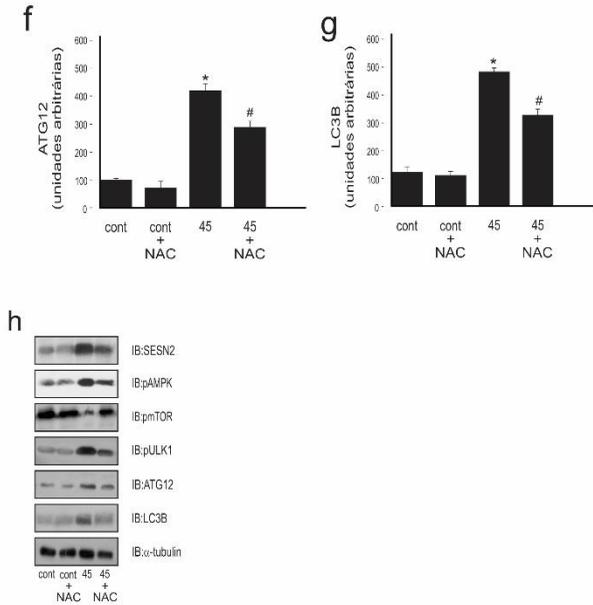


Figura 7B. Fosforilação e níveis proteicos das moléculas estudadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e suplementados com NAC. Níveis proteicos de Atg12 (**f**), níveis proteicos de LC3 II (**g**) e bandas representativas das moléculas (**h**). A membrana foi estripada e reblotada com α -tubulina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para peso úmido do pulmão e DCF, e 5 amostras (*pool* de pulmão de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça). # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 45 dias (45).

4.3 EFEITOS DA CESSAÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS EM DIFERENTES TEMPOS (ETAPA 3)

Observou-se uma redução significativa nos níveis de DCF nos 15, 30 e 45 dias de cessação em relação ao grupo exposto à fumaça de cigarro durante 45 dias (Fig 8a).

Com relação aos níveis proteicos de SESN2 e a fosforilação de AMPK, observou-se diminuição significativa nos tempos 15, 30 e 45 dias de cessação em comparação aos expostos por 45 dias (fig 8b e 8c, respectivamente). Por outro lado, a fosforilação de mTOR apresentou aumento significativo e progressivo nos 15, 30 e 45 dias de cessação em relação aos 45 dias de exposição (fig 8d).

Observou-se uma diminuição significativa da fosforilação da ULK1 na cessação em relação aos 45 dias de exposição (Fig 8e). Com relação aos níveis proteicos de ATG12 e LC3B, pode-se constatar uma redução significativa nos 7 (somente para LC3B), 15, 30 e 45 dias de cessação em comparação aos 45 dias de exposição (Fig 8f e 8g).

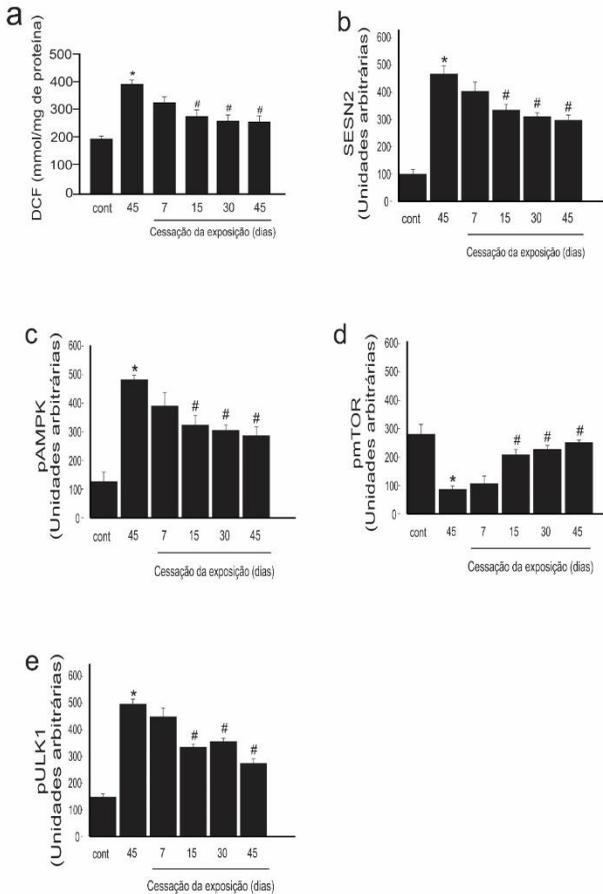


Figura 8A. DCF, fosforilação e níveis proteicos das moléculas estudadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e cessados por 7, 15, 30 e 45 dias. Determinação dos níveis de dicloro fluoresceína – DCF (a), níveis proteicos de SESN2 (b), fosforilação da AMPK^{Thr172} (c), fosforilação da mTOR^{Ser2448} (d), fosforilação da ULK^{Ser317} (e). A membrana foi estripada e re-blotada com α -tubulina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para DCF, e 5 amostras (*pool* de pulmão de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça). # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 45 dias (45).

