

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
CURSO DE FISIOTERAPIA**

**SAMANTA PORTÃO DE CARLOS**

**DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS  
POR MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA  
DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

**CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.**

**SAMANTA PORTÃO DE CARLOS**

**DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS  
POR MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA  
DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para obtenção do Grau de Bacharel, no Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Orientador: Profº Dr. Ricardo Aurino de Pinho

Co-Orientador: Profº Dr. Garpar R. da S. Chiappa

**CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.**



**SAMANTA PORTÃO DE CARLOS**

**DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS POR  
MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO  
EM CAMUNDONGOS**

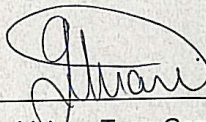
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
para Obtenção do Grau de Fisioterapeuta, no  
Curso de Fisioterapia da Universidade do  
Extremo Sul Catarinense, UNESC.

Criciúma, junho de 2011.

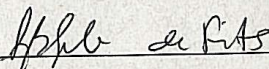
**BANCA EXAMINADORA**



**Presidente Prof. MSc. Luciano Acordi**  
(Representante Prof. Dr. Ricardo Pinho)



Profª. Dra. Lisiane Tuon Generoso Bitencourt



Profª. Dra. Luciana Sperb de Freitas

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Deus, pela conquista de mais uma etapa vencida em minha vida.

Agradeço aos meus Pais, Jaqueline e Roberto por me proporcionarem esta oportunidade em minha vida, e por ser quem mais me deu apoio, juntamente com meu irmão Gustavo.

Agradeço ao meu namorado Lucas por estar comigo nas horas boas e difíceis, de desânimo, e por sempre dedicar seu tempo em conselhos nos momentos de dúvida. Juntamente com sua família, me proporcionaram muitos momentos que jamais esquecerei.

Agradeço ao meu orientador Ricardo Pinho, que dedicou seu pouco tempo à este trabalho de última hora. Muito obrigada pela dedicação nestes últimos meses. Ao meu ex-orientador e agora Co-orientador Gaspar Chiappa, por confiar e acreditar em mim, e nos proporcionar este conhecimento que levarei ao resto de minha vida, obrigada pelos momentos mais divertidos nesses dois anos.

Ao quarteto fantástico (Pati, Preta e Thai), que dividimos por muito tempo as angústias, tristezas, stress, e tarefas, mas também dividimos alegrias, risadas, segredos, muitas tarefas. Vocês estarão comigo para sempre.

**“A parte que ignoramos é muito maior que tudo quanto sabemos.”**

**Platão**

## SUMÁRIO

Capítulo I – Projeto de pesquisa .....	7
Capítulo II – Artigo Científico.....	38
Capítulo III – Normas da Revista.....	54

## **CAPÍTULO I – PROJETO DE PESQUISA**

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC  
CURSO DE FISIOTERAPIA**

**SAMANTA PORTÃO DE CARLOS**

**DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS  
POR MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA  
DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

**CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.**

**SAMANTA PORTÃO DE CARLOS**

**DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS  
POR MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA  
DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS**

Projeto de pesquisa, encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa pela acadêmica Samanta Portão de Carlos do Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Gaspar Chiappa

**CRICIÚMA, JUNHO DE 2011.**

## RESUMO

Os efeitos induzidos pelo cigarro estão intimamente ligados ao desenvolvimento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e aos seus efeitos secundários como o comprometimento muscular. Em condições normais, os músculos respiratórios e periféricos são adequadamente equipados para realizar suas respectivas funções na respiração e no movimento, porém a disfunção destas duas musculaturas é reconhecida como a maior manifestação sistêmica da DPOC. A fumaça do cigarro contém substâncias químicas e gases reativos com altas concentrações de radicais livres e outros oxidantes que estão diretamente relacionados com a patogênese das doenças pulmonares. O objetivo do presente estudo será avaliar o dano pulmonar e as alterações musculares induzidas por modelo de estratificação de exposição à fumaça de cigarro em camundongos. Para tal, 36 camundongos C57BL-6 machos, com 3 meses de idade, pesando entre 25 a 30g serão randomizados em 6 grupos (n=6): EC: Estratificação controle; E7: Estratificação 7 dias; E15: Estratificação 15 dias; E30: Estratificação 30 dias; E45: Estratificação 45 dias; E60: Estratificação 60 dias. O dano pulmonar será causado com exposição à fumaça de cigarro com 4 cigarros/sessão, 3x/dia, 7dias/semana, sendo o tempo de exposição de cada grupo de acordo com os dias especificados na sua classificação. Quarenta e oito horas após o último procedimento, os animais serão mortos para retirada dos músculos quadríceps e diafragma e o pulmão direito. Após remoção, uma alíquota de cada estrutura será homogeneizada, em tampão específico, para análise de proteínas intracelulares pela técnica Westernblotting como descrito a seguir. O restante será estocado em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e histológicas. Os danos oxidativos em biomoléculas serão avaliados pelos processos de lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, e conteúdo total de sulfidril. O sistema de defesa antioxidante pela atividade e expressão das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX), e o metabolismo energético muscular através da expressão das proteínas Carnitina Palmitoiltransferase-1 (CPT<sub>1</sub>), Fosfofrutoquinase-1 (PFK<sub>1</sub>), Succinato Desidrogenase (SDH) e Citocromo-C Oxidase (COX).

**Palavras-chave:** Cigarro. Dano pulmonar. Estresse oxidativo.

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

CAT – Catalase  
COX – Citocromo-C Oxidase  
CPT<sub>1</sub> – Carnitina Palmitoiltransferase-1  
DOPC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crnica  
eNOS – Óxido Ntrico Sintase Endotelial  
ERO – Espécies Reativas de Oxignio  
GPX – Glutaciona Peroxidase  
GSH – Glutaciona Reduzida  
GSSG – Glutaciona Oxidada  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrognio  
HADH – 3-hidrociadil-coenzima A Deidrogenase  
HOCl – Ácido Hipocloroso  
iNOS – Óxido Ntrico Sintase Induzível  
MPO – Mieloperoxidase  
nNOS – Óxido Ntrico Sintase Neuronal  
NO<sup>•</sup> – Óxido Ntrico  
O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Superóxido  
OH<sup>•</sup> – Radical Hidroxil  
ONOO<sup>•</sup> – Peroxinitrito  
PFK<sub>1</sub> – Fosfofrutoquinase-1  
SDH – Succionato Desidrogenase  
SOD – Superóxido Dismutase  
VO<sub>2</sub> – Consumo de Oxignio  
XO – Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
1.1 CIGARRO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	14
1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	16
1.3 PARÂMETROS COMPARATIVOS: MÚSCULOS QUADRÍCEPS E DIAFRAGMA .....	17
2 OBJETIVOS .....	20
2.1 OBJETIVO GERAL .....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA.....	21
3.2 JUSTIFICATIVA PARA USO DE ANIMAIS .....	21
3.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA.....	21
3.4 AMOSTRA.....	22
3.5 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO .....	22
3.6 EUTANÁSIA E DESCARTE .....	23
3.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	23
3.8 HOMOGENEIZAÇÃO PARA WESTERNBLOTING .....	24
3.9 ENSAIOS BIOQUÍMICOS .....	24
3.10 ENSAIO HISTOLÓGICO.....	25
3.11 WESTERNBLOT .....	26
3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO .....	27
4 CRONOGRAMA DE ATIVIDADES DE PESQUISA .....	28
5 ORÇAMENTO .....	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	30
ANEXOS .....	36

## 1 INTRODUÇÃO

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) representa um dos principais problemas de saúde no mundo devido ao aumento de sua prevalência, morbidade e mortalidade. É esperada que seja a terceira causa mais comum de morte no mundo em meados de 2020 (FARAMAWY et al., 2009). A DPOC é caracterizada por limitação do fluxo aéreo irreversível, na maioria dos casos, juntamente com uma resposta inflamatória anormal a partículas ou gases. Pacientes podem apresentar bronquite crônica, enfisema, comprometimento de vias aéreas superiores, ou uma combinação destes fatores (WOOD & STOCKLEY, 2006). Fatores causais para a disfunção de músculos respiratórios na DPOC incluem distúrbios nos eletrólitos, hipercapnia, uso prolongado de corticoesteróides, entre outros. A geometria alterada do tórax em enfisemas pulmonares severos também pode comprometer a função da bomba ventilatória do diafragma (HEUNKS & DEKHUIJZEN, 2000) devido à resistência inspiratória aumentada, que leva a fadiga e injúrias estruturais do mesmo (VASSILAKOPOULOS & HUSSAIN, 2007).

Embora a DPOC tenha efeitos primariamente pulmonares, é recentemente conhecido que seus efeitos sistêmicos contribuam significativamente para sua severidade e mortalidade (LÜTHJE et al., 2009), e que estão intimamente relacionados com o fumo de tabaco, inflamações crônicas e estresse oxidativo (LÜTHJE et al., 2009; VASSILAKOPOULOS & HUSSAIN, 2007).

Os efeitos induzidos pelo cigarro estão intimamente ligados a vários distúrbios cardiorrespiratórios como bronquite, enfisema, infarto do miocárdio, cânceres e outros (PANDA et al., 2001), sendo que estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado que a gravidade da doença está diretamente relacionada com a quantidade e o tempo de exposição (CARNEVALI et al., 2003). O dano pulmonar pela fumaça do cigarro é caracterizado pela indução de proteínas inflamatórias incluindo citocinas, fatores de crescimento e moléculas de adesão. Estas moléculas ativam potentes mediadores que alteram as vias aéreas brônquicas, danos no epitélio e acarretam em mudanças fundamentais na estrutura pulmonar (FORONJY & D'ARMIENTO, 2006). Por isso, a fumaça do cigarro é um potente fomentador inflamatório ligado com a severidade do dano pulmonar.

Sendo o cigarro considerado o maior e mais importante fator de risco para o desenvolvimento de danos pulmonares, principalmente a DPOC, evidências mostram que o dano pulmonar causado pela fumaça do cigarro é gerado por um mecanismo complexo de desequilíbrio entre oxidante/antioxidante, pró-inflamatório/anti-inflamatório e protease/antiprotease (BARNES et al., 2003; TUDER et al., 2006; KIM et al., 2008).

### 1.1 CIGARRO E ESTRESSE OXIDATIVO

Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) têm sido implicadas em alguns processos vitais a vida humana e também são fundamentais nos efeitos de danos e na adaptação que acompanham o exercício físico (SACHDEV et al., 2008). Porém, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de ERO e o sistema de defesa antioxidante, ocorre um processo danoso ao organismo conhecido como estresse oxidativo.

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das ERO são produzidas na cadeia respiratória mitocondrial, pela qual 2-5% do oxigênio é desviado para a formação de radicais livres. Entretanto, as ERO podem ser geradas em outros eventos bioquímicos celulares como processos inflamatórios, isquemia/reperfusão, oxidação de catecolaminas, entre outros eventos oxidativos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A fumaça do cigarro contém substâncias químicas e gases reativos com altas concentrações de radicais livres e outros oxidantes que estão diretamente relacionados com a patogênese das doenças pulmonares (VALENÇA et al., 2004; RAHMAN & MACNEE, 1996). Devido a isso, o cigarro tem sido fortemente associado à redução dos sistemas de defesas antioxidantes e conseqüentemente ao estresse oxidativo (BOOTS et al., 2003).

A fumaça do cigarro é constituída por uma mistura de substâncias tóxicas diferentes, apresentando uma fase gasosa e outra particulada. A fase gasosa é composta, entre outros, por monóxido de carbono, amônio, cetonas, formaldeído, acetaldeído e acroleína. A fase particulada contém nicotina, monóxido de carbono e alcatrão, que concentram 43 substâncias cancerígenas, dentre as quais estão o arsênico, níquel, benzo-pireno, cádmio e chumbo (SPADA et al., 2006). De acordo com Duarte (2006), três substâncias se destacam na composição química da

fumaça do cigarro: nicotina, monóxido de carbono e alcatrão. Essas substâncias são oxidantes e podem causar alteração na estrutura (ELSAYED & BENDICH, 2001) e no estado redox pulmonar (GOCHMAN et al., 2007). Estudos demonstram que após a inalação contínua de fumaça de cigarro, macrófagos, neutrófilos e outras células migram para o interstício pulmonar, produzindo ERO, que lesam diretamente a membrana das células intersticiais e do endotélio (GERRITSEN et al., 2005; SADOWSKA et al., 2005; MENEGALI et al., 2009).

Importantes fontes de produção de radicais livres, como o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), são a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria e a xantina oxidase citosólica (XO). O superóxido pode ser convertido a um radical de alta reatividade, o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), ou reagir com o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) resultando na formação de peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ). O dano causado por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem induzir dano em biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, como também podem levar a oxidação de grupos tióis, resultando na modificação da função de proteína, por exemplo (HEUNKS & DEKHUIJZEN, 2000).