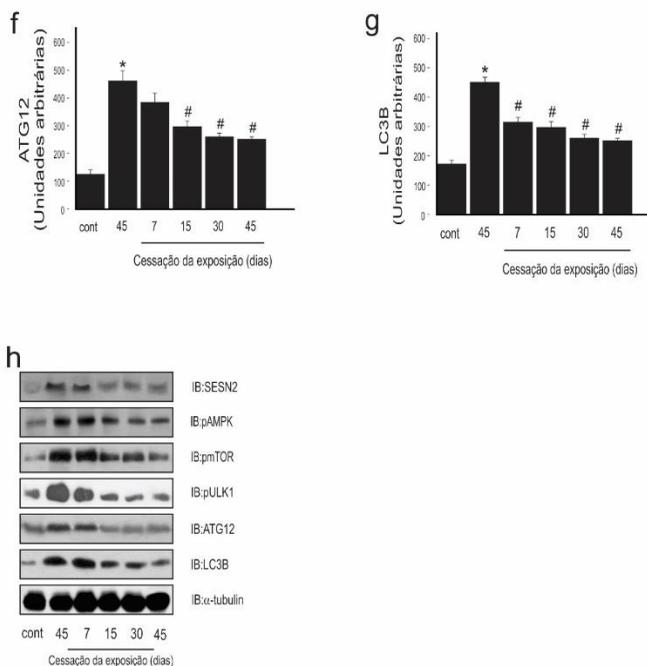


Figura 8B. Fosforilação e níveis proteicos das moléculas estudadas no tecido pulmonar de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e cessados por 7, 15, 30 e 45 dias. Níveis proteicos de Atg12 (**f**), níveis proteicos de LC3 II (**g**) e bandas representativas das moléculas (**h**). A membrana foi estripada e re-blotada com α -tubulina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de 10 amostras por grupo para DCF, e 5 amostras (*pool* de pulmão de 2 camundongos por amostra) para as análises moleculares, * $p < 0,05$ versus grupo controle (cont – não exposto a fumaça). # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 45 dias (45).

5 DISCUSSÃO

O tabagismo é uma das principais causas de morte evitável; é considerado um fator crucial no desenvolvimento de doenças pulmonares crônicas e um importante problema de saúde pública mundial (IBGE, 2013; Rosenberg et al., 2015). A fumaça de cigarro contém inúmeros oxidantes, radicais livres e substâncias químicas altamente lesivas que podem induzir o estresse oxidativo nos pulmões e em outros órgãos levando à morte celular e senescência (Shi et al., 2012; Rahman, 2003). Contudo, muitos estudos ainda são inconclusivos em relação aos mecanismos que levam a alterações moleculares e estruturais. Como recentes pesquisas apontam para o envolvimento da autofagia neste processo (Wen et al, 2013; Malaviya et al, 2014; Aggarwal et al, 2016; Mizumura et al, 2016); o presente estudo teve como objetivo investigar o papel da fumaça de cigarro na via da autofagia. Para isso foi utilizado um modelo animal de exposição à fumaça de cigarro, adaptado de Valença et al. (2004), e Menegali et al. (2009).

Ao avaliar o peso corporal dos animais, detectou-se uma diminuição ponderal significativa ao longo dos dias de exposição. A relação entre o tabagismo e o peso corporal, já está bem consolidada na literatura, e inúmeros mecanismos podem estar envolvidos neste processo (Grunberg, 1982; Wager-Srdar et al., 1984; Levin et al., 1987; Grunberg et al., 1988; Perkins, 1992). Indivíduos que fumam apresentam frequentemente uma redução do índice de massa corporal em comparação a indivíduos não fumantes e há evidências de uma relação inversa entre perda de peso e cessação. Um dos mecanismos de ação parece ser mediado pela nicotina. Em um estudo experimental de Chen e colaboradores (2005), realizado com camundongos Balb/C de oito

semanas expostos à fumaça de cigarro, foi apontada uma redução significativa ponderal e uma diminuição da ingestão alimentar evidente já nos 2 dias de exposição, sendo que este achado corrobora com o presente estudo, onde a redução de peso foi significativa aos 7 dias de exposição à fumaça de cigarro. Um outro trabalho de Carlos e colaboradores, (2014) realizado com camundongos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro através de um protocolo equivalente ao do presente estudo, observaram uma diminuição significativa do peso corporal após 30, 45 e 60 dias de exposição em comparação aos valores basais, sendo estes achados semelhantes aos encontrados no estudo atual.

A redução do apetite e a diminuição ponderal com a exposição à fumaça é consistente com achados em seres humanos e com vários estudos experimentais que utilizaram a administração de nicotina (Grunberg 1982, Bishop, Parker et al. 2002, Bellinger, Cepeda-Benito et al. 2003). Em uma recente revisão, Harris et al. (2016) apontam que a fumaça do cigarro e a nicotina promovem alterações de peso corporal decorrentes de mudanças no metabolismo da glicose, resultantes da ativação da lipase lipoproteica que promove a degradação dos triglicérides em ácidos graxos livres; da ativação do sistema nervoso simpático e de outras alterações que podem levar ao aumento do consumo de energia e conseqüentemente à perda de peso. Em adição, um estudo de Mineur et al., (2011) revelou que a nicotina age de forma agonista sobre o sistema nervoso central através da ativação da via hipotalâmica, reduzindo a ingestão alimentar, o ganho de peso e o índice de massa corporal.