A Figura 1 representa um desenho esquemático da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio onde: nNOS = óxido nítrico sintase neuronal; eNOS = óxido nítrico sintase endotelial; iNOS = óxido nítrico sintase induzível;  $H_2O_2$  = peróxido de hidrogênio; MPO = mieloperoxidase; HOCl = ácido hipocloroso; GSH = glutatona reduzida; GSSG = glutatona oxidada.

Como descrito anteriormente, a fumaça do cigarro é um facilitador do estresse oxidativo, pois contém radicais livres que estimulam a produção de novas ERO, como também possui altas concentrações de ferro. O ferro estimula a produção de uma espécie radicalar altamente reativa, a partir de reação conhecida como Reação de Fenton, onde superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) reage com o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), tendo como produto o radical hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ) (JACKSON et al., 1987; RAHMAN & MACNEE, 1996; Liu et al., 2005). O radical hidroxil é considerado o radical mais potente e o maior responsável pelos ataques em fitas de DNA (LIU et al., 2005; 2008).

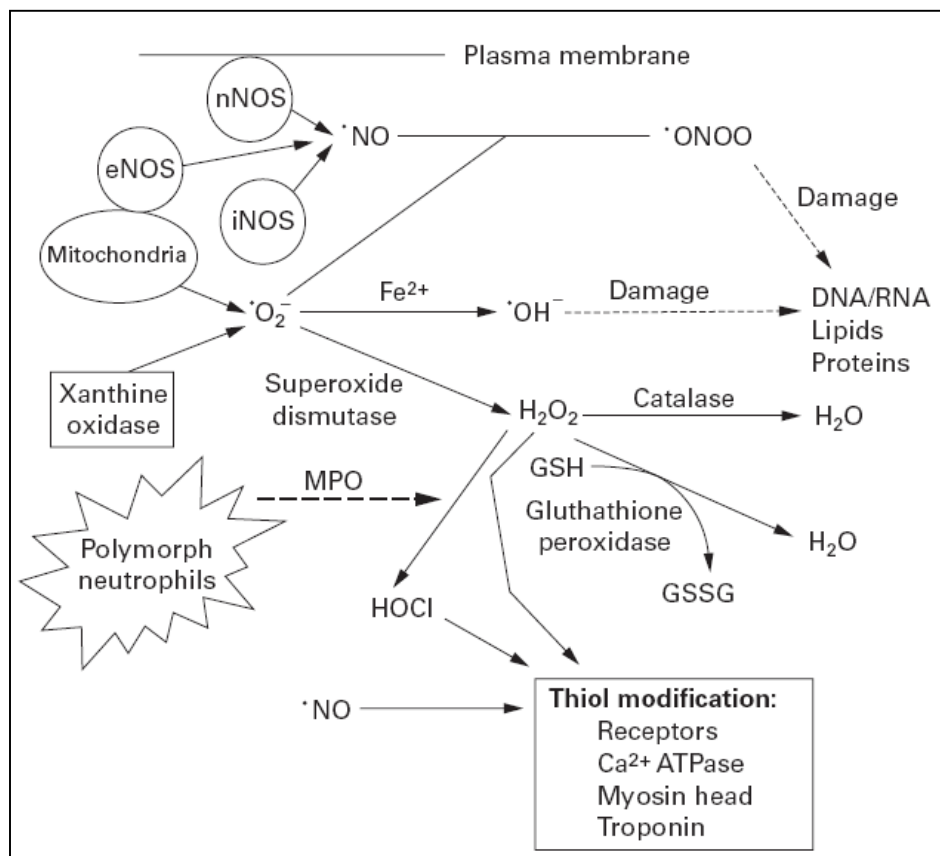


Figura 1: Representação esquemática da formação de radicais livres no músculo esquelético.  
Fonte: Heunks & Dekhuijzen, 2000.

## 1.2 EXERCÍCIO FÍSICO E ESTRESSE OXIDATIVO

Diante das evidências de que o estresse oxidativo está envolvido na patogênese pulmonar induzida pela fumaça de cigarro, acredita-se que o uso de terapias alternativas, como o exercício físico, possa exercer um efeito terapêutico minimizando a severidade dos danos pulmonares (MENEGALI 16L 16L., 2009).

Espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas em alguns processos vitais da vida humana e também são fundamentais nos efeitos de danos e na adaptação que acompanham o exercício físico (SACHDEV 16L 16L., 2008). Durante o exercício físico, as taxas metabólicas são elevadas e podem aumentar drasticamente o consumo de oxigênio ( $VO_2$ ) em 20 vezes com relação aos valores de repouso (CARMELI 16L 16L., 2000) e em 100 vezes na fibra muscular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007), concomitantemente, eleva a produção de radicais livres (ALESSIO & GOLDFARB, 1988). Entretanto, estudos têm

demonstrado que, mesmo com esse aumento da produção de radicais livres, o treinamento físico de intensidade moderada aumenta as defesas antioxidantes e a resistência do tecido (ALESSIO & GOLDFARB, 1988; RADÁK 17L 17L., 1999; GOMEZ-CABRERA 17L 17L., 2006, PINHO 17L 17L., 2006), melhorando o quadro de estresse oxidativo.

### 1.3 PARÂMETROS COMPARATIVOS: MÚSCULOS QUADRÍCEPS E DIAFRAGMA

Em condições normais, os músculos respiratórios e periféricos são adequadamente equipados para realizar suas respectivas funções na respiração e no movimento, porém a disfunção destas duas musculaturas é reconhecida como a maior manifestação sistêmica da DPOC (GOSKER et al., 2000). A disfunção da musculatura respiratória, especialmente a do diafragma, é parte de um processo generalizado envolvendo toda musculatura esquelética (HEUNKS & DEKHUIJZEN, 2000). Sendo estas duas musculaturas expostas a diferentes níveis de ativação, inferências podem ser feitas sobre seus respectivos papéis de fatores locais e sistêmicos nas adaptações músculo esqueléticas na DPOC.

Dependendo da severidade da doença e da população estudada, é estimado que 4-35% dos pacientes com DPOC apresentam uma redução de massa muscular periférica (CORONELL et al., 2002; SCHOLS et al., 1993; VESTBO et al., 2006). A atrofia do quadríceps, por exemplo, está diretamente associada com fraqueza muscular, intolerância ao exercício (Bernard et al., 1998) e diminuição da qualidade de vida (MOSTERT et al., 2000). Já em relação à musculatura respiratória, alterações na área transversal da fibra do diafragma e no seu conteúdo de miosina também vêm sendo reportadas em estudos com pacientes com DPOC (LEVINE et al., 1997; OTTENHEIJM et al., 2005). Porém interessante, essas reduções ocorrem apesar da atividade muscular aumentada, conseqüente de um trabalho respiratório aumentado em pacientes com DPOC. Estas observações destacam a diferença fundamental nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da atrofia muscular periférica e respiratória como o nível de ativação destes dois grupos musculares que variam em direções opostas na DPOC (CARON et al., 2009).

Outras importantes alterações que ocorrem em direções opostas entre o músculo quadríceps e o diafragma, em pacientes com DPOC, são as metabólicas, onde de um lado o quadríceps adota um padrão mais glicolítico, enquanto do

diafragma, mais oxidativo (CARON et al., 2009). Na musculatura periférica, a atividade de enzimas oxidativas como a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HADH) (GREEN et al., 2008; MALTAIS et al., 1996; MALTAIS et al., 2000) e a citrato sintase (MALTAIS et al., 1996; MALTAIS et al., 2000) é reduzida no vasto lateral (porção lateral do músculo quadríceps) em pacientes com DPOC moderada e grave. A citocromo-C oxidase, uma enzima da cadeia transportadora de elétrons, também tem sua atividade diminuída nestes indivíduos. Já as enzimas glicolíticas não são afetadas na presença da DPOC. No entanto, quando a proporção entre enzimas oxidativas e glicolíticas foi avaliada, o metabolismo glicolítico foi predominante no quadríceps de pacientes com a doença em questão (GREEN et al., 2008). Já no músculo diafragma é observado um aumento da atividade das enzimas oxidativas combinada com uma diminuição da atividade das enzimas glicolíticas, resultando na predominância do metabolismo oxidativo (DOUCET et al., 2004; LEVINE et al., 1997).

Estas observações indicam que algumas adaptações musculares, como as do metabolismo energético na DPOC, são provavelmente mais dependentes do local do que de fatores sistêmicos. Exemplo disso são as alterações musculares em relação ao estresse oxidativo e a via Ubiquitina-Proteassoma, onde ambas estão presentes no diafragma e no quadríceps. Mesmo que existam fatores sistêmicos envolvidos no estresse oxidativo e na proteólise do diafragma e quadríceps, o nível de ativação local pode também modular a expressão destas alterações musculares. Por exemplo, a alta atividade metabólica diafragmática pode estimular a produção de espécies reativas de oxigênio e levar a danos oxidativos (Barreiro et al., 2005) eventualmente levando a uma proteólise aumentada neste músculo (OTTENHEIJM et al., 2006; 2008).

A conjugação de ubiquitinas à proteínas marca estas proteínas para degradação proteossomal sendo reconhecido que a via Ubiquitina-Proteassoma está envolvida na degradação das proteínas musculares, as miofibrilas (actina e miosina). Em estudo de Ottenheijm e colaboradores foram investigados os níveis de ubiquitinas conjugadas a proteínas no músculo diafragma de humanos, sendo que esses níveis foram encontrados elevados em pacientes com DPOC de leve a moderada, em comparação a indivíduos sem diagnóstico da doença, sugerindo que existe um envolvimento da via da Ubiquitina-Proteassoma na degradação muscular e na perda de geração de força, principalmente devido a perda da cadeia de miosina

no músculo diafragma desses pacientes (OTTENHEIJM et al., 2005). Já no quadríceps, a presença do estresse oxidativo pode estar relacionada a outros mecanismos como um desacoplamento mitocondrial entre o ciclo do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons (PUENTE-MAESTU et al., 2009), que não parece estar presente no diafragma o qual se sabe que existe um papel oxidativo mais eficiente.

Baseado nestas evidências se tem como hipótese de que quanto maior o tempo de exposição à fumaça de cigarro, maior o quadro de dano pulmonar e maior o comprometimento da musculatura.

Sendo o comprometimento respiratório e muscular no DPOC associado com importantes conseqüências clínicas como intolerância ao exercício, diminuição da qualidade de vida e até mesmo mortalidade prematura, este trabalho justifica-se pela importância de melhor entendimento dos modelos animais de dano pulmonar em relação ao cigarro para se obter respostas mais fidedignas em estudos futuros. Este melhor entendimento se da no estudo tanto das alterações bioquímicas e moleculares da musculatura respiratória e periférica, das alterações histológicas pulmonares, como o estudo de como estas alterações se comportam perante diferentes intensidades de exposição à fumaça de cigarro a fim de estratificar com maior precisão a quantidade de cigarros para modelo animal de dano pulmonar em camundongos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o dano pulmonar e as alterações musculares induzidas por modelo de estratificação de exposição à fumaça de cigarro em camundongos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os danos oxidativos em biomoléculas pelos processos de lipoperoxidação, carbonilação de proteínas, e conteúdo total de sulfidrila;
- Avaliar o sistema de defesa antioxidante pela atividade e expressão das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPX);
- Avaliar o metabolismo energético muscular através da expressão das proteínas Carnitina Palmitoiltransferase-1 (CPT<sub>1</sub>), Fosfofrutoquinase-1 (PFK<sub>1</sub>), Succinato Desidrogenase (SDH) e Citocromo-C Oxidase (COX).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo se caracteriza por um estudo quali-quantitativo, experimental do tipo ensaio clínico randomizado.

Todos os procedimentos serão realizados de acordo com a Lei nº 11.794/08 (DOU 196, seção 1, outubro/2008) e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

#### 3.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

O estudo será realizado no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício (Lafibe) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil. O Lafibe apresenta todas as condições estruturais e técnicas necessárias para o desenvolvimento do estudo e para atender as eventuais intercorrências, garantindo a proteção aos possíveis riscos.

#### 3.2 JUSTIFICATIVA PARA USO DE ANIMAIS

Justifica-se o uso de animais a partir da necessidade de investigar parâmetros bioquímicos diretamente do tecido muscular e imediatamente após o exercício, sendo este procedimento inviável em seres humanos por suas características altamente invasivas.

#### 3.3 CÁLCULO DO TAMANHO DA AMOSTRA

Com base em estudos prévios e considerando a média ( $\pm$ DP) na atividade da Catalase antes ( $1,3 \pm 0,2$  U de CAT/mg proteína) e após ( $3,2 \pm 0,4$  U de CAT/mg proteína) a sessão do treinamento, o tamanho do grupo amostral necessário para detectar uma diferença significativa, considerando um nível de significância de 5% e poder de 80%, foi de 6 animais por grupo.

### 3.4 AMOSTRA

Serão randomizados 36 camundongos C57BL-6 machos, com 3 meses de idade, do biotério da Universidade, pesando entre 20g a 30g. Estes animais serão alocados em gaiolas específicas, num ambiente com temperatura controlada a 23°C, num ciclo de iluminação de 12 horas claro/escuro e com alimentação/hidratação *ad libitum*. Os animais serão divididos randomicamente em 6 grupos (n=6):

- EC: Estratificação controle
- E7: Estratificação 7 dias
- E15: Estratificação 15 dias
- E30: Estratificação 30 dias
- E45: Estratificação 45 dias
- E60: Estratificação 60 dias

### 3.5 PROTOCOLO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO

Os animais serão expostos a 4 cigarros comerciais com filtro (alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg) por sessão, 3 sessões/dia, 7 dias/semana, sendo o tempo de exposição de cada grupo de acordo com os dias especificados na sua classificação. Os animais serão alocados em uma câmara de inalação de acrílico (40x30cm por 25cm de altura), dentro de uma capela de exaustão. O cigarro será acoplado a uma seringa de plástico de 60ml para captação da fumaça e imediatamente expelida dentro da caixa. Os animais serão mantidos exposto à fumaça do cigarro (73%) durante 6 minutos. Então a tampa da caixa de inalação será removida, e ligando o exaustor da capela, a fumaça será evacuada durante 1 minuto. Os animais serão então imediatamente expostos a nova inalação da fumaça de um próximo cigarro (Quadro 1).

Quadro 1: Protocolo de Indução da Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.

Semana	Manhã	Tarde	Noite	Tempo/cigarro	Tempo de exaustão
1	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min.	1 min.
2	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
3	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
4	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
5	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
6	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
7	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.

Fonte: Dados da pesquisadora

### 3.6 EUTANÁSIA E DESCARTE

Quarenta e oito horas após a última sessão de exposição à fumaça de cigarro os animais serão mortos por deslocamento cervical e os músculos diafragma e quadríceps como também o pulmão direito serão retirados cirurgicamente. Após remoção, uma alíquota de cada estrutura será homogeneizada, em tampão específico, para análise de proteínas intracelulares pela técnica Westernblotting como descrito a seguir. O restante será estocado em freezer -80°C para posteriores análises bioquímicas e histológicas. O descarte dos animais será feito a partir do acondicionamento em saco branco leitoso e armazenados em freezer -40°C para posterior tratamento e deposição final em aterro sanitário, conforme procedimentos estabelecidos pela Vigilância Sanitária (RDC 306/2004).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

A quantidade de total de proteína para os ensaios de expressão e atividade enzimática, danos oxidativos e cadeia respiratória serão determinadas a partir da técnica descrita por Lowry et al. (1951).

### 3.8 HOMOGENEIZAÇÃO PARA WESTERNBLOTING

As estruturas serão homogeneizadas em tampão contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de EDTA, 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C. O homogeneizado será então centrifugado a 11000 rpm por 40 minutos. No sobrenadante será determinada a concentração de proteína utilizando o método de Lowry e posteriormente será realizada a determinação do extrato total com anticorpo específico.

### 3.9 ENSAIOS BIOQUÍMICOS

**Ânion Superóxido:** Será determinada pela taxa de oxidação da adrenalina lido em espectrofotômetro a 780nm conforme descrito por Poderoso et al. (1996).

**Atividade da Superóxido Dismutase (SOD):** a atividade enzimática da SOD será determinada pela inibição da auto-oxidação da adrenalina medida espectrofotometricamente (480nm) segundo McCord e Fridovich (1969), e será expressa em U/mg proteína.

**Atividade da Catalase (CAT):** A atividade da CAT será determinada pela diminuição na absorbância (240nm) correspondente ao consumo peróxido de hidrogênio, conforme previamente descrito por Aebi (1984) e será expressa em U/mg proteína.

**Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX):** A GPX será determinada através da taxa de decaimento da NADPH, medida em espectrofotômetro (340nm) e será expressa em U/mg proteína, conforme Filho e Gunzler (1984).

**Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS):** Como índice de peroxidação de lipídeos será mensurado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico medido espectrofotometricamente (532nm) e serão expressos em nmol TBARS/mg proteína, conforme descrito por Draper e Hadley (1990).

**Carbonilação de Proteínas (CARBONIL):** Os danos oxidativos em proteínas serão mensurados pela determinação de grupos carbonil baseados na reação com dinitrofenilhidrazina como previamente descrito por Levine et al. (1990).

O conteúdo de carbonil será determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente  $22.0000 \text{ Molar}^{-1}$  e serão expressos em nmol/mg proteína.

**Sulfidrila:** O ácido ditionitrobenzóico é reduzido por tióis gerando um derivado amarelo (TNB) lido espectrofotometricamente a 412 nm. Este método determina os tióis totais da amostra, sendo um parâmetro de medida de dano oxidativo às proteínas da mesma (Aksenov & Markesbery, 2001). As amostras serão homogeneizadas em 1 mL de tampão PBS (7.4 PH) com 1 mM de EDTA e incubadas por 60 min, à temperatura ambiente o escuro com 0,2 M de fosfato de potássio e 0,4% de ácido ditionitrobenzóico.

### 3.10 ENSAIO HISTOLÓGICO

Para os estudos histológicos, o pulmão direito será perfundido com solução salina (0,9%) para remover o sangue do pulmão. O pulmão direito será fixado usando uma solução de fosfato 4% tamponada (pH 7.2) a uma pressão de 25cm de  $\text{H}_2\text{O}$  durante 2 minutos através de um cateter traqueal e posteriormente será removido e pesado. Os pulmões inflados serão fixados por 48h antes de serem incorporados na parafina. Cortes sagitais seriais de  $5\mu\text{m}$  serão obtidos para análises histológicas.

Macrófagos e neutrófilos serão quantificados nos alvéolos. Em casa grupo, 30 campos de  $26.000 \mu\text{m}^2$  (10 campos aleatórios de 3 diferentes sessões) do pulmão direito serão analisados. O número de macrófagos e neutrófilos (células/ $\text{mm}^2$ ) serão contadas usando a imagem do campo microscópico em objetiva 40x de um microscópio Olympus BH-2 equipado com uma ocular.

O enfisema pulmonar será quantificado baseado no grau de destruição alveolar como determinado pela medição do intercepto linear médio (Lm, diâmetro alveolar médio) em micrometros (SAETTA et al., 1985). Para este fim, 16 campos de cada slide serão contados e observados com uma ampliação de 2000x através de um retículo acoplado ao monitor.

Para obter amostras de pulmão uniformes e proporcionais, 18 campos (seis campos não coincidentes em três diferentes sessões) serão aleatoriamente identificados e analisados usando um vídeo microscópico (microscópio Zeiss-Axioplan com objetiva 20x e uma câmera de vídeo colorida JVC ligada a um monitor colorido Sony Trinitron; Carl Zeiss, Alemanha) e um sistema de teste ciclóide sobrepostas na tela do monitor. A referência em termos de volume será estimada

pela contagem de pontos usando o teste de sistema de pontos (PT) (WEIBEL, 1979). The points hitting the airspaces (PP) serão contados para estimar a densidade do volume ( $V_v$ ) destas estruturas ( $V_v = PP/PT$ ). A área total de  $1.3 \text{ mm}^2$  serão analisadas para determinar a densidade do volume do alvéolo ( $V_v[\text{air}]$ ) e as fibras elásticas ( $V_v[\text{elastic fibers}]$ ) em cortes corados com hematoxilina e eosina (H/E) e Orceina. Dois pesquisadores irão realizar todas as medições e contar as áreas não identificadas.

### 3.11 WESTERNBLOT

Alíquotas contendo  $250 \mu\text{g}$  de proteína por amostra serão aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de  $1,5 \text{ mm}$  de espessura. A eletroforese será realizada em cuba de minigel da *Bio Rad* (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese, previamente diluída. O SDS-PAGE será submetido a  $25 \text{ volts}$ , inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento e  $120 \text{ volts}$  até o final do gel de resolução. Na seqüência, as proteínas separadas no SDS-PAGE, serão transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de minigel da *Bio Rad*, e a solução tampão para transferência mantido em voltagem constante de  $120 \text{ volts}$  por  $2 \text{ horas}$ , sob refrigeração contínua por gelo. As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas serão incubadas em solução bloqueadora por  $2 \text{ horas}$ , a temperatura ambiente, para diminuir a ligação inespecífica de proteínas. A seguir, as membranas serão lavadas com solução basal por  $3 \text{ sessões}$  de  $10 \text{ minutos}$  e incubadas com anticorpos específicos sob agitação constante por uma noite a  $4^\circ\text{C}$ ; a saber: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx), Carnitina palmitoiltransferase ( $\text{CPT}_1$ ), Fosfofrutoquinase-1 ( $\text{PFK}_1$ ), Succinato desidrogenase (SDH) e Citocromo-C Oxidase (COX). Então, serão lavadas novamente com solução basal por  $3 \text{ sessões}$  de  $10 \text{ minutos}$  e incubadas a seguir em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante  $2 \text{ horas}$  à temperatura ambiente. O excesso do secundário será lavado com solução basal e então, as membranas serão incubadas por dois minutos em substrato enzimático e expostas ao filme de RX (Kodak XAR - Rochester, NY), com intensificador (Cronex Lightning Plus - DuPont, Wilmington, DE) em cassete de revelação autoradiográfica. A intensidade das bandas será determinada através da leitura das autoradiografias

reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP 3400) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation).

**Imunoprecipitação:** Volumes das amostras, com concentração protéica de 5 mg, serão utilizadas para imunoprecipitação com anticorpos específicos, sendo que a determinação das proteínas seguirá as etapas descritas anteriormente no item “extração dos tecidos”. As amostras serão colocadas sob incubação durante 12 horas a 4°C, sob agitação contínua. Em seguida, será acrescentado a proteína A-Shepharose 6MB em todas as amostras para precipitação do complexo antígeno/anticorpo, sendo mantidas em agitação contínua por mais duas horas. Após nova centrifugação por 15 minutos, a 12.000 rpm a 4°C, o sobrenadante será descartado e o material precipitado lavado por três vezes com a solução tampão específico para lavagem. As proteínas precipitadas, a seguir, serão tratadas com tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT (Ditiotreitol), aquecidas em água fervente por 5 minutos e centrifugadas por 1 minuto. As proteínas serão então submetidas à eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo as etapas descritas no item “Westernblot”. Nestes experimentos de imunoprecipitação, as membranas serão submetidas ao *blotting* com anticorpo antifosfotirosina.

### 3.12 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Os dados serão expressos em média e erro padrão médio e analisados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA) one-way, seguido pelo teste post hoc Tukey. O nível de significância estabelecido para o teste estatístico é de  $p < 0,05$ . Será utilizado o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 como pacote estatístico.



**5 ORÇAMENTO**

<b>Discriminação</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Valor Unitário R\$</b>	<b>Valor Total R\$</b>
<b>1. Custeio</b>			
<b>a) Consumo</b>			
Reagentes diversos			3000,00
Camundongos	64	8,00	512,00
<b>TOTAL</b>			<b>3.512,00</b>

OBSERVAÇÃO: Todas as despesas necessárias para o desenvolvimento do projeto e para os reagentes serão subsidiadas pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício/PPGCS/UNESC.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI U, FOWLER WE, BUHLE EL Jr, SMITH PR. Electron microscopy and image processing applied to the study of protein structure and protein-protein interactions. **J Ultrastruct Res**, 143-176. 1984

AKSENOV MY, MARKESBERYA WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**. 302:141-5. 2001.

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

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

BARREIRO E, DE LA PUENTE B, MINGUELLA J, COROMINAR JM, SERRANO S, HUSSAIN SN, GEA J. Oxidative stress and respiratory muscle dysfunction in severe chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 171: 1116-1124, 2005.

BERNARD S, LeBLANC P, WHITTON F, CARRIER G, JOBIN J, BELLEAU R, MALTAIS F. Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 158: 629-634, 1998.

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

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

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

CARON M.A., DEBIGARÉ R., DEKHUIJZEN P.N.R., MALTAIS F. Comparative Assessment of the Quadriceps and the Diaphragm in Patients with COPD. **Journal of Applied Physiology**. 107: 952-961. 2009.

CORONEEL C, OROZCO-LEVI M, GEA J. COPD and body weight in a Mediterranean population. **Clinical Nutrition** 21: 437-438, 2002.

DOUCET M, DEBIGARE R, JOANISSE DR, COTE C, LeBLANC P, GREGOIRE J, DESLAURIERS J, VAILLANCOURT R, MALTAIS F. Adaptation of the diaphragm and the vastus lateralis in mild-to-moderate COPD. **European Respiratory Journal**. 24: 971-979, 2004.

DRAPER HH, HADLEY M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. 186: 421-431. 1990.

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

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

FARAMAWY M.M., MOHAMMED T.O., HOSSAINI A.M., KASHEM R.A., RAHMA R.M.A. Genetic polymorphism of GSTT1 and GSTM1 and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Journal of Critical Care**. 24(3):e7-e10, 2009.