Considerando que os pulmões são alvos primários e suscetíveis ao dano oxidativo causado pelo tabagismo, os níveis das espécies reativas

de oxigênio (ERO) foi avaliado (através do DCFH) no tecido pulmonar nos diferentes tempos de exposição. O presente estudo demonstrou um aumento significativo da oxidação do DCFH nos 30, 45 e 60 dias de exposição. Estudo de Raza et al. (2013) expôs camundongos BALB/C à 9 cigarros diários por 4 dias, e foi observado um aumento de ERO (também mensurado pelo DCFH) no tecido pulmonar em comparação ao controle. Em adição, um estudo realizado por Carlos e colaboradores (2014) onde foram utilizados camundongos C57BL/6, também foi relatado um aumento significativo das ERO a partir do sétimo dia de exposição à fumaça de cigarro e que se manteve até os 60 dias. Este mesmo estudo comprovou o dano oxidativo pulmonar através do aumento dos níveis de TBARS e carbonilas, e diminuição dos níveis de sulfidrilas no tecido pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarro em um protocolo foi muito semelhante ao do presente estudo, o que pode ter ocorrido na atual pesquisa, porém esses dados não foram avaliados.

Com o objetivo de verificar as alterações no estado redox celular e na autofagia, os camundongos foram suplementados com NAC, na quantidade de 60 mg/Kg administrada em uma única dose diária e os resultados mostraram uma redução significativa dos níveis de DCF, após 45 dias de exposição + NAC em comparação aos 45 dias sem NAC. Esse resultado era esperado uma vez que a NAC é uma poderosa molécula tiolica com propriedades antioxidantes. A ação antioxidante da NAC é conferida diretamente através dos seus três grupos sulfidrilas que atuam como elétrons na neutralização de radicais livres, e indiretamente através do reabastecimento dos níveis intracelulares de glutatona (GSH) (Matera et al., 2016). No sistema respiratório a proteção antioxidante é garantida principalmente pela GSH presente no tecido epitelial através da mudança

da forma reduzida para a oxidada, sendo após convertida novamente para a forma reduzida pela enzima glutathione reductase (Kim, Lee et al. 2013; Sanguinetti, 2015). O aumento dos níveis de GSH pode ter reduzido a quantidade de H_2O_2 , justificando a diminuição dos níveis de DCF no presente estudo.

Objetivando comprovar através de uma segunda estratégia metodológica que o estado redox estava envolvido no processo autofágico e sabendo que a cessação reduziria os níveis de ERO, numa terceira etapa, os camundongos foram expostos à fumaça de cigarro por 45 dias e em seguida ao processo de cessação da exposição por diferentes tempos.

Identificou-se no presente estudo uma diminuição significativa dos níveis de DCF nos 15, 30 e 45 dias de cessação à fumaça de cigarro, em comparação com os 45 dias de exposição, o que comprova uma diminuição dos níveis de ERO devido ao possível aumento dos níveis de antioxidantes sintetizados no período de cessação. Estudos clínicos realizados em longos períodos de exposição à fumaça de cigarro, têm demonstrado peroxidação lipídica sistêmica, depleção de antioxidantes no plasma e elevação das respostas inflamatórias teciduais (Yanbaeva et al., 2007), porém as moléculas-chaves responsáveis por interromper esse processo ainda não são bem compreendidas. Em um estudo randomizado e controlado realizado com 434 indivíduos tabagistas após a cessação do hábito tabágico, foi observado um aumento significativo dos níveis de GSH nos indivíduos ex-tabagistas após 12 meses, em comparação aos que continuaram fumando, confirmando que houve uma redução do estresse oxidativo após a cessação do tabagismo (Mons et al., 2016). Em um estudo de Wozniak et al. (2013) realizado com 73 indivíduos fumantes com DPOC que foram submetidos a um programa de cessação do

tabagismo, 35 tabagistas sem DPOC e 35 indivíduos não tabagistas saudáveis (grupo controle), onde foram avaliadas amostras de sangue após o primeiro, segundo e terceiro mês de abstinência tabágica, foi identificada uma diminuição significativa dos biomarcadores de peroxidação lipídica e aumento da atividade de SOD e GPx após 2 e 3 meses de cessação em comparação ao grupo controle, o que comprova uma diminuição do estresse oxidativo com a cessação. Um estudo de Polidori et al. (2003) identificaram uma concentração de antioxidantes diminuída no plasma de indivíduos tabagistas sem doença pulmonar antes do período da cessação e que se restabeleceu após 4 semanas de abstinência.

Ao avaliar os níveis proteicos de SESN2 no tecido pulmonar, percebeu-se um aumento significativo nos 30, 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro. Um recente estudo de Heidler et al. (2013) realizado com camundongos *knockout* para SESN2 expostos à fumaça de cigarro 6 horas por dia durante 5 dias da semana por 8 meses, demonstrou que a inativação de SESN2 protegeu o animal do desenvolvimento do enfisema pulmonar induzido pela fumaça de cigarro. Por outro lado, os mesmos autores observaram uma superexpressão de SESN2 em pulmões de indivíduos tabagistas e especialmente em pulmões de indivíduos com DPOC avançada em comparação com indivíduos saudáveis fumantes sem doença pulmonar. A SESN2 pertence à família das proteínas antioxidantes altamente conservadas, e apesar de não possuir atividade antioxidante catalítica intrínseca, exerce um papel importante na supressão de ERO (Rhee e Bae, 2015). Acredita-se que em mamíferos a SESN2 reduza o estresse oxidativo resgatando a atividade peroxidase das peroxiredoxinas (Budanov et al., 2004) e através da ativação do fator de

transcrição NRF2 (Bae et al., 2013). Há evidências ainda de que após estímulos, o aumento de SESN2 pode ativar a AMPK resultando em uma regulação negativa da mTOR (Lee et al., 2010).