FLOHÉ, L., GUNZLER, W. Assay of glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. 105: 114-21. 1984

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

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

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

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

GOSKER HR, WOUTERS EF, VAN DER VUSSE GJ, SCHOLS AM. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease and chronic heart failure: underlying mechanisms and therapy perspectives. **American Journal of Clinical Nutrition**. 71: 1033-1047, 2000.

GREEN HJ, BOMBARDIER E, BERNETT M, IGBAL S, D'ARSIGNY CL, O'DONNELL DE, OUYANG J, WEBB KA. Organization of metabolic pathways in vastus lateralis of patients with chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 295: R935-41, 2008.

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

HEUNKS LMA, DEKHUIJZEN PNR. Respiratory muscle function and free radicals: from cell to COPD. **Thorax**. 55:704-716. 2000.

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

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

LEVINE RL, GARLAND D, OLIVER CN, AMICI A, CLIMENT I, LENZ AG, AHN BW, STADTMAN ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 186: 464-478. 1990.

LEVINE S, KAISER L, LEFEROVICH J, TIKUNOV B. Cellular adaptations in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. **The New England Journal of Medicine**. 337: 1799-1806, 1997.

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

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

LOWRY OH, ROSEBOUGH NG, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275. 1951.

LÜTHJE L, RAUPACH T, MICHELS H, UNSÖLD B, HASENFUSS G, KÖGLER H, ANDREAS S. Exercise intolerance and systemic manifestations of pulmonary emphysema in a mouse model. **Respiratory Research**. 10(7). 2009

MALTAIS F, LeBLANC P, WHITTOM F, SIMARD C, MARQUIS K, BELANGER M, BRETON MJ, JOBIN J. Oxidative enzyme activities of the vastus lateralis muscle and the functional status in patients with COPD. **Thorax**. 55: 848-853, 2000.

MALTAIS F, SIMARD AA, SIMARD C, JOBIN J, DESGAGNES P, LeBLANC P. Oxidative capacity of the skeletal muscle and lactic acid kinetics during exercise in normal subjects and in patients with COPD. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 153: 288-293, 1996.

MCCORD, J. M., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymatic Function for erythrocyte (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**. 244: 6049–6055. 1969.

MENEGALI BT, NESI RT, SOUZA OS, SILVA LA, SILVEIRA PCL, VALENÇA SS, PINHO RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. 22:567–573. 2009.

MOSTERT R, GORIS A, WELING-SCHEEPERS C, WOUTERS EF, SCHOLS AM. Tissue depletion and health related quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Medicine**. 94: 859-867, 2000.

OTTENHEIJM CA, HEUNKS LM, SIECK GC, ZHAN WZ, JANSEN SM, DEGENS H, DE BOO T, DEKHUIJZEN PN. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 172: 200-205, 2005.

OTTENHEIJM CA, HEUNKS LM, LI YP, JIN B, MINNAARD R, VAN HEES HW, DEKHUIJZEN PN. Activation of the ubiquitin-proteasome pathway in the diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 174: 997-1002, 2006.

OTTENHEIJM CA, HEUNKS LM, DEKHUIJZEN RP. Diaphragm adaptations in patients with COPD. **Respiratory Research**. 9: 12, 2008.

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

PINHO RA, SILVEIRA PC, PIAZZA M, TUON T, SILVA G, DAL-PIZZOL F E MOREIRA J. Exercício físico regular diminui o estresse oxidativo pulmonar em ratos após exposição aguda ao carvão mineral. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte** 12: 2. 2006.

PODEROSO JJ, CARRERAS MC, LISDERO CL. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 328: 85-92. 1996.

PUENTE-MAESTU L, PEREZ-PARRA J, GODOY R, MORENO N, TEJEDOR A, GONZALEZ-ARAGONESES F, BRAVO JL, VILLAR F, CAMANO S, AGUSTI A. Abnormal mitochondrial function in locomotor and respiratory muscles of COPD patients. **European Respiratory Journal**. 33:1045-1052. 2009.

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

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

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

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

SAETTA M, SHINER RJ, ANGUS GE, KIM WD, WANG NS, KING M, et al. Destructive index: a measurement of lung parenchymal destruction in smokers. **American Review of Respiratory Disease Journal**.131:764–9. 1985.

SCHOLS AM, SOETERS PB, DINGEMANS AM, MOSTERT R, FRANTZEN PJ, WOUTERS EF. Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation. **American Review of Respiratory Disease**. 147: 1151-1156, 1993.

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

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

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

VASSILAKOPOULOS T, HUSSAIN SNA. Ventilatory muscle activation and inflammation: cytokines, reactive oxygen species, and nitric oxide. **Journal of Applied Physiology**. 102: 1687-1697. 2007.

VESTBO J, PRESCOTT E, ALMDAL T, DAHL M, NORDESTGAARD BG, ANDERSEN T, SORESEN TI, LANGE P. Body mass, fat-free body mass, and prognosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease from a random population sample: findings from the Copenhagen City Heart Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 173: 79-83, 2006.

WEIBEL ER. Stereologic methods: I. Practical methods for biological morphometry. **London: Academic Press**. 1979.

WOOD AM, STOCKLEY RA. The genetics of chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory Research**. 7:130. 2006.

## **ANEXOS**



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC  
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA



**Resolução**

O Comitê de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 04/2008/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou as aulas práticas abaixo.

**Projeto: 23/2010**

**Pesquisador:**

Gaspar Chiappa

**Título:** “Dano pulmonar e alteração musculares induzidas por modelo de estratificação de exposição a fumaça de cigarro em camundongos”.

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado ao CEUA. Os membros do CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar o CEUA. [www.unesc.net/propex/ceua](http://www.unesc.net/propex/ceua).

Criciúma, 14 de setembro de 2010.

*Carina Rodrigues Boeck*

Coordenadora do CEUA

## **CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO**

## DANO PULMONAR E ALTERAÇÕES MUSCULARES INDUZIDAS EM MODELO DE ESTRATIFICAÇÃO DE EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM CAMUNDONGOS

Samanta Portão<sup>1</sup>, Aires Mondardo<sup>2</sup>, Patrícia Damiani<sup>3</sup>, Thaise Graciano<sup>4</sup>, Gaspar Chiappa<sup>5</sup>, Ricardo Pinho<sup>6</sup>.

- 1- Samanta Portão de Carlos - Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.
- 2- Aires Mondardo Júnior - Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.
- 3- Patrícia Damiani Patrício - Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.
- 4- Thaise Graciano - Curso de Fisioterapia da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.
- 5- Gaspar Rogério da Silva Chiappa – Laboratório de Pesquisa em Fisiopatologia do Exercício da Divisão de Cardiologia do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- 6- Ricardo Aurino de Pinho - Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício – LAFIBE da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil.

Endereço:

Samanta Portão de Carlos

Rua Irene Dalpont Milioli – 13 Bairro Jd. Maristela

CEP: 88813470

Criciúma – SC BRASIL

### Resumo

**Contextualização:** Estudos mostram que a fumaça do cigarro é responsável pela patogênese de várias doenças pulmonares, incluindo doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Sabe-se que o cigarro causa danos pulmonares, inflamação e estresse oxidativo no enfisema pulmonar. Além disso, a DPOC é frequentemente associada à perda de massa muscular e disfunção do músculo esquelético. **Objetivos:** O objetivo do estudo foi investigar a inflamação e o estresse oxidativo em ratos expostos à fumaça do cigarro. **Métodos:** os ratos foram expostos por 7, 15, 30, 45 e 60 dias consecutivos para saber quando o dano oxidativo no músculo esquelético aconteceu, com a exposição aguda ou crônica da fumaça de cigarro. **Resultados:** os dados demonstraram a relação entre o dano oxidativo medido através do diafragma, pulmão e quadríceps. Trinta e seis camundongos foram divididos em seis grupos (n = 6): grupo controle, 7 -, 15 -, 30 -, 45 – 60 dias de fumaça de cigarro, respectivamente. Os grupos foram expostos à fumaça de cigarro 3 vezes / dia (4 cigarros por sessão). Vinte e

quatro horas após a exposição do último cigarro, foi realizado a eutanásia dos animais, a coleta das amostras e usados nos próximos ensaios. Além da análise da oxidação dos lipídios e proteínas (TBARS e carbonilação), o ensaio sulfidríla, histologia e estudos morfológicos foram realizados. **Conclusão:** os dados demonstram a influência da fumaça de cigarro no dano oxidativo não só no pulmão, mas sobre o músculo esquelético, mostrando o efeito da difusão da fumaça de cigarro e que o músculo esquelético são afetados antes do tecido pulmonar.

**Palavras-chave:** Dano oxidativo. Fumaça de cigarro. Músculo-esquelético.

## Introdução

O tabagismo é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de Doença Pulmonar Obstrutiva Bônquica (DPOC), e o enfisema pulmonar é uma das suas principais manifestações<sup>24</sup>. As características do enfisema pulmonar são a destruição alveolar, espessamento dos septos e reparação anormal<sup>12</sup>. Vários estudos têm demonstrado que o desenvolvimento do enfisema não está somente ligado ao desequilíbrio entre a atividade da protease e antiprotease, mas principalmente no desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, que por sua vez, estão ligadas à inflamação na patogênese do enfisema pulmonar<sup>2, 5, 17, 36</sup>.

O estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese do enfisema pulmonar induzido por fumaça de cigarro por potencializar os danos proteolíticos, induzindo a morte das células endoteliais, epiteliais e mecanismos de reparo do pulmão<sup>23, 24, 36</sup>. O efeito combinado do dano pulmonar proteolítico, aumento da morte celular e diminuição do remodelamento, leva ao enfisema pulmonar<sup>28</sup>. Por exemplo, os níveis de peroxidação lipídica<sup>13</sup>, carbonilação de proteínas, oxidação de tióis<sup>10</sup>, e DNA oxidado<sup>21</sup> se mostraram aumentado no sangue de fumantes<sup>10, 13, 21</sup> e em vários órgãos de animais expostos cronicamente à fumaça de cigarro<sup>21</sup>.

Clinicamente, os pacientes com enfisema pulmonar têm disfunção muscular esquelética clara com a progressão da doença. Todas essas manifestações sistêmicas e estresse oxidativo estão frequentemente associada com danos pulmonares, embora a perda muscular e disfunção do músculo esquelético são desconhecidas<sup>3</sup>.

Estudos recentes têm relacionado a inflamação e as respostas ao estresse oxidativo com disfunção muscular em pacientes com DPOC<sup>3</sup>. Estes estudos demonstraram que a fumaça de cigarro exerce diretas alterações oxidativas nas proteínas do músculo independente da inflamação. Aparentemente, o dano oxidativo em proteínas musculares precede as

alterações pulmonares e pode contribuir para a disfunção e perda de massa muscular periférica.

Nosso estudo sugere que o dano oxidativo ocorre no músculo esquelético antes do tecido pulmonar e contribui para aumento do comprometimento muscular em pacientes com enfisema pulmonar. Por esta razão, o objetivo de nosso estudo é analisar se o dano oxidativo no músculo esquelético acontece antes que as alterações morfológicas e dano oxidativo induzido no parênquima pulmonar durante a indução de fumaça de cigarro em 7, 15, 30, 45 e 60 dias de exposição à fumaça de cigarro. Além disso, o tratamento antioxidante local pode ser um importante mecanismo terapêutico em termos da melhora da eficácia do sistema de defesa contra dano oxidativo excessivo no músculo esquelético após a exposição à fumaça de cigarro.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram usados trinta e seis camundongos C57BL-6 machos de 2 meses de idade, pesando 30-35 g. O procedimento adotado no presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade do Sul Catarinense. Os animais recebiam água e alimentos (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S / A, Brasil) à vontade.

A sala foi mantida em 70% de umidade e temperatura de  $20 \pm 2$  °C com um ciclo de 12 horas claro-escuro. Os camundongos foram verificados periodicamente para certificar a ausência de agentes patogênicos. Para os ensaios bioquímicos, os animais foram divididos em seis grupos (6 animais / grupo). Um grupo controle e cinco grupos expostos à fumaça do cigarro por 7, 15, 30, 45 e 60 dias. Para o estudo histológico, os animais foram selecionados aleatoriamente (n = 3).

### **Exposição à Fumaça de Cigarro**

Foram utilizados cigarros adquiridos comercialmente (8 mg de alcatrão e 0,6 mg de nicotina no total). Os animais foram expostos a 12 cigarros por dia, durante 7, 15, 30, 45 e 60 dias, como descrito anteriormente por Menegali et al. (17). Resumidamente, os animais foram colocados em uma câmara de inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura) dentro de uma capela de exaustão. Um cigarro é acoplado a uma seringa de plástico de 50 mL onde a fumaça pudesse ser aspirada (20 jatos de 50mL) e, na sequência,

expulsa para a câmara de exposição. Os animais foram mantidos nesta condição por 6 min. Em seguida, a tampa foi retirada da câmara de inalação, e ligado o exaustor da capela, a fumaça foi eliminada por 1 minuto. Este processo foi repetido 3 vezes, as sessões foram realizadas três vezes por dia (manhã, tarde, e a noite), resultando em 72 minutos de exposição à fumaça de cigarro. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical 48 horas após a última exposição de fumaça de cigarro. Pulmão, diafragma e quadríceps foram retirados e homogeneizados em solução tampão utilizada para cada técnica. Os homogeneizados foram centrifugados a 1000 xg por 10 min a 4 ° C, eo sobrenadante mantido à - 70° C até ser utilizado para os experimentos.

### **Avaliação Histológica**

O pulmão direito foi fixado com uma infusão de 4% de fosfato (pH 7,2) a 25 cm de H<sub>2</sub>O de pressão por 2 minutos através do cateter traqueal e, posteriormente, removidos e pesados. Os pulmões instilados foram fixadas por 48 horas antes de serem incluídos em parafina. Corte sagital 5 mm foram realizadas para análise histológica e morfometria. Macrófagos e neutrófilos foram quantificadas nos alvéolos. Em cada grupo, 30 campos de 26.000 mm<sup>2</sup> (10 campos aleatórios de 3 seções diferentes) do pulmão direito foram analisadas. O número de macrófagos e neutrófilos (células/mm<sup>2</sup>) foram contadas utilizando o campo imagem microscópica (40x).

### **Conteúdo Sulfidril**

Os danos oxidativos em proteína foram calculados pela determinação de grupos carbonis baseados na reação com os dinitrofenilhidrazina. O conteúdo carbonil foi determinado espectrofotometricamente em 370nm usando um coeficiente 22.0000 molar.

### **Lipoperoxidação**

Como índice de peroxidação de lipídeos foi verificado a formação de substâncias reativas ao aquecimento do ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Draper e Hadley (1990). Primeiramente as amostras foram misturadas com 1ml de ácido tricloroacético (10%) e 1ml de ácido tiobarbitúrico (0,67%), seguido por aquecimento em banho-maria (60°C) por

30 minutos. Os níveis de TBARS foram medidos espectrofotometricamente (532nm) e expressos como equivalentes de malondialdeído (nmol/mg proteína).

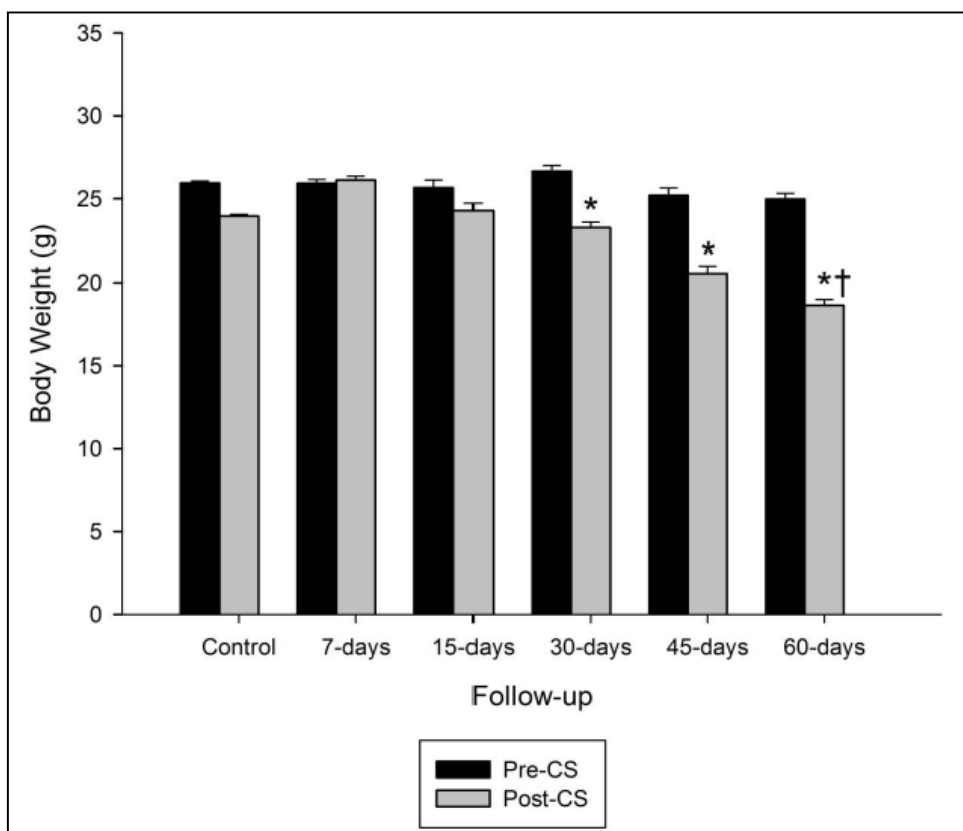
### Análise Estatística

Os dados foram expressos como média e erro padrão da média ( $\pm$  EP), e analisados estatisticamente pela análise de variância one-way(ANOVA), seguido pelo teste de Tukey HSD post-hoc. O nível de significância foi fixado em 95% ( $p < 0,05$ ). O software utilizado para análise dos dados foi

### Resultados

O peso corporal dos animais foram afetados pela exposição à fumaça de cigarro. Todos os camundongos apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%. O peso corporal dos animais diminuiu apenas após 30 dias (\*  $P < 0.01$ ) e persistiu até 60 dias ( $\dagger P < 0.001$ ) de exposição de fumaça de cigarro.

Figural:

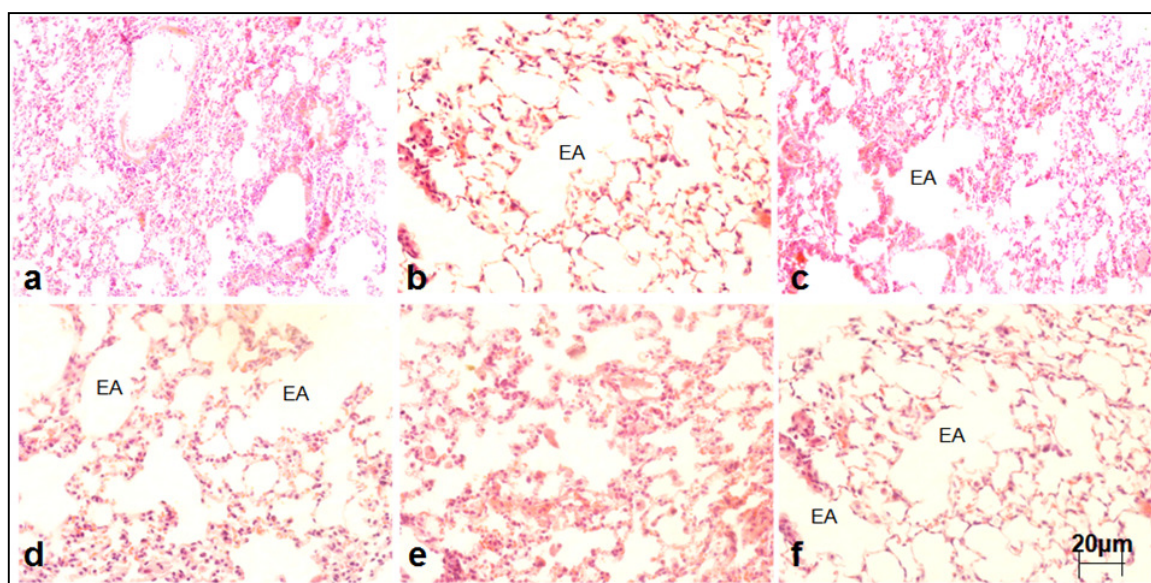


Fonte: Dados da pesquisadora

### Efeitos histológicos da exposição à fumaça de cigarro

A histologia pulmonar dos animais controle apresentaram septos alveolares e menores alvéolos normais, enquanto os ratos que foram expostos à fumaça de cigarro apresentaram destruição dos septos alveolares a partir do 15º dia de exposição, alargamento dos alvéolos, e a presença de macrófagos alveolares:

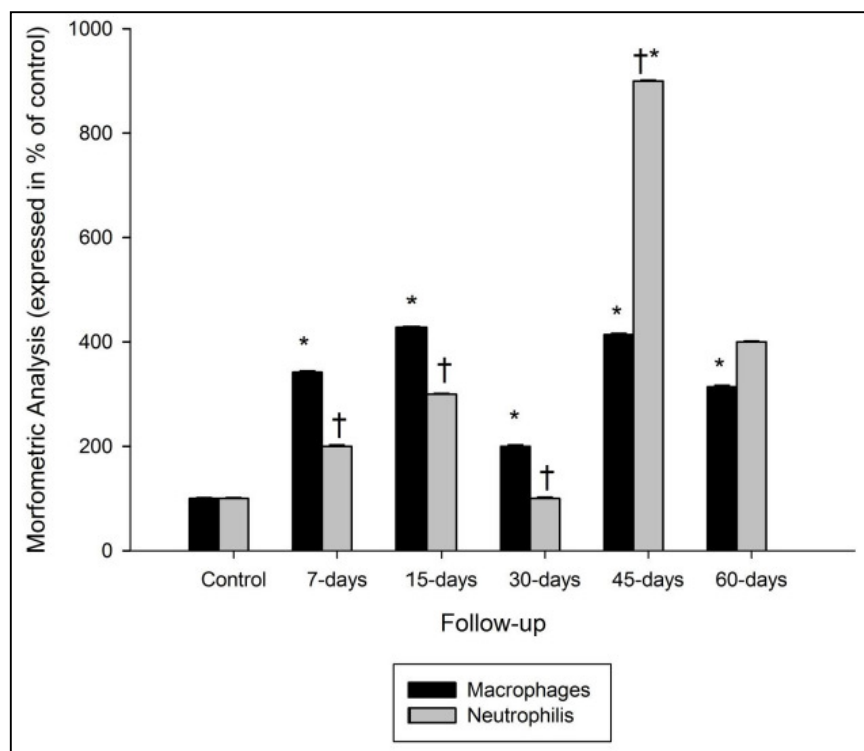
Figura 2:



Fonte: Dados da pesquisadora

A área de ampliação dos alvéolos foi significativamente maior durante os 45 dias de exposição à fumaça de cigarro (Fig.2e). Como na figura 3, o número de macrófagos e neutrófilos, nos grupos de fumaça de cigarro (controle%) aumentou em 7 dias, quando comparado com o controle ( $p < 0,01$ ). No entanto, o número de neutrófilos foi significativamente maior após 45 dias de exposição à fumaça de cigarro ( $p < 0,001$ ).

Figura 3:



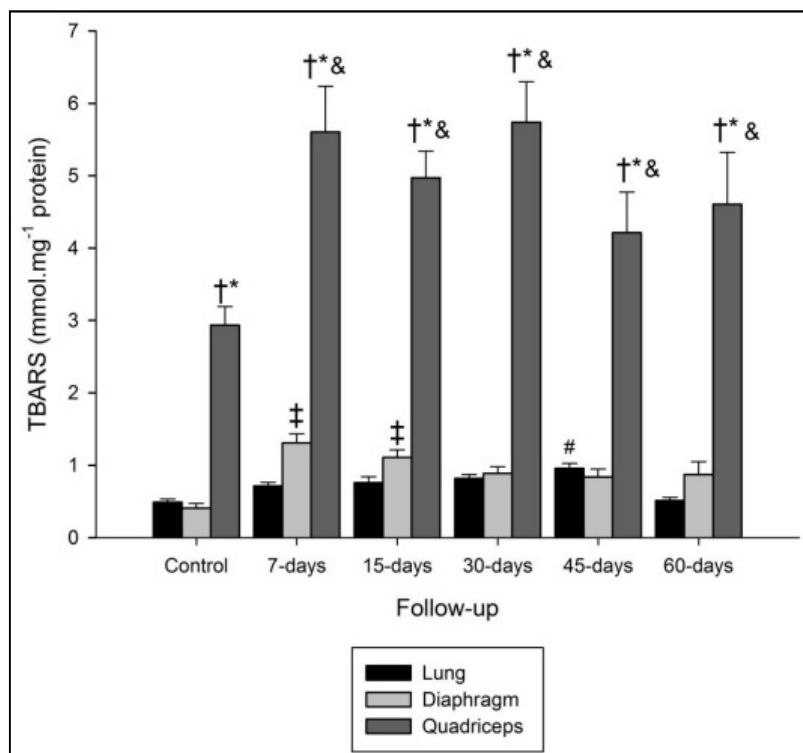
Fonte: Dados da pesquisadora

### Danos Oxidativos

As figuras 4, 5 e 6 mostram os níveis de peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e conteúdo total de tióis no pulmão, diafragma e os músculos do quadríceps. No pulmão, TBARS aumentou durante a exposição de 45 dias à fumaça de cigarro, em comparação ao grupo controle. No diafragma teve aumento em 7 e 15 dias de exposição à fumaça de cigarro. Surpreendentemente, a fumaça de cigarro apresentou um aumento importante nos níveis de TBARS no músculo quadríceps em todos os períodos de exposição. Em contraste, a fumaça de cigarro induziu um aumento nos níveis de carbonilas em todos os tecidos no grupo 7 dias. No pulmão, o nível de carbonilas foi aumentada de forma diferente no grupo 60 dias, embora a fumaça de cigarro induzida no diafragma e dos músculos do quadríceps aumentou nos dias 7, 15, 30 e 45. Os níveis de sulfidrila diminuiu em todos os períodos, em comparação ao grupo controle. Todavia, a maior alteração foi encontrada no músculo quadríceps após 7 dias de exposição à fumaça de cigarro, com um pico observado 15º dia.