No presente estudo observou-se uma redução dos níveis proteicos de SESN2, fosforilação da AMPK e aumento da fosforilação da mTOR no grupo exposto à fumaça de cigarro por 45 dias e suplementado com NAC. Sugere-se que após a suplementação com NAC, houve um aumento da atividade antioxidante celular e concomitantemente uma diminuição dos níveis proteicos de SESN2, por ser uma molécula que participa na redução dos níveis de ERO. Kim et al. (2013), ao tratarem células de câncer de cólon com quercetina e quercetina + NAC, observaram que nas células tratadas somente com quercetina, houve um incremento da apoptose e da geração de ERO que foi responsável pelo aumento da expressão de SESN2 e que a mesma foi acompanhada da ativação da AMPK. Nas células tratadas concomitantemente com NAC, os autores detectaram uma diminuição de SESN2, da expressão de p53 e da fosforilação da AMPK induzindo a ativação de mTOR. Os pesquisadores ainda identificaram que a atividade da mTOR induzida pela SESN2, foi dependente da fosforilação da AMPK. Verificou-se na presente tese, um comportamento inverso entre a mTOR e AMPK e que foi dependente do tempo, achado que já era esperado. Observou-se que houve um aumento da expressão da SESN2 com maior fosforilação da AMPK e menor fosforilação de mTOR. Foi demonstrado no estudo de Kim et al. (2011) que a AMPK pode regular a autofagia juntamente com a mTOR através da fosforilação direta de ULK1 em condições de privação de nutrientes. Com relação à cessação da exposição à FC, o presente estudo detectou uma diminuição dos níveis de ERO confirmada

pela diminuição dos níveis de DCF a partir dos 15 dias de cessação e dos níveis proteicos de SESN2, demonstrando que essa proteína participa dos processos redox celulares. Foi constatada também uma diminuição significativa da fosforilação da AMPK nos 15, 30 e 45 dias de cessação e como esperado, houve um aumento da fosforilação da mTOR que foi significativo nos 15, 30 e 45 dias de cessação.

Em um trabalho realizado por Furlong e colaboradores (2015) com o objetivo de avaliar a via autofágica em homogeneizados ovarianos de camundongos expostos à fumaça de cigarro, foi detectada uma diminuição significativa da mTOR em contraste com um aumento significativo da AMPK em comparação com o grupo controle, o que foi consistente com os achados do presente estudo apesar da distinção celular entre ambos. A autofagia ocorre a partir de uma interação entre AMPK e mTOR através da fosforilação coordenada de ULK1 (Kim et al., 2011; Roach, 2011). No presente estudo, observou-se aumento da fosforilação da ULK1 nos 30, 45 e 60 dias de exposição comparado ao grupo controle, que pode ter ocorrido através da inibição da mTOR, tornando-a ativa, ou da ativação direta pela AMPK. A ULK1 é uma enzima *downstream* da mTOR que regula a nucleação da membrana do fagóforo e que é o antecessor do autofagossoma, sendo sua ativação crucial para a iniciação da autofagia (Choi et al., 2013). Após o alongamento do fagóforo, é imprescindível a formação de um segundo complexo: LC3 – PE para que aconteça o sequestro dos componentes celulares a serem degradados (Nakahira et al., 2014). A LC3B é uma proteína frequentemente analisada em estudos experimentais como marcador da formação do autofagossoma (Klionsky et al., 2016). No corrente estudo, identificou-se uma elevação significativa dos níveis proteicos de ATG12 e LC3B nos 30, 45 e 60 dias

de exposição quando comparado com o grupo controle, demonstrando que houve um aumento das moléculas envolvidas no início do processo autofágico. Em um estudo realizado com extrato de fumaça de cigarro (EFC) em cultura de células epiteliais de Zhu et al. (2013), observaram um aumento importante da expressão de LC3B-I e LC3B-II e que esta elevação foi dose e tempo dependente. Estudo de Chen e colaboradores (2008) mostrou uma alteração na autofagia que foi confirmada através do aumento dos níveis LC3B-II/I, e das proteínas ATG4, AT5-ATG12 e ATG7, além do incremento dos autofagossomas identificado através dos vacúolos pela microscopia eletrônica (ME) nos pulmões de pacientes com DPOC em comparação com a pequena formação dos vacúolos evidentes nos tecidos do grupo controle. Em adição, esses mesmos autores utilizando cultura de células epiteliais pulmonares humanas *knockdown* para LC3B, observaram uma inibição da autofagia que protegeu as células epiteliais de apoptose induzida pelo extrato da fumaça de cigarro (EFC) e que em animais com deficiência genética de LC3B, houve uma associação com a resistência ao desenvolvimento do enfisema pela exposição à fumaça de cigarro. Em outro estudo, Chen et al. (2010) realizaram um trabalho utilizando ratos *wistar* LC3B^{-/-} e obtiveram uma redução significativa dos níveis de apoptose e resistência ao enfisema em tecido pulmonar após a exposição de fumaça de cigarro.

No presente estudo identificou-se uma diminuição da fosforilação da ULK1, dos níveis proteicos de ATG12 nos tempos 15, 30 e 45 dias e LC3B nos tempos 7, 15, 30 e 45 dias de cessação da exposição à fumaça de cigarro, o que aponta para uma diminuição da autofagia. Em um estudo de Lam et al. (2010) ao avaliar o estado estável dos níveis de LC3B em homogeneizados de pulmão enriquecidos com lisossomos,

identificaram um aumento *in vivo* da degradação de LC3B que foi sensível a um inibidor de protease e que o mesmo foi dependente do tempo, pois persistiu até 24 horas após a exposição à FC, revelando que a fumaça de cigarro causa um aumento acumulativo do fluxo autofágico no tecido pulmonar. Por fim, os resultados sugerem que o aumento dos níveis de ERO ocasionado pela exposição à fumaça de cigarro gerou um incremento dos níveis proteicos de SESN2, que consequentemente aumentou a fosforilação de AMPK tornando-a ativa, levando à autofagia a partir da inibição da mTOR e ativação da ULK1, e que esses eventos podem ser minimizados através da suplementação com a NAC.

O presente estudo é o primeiro a relatar uma diminuição da autofagia com a cessação da exposição à fumaça de cigarro, de fato, este evento pode ser extrapolado às prováveis alterações do tecido pulmonar decorrentes da autofagia exacerbada em seres humanos, e futuramente gerar novas pesquisas para uma melhor compreensão deste processo e o impacto do mesmo sobre o manejo da doença. A literatura ainda é discordante em relação ao processo autofágico. Especula-se que com a exposição à fumaça de cigarro e na doença pulmonar crônica, a autofagia pode ser vantajosa ou deletéria dependendo do tipo celular e da intensidade do estímulo, porém, muitos estudos apontam para um desequilíbrio deste processo que pode influenciar na manutenção da inflamação e da integridade do tecido pulmonar que se perpetua mesmo após a cessação do hábito tabágico.

Sugere-se mais estudos que envolvam outras moléculas para melhor compreensão deste processo.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo evidenciou que a exposição à fumaça de cigarro resultou no aumento das espécies reativas de oxigênio que levou à modulação da autofagia através das moléculas AMPK, mTOR e ULK1 no tecido pulmonar de camundongos *Swiss*. Com relação aos efeitos da exposição à fumaça de cigarro, foi evidenciado um acréscimo da fosforilação da AMPK e diminuição da fosforilação da mTOR que foi dependente do aumento dos níveis proteicos de SESN2. Foi observado também um aumento da fosforilação de ULK1 e dos níveis proteicos de ATG12 e LC3B.

Com a suplementação de NAC e a cessação da exposição à fumaça de cigarro observou-se diminuição da fosforilação da AMPK e um aumento da fosforilação da mTOR que foi dependente da diminuição dos níveis proteicos de SESN2. Com relação às moléculas envolvidas no processo autofágico, observou-se um aumento da fosforilação de ULK1 e dos níveis proteicos de ATG12 e LC3B.

As alterações moleculares após o uso concomitante de NAC e a estratégia da cessação reforçaram ainda mais a possível participação das espécies reativas de oxigênio no processo de ativação da autofagia em tecido pulmonar de camundongos expostos à fumaça de cigarro.