## TBARS

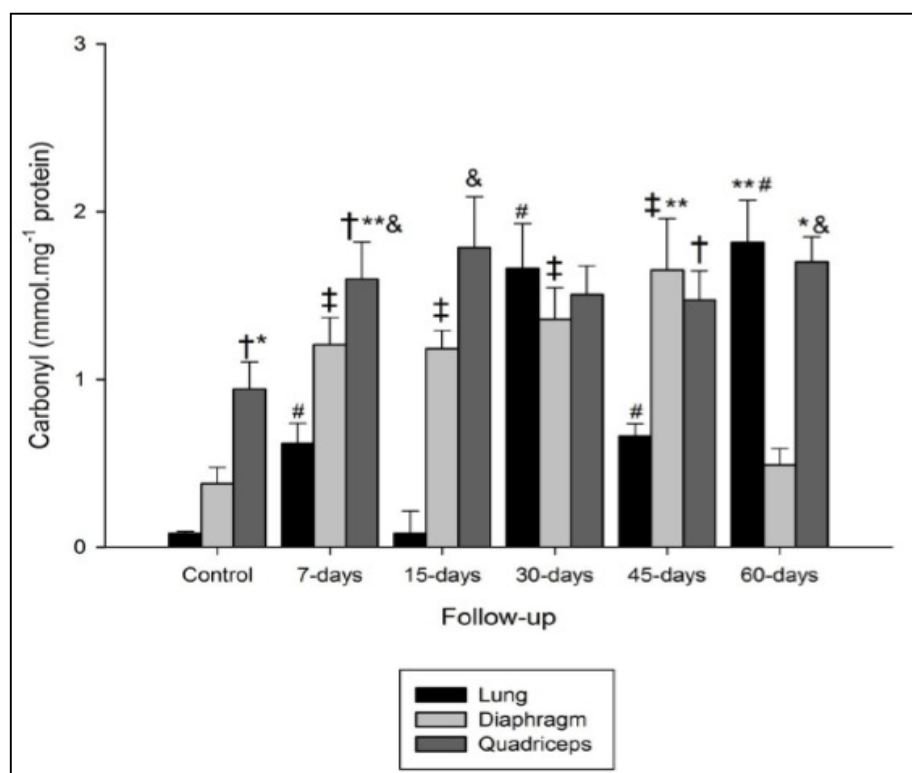
Figura 4:



Fonte: Dados da pesquisadora

## Carbonilas

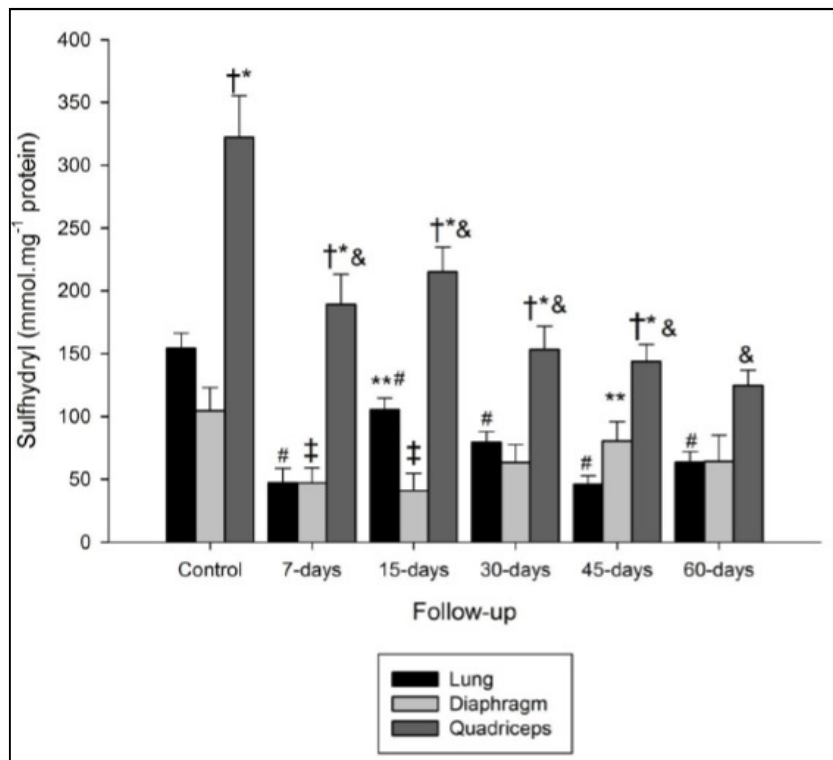
Figura 5:



Fonte: Dados da pesquisadora

## Sulfidrilas

Figura 6:



Fonte: Dados da pesquisadora

## Discussão

O principal objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da exposição à fumaça de cigarro pelo dano oxidativo no músculo esquelético e saber se as alterações morfológicas pulmonares e o dano oxidativo são tempo-dependente. Além disso, macrófagos e neutrófilos estão aumentados em pacientes com DPOC, mantendo uma estreita relação com a gravidade da doença<sup>25</sup>.

Os nossos dados demonstram o aumento nos leucócitos, como os macrófagos e neutrófilos, começando com a exposição à fumaça de cigarro por 45 dias, pode estar relacionado com os números de aumento celular e proliferação, resultando na ativação da resposta imune<sup>9</sup>.

Conforme observado, as alterações pulmonares induzidas pela fumaça de cigarro parece decorrer em consequência de uma lesão primária inflamatória caracterizada por uma acumulação de macrófagos alveolares e neutrófilos no trato respiratório inferior, como a resposta imune e que é crucial na doença inflamatória<sup>33</sup>.

Sabe-se que espécies reativas de oxigênio (ERO) desempenham um papel importante na resposta inflamatória à exposição de fumaça de cigarro. O estresse oxidativo é caracterizado pela maior produção de ERO e diminuição dos níveis de antioxidantes, com a peroxidação lipídica, alterações tióis e carbonilação de proteínas no plasma<sup>20,26</sup>. O enfisema pulmonar é associado com estresse oxidativo, respostas intensivas que resulta em uma relação direta entre a atividade de defesa sistêmica<sup>14</sup>, e os danos oxidativos<sup>22,32</sup>.

O dano oxidativo e inflamação no tecido pulmonar após a exposição à fumaça de cigarro, são freqüentemente estudados. No presente estudo, detectou uma relação entre a contagem total de neutrófilos presentes após o 45<sup>o</sup> dia de exposição e nível de TBARS no tecido pulmonar e do músculo quadríceps, respectivamente ( $r^2 = 0,72$ ,  $p < 0,001$  e  $r^2 = 0,93$ ,  $p < 0,01$ ). Estes dados são consistentes com os resultados que mostram a estreita correlação entre os aspectos positivos da histopatologia e os níveis de malondialdeído tecidual<sup>18</sup>.

Além disso, segundo Macnee o estresse oxidativo medido como TBARS nível plasmático está associada à limitação do fluxo aéreo<sup>16</sup>. As alterações do fluxo aéreo desempenham um papel na função dos músculos respiratórios, como o diafragma. Entretanto, nossos achados demonstram que há um aumento na intensidade da resposta inflamatória no tecido pulmonar começando com a exposição de 45 dias de fumaça de cigarro, que pode favorecer o aparecimento de dano oxidativo no músculo quadríceps.

Segundo Park<sup>21</sup>, a inalação da fumaça do cigarro por 30 dias causa oxidação significativa e esgotamento dos níveis de glutathione nos pulmões. O autor também sugere que o pulmão é um alvo primário do dano oxidativo pelo tabagismo nos estágios iniciais, a fumaça do cigarro, eventualmente, exerce os seus efeitos oxidativos em todos os órgãos. Em nosso estudo, observou-se que a fumaça de cigarro induzida provoca danos oxidativos, mudanças não apenas nos pulmões, mas também nos músculos esqueléticos.

A exposição ao fumo de cigarros por 30-45 dias foi suficiente para gerar níveis mais elevados de dano oxidativo no músculo esquelético. Nossos dados são consistentes com as situações clínicas em que uma maior deterioração do músculo esquelético em pacientes com DPOC foi observado. Um estudo recente mostrou que a principal limitação encontrada nestes pacientes pode estar relacionada a um menor débito cardíaco associado com limitação do fluxo aéreo<sup>6</sup>.

Este estudo demonstra que uma estratégia que seja capaz de melhorar a limitação do fluxo expiratório e hiperinsuflação dinâmica (heliox) acelera a dinâmica de utilização da musculatura periférica de oxigênio como consequência de uma melhor prestação, durante exercícios de alta intensidade em pacientes com DPOC moderada a grave.

Acreditamos que essas interações podem estar ligadas com o equilíbrio redox e reações inflamatórias. Evidências recentes demonstram que a heliox podem ter benefícios terapêuticos atenuando a inflamação do pulmão, reduzindo o estresse oxidativo e mecânicas no manejo clínico da lesão pulmonar aguda <sup>19</sup>.

Os danos oxidativos gerados pela exposição à fumaça de cigarro no músculo esquelético pode levar à perda da função muscular, ou seja, uma queda na força e conseqüente aumento da susceptibilidade à fadiga <sup>3, 35, 4</sup>. A presente investigação é a primeira a fornecer evidências de mudanças oxidativas induzidas pelas ERO no diafragma e de proteínas do músculo quadríceps em animais cronicamente expostos à fumaça de cigarro.

De acordo com nossos resultados, a oxidação protéica foi significativamente maior nos músculos após 7 dias de exposição à fumaça de cigarro. Além disso, durante um protocolo de exposição à fumaça do cigarro, observamos que 7 à 15 dias de exposição é suficiente para elevar a carbonilação do músculo quadríceps.

A carbonilação do diafragma aumentou em 30-45 dias, já a carbonilação no pulmão apenas em 60 dias de exposição. Curiosamente, nossos dados indicam que a exposição à fumaça de cigarro compromete principalmente quadríceps e diafragma, o que pode significar uma perda significativa da função locomotora e da musculatura respiratória em enfisema pulmonar.

De acordo com Barreiro et al. <sup>3</sup>, os efeitos da oxidação protéica muscular no quadríceps ocorreu numa fase anterior, em comparação com os efeitos observados no sistema respiratório. Estes resultados reforçam o conceito que fumaça de cigarro, por si só eleva a toxicidade tecidual da musculatura esquelética dos ratos, independentemente das alterações pulmonares e brônquicas.

Além disso, observou-se que os mesmos animais agudamente expostos a fumaça de cigarro apresentaram um aumento significativo no TBARS, juntamente com uma redução nos níveis de sulfidril muscular imediatamente após a exposição. A carbonilação é fundamental para iniciar o percurso radical e promover a peroxidação lipídica.

Aparentemente, os estudos sobre a exposição crônica à fumaça de cigarro demonstraram que a função pulmonar diminui com o tempo de exposição à fumaça de cigarro, à semelhança do que tem sido observado em humanos <sup>11</sup>. Além disso, a exposição à fumaça de cigarro crônica determina a obstrução ao fluxo aéreo <sup>34</sup>.

## **Conclusão**

Nosso estudo mostrou, pela primeira vez que as alterações oxidativas nas proteínas musculares ocorreram nos músculos do 7º ao 45º dia de exposição à fumaça de cigarro. Além disso, este evento ocorreu concomitantemente com as anormalidades do parênquima induzida pela fumaça de cigarro nos pulmões, sugerindo um efeito tóxico direto da fumaça de cigarro sobre as proteínas do músculo esquelético. No entanto, torna-se mais evidente que o enfisema pulmonar é uma doença complexa, com impacto negativo para todo o corpo e que o dano oxidativo causado pela exposição à fumaça de cigarro ocorre primeiro no músculo esquelético e no tecido pulmonar.

## REFERÊNCIAS

1. **Aksenov MY, and Markesbery WR.** Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 302: 141-145, 2001.
2. **Barnes PJ, Shapiro SD, and Pauwels RA.** Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *European Respiratory Journal* 22: 672-688, 2003.
3. **Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, Gea J, and Barbera JA.** Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 477-488.
4. **Barreiro E, Rabinovich R, Marin-Corral J, Barbera JA, Gea J, and Roca J.** Chronic endurance exercise induces quadriceps nitrosative stress in patients with severe COPD. *Thorax* 64: 13-19, 2009.
5. **Cantin A, and Crystal RG.** Oxidants, Antioxidants and the Pathogenesis of Emphysema. *European Journal of Respiratory Diseases* 66: 7-17, 1985.