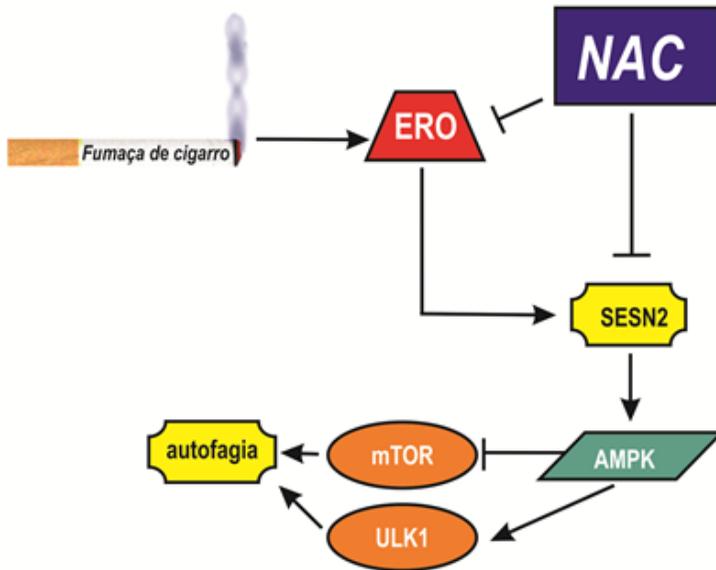


Figura 9. Conclusão esquemática: as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pela exposição à fumaça de cigarro, ocasionou um aumento da fosforilação de AMPK tornando-a ativa, que oi dependente do aumento dos níveis proteicos de SESN2 levando à autofagia a partir da inibição da mTOR e/ou por ativação da ULK1, e que esses achados foram prevenidos com a suplementação de NAC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade Júnior DR, Souza RB, Santos SA, Andrade DR. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2005;31:60-8.
- Asevedo E, Mendes AC, Berk M, Brietzke E. Systematic review of N-acetylcysteine in the treatment of addictions. *Revista Brasileira de Psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*. 2014;36(2):168-75.
- Astrinidis A, Cash TP, Hunter DS, Walker CL, Chernoff J, Henske EP. Tuberin, the tuberous sclerosis complex 2 tumor suppressor gene product, regulates Rho activation, cell adhesion and migration. *Oncogene*. 2002;21(55):8470-6.
- Azambuja R, Bettencourt M, Costa CH, Rufino R. Panorama da doença pulmonar obstrutiva crônica. *Revista HUPE*. 2013;12(2):13-8.
- Bae SH, Sung SH, Oh SY, Lim JM, Lee SK, Park YN, et al. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metabolism*. 2013;17(1):73-84.
- Barbosa VA, Luciano TF, Marques SO, Vitto MF, Souza DR, Silva LA, et al. Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species. *International Journal of Cardiology*. 2013;167(6):2983-8.
- Bellinger L, Cepeda-Benito A, Wellman PJ. Meal patterns in male rats during and after intermittent nicotine administration. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 2003;74(2):495-504.
- Bishop C, Parker GC, Coscina DV. Nicotine and its withdrawal alter feeding induced by paraventricular hypothalamic injections of neuropeptide Y in Sprague-Dawley rats. *Psychopharmacology*. 2002;162(3):265-72.
- Bridgeman MM, Marsden M, MacNee W, Flenley DC, Ryle AP. Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax*. 1991;46(1):39-42.
- Boutten A, Goven D, Boczkowski J, Bonay M. Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 2010;14(3):329-46.
- Bouzid MA, Filaire E, McCall A, Fabre C. Radical Oxygen Species, Exercise and Aging: An Update. *Sports Medicine (Auckland, NZ)*. 2015;45(9):1245-61.

- Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science (New York, NY)*. 2004;304(5670):596-600.39.
- Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008;134(3):451-60.
- Cai S, Chen P, Zhang C, Chen JB, Wu J. Oral N-acetylcysteine attenuates pulmonary emphysema and alveolar septal cell apoptosis in smoking-induced COPD in rats. *Respirology (Carlton, Vic)*. 2009;14(3):354-9.
- Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008;27(16):2276-88.
- Carlos SP, Dias AS, Forgiarini Júnior LA, Patricio PD, Graciano T, Nesi RT, et al. Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2014;40:411-20.
- Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*. 2004;29(1):18-24.
- Chen ZH, Lam HC, Jin Y, Kim HP, Cao J, Lee SJ, et al. Autophagy protein microtubule-associated protein 1 light chain-3B (LC3B) activates extrinsic apoptosis during cigarette smoke-induced emphysema. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(44):18880-5.
- Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death and Differentiation*. 2008;15(1):171-82.
- Chen H, Vlahos R, Bozinovski S, Jones J, Anderson GP, Morris MJ. Effect of short-term cigarette smoke exposure on body weight, appetite and brain neuropeptide Y in mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2005;30(4):713-9.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):651-62.
- Comhair SA, Erzurum SC. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. *American journal of physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2002;283(2):L246-55.
- Corradetti MN, Guan KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. 2006;25(48):6347-60.
- Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2007;28(5):601-8.

- Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1):47-95.
- Ekman S, Wynes MW, Hirsch FR. The mTOR pathway in lung cancer and implications for therapy and biomarker analysis. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2012;7(6):947-53.
- Ellisen LW. Smoking and emphysema: the stress connection. *Nature Medicine*. 2010;16(7):754-5.
- Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Experimental and toxicologic pathology : Official Journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2008;60(1):77-85.
- Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8204-9.
- Fielhaber JA, Carroll SF, Dydensborg AB, Shourian M, Triantafillopoulos A, Harel S, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin augments lipopolysaccharide-induced lung injury and apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188(9):4535-42.
- Furlong HC, Stampfli MR, Gannon AM, Foster WG. Cigarette smoke exposure triggers the autophagic cascade via activation of the AMPK pathway in mice. *Biology of Reproduction*. 2015;93(4):93.
- GOLD - Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease Pocket Guide to COPD Diagnosis, Management and Prevention, Updated 2015.
- Goldkorn T, Filosto S, Chung S. Lung injury and lung cancer caused by cigarette smoke-induced oxidative stress: Molecular mechanisms and therapeutic opportunities involving the ceramide-generating machinery and epidermal growth factor receptor. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;21(15):2149-74.
- Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, et al. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(41):30107-19.
- Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in Molecular Medicine*. 2005;11(8):353-61.
- Grunberg NE, Popp KA, Bowen DJ, Nespor SM, Winders SE, Eury SE. Effects of chronic nicotine administration on insulin, glucose, epinephrine, and norepinephrine. *Life Sciences*. 1988;42(2):161-70.