6. **Chiappa GR, Borghi-Silva A, Ferreira LF, Carrascosa C, Oliveira CC, Maia J, Gimenes AC, Queiroga F, Jr, Berton D, Ferreira EMV, Nery LE, and Neder JA.** Kinetics of muscle deoxygenation are accelerated at the onset of heavy-intensity exercise in patients with COPD: relationship to central cardiovascular dynamics. *J Appl Physiol* 104: 1341-1350, 2008.
7. **Chiappa GR, Queiroga F, Jr., Meda E, Ferreira LF, Diefenthaler F, Nunes M, Vaz MA, Machado MCL, Nery LE, and Neder JA.** Heliox Improves Oxygen Delivery and Utilization during Dynamic Exercise in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 179: 1004-1010, 2009.
8. **Draper HH, and Hadley M.** Malondialdehyde Determination as Index of Lipid-Peroxidation. *Methods in Enzymology* 186: 421-431, 1990.
9. **Duong C, Seow HJ, Bozinovski S, Crack PJ, Anderson GP, and Vlahos R.** Glutathione peroxidase-1 protects against cigarette smoke-induced lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 299: L425-433.
10. **Frei B, Forte TM, Ames BN, and Cross CE.** Gas-Phase Oxidants of Cigarette-Smoke Induce Lipid-Peroxidation and Changes in Lipoprotein Properties in Human Blood-Plasma - Protective Effects of Ascorbic-Acid. *Biochemical Journal* 277: 133-138, 1991.
11. **Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, and Dockery DW.** Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. *N Engl J Med* 335: 931-937, 1996.
12. **Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, and Pare PD.** The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 350: 2645-2653, 2004.
13. **Kalra J, Chaudhary AK, and Prasad K.** Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 72: 1-7, 1991.
14. **Kluchova Z, Petrasova D, Joppa P, Dorkova Z, and Tkacova R.** The association between oxidative stress and obstructive lung impairment in patients with COPD. *Physiol Res* 56: 51-56, 2007.
15. **Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, and Stadtman ER.** Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology* 186: 464-478, 1990.
16. **MacNee W.** Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol* 429: 195-207, 2001.
17. **Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valenca SS, and Pinho RA.** The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther* 22: 567-573, 2009.

18. **Murarescu ED, Iancu R, and Mihailovici MS.** Morphological changes positive correlates with oxidative stress in COPD. Preliminary data of an experimental rat model--study and literature review. *Rom J Morphol Embryol* 48: 59-65, 2007.
19. **Nawab US, Touch SM, Irwin-Sherman T, Blackson TJ, Greenspan JS, Zhu G, Shaffer TH, and Wolfson MR.** Heliox Attenuates Lung Inflammation and Structural Alterations in Acute Lung Injury. *Pediatric Pulmonology* 40: 524-532, 2005.
20. **Park E-M, Park Y-M, and Gwak Y-S.** Oxidative Damage in Tissues of Rats Exposed to Cigarette Smoke. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 79-86, 1998.
21. **Park EM, Park YM, and Gwak YS.** Oxidative damage in tissues of rats exposed to cigarette smoke. *Free Radic Biol Med* 25: 79-86, 1998.
22. **Pinho RA, Chiesa D, Mezzomo KM, Andrades ME, Bonatto F, Gelain D, Dal Pizzol F, Knorst MM, and Moreira JCF.** Oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease patients submitted to a rehabilitation program. *Respiratory Medicine* 101: 1830-1835, 2007.
23. **Rangasamy T, Cho CY, Thimmulappa RK, Zhen LJ, Srisuma SS, Kensler TW, Yamamoto M, Petrache I, Tudor RM, and Biswal S.** Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Journal of Clinical Investigation* 114: 1248-1259, 2004.
24. **Rangasamy T, Misra V, Zhen L, Tankersley CG, Tudor RM, and Biswal S.** Cigarette smoke-induced emphysema in A/J mice is associated with pulmonary oxidative stress, apoptosis of lung cells, and global alterations in gene expression. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L888-900, 2009.
25. **RETAMALES I, ELLIOTT WM, MESHI B, COXSON HO, PARE PD, SCIURBA FC, ROGERS RM, HAYASHI S, and HOGG JC.** Amplification of Inflammation in Emphysema and Its Association with Latent Adenoviral Infection. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 469-473, 2001.
26. **Reznick AZ, Cross CE, Hu ML, Suzuki YJ, Khwaja S, Safadi A, Motchnik PA, Packer L, and Halliwell B.** Modification of Plasma-Proteins by Cigarette-Smoke as Measured by Protein Carbonyl Formation. *Biochemical Journal* 286: 607-611, 1992.
27. **Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, Bezerra FS, Pinho RA, Valenca SS, and Porto LC.** Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit* 16: BR218-226, 2010.
28. **Tudor RM, Petrache I, Elias JA, Voelkel NF, and Henson PM.** Apoptosis and emphysema: the missing link. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28: 551-554, 2003.
29. **Valenca SS, Bezerra FS, Romana-Souza B, Paiva RO, Costa AM, and Porto LC.** Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. *J Nutr Biochem* 19: 604-611, 2008.

30. **Valenca SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, Koatz VL, and Porto LC.** Light cigarette smoke-induced emphysema and NF $\kappa$ B activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol* 87: 373-381, 2006.
31. **Valenca SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, and Porto LC.** Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol* 32: 351-356, 2004.
32. **Vibhuti A, Arif E, Deepak D, Singh B, and Qadar Pasha MA.** Correlation of oxidative status with BMI and lung function in COPD. *Clinical Biochemistry* 40: 958-963, 2007.
33. **Vlahos R, Bozinovski S, Jones JE, Powell J, Gras J, Lilja A, Hansen MJ, Gualano RC, Irving L, and Anderson GP.** Differential protease, innate immunity, and NF- $\kappa$ B induction profiles during lung inflammation induced by subchronic cigarette smoke exposure in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290: L931-945, 2006.
34. **Wright JL, Sun JP, and Vedal S.** A longitudinal analysis of pulmonary function in rats during a 12 month cigarette smoke exposure. *Eur Respir J* 10: 1115-1119, 1997.
35. **Wust RC, Morse CI, de Haan A, Rittweger J, Jones DA, and Degens H.** Skeletal muscle properties and fatigue resistance in relation to smoking history. *Eur J Appl Physiol* 104: 103-110, 2008.
36. **Yoshida T, and Tudor RM.** Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 87: 1047-1082, 2007.

### CAPÍTULO III – NORMAS DA REVISTA

*A Respiratory Medicine* é uma revista de renome internacional, clinicamente orientada, combinando a investigação de ponta original com opiniões state-of-the-art para lidar com todos os aspectos das doenças respiratórias e as intervenções terapêuticas, com uma clara relevância clínica. A revista é um fórum criado para a publicação de trabalho experimental e de fases clínicas na vanguarda da investigação interventiva. Bem como trabalhos de pesquisa original de longa-metragem, resenhas, correspondências e comunicações breves. A revista também publica suplementos regulares em áreas de interesse especial.

#### *Apresentação Online de Manuscritos*

A apresentação e análise de todos os trabalhos agora é conduzido inteiramente online, aumentando a eficiência para editores, autores e revisores, aumentando a velocidade da publicação. Os autores são guiados passo a passo em todo o processo, e são mantidos a par dos progressos de seu papel em cada etapa.

O sistema cria versão em PDF do manuscrito submetido para revisão dupla, revisão e correção. Toda a correspondência, incluindo a decisão do editor e do pedido de revisão, é realizada por e-mail. Os autores que solicitam mais informações sobre submissão on-line são fortemente encorajados a ver o sistema, incluindo um tutorial, em <http://ees.elsevier.com/yrmed>. Os autores devem estar atentos a revisão dupla, a orientação e os tempos de publicação disponível na homepage da Revista *Respiratory Medicine*.

## Revisão Dupla

As inscrições são alocadas para um editor de movimentação, normalmente um Editor Associado. Caso o papel seja considerado adequado para a revisão dupla, revisores apropriados serão recrutados. Os autores são obrigados a fornecer o nome e os dados de contato total de 2 alunos em potencial, embora a escolha dos alunos fica a critério do editor de manipulação. A responsabilidade da decisão final cabe ao editor de manipulação, que se reserva o direito de rejeitar o papel apesar das críticas favoráveis em função das prioridades da revista.

## Carta de Apresentação

Os autores correspondentes devem apresentar uma carta de apresentação, que inclui declarações, respondendo às seguintes perguntas:

- ✓ A obra foi vista e aprovada por todos os co-autores?

Como o trabalho é clinicamente relevante, e como é que se somam as pesquisas existentes?

- ✓ Tenho documentos estreitamente relacionado com o manuscrito submetido sido publicados ou submetidos para publicação em outro lugar? Em caso afirmativo, fornecer pormenores.

A falha no fornecimento de uma carta abordando cada uma das perguntas acima resultará na devolução da obra ao autor. A carta deve ser enviada como um item de apresentação separada. Para consultas, favor contatar o escritório editorial da revista diretamente: [respiratorymedicine@elsevier.com](mailto:respiratorymedicine@elsevier.com)

## Autoria

Todos os autores deveriam ter feito contribuições substanciais para as seguintes características: (1) a concepção e desenho do estudo, ou a aquisição de dados, ou análise e interpretação dos dados, (2) redação do artigo ou revisão crítica do conteúdo intelectual (3), a aprovação final da versão a ser apresentada.

### Agradecimentos

Todos os contribuintes que não cumprem os critérios de autoria definidos acima devem ser listadas em uma seção de agradecimentos. Exemplos de pessoas que poderiam ser reconhecidos incluem uma pessoa que prestaram apoio puramente técnico, auxílio na redação ou chefes de departamento que tenham dado apenas apoio geral. Os autores devem revelar se eles tinham qualquer tipo de assistência por escrito e identificar a entidade que pagou por esta assistência.

### Conflito de interesse

O potencial de conflito de interesse existe quando um autor (ou a instituição do autor), revisor ou editor tem relações financeiras ou pessoais que possam influenciar inadequadamente suas ações. Os editores e revisores da Revista são responsáveis por divulgar ao Editor-Chefe qualquer relação pessoal ou financeira que possa enviesar o seu trabalho durante o processo de revisão dupla. Os autores são especificamente convidados a refletir sobre os conflitos de interesse financeiros (tais como emprego, consultoria, propriedade de ações, honorários de peritos e testemunhos pagos), assim como outras formas de conflito de interesse, incluindo as questões pessoais, acadêmica e intelectual.

Para a declaração de conflito de interesse de todos os autores devem revelar as relações financeiras e pessoais com outras pessoas ou organizações que poderiam influenciar de forma inadequada (viés) o seu trabalho. Exemplos de potenciais conflitos de interesse incluem o emprego, consultorias, participação acionária, honorários, depoimento de peritos pagos, pedidos de patentes / registros, e de subvenções ou outros financiamentos. O conflito de interesse é um item de apresentação obrigatória: os autores são obrigados a apresentar a declaração para prosseguir com sua apresentação. A declaração do Conflito de Interesse normalmente será publicado dentro do corpo do artigo, e será exibido antes da seção de referências. Todas as fontes de financiamento devem ser declaradas como um aviso no final do texto. Os autores devem declarar o papel dos patrocinadores do estudo, se houver, no desenho do estudo, análise e interpretação dos dados, na redação do manuscrito e na decisão de submeter o manuscrito para publicação. Se os patrocinadores do estudo não tiveram nenhuma participação, os autores devem declarar esse fato.

### Ensaio clínico randomizado

Todos os ensaios clínicos randomizados controlados submetidos para publicação na *Respiratory Medicine* devem incluir uma conclusão consolidada do Reporting Standards Trials (CONSORT) fluxograma. Por favor, consulte o site da declaração CONSORT na <http://www.consort-statement.org> para mais informações.

A Revista *Respiratory Medicine* aprovou a proposta do Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos (ICMJE), que exigem, como condição de reflexão para a publicação de ensaios clínicos, a inscrição em um registro de julgamentos públicos. Os ensaios devem registrar-se antes do início da inscrição do paciente. O número de registro de ensaios clínicos devem ser incluídas no final do resumo do artigo. Para esse efeito, um ensaio clínico é definido como qualquer pesquisa que prospectivamente designa participantes humanos ou grupos de seres humanos para uma ou mais intervenções relacionadas à saúde para avaliar os efeitos dos resultados de saúde. Intervenções relacionadas com a saúde incluem qualquer intervenção usada para modificar um resultado biomédica ou relacionada à saúde (por exemplo, medicamentos, procedimentos cirúrgicos, aparelhos, tratamentos comportamentais, intervenções dietéticas e mudanças no processo de prestação de cuidados). Consequências para a saúde incluem medidas biomédica ou relacionados com a saúde obtidos em pacientes ou participantes, incluindo as medidas farmacocinéticas e efeitos adversos. Puramente estudos observacionais (aqueles em que a atribuição da intervenção médica não é a critério do pesquisador) não vai exigir o registro. Mais informações podem ser encontradas em <http://www.icmje.org>.

#### Divulgação dos resultados dos ensaios clínicos

Ao apresentar um documento de avaliação clínica para a revista através do sistema de submissão on-line, por favor selecione Ensaio Clínico Livre como um tipo de artigo. Em consonância com a posição do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas, a *Respiratory Medicine* não vai considerar os resultados registrados no Registro mesmos ensaios clínicos em que o registro principal reside a publicação prévia, se os resultados destacados são apresentados sob a forma de um resumo estruturado (menos de 500 palavras) abstrato ou tabela. No entanto, divulgar os resultados em outras circunstâncias (por exemplo em reuniões) é desencorajado e podem comprometer consideração do manuscrito. Os autores devem divulgar plenamente todas as postagens nos registros dos resultados do mesmo ou de trabalhos relacionados.

#### Material suplementar

A *Respiratory Medicine* aceita material suplementar eletrônico para apoiar e melhorar a sua investigação científica. Arquivos Complementares oferecem as possibilidades de autores adicionais para publicar aplicações de suporte, filmes, seqüências de animação, imagens de alta resolução, conjuntos de dados de fundo, clips de som e muito mais. Arquivos complementares fornecidos serão publicados online junto com a versão eletrônica do seu artigo, incluindo a Science Direct: <http://www.sciencedirect.com>. A fim de garantir que o material apresentado está diretamente utilizável, certifique-se que os dados são fornecidos em um dos nossos formatos de arquivo recomendado. Os autores devem apresentar o material em formato eletrônico em conjunto com o artigo e fornecer uma legenda concisa e descritiva para cada arquivo. Para obter instruções mais detalhadas, visite nossas páginas e veja as instruções no <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

#### Ética

Trabalho sobre os seres humanos que são submetidos a *Respiratory Medicine* deve respeitar os princípios estabelecidos na Declaração de Helsinki; Recomendações orientando os médicos na investigação biomédica envolvendo seres humanos. Adotado pela 18ª Assembleia Médica Mundial, Helsinki, Finlândia, Junho de 1964, alterada pela 29ª Assembléia Médica Mundial, Tóquio, Japão, em outubro de 1975, a 35ª Assembléia Médica Mundial, Veneza, Itália, outubro de 1983, e a 41ª Assembléia Médica Mundial, Hong Kong, setembro de 1989. O manuscrito deve conter uma declaração de que o trabalho foi aprovado pelos comitês de ética apropriada relacionados com a instituição (ões) em que foi realizado e que os sujeitos deram consentimento informado para o trabalho. Estudos que envolvem experimentos com animais deve indicar que os seus cuidados estava de acordo com normas da instituição. Nomes, siglas e números de Hospital de pacientes e voluntários não devem ser divulgados.

#### Direitos autorais

**Os trabalhos aceitos e que se tornarem o autor da Revista e são aceitos no entendimento de que eles não tenham sido publicados, não estão sendo considerados para publicação em outros lugares e estão sujeitos a revisão editorial.** Se os títulos intimamente relacionado com o manuscrito submetido ter sido publicados ou submetidos para publicação em outro lugar, o autor deve mencionar esse facto na sua carta. Após a aceitação de um artigo, os autores serão convidados a assinar um "Acordo de Editoração de Revistas" (para mais informações sobre estes direitos autorais ver em <http://www.elsevier.com/authors>). A aceitação do acordo vai garantir a mais ampla divulgação possível de informações. Um e-mail (ou carta) será enviado ao autor correspondente confirmando o recebimento do manuscrito, juntamente com o formulário de "Acordo de Editoração de Revistas. Se excertos de outras obras protegidas estão incluídas, o autor (s) devem obter permissão por escrito dos proprietários de direitos autorais e de crédito a fonte (s) no artigo. Elsevier disponibiliza os formulários pré-impressos para utilização pelos autores nos seguintes casos: consulte <http://www.elsevier.com/permissions>. Ou e-mail [healthpermissions@elsevier.com](mailto:healthpermissions@elsevier.com).

#### Lista de apresentação do Manuscrito

Os autores devem garantir que eles tenham enviado os seguintes itens separados, para que a redação possa processar a sua apresentação. O não fornecimento de qualquer um dos itens obrigatórios abaixo resultará na devolução do manuscrito ao autor:

- ✓ Carta de Apresentação (obrigatório);
- ✓ Resumo (incluindo o número de ensaios clínicos de registo se for caso clinico) (obrigatório);
- ✓ Declaração de Conflito de Interesses (obrigatório);
- ✓ Manuscrito incluindo a declaração de ética conforme o caso (obrigatório);
- ✓ Arquivo Complementar da Obra, como por exemplo: conjuntos de dados, arquivos de vídeo (opcional);
- ✓ Permissões de letras (Se necessário, veja abaixo) Consolidado do Reporting Standards Trials (CONSORT) fluxograma, conforme apropriado.

## Comentários

A revista é aberta a apresentação de opiniões state-of-the-art sobre temas importantes com relevância clínica. Autores para potenciais revisões são encorajados a contatar o editor-adjunto Dr. N. Hanania [hanania@bcm.tmc.edu](mailto:hanania@bcm.tmc.edu) antecipadamente com as suas propostas de revisão.

## Relatos de Casos (*Respiratory Medicine CME*)

Todos os relatos de caso passarão a deixar de ser considerado para publicação em *Respiratory Medicine*, mas sim para a publicação na ***Respiratory Medicine CME***. *Por favor, note que esta é uma publicação separada para a revista regular. Os relatos do caso podem ser submetidos à considerações para a Respiratory Medicine CME através do site de submissão da mesma linha da revista regular, conforme descrito abaixo. Autores são convidados a visitar a Respiratory Medicine CME para obter informações específicas e critérios de aceitação utilizados.*

## Preparando seu manuscrito

Os autores devem ter em mente os seguintes pontos adicionais antes de entrar no processo de submissão.

## Formato e estrutura

A maioria dos formatos de texto pode ser acomodado, mas a Microsoft Word é preferível. Em geral, os artigos devem estar em conformidade com a estrutura convencional de Resumo, Introdução, Métodos, Resultados, Discussão e Referências.

## Título

Sua página de rosto, deve apresentar o título em letras maiúsculas (não superior a 100 cartas), um título resumido (máximo 50 letras) e os nomes dos autores (como estão a aparecer), filiações e endereços completos, incluindo código postal (CEP). O autor e endereço para quem a correspondência deve ser enviada deve ser claramente indicada. Favor fornecer telefone, fax e números de e-mail para o autor correspondente.

## Resumo

O resumo de seu manuscrito que resume o conteúdo, a um máximo de 250 palavras, deve ser fornecido como um item de apresentação separada.

## Formato das Referências

Os manuscritos devem utilizar o estilo 'Embellished Vancouver para referências, como segue:

*Texto:* Indique as referências por números sobrescritos no texto. Os autores reais podem ser mencionados, mas o número de referência (s) devem ser sempre fundamentadas.

*Tabela:* Númere as referências na lista na ordem em que aparecem no texto.

Exemplos:

Referência a uma publicação da Revista:

Van der Geer J, Hanraads RA Lupton JAJ. A arte de escrever um artigo científico. *J Commun Sci* 2000; 163:51-9.

Referência a um livro:

2. W Strunk Jr, EB White. Os elementos do estilo. 3<sup>a</sup> ed. New York: Macmillan, 1979.

Referência a um capítulo de um livro editado:

3. Mettam GR, LB Adams. Como preparar uma versão eletrônica de seu artigo. In: BS Jones, Smith RZ, editores. *Introdução à era eletrônica*. Nova York: E-Publishing Inc, 1999, p. 281-304. Nota a forma abreviada para o número da última página. por exemplo, 51-9, e que por mais de 6 autores os 6 primeiros devem ser listados, seguidos por "et al". Para mais detalhes, consulte "Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas" (*J Am Med Assoc* 1997; 277:927-34), ver também [http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html).

## Figuras

Figuras de boa qualidade devem ser submetidos on-line como um arquivo separado. Para obter instruções detalhadas sobre a preparação da obra de arte eletrônica, consultar: <http://www.elsevier.com/authors>. A permissão para reproduzir ilustrações devem ser sempre obtido antes do envio e detalhes incluídos com as legendas.

## Tabelas

As tabelas devem ser enviadas on-line como um arquivo separado, ter um título curto e descritivo, e ser numeradas em algarismos arábicos. As tabelas devem ser citadas no texto.

## Palavras-chave

Uma lista de três a seis palavras-chave devem ser fornecidos: instruções completas são fornecidas no momento da apresentação do artigo online.

## Unidades e abreviações

Estes devem ser apresentados em unidades SI com a tradicional equivalente entre parênteses quando apropriado. Convenções para as abreviaturas devem ser os descritos nas unidades, símbolos e abreviaturas, disponível a partir da Royal Society of Medicine.

## Edição de linguagem

Documentos somente serão aceitos quando eles são escritos em um padrão aceitável de Inglês. Autores que necessitam de informações sobre serviços de edição de texto e edição de linguagem pré-e pós-apresentação, visitar <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> ou contato para mais informações [authorsupport@elsevier.com](mailto:authorsupport@elsevier.com). A Elsevier não endossa nem assume a responsabilidade de quaisquer produtos, bens ou serviços oferecidos por fornecedores externos através dos nossos serviços ou de qualquer publicidade. Para obter mais informações, consulte os nossos Termos e Condições.

## Comunicações Breves

Estes devem ser apresentados, conforme detalhado acima, mas não deve exceder 1000 palavras, e pode, normalmente, conter apenas uma ilustração ou tabela. As comunicações breves contendo novas informações podem ser selecionados para a revisão dupla e publicação rápida, a critério do editor e conselho editorial.

## Informações sobre permissões

Se as ilustrações são emprestadas de fontes publicadas, a permissão por escrito deve ser obtido a partir de ambos editor e autor, e uma linha de crédito acrescentada a fonte da legenda. Se o material de texto, totalizando 250 a 300 palavras, ou tabelas, são emprestados de fontes publicadas na íntegra, é necessário autorização por escrito de ambos editor e autor. Com citações menores, é suficiente para adicionar um crédito bibliográfico. Cartas de permissão para reprodução de texto ou ilustração deve acompanhar o manuscrito. Se você foi incapaz de obter a permissão, por favor, apontar isso.

## Publicação Acelerada

A revista aponta para a publicação imediata de todos os trabalhos aceitos, sobretudo as inscrições que contenham dados novos, podem ser acelerado, para revisão e publicação. Esta é uma facilidade e é estritamente limitada a critério do Editor-Chefe.

## Provas

Um conjunto de provas de página em formato PDF será enviado por e-mail para o autor correspondente, o qual são solicitados para corrigir e voltar dentro de 48 horas. Apenas pequenas correções são aceitáveis nesta fase. Se não temos um endereço de e-mail, em seguida, as provas em papel serão enviados pelo correio. Elsevier agora envia as provas no formato PDF que podem ser anotados, para isso você precisará baixar o Adobe Reader versão 7 disponível gratuitamente a partir da Adobe. Instruções sobre como fazer anotações em arquivos PDF irá acompanhar as provas. Os requisitos exatos do sistema são fornecidos no site da Adobe. Se você não quiser usar o PDF função de anotações, você pode listar as correções (incluindo as respostas ao formulário de consulta) e voltar a Elsevier em um e-mail. Por favor, liste as suas correções citando o número da linha. Se, por qualquer motivo, não for possível marcar as correções e quaisquer outras observações (incluindo as respostas ao formulário de consulta) envie em uma cópia impressa de sua prova e retornar por fax ou digitalizar as páginas e e-mail, ou pelo correio . Por favor, utilize esta prova apenas para verificar a composição, edição, exaustividade e correção do texto, tabelas e figuras.

## Separatas

O autor correspondente será dotado de um arquivo PDF do artigo via e-mail ou, alternativamente, 25 separatas papel livre, sem custo. O arquivo PDF é uma

versão com marca d'água do artigo publicado e inclui uma folha de rosto com a imagem da capa da Revista e de uma declaração que define os termos e condições de uso. Separatas de papel adicionais podem ser solicitadas pelos autores. Um formulário com os preços será enviada ao autor correspondente.

### Artigos aceitos

Para controlar artigos aceitos e definir alertas de e-mail para lhe informar quando o status de um artigo mudou visite: <http://www.elsevier.com/authors>. Há também orientações detalhadas, informações de copyright, perguntas frequentes e muito mais. Detalhes do contato para as questões suscitadas após a aceitação de um artigo, especialmente aqueles relacionados às provas, são fornecidos após o registro de um artigo para publicação.

### Acordos de financiamento e políticas

Elsevier estabeleceu acordos e políticas desenvolvidas para permitir que os autores que publicam manuscritos em periódicos Elsevier possam cumprir com as potenciais exigências especificadas em um arquivo com as condições da sua concessão de prêmios. Para saber mais sobre os acordos e as políticas de financiamento, visite <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Escritório Editorial Para contactar o escritório editorial da *Respiratory Medicine*, envie e-mail para [respiratorymedicine@elsevier.com](mailto:respiratorymedicine@elsevier.com). Nosso objetivo é responder a todos os pedidos rapidamente.