- Grunberg NE. The effects of nicotine and cigarette smoking on food consumption and taste preferences. *Addictive Behaviors*. 1982;7(4):317-31.
- Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003;144(12):5179-83.
- Harris KK, Zopey M, Friedman TC. Metabolic effects of smoking cessation. *Nature reviews Endocrinology*. 2016;12(11):684.
- Hay N. Interplay between FOXO, TOR, and Akt. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011;1813(11):1965-70.
- Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development*. 2004;18(16):1926-45.
- Heidler J, Fysikopoulos A, Wempe F, Seimetz M, Bangsow T, Tomasovic A, et al. Sestrin-2, a repressor of PDGFRbeta signalling, promotes cigarette-smoke-induced pulmonary emphysema in mice and is upregulated in individuals with COPD. *Disease Models & Mechanisms*. 2013;6(6):1378-87.
- Henze K, Martin W. Evolutionary biology: essence of mitochondria. *Nature*. 2003;426(6963):127-8.
- Hu Y, Zhang Z, Yang C. The determination of hydrogen peroxide generated from cigarette smoke with an ultrasensitive and highly selective chemiluminescence method. *Analytica Chimica Acta*. 2007;601(1):95-100.
- Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *Journal of Cell Science*. 2007;120(Pt 15):2479-87.
- Hwang JW, Rajendrasozhan S, Yao H, Chung S, Sundar IK, Huyck HL, et al. FOXO3 deficiency leads to increased susceptibility to cigarette smoke-induced inflammation, airspace enlargement, and chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;187(2):987-98.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde (PNS). Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013/>. Acesso em: 10/09/16.
- Itoh M, Tsuji T, Nakamura H, Yamaguchi K, Fuchikami J, Takahashi M, et al. Systemic effects of acute cigarette smoke exposure in mice. *Inhalation Toxicology*. 2014;26(8):464-73.
- Jegal KH, Ko HL, Park SM, Byun SH, Kang KW, Cho IJ, et al. Eupatilin induces Sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress.

- Apoptosis : an International Journal on Programmed Cell Death. 2016;21(5):642-56.
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radical Biology & Medicine*. 2012;52(1):1-6.
- Khayyat A, Tobwala S, Hart M, Ercal N. N-acetylcysteine amide, a promising antidote for acetaminophen toxicity. *Toxicology letters*. 2016;241:133-42.
- Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2006;8(1-2):152-62.
- Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
- Kwiatkowski DJ, Manning BD. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Human Molecular Genetics*. 2005;14 Spec No. 2:R251-8.
- Lam HC, Cloonan SM, Bhashyam AR, Haspel JA, Singh A, Sathirapongsasuti JF, et al. Histone deacetylase 6-mediated selective autophagy regulates COPD-associated cilia dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(12):5212-30.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
- Lee JH, Budanov AV, Karin M. Sestrins orchestrate cellular metabolism to attenuate aging. *Cell Metabolism*. 2013;18(6):792-801.
- Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, et al. Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science (New York, NY)*. 2010;327(5970):1223-8.
- Levin ED, Morgan MM, Galvez C, Ellison GD. Chronic nicotine and withdrawal effects on body weight and food and water consumption in female rats. *Physiology & Behavior*. 1987;39(4):441-4.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 1951;193(1):265-75.
- Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Oxidative stress-induced autophagy: role in pulmonary toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2014;275(2):145-51.
- Mascarenhas J, Bettencourt P, Azevedo A. Clinical Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Arquivos de Medicina*. 2011;25:146-52.

- Matera MG, Calzetta L, Cazzola M. Oxidation pathway and exacerbations in COPD: the role of NAC. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2016;10(1):89-97.
- Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valenca SS, et al. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 2009;22(6):567-73.
- Mineur YS, Abizaid A, Rao Y, Salas R, DiLeone RJ, Gundisch D, et al. Nicotine decreases food intake through activation of POMC neurons. *Science (New York, NY)*. 2011;332(6035):1330-2.
- Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Emerging role of selective autophagy in human diseases. *Frontiers in Pharmacology*. 2014;5:244.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
- Mons U, Muscat JE, Modesto J, Richie JP, Jr., Brenner H. Effect of smoking reduction and cessation on the plasma levels of the oxidative stress biomarker glutathione--Post-hoc analysis of data from a smoking cessation trial. *Free radical Biology & Medicine*. 2016;91:172-7.
- Nakahira K, Cloonan SM, Mizumura K, Choi AM, Ryter SW. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2014;20(3):474-94.
- Patel AS, Morse D, Choi AM. Regulation and functional significance of autophagy in respiratory cell biology and disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;48(1):1-9.
- Perng DW, Chang TM, Wang JY, Lee CC, Lu SH, Shyue SK, et al. Inflammatory role of AMP-activated protein kinase signaling in an experimental model of toxic smoke inhalation injury. *Critical Care Medicine*. 2013;41(1):120-32.
- Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Sies H. Cigarette smoking cessation increases plasma levels of several antioxidant micronutrients and improves resistance towards oxidative challenge. *The British Journal of Nutrition*. 2003;90(1):147-50.
- Rabahi M. *Epidemiologia da DPOC: Enfrentando Desafios*. Pulmão RJ. 2013;22(2):4-8.
- Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *The European Respiratory Journal*. 2006;28(1):219-42.
- Rahman I. Oxidative stress, chromatin remodeling and gene transcription in inflammation and chronic lung diseases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 2003;36(1):95-109.

- Raza H, John A, Nemmar A. Short-term effects of nose-only cigarette smoke exposure on glutathione redox homeostasis, cytochrome P450 1A1/2 and respiratory enzyme activities in mice tissues. *Cellular physiology and biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. 2013;31(4-5):683-92.
- Reddy NM, Kleeberger SR, Bream JH, Fallon PG, Kensler TW, Yamamoto M, et al. Genetic disruption of the Nrf2 compromises cell-cycle progression by impairing GSH-induced redox signaling. *Oncogene*. 2008;27(44):5821-32.
- Rhee SG, Bae SH. The antioxidant function of sestrins is mediated by promotion of autophagic degradation of Keap1 and Nrf2 activation and by inhibition of mTORC1. *Free Radical Biology & Medicine*. 2015;88(Pt B):205-11.
- Roach PJ. AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Molecular and Cellular Biology*. 2011;31(15):3082-4.
- Rosenberg SR, Kalhan R, Mannino DM. Epidemiology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Prevalence, Morbidity, Mortality, and Risk Factors. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015;36(4):457-69.
- Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, et al. Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Medical science monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2010;16(7):Br218-26.
- Ryter SW, Lee SJ, Choi AM. Autophagy in cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Review of Respiratory Medicine*. 2010;4(5):573-84.
- Sanguinetti CM. N-acetylcysteine in COPD: why, how, and when? *Multidisciplinary Respiratory Medicine*. 2015;11:8.
- Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current Biology : CB*. 2004;14(14):1296-302.
- Sangani RG, Ghio AJ. Lung injury after cigarette smoking is particle related. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2011;6:191-8.
- Shang L, Wang X. AMPK and mTOR coordinate the regulation of Ulk1 and mammalian autophagy initiation. *Autophagy*. 2011;7(8):924-6.
- Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*. 2007;26(7):1749-60.

- Shi J, Yin N, Xuan LL, Yao CS, Meng AM, Hou Q. Vam3, a derivative of resveratrol, attenuates cigarette smoke-induced autophagy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2012;33(7):888-96.
- Shirwany NA, Zou MH. AMPK: a cellular metabolic and redox sensor. A minireview. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*. 2014;19:447-74.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiological Reviews*. 2009;89(3):1025-78.
- Storz P. Forkhead homeobox type O transcription factors in the responses to oxidative stress. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;14(4):593-605.
- Takasaka N, Araya J, Hara H, Ito S, Kobayashi K, Kurita Y, et al. Autophagy induction by SIRT6 through attenuation of insulin-like growth factor signaling is involved in the regulation of human bronchial epithelial cell senescence. *Journal of Immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2014;192(3):958-68.
- Tse HN, Raiteri L, Wong KY, Yee KS, Ng LY, Wai KY, et al. High-dose N-acetylcysteine in stable COPD: the 1-year, double-blind, randomized, placebo-controlled HIACE study. *Chest*. 2013;144(1):106-18.
- Tse HN, Tseng CZ. Update on the pathological processes, molecular biology, and clinical utility of N-acetylcysteine in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 2014;9:825-36.
- Tuder RM, Petrache I. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2012;122(8):2749-55.
- Valença SS, Porto LC. Estudo imunohistoquímico do remodelamento pulmonar em camundongos expostos à fumaça de cigarro. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2008;34:787-95.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
- Van der Vaart H, Postma DS, Timens W, ten Hacken NH. Acute effects of cigarette smoke on inflammation and oxidative stress: a review. *Thorax*. 2004;59(8):713-21.
- Vlahos R, Bozinovski S. Recent advances in pre-clinical mouse models of COPD. *Clinical Science (London, England : 1979)*. 2014;126(4):253-65.
- Viollet B, Horman S, Leclerc J, Lantier L, Foretz M, Billaud M, et al. AMPK inhibition in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 2010;45(4):276-95.

- Wager-Srdar SA, Levine AS, Morley JE, Hoidal JR, Niewoehner DE. Effects of cigarette smoke and nicotine on feeding and energy. *Physiology & Behavior*. 1984;32(3):389-95.
- Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999;27(5-6):612-6.
- Wen X, Wu J, Wang F, Liu B, Huang C, Wei Y. Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology & Medicine*. 2013;65:402-10.
- WHO. World Health Organization. Report on the Global Tobacco Epidemic, 2013
- Wozniak A, Gorecki D, Szpinda M, Mila-Kierzenkowska C, Wozniak B. Oxidant-antioxidant balance in the blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease after smoking cessation. *Oxidative Medicine and Cellular longevity*. 2013;2013:897075.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 2006;124(3):471-84.

ANEXO 1



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 001/2013-2

Professor Responsável: Cláudio Teodoro de Souza.

Equipe: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thaís Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Título: "AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E MOLECULARES DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS: PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E AMPK".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 420 Camundongo heterogêneo Swiss 30 dias 20-25g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 001/2013-2

Principal Investigator: Cláudio Teodoro de Souza.

Researchers: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thaís Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Project title: "EVALUATION OF METABOLIC AND MOLECULAR ALTERATIONS TO CIGARETTE SMOKE ESPOSURE IN DIFFERENT TISSUES OF LEAN AND OBESE MICE: ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND AMPK".

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.

Criciúma, 06 de agosto de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA