

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
PPG CBIOL

Dissertação

**Avaliação dos efeitos da
exposição à fumaça de cigarro
e ao aerossol de cigarro
eletrônico em camundongos
adultos C57BL/6.**

Andrea Jazel Rodríguez Herrera

Ouro Preto
2022





Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas



**Avaliação dos efeitos da exposição à fumaça de
cigarro e ao aerossol de cigarro eletrônico em
camundongos adultos C57BL/6**

Andrea Jazel Rodríguez Herrera

Ouro Preto

2022

Andrea Jazel Rodriguez Herrera

**Avaliação dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro
e ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos
adultos C57BL/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra

Ouro Preto

2022

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

H565a Herrera, Andrea Jazel Rodriguez.

Avaliação dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos adultos C57BL/6. [manuscrito] / Andrea Jazel Rodriguez Herrera. - 2022.

78 f.: il.: color., gráf., tab..

Orientador: Prof. Dr. Frank Silva Bezerra.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Cigarro eletrônico. 2. Cigarro convencional. 3. Enfisema pulmonar. I. Bezerra, Frank Silva. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Andrea Jazel Rodríguez Herrera

Avaliação dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro e ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos adultos C57BL/6

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 29 de julho de 2022.

Membros da banca

Doutor - Frank Silva Bezerra - Orientador - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutor - Akinori Cardozo Nagato - Universidade Federal de Juiz de Fora

Frank Silva Bezerra, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 19/09/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Frank Silva Bezerra, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 19/09/2022, às 16:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0400146** e o código CRC **A1533E20**.

Diante todo, este trabalho que marcou a minha vida profissional como uma das metas mais importantes da minha carreira é dedicado com intensa devoção para minha avó Rosário (Mita), minha mãe Mayela e finalmente para minha família inteira, que sempre foram fonte de apoio e incentivo para minha realização acadêmica.

Agradecimentos

Com profundo amor e devoção agradeço sempre ao meu senhor Deus pai todo-poderoso, por todas as bênçãos que me concedeu ao longo da minha vida.

Sou grato a minha família, que mesmo permanecendo longe fisicamente sempre estiveram perto de mim através das orações e as ligações que periodicamente fazíamos. Um agradecimento especial para minha avó e minha mãe que tem sido as pessoas mais próximas em apoio e amor incondicional.

Para o meu parceiro, namorado e noivo Fernando Bendaña, pelo apoio, presença, amor e companheirismo. Espero que sempre fique ao meu lado pelo resto das nossas vidas, construindo os sonhos que tanto anelamos.

Ao meu orientador Dr. Frank Silva Bezerra, pela oportunidade de ser parte do seu grupo de laboratório, pela paciência nos momentos de atraso, e pelo incentivo dessa fala de inglês sempre em nossas reuniões.

A toda a equipe do Laboratório de fisiopatologia experimental (LAFEX), que sem exceção foram muito importantes na realização deste projeto, pelos seus conhecimentos e apoio compartilhados comigo.

A minha amiga venezuelana Elena Cecilia Marcano Gomez, por todo o apoio que ela foi neste período de minha vida.

Aos membros dos laboratórios LMB e LABIIN, por sua ajuda com equipamentos e procedimentos de análises específicos que foram de muita importância para a conformação desse trabalho de pesquisa.

Às instituições de fomento PAEC OEA-GCUB, CAPES e UFOP, pelo apoio financeiro e administrativo.

Resumo

O tabagismo é o responsável pela morte de 8 milhões de pessoas por ano, e é a causa de aproximadamente 50 doenças, incluindo câncer, doenças respiratórias crônicas e cardiovasculares. Os cigarros eletrônicos, surgiram como uma alternativa ao tabagismo, mas as consequências do uso a longo prazo ainda não estão claras. O objetivo deste estudo foi avaliar um modelo crônico de exposição à fumaça de cigarro e ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos C57BL/6 machos e fêmeas. Foram utilizados 48 camundongos com idade entre 8 e 10 semanas, que foram divididos em 6 grupos (n=8): controle fêmeas (GCF), cigarro convencional fêmeas (GCCF), cigarro eletrônico fêmeas (GCEF), controle machos (GCM), cigarro convencional machos (GCCM) e cigarro eletrônico machos (GCEM). Os animais dos grupos GCCF e GCCM foram expostos à fumaça de cigarro convencional (FC) (12 cigarros por dia) durante 60 dias. Os grupos GCEF e GCEM foram expostos ao aerossol do cigarro eletrônico (ACE) durante 60 dias (12 ciclos de exposição com 20 puffs/cada ciclo). Ao final das exposições, os animais foram mantidos por 60 dias sem exposição. 24 horas após o protocolo experimental, os parâmetros ventilatórios foram mensurados e coletados e os animais foram eutanasiados, e coletados o sangue, o lavado broncoalveolar e os pulmões para análise morfométrica e bioquímica. Os animais do grupo GCEF apresentaram maior frequência respiratória e volume minuto em comparação com o GCF. Nos machos, GCCM e GCEM apresentaram maior volume corrente e volume minuto comparado com o GCM. No sangue periférico, GCCF foi observado maior número de linfócitos, monócitos e neutrófilos em comparação com o GCF. A exposição ao ACE aumentou o número de monócitos e neutrófilos. A exposição à FC e ao ACE promoveram recrutamentos de macrófagos, neutrófilos e linfócitos para as vias aéreas inferiores e promoveu maior peroxidação lipídica e oxidação de proteínas em comparação ao controle em machos e fêmeas. No homogenato pulmonar GCEF e GCEM mostraram maior concentração de proteínas comparado com o controle. A atividade de superóxido dismutase (SOD) foi maior no GCCF em comparação com o controle. Nos machos, a atividade de SOD foi menor no GCEM comparado com GCM e GCCM. Além disso, a atividade de catalase foi menor GCEM em comparação com GCM e

GCCM. A expressão da metaloproteinase 2 (MMP-2) foi maior em GCCF comparado com o GCF. Houve maior densidade de volume de espaço aéreo alveolar ($V_v [a]$) e intercepto linear médio (Lm) no GCEF comparado com o GCF. Nos machos, GCCM e GCEM apresentaram maior $V_v[a]$ e Lm em comparação com GCM. Os resultados mostraram que a FC e ACE provocaram em camundongos C57BL/6 de ambos os sexos danos no pulmão confirmados pelas alterações no parênquima pulmonar e parâmetros ventilatórios, através do recrutamento de células inflamatórias e desequilíbrio redox, desenvolvendo uma condição patológica semelhante à enfisema pulmonar.

Palavras chave: Cigarro eletrônico, fumaça de cigarro, enfisema pulmonar.

Abstract

Smoking is responsible for the death of 8 million people a year, and is the cause of approximately 50 diseases, including cancer, chronic respiratory and cardiovascular diseases. Electronic cigarettes have emerged as an alternative to smoking, but the consequences of long-term use are still unclear. The objective of this study was to evaluate a chronic model of exposure to cigarette smoke and e-cigarette aerosol in male and female C57BL/6 mice. 48 mice aged between 8-10 weeks, which were divided into 6 groups (n =8): Control females (CFG), conventional cigarette females (CCFG), electronic cigarette females (ECFG), control males (CMG), conventional cigarette males (CCMG) and electronic cigarette males (ECMG). Animals in the CCFG and CCMG groups were exposed to conventional cigarette smoke (CS) (12 cigarettes per day) for 60 days. The CCFG and CEMG groups were exposed to electronic cigarette aerosol (ECA) for 60 days (12 exposure cycles with 20 puffs/each cycle). At the end of the exposures the animals were kept for 60 days without exposure. 24 hours after the experimental protocol, the ventilatory parameters were collected, the animals were euthanized, and blood, bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and lungs were collected for morphometric and biochemical analysis. The animals in the ECFG group had higher respiratory rate and minute volume compared to the CFG. In males, CCMG and ECMG had higher tidal volume and minute volume compared to CMG. In peripheral blood, GCCF was observed to have a greater number of lymphocytes, monocytes and neutrophils compared to CFG. Exposure to ECA increased the number of monocytes and neutrophils. Exposure to FC and ACE promoted recruitment of macrophages, neutrophils and lymphocytes to the lower airways and promoted greater lipid peroxidation and protein oxidation compared to control in males and females. In lung homogenate, ECFG and ECMG showed higher protein concentration compared to control group. Superoxide dismutase (SOD) activity was higher in CCFG compared with control. In males, SOD activity was lower in ECMG compared to CMG and CCMG. Moreover, the catalase activity was lower in ECMG compared to CMG and CCMG. Metalloproteinase 2 (MMP2) expression was higher in CCFG compared to control. There was an increase of higher alveolar airspace volume density ($V_v [a]$) and mean linear intercept (L_m) in ECFG compared to CFG. In males, CCMG and ECMG showed

higher $V_v[a]$ and L_m compared to CMG. The results showed that CS and ECV promoted lung damage confirmed by changes in lung parenchyma and ventilatory parameters, through recruitment of inflammatory cells and redox imbalance, developing a pathological emphysema-like condition.

Keywords: Electronic cigarette, cigarette smoke, pulmonary emphysema.

Lista de Figuras

Figura 1. Fenótipo de DPOC	16
Figura 2. Fisiopatologia da DPOC	18
Figura 3. Respostas ao estresse oxidativo na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC)	19
Figura 4. Estrutura de um dispositivo eletrônico	21
Figura 5. Possível mecanismo de sinalização para dano pulmonar induzido por cigarro eletrônico contendo nicotina	23
Figura 6. Desenho experimental de exposição ao cigarro convencional e cigarro eletrônico	27
Figura 7. Esquema da câmara de inalação	28
Figura 8. Massa corporal dos animais em três momentos diferentes (0,60 e 120 dias)	39
Figura 9. Fotomicrografias representativas do pulmão coradas com hematoxilina e eosina	51
Figura 10. Resumo dos resultados do estudo	52

Lista de tabelas

Tabela 1. Densidade pulmonar e massa relativa do pulmão	40
Tabela 2. Parâmetros ventilatórios dos grupos experimentais	41
Tabela 3. Contagem total e diferencial de células do sangue	42
Tabela 4. Contagem total e diferencial de células do LBA	44
Tabela 5. Biomarcadores de estresse oxidativo no parênquima pulmonar dos grupos experimentais	46
Tabela 6. Níveis de citocinas no LBA dos grupos experimentais	47
Tabela 7. Níveis da expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar	48
Tabela 8. Análises estereológicas do parênquima pulmonar	50

Lista de siglas e abreviaturas

ACE: Aerossol de cigarro eletrônico	ENDS: <i>Electronic nicotine delivery systems</i>
ANVISA: Agência nacional de vigilância	EROS: Espécies reativas de oxigênio
ATB: Ácido tiobarbitúrico	EVALI: <i>E-cigarette or Vaping product use-Associated Lung Injury</i>
ATC: Ácido tricloroacético	FCC: Fumaça de cigarro convencional
AVC: Acidente vascular cerebral	FR: Frequência respiratória
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	GCCF: Grupo cigarro convencional fêmeas.
CAT: Catalase	GCCM: Grupo cigarro convencional machos
CC: Cigarro convencional	GCEF: Grupos cigarro eletrônico Fêmeas
CCA: Centro de ciência animal	GCEM: Grupo cigarro eletrônico machos
CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças	GCF: Grupo controle fêmeas
CE: Cigarro eletrônico	GCM: Grupo controle machos
CEUA: Comitê de ética no uso de animais	GCUB: Grupo de cooperação internacional de universidades brasileiras
CO: Monóxido de carbono	GOLD: <i>Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease</i>
DCNT: Doenças crônicas não transmissíveis	IL: Interleucina
DEF: Dispositivos eletrônicos para fumar	INCA: Instituto Nacional de Câncer
DMSO: Dimetilsulfóxido	IRPM: Incursões respiratórias por minuto
DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina	LBA: Lavado broncoalveolar
DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica	Lm: Intercepto linear médio
ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática	

MDA: Malondialdeído

MMP: Metaloproteinasas da matriz

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2H]-2,5-difeniltetrazólio

OEA: Organização dos Estados Americanos

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana da Saúde

PAEC: Programa de Alianças para Educação e Capacitação

PG: Propilenoglicol

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SOD: Superóxido dismutase

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

UFOP: Universidade Federal de Ouro preto

VC: Volume corrente

VG: Glicerina vegetal

VM: Volume minuto

Vv (a): Densidade de volume de alvéolo

Vv (sa): Densidade de volume de septos alveolares

WHO: *World Health Organization*

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1. Tabaco, cigarro e doenças	13
2.2. Doença pulmonar obstrutiva crônica	15
2.3. Cigarro Eletrônico.....	20
3. JUSTIFICATIVA.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo Geral.....	25
4.2. Objetivos Específicos	25
5. MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1. Animais.....	26
5.2. Exposição à fumaça ou aerossol de cigarros	27
5.2.1. Exposição à fumaça de cigarro convencional	27
5.2.2. Exposição ao aerossol de cigarro eletrônico.....	28
5.3. Parâmetros biométricos.....	29
5.4. Parâmetros ventilatórios	29
5.5. Coleta do sangue e esfregaço sanguíneo	29
5.6. Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)	30
5.7. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA	30
5.8. Processamento e homogeneizado tecidual.....	31
5.9. Marcadores de defesas antioxidantes	31
5.9.1. Proteínas totais	31
5.9.2. Atividade da superóxido dismutase (SOD)	32
5.9.3. Atividade de Catalase	33
5.10. Marcadores de dano oxidativo	33
5.10.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	33
5.10.2. Carbonilação de proteínas	34
5.11. Mensuração de marcadores inflamatórios	34
5.12. Atividade da MMP-9 E MMP-2.	35
5.13. Histopatologia pulmonar.....	36
5.13.1. Análises estereológico	36

5.13.2. Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm).....	36
5.14. Análise estatística	37
6. RESULTADOS	38
6.1. Avaliação de parâmetros biométricos.....	38
6.2. Avaliação de parâmetros ventilatórios.....	40
6.3. Avaliação dos leucócitos no sangue periférico	41
6.4. Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado broncoalveolar ..	42
6.5. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar	44
6.6. Análise dos níveis de citocinas no LBA	46
6.7. Análise da expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9 no tecido pulmonar	48
6.8. Análises morfométricas do parênquima pulmonar.....	49
7. DISCUSSÃO.....	53
8. CONCLUSÕES.....	65
9. REFERÊNCIAS	66
ANEXOS	78
Anexo I. Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais da UFOP	78
Anexo II. Certificado de apresentação em congressos	79

1. INTRODUÇÃO

A sociedade tem sido acometida por múltiplas doenças ao longo da história, e novas enfermidades têm sido desenvolvidas por causa do estilo de vida e o consumo de produtos prejudiciais para a saúde (OPAS/OMS, 2016). O tabagismo representa uma das maiores ameaças para a saúde pública. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o tabaco é a principal causa de morte evitável em todo o mundo, sendo responsável por cerca de 63% dos óbitos relacionados às doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (OPAS/OMS, 2016).

O tabagismo é causa de aproximadamente 50 doenças, muitas delas incapacitantes e fatais como câncer, doenças respiratórias crônicas e cardiovasculares (INCA, 2019). No Brasil estima-se que aproximadamente 443 pessoas morrem a cada dia por causa do tabagismo. Em relação às mortes anuais atribuíveis ao tabagismo: 37.686 correspondem à Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (INSTITUTO DE EFETIVIDADE CLÍNICA E SANITÁRIA, 2020).

A Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) representa um problema de saúde pública e pode levar à morte (GOLD, 2019). A mortalidade por DPOC entre homens e mulheres tem crescido desde 1964. Dados mostram que mais mulheres que homens morrem anualmente por consequência da DPOC, sugerindo que o gênero feminino é mais suscetível para o desenvolvimento da doença (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN, 2014).

Como uma alternativa ao tabagismo foram desenvolvidos os cigarros eletrônicos, também conhecidos como dispositivos eletrônicos para fumar (DEF). A produção desses dispositivos teve início na China em 2003, seguido da Europa em 2006 e os Estados Unidos em 2007 (BALLBÈ *et al.*, 2014; BULLEN, 2014; COLLACO; DRUMMOND; MCGRATH-MORROW, 2015). No Brasil, o comércio, importação e propaganda dos cigarros eletrônicos é proibido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009). Os DEF são aparelhos mecânico-eletrônicos alimentados por bateria de lítio. Seu interior é composto por um espaço para a inserção do cartucho ou refil, onde fica armazenada a nicotina solubilizada em propilenoglicol ou glicerina vegetal, disponível em

concentrações que variam entre 0 e 36 mg/ml. O atomizador é responsável por aquecer e vaporizar a nicotina (MARTINS *et al.*, 2016).

Apesar desses aparelhos terem sido concebidos como uma alternativa para a saúde do fumante, o cigarro eletrônico promove consequências para a saúde. Recentemente o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC – do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) dos Estados Unidos nomeou as doenças pulmonares relacionadas ao cigarro eletrônico como lesão pulmonar associada ao uso de produtos eletrônicos ou *vaping* (EVALI – do inglês *E-cigarette or Vaping product use-Associated Lung Injury*) (SIEGEL *et al.*, 2019). Os usuários principais desse produto são adolescentes e segundo a OMS eles podem dobrar o risco de fumar cigarro convencional (WHO, 2021).

Recentemente, estudos descrevem que o coração e o pulmão sofrem inúmeras mudanças devido ao uso de cigarros eletrônicos, assim, o desenvolvimento de doenças nesses órgãos vitais depende de como as mudanças causadas pela inalação dos compostos interagem com fatores ambientais, genéticos e qualidade de vida (TSAI *et al.*, 2020). Particularmente, a fisiologia pulmonar é afetada pelo aerossol do cigarro eletrônico promovendo aumento da reatividade e obstrução das vias aéreas, inflamação e enfisema (TSAI *et al.*, 2020).

Na literatura científica, o cigarro convencional possui uma relevância acorde ao seu impacto direto na saúde humana, porém, o cigarro eletrônico ainda precisa ser estudado e estabelecer sua relação com desenvolvimento de doenças crônicas e suscetibilidade sexual. É por esse motivo que o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a exposição crônica de fumaça de cigarro convencional e aerossol de cigarro eletrônico em camundongos C57BL/6 adultos machos e fêmeas e relatar as implicações fisiopatológicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Tabaco, cigarro e doenças

O tabagismo representa uma das maiores ameaças para a saúde pública. De acordo com a OMS o tabaco é a principal causa de morte evitável no mundo, sendo responsável por 63% dos óbitos relacionados às Doenças Crônicas não Transmissíveis (DCNT). Segundo a Organização Pan-Americana da saúde (OPAS), o tabaco é responsável pela morte de 8 milhões de pessoas por ano, das quais 7 milhões são resultado do uso direto do tabaco, e mais de 1,2 milhões de mortes são resultado de não fumantes expostos ao fumo passivo (OPAS/OMS, 2019).

O tabagismo está inserido na 11^a Classificação Internacional de Doenças (CID-11) para Estatísticas de Mortalidade e Morbidade. No grupo "transtornos mentais, comportamentais ou do neurodesenvolvimento", consta: "distúrbios devido ao uso de nicotina" (WHO, 2022). Aproximadamente 50 doenças estão relacionadas ao tabagismo como doenças respiratórias crônicas, doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer como: câncer de bexiga, pâncreas, fígado, colo do útero, esôfago, rim e ureter, laringe, cavidade oral, faringe, estômago, cólon e reto, traqueia, brônquios e pulmão (WHO, 2022). Além de estar associado às DCNT o tabagismo também contribui para o desenvolvimento de outras enfermidades, tais como tuberculose, infecções respiratórias, úlcera gastrintestinal, impotência sexual, infertilidade em mulheres e homens, osteoporose e catarata (INCA, 2021).

No Brasil, aproximadamente 443 pessoas morrem a cada dia por causa do tabagismo. Quanto às mortes anuais atribuíveis ao tabagismo cerca de 37.686 correspondem à DPOC, 33.179 às doenças cardíacas, 25.683 a outros cânceres, 24.443 ao câncer de pulmão (o segundo mais comum entre homens e mulheres), 18.620 ao tabagismo passivo e outras causas, 12.201 à pneumonia e 10.041 ao acidente vascular cerebral (AVC) (INSTITUTO DE EFETIVIDADE CLÍNICA E SANITÁRIA, 2020).

Os riscos de doenças a causa do fumo em mulheres aumentaram dramaticamente nos últimos 50 anos e agora são iguais aos dos homens (U.S.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN, 2014). Em 2018 foram registrados um total de 28.717 mortes por câncer de pulmão, correspondendo em homens 16.371 e mulheres 12.346 (INCA, 2020). Assim, estudos recentes, sugerem que as mulheres são mais suscetíveis do que os homens aos carcinógenos presentes na fumaça do tabaco (TØNNESEN *et al.*, 2007).

Considera-se que o consumo de qualquer derivado do tabaco, produtor ou não de fumaça (cigarro, charuto, cachimbo, cigarrilha, cigarro de palha, rapé, tabaco mascado, narguilé) caracteriza o tabagismo (MEIRELLES, 2009). O cigarro é o principal produto para o consumo de tabaco, é feito a partir de folhas de tabaco curadas e finamente cortadas embrulhadas em papel fino que pode ou não ser adicionado a substâncias aromáticas e gustativas (INCA, 2020). Embora o componente principal do cigarro seja o tabaco, existem aproximadamente 600 ingredientes em um único cigarro, além disso, a queima do cigarro libera mais de 7000 compostos químicos (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2020). A fumaça de cigarro é constituída por duas fases: a particulada que contém nicotina e alcatrão, e a fase gasosa composta por monóxido de carbono, amônia, cetonas, formaldeído, acetaldeído, acroleína, entre outros (INCA, 2019). Uma parte dos produtos produzidos na queima do cigarro são carcinogênicos e tóxicos (AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2020).

A nicotina é uma droga psicoativa que garante os efeitos do fumo como a sensação de prazer e relaxamento. Além disso, essa substância é a grande responsável pela dependência química. A nicotina é o principal componente imunossupressor presente na fumaça do cigarro, inibindo tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (SOPORI, 2002). Esse composto pode se disseminar por todos os tecidos do corpo, tais como pulmão e cérebro. Ela também é encontrada na saliva, no suco gástrico, leite materno, músculo esquelético e no líquido amniótico (MARTINS, 2022).

O monóxido de carbono (CO) é um gás transparente produzido durante a queima do cigarro, e representa um dos componentes mais perigosos que entram no organismo durante a exposição à fumaça de cigarro (INCA, 2019). Uma vez no organismo, o CO diminui os níveis de oxigênio na corrente sanguínea, o que está relacionado com a alta afinidade do monóxido de carbono

com a hemoglobina. O CO ocupa os locais de ligação do oxigênio na hemoglobina, o que reduz o conteúdo de oxigênio no sangue (THOM, 2011).

O alcatrão é um composto de mais de 40 substâncias cancerígenas identificadas, que são formadas a partir da combustão dos derivados do tabaco, dentre essas substâncias temos: arsênio, níquel, benzopireno, cádmio, resíduos agrotóxicos, substâncias radioativas (Polônio 210), acetona, naftalina e até fósforo P4/P6 (INCA, 2021).

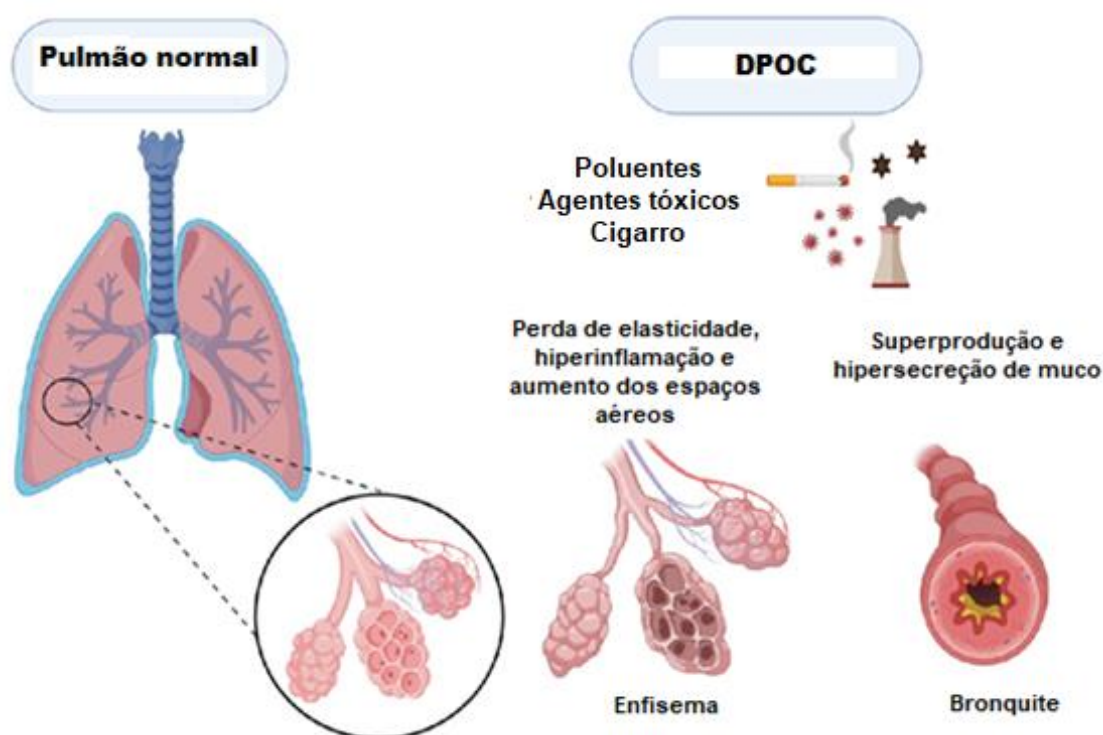
2.2. Doença pulmonar obstrutiva crônica

DPOC é um importante problema de saúde pública, sendo a terceira causa de morte em todo o mundo no ano 2019 (WHO, 2019). A doença apresenta como principal causa o tabagismo, que é responsável aproximadamente por 85% de mortes causadas por bronquite e enfisema pulmonar (PESSOA, 2017). A mortalidade por DPOC entre homens e mulheres tem crescido desde 1964. Dados mostram que mais mulheres que homens morrem anualmente por consequência da DPOC, sugerindo que o gênero feminino é mais suscetível para o desenvolvimento da doença (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN, 2014). Van Den Berge e colaboradores demonstraram a expressão diferencial de genes específicos da DPOC no pulmão de homens e mulheres. O gene SGMS1 está envolvido no metabolismo de esfingolipídeos, os resultados sugerem que esse metabolismo pode ser desregulado em mulheres, mas não em homens com DPOC (VAN DEN BERGE *et al.*, 2019).

A Iniciativa Global para Doenças Pulmonar Obstrutiva Crônica (GOLD – do inglês *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease*) define a DPOC:

"Doença comum, evitável e tratável, caracterizada por sintomas respiratórios persistentes e limitação do fluxo aéreo devido a anormalidades das vias aéreas e/ou alveolares, geralmente causadas por exposição significativa a partículas ou gases nocivos" (GOLD, 2019).

A DPOC pode se apresentar sob duas formas: bronquite crônica obstrutiva e enfisema pulmonar (Figura 1). A bronquite crônica é definida clinicamente pela presença de tosse e expectoração na maioria dos dias por no mínimo três meses/ano durante dois anos consecutivos. O enfisema pulmonar é definido anatomicamente como aumento dos espaços aéreos distais ao bronquíolo terminal, com destruição das paredes alveolares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



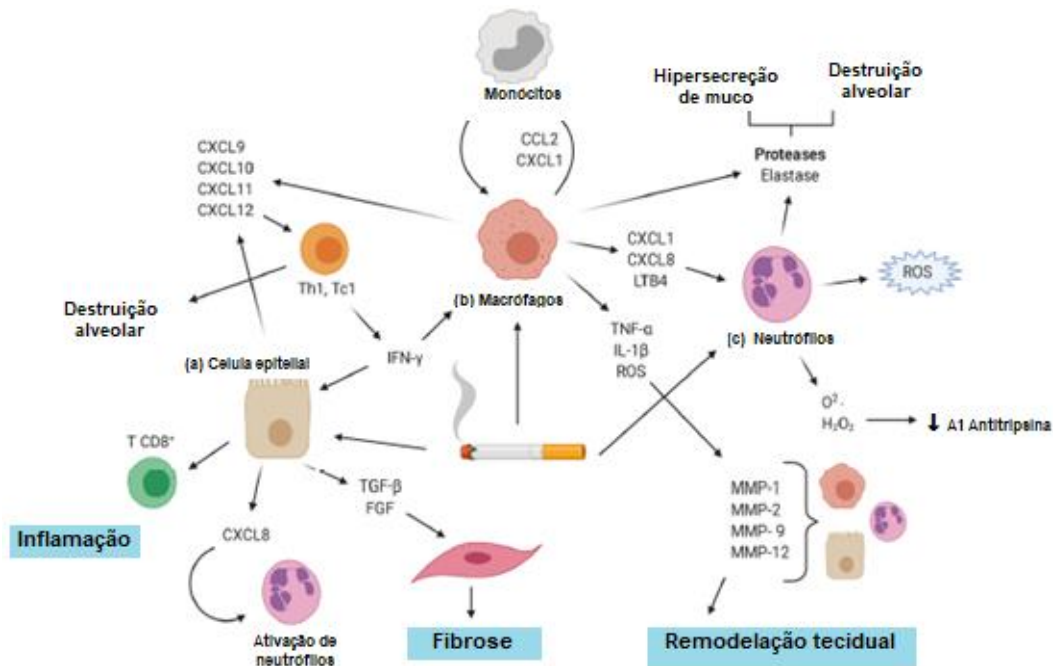
Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2021.

Figura 1. Fenótipos de DPOC. Pulmões com DPOC podem apresentar duas características distintas: enfisema, que promove destruição alveolar e consequente redução da função pulmonar e bronquite, que aumenta a produção de muco, estreitando as vias aéreas e reduzindo o fluxo de ar.

Os principais fatores patogênicos envolvidos no desenvolvimento da DPOC incluem infecção e inflamação, desequilíbrio de protease e antiprotease, e estresse oxidativo (Figura 2) (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2021), condições observadas em pessoas fumantes de cigarro. A fumaça de cigarro e outros compostos ativam células epiteliais e macrófagos alveolares, que liberam fatores quimiotáticos como o ligante 2 de quimiocina CC (CCL2), que atua no receptor 2 de quimiocina CC (CCR2) para

atrair monócitos. CXC -ligante de quimiocina 1 (CXCL1) e CXCL8, que atuam no CCR2 para atrair neutrófilos e monócitos e CXCL9, CXCL10 e CXCL11, que atuam no CXCR3 para atrair células T helper 1 (Th1) e células T citotóxicas tipo 1 (TC1). Essas células inflamatórias juntamente com macrófagos e células epiteliais liberam proteases, como a metaloproteinase 9 (MMP-9), que causa degradação da elastina e enfisema. A elastase de neutrófilos também causa hipersecreção de muco (BARNES, 2008).

As células epiteliais e os macrófagos também liberam o fator de crescimento transformador- β (TGF β), que estimula a proliferação de fibroblastos, resultando em fibrose nas pequenas vias aéreas (BARNES, 2008). Além disso, agentes na fumaça e aqueles liberados por células inflamatórias inativam inibidores de proteases, como a α 1-antitripsina, e causam senescência e apoptose de células pulmonares que produzem matriz extracelular. Produtos da matriz extracelular danificada, como peptídeos de elastina degradada, são quimiotáticos para células inflamatórias; assim, a degradação da matriz extracelular pode levar a um ciclo de retroalimentação que perpetua a inflamação (GRIPPI *et al.*, 2015).

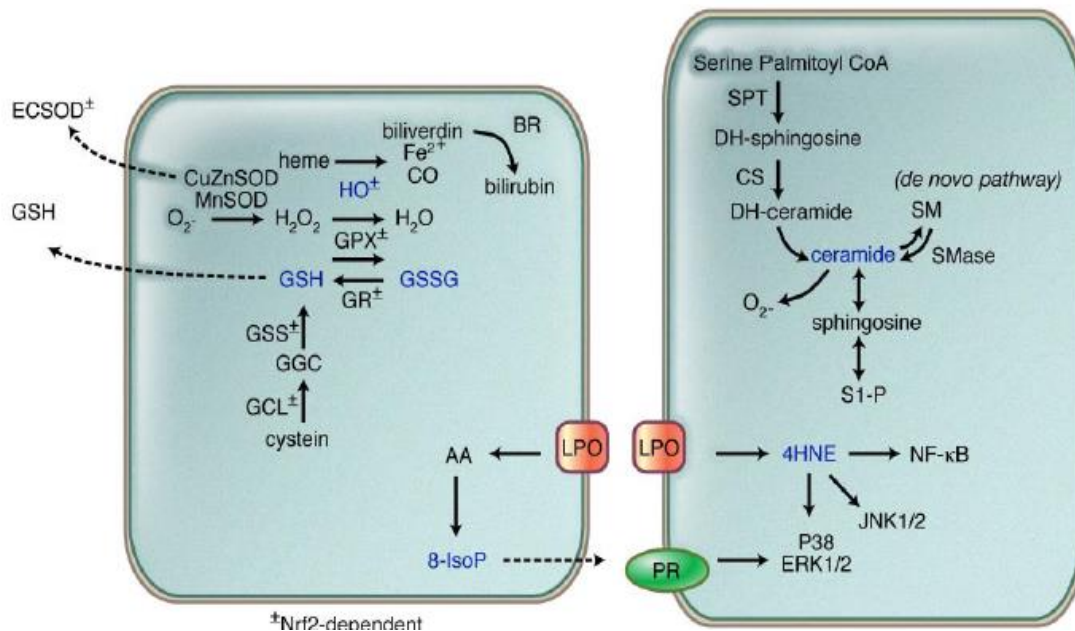


Fonte: Adaptado de RODRIGUES *et al.*, 2021

Figura 2. Fisiopatologia da DPOC. As toxinas presentes na fumaça do cigarro levam ao recrutamento de células inflamatórias e à liberação de mediadores inflamatórios. Os macrófagos liberam CXCL1, CXCL8 e LTB4, que atraem neutrófilos, e CCL2 e CXCL1, que atraem monócitos. Os neutrófilos liberam ROS, aumentando a inflamação e inativando redutivamente 1 antitripsina. Eles também liberam proteases, como NE, levando a danos nos tecidos. Células epiteliais e macrófagos liberam CXCL9, CXCL10, CXCL11 e CXCL12, que atraem linfócitos Th1 e Tc1. Eles também liberam IFN-, levando a destruição alveolar. As células epiteliais liberam CXCL8, recrutando e ativando neutrófilos, e TGF- e FGF, recrutando fibroblastos que promovem fibrose tecidual. As células epiteliais também atraem as células T CD8+ que se acredita promoverem a inflamação. Os macrófagos liberam TNF-, IL-1 e ROS, induzindo a secreção de MMP por células epiteliais, macrófagos e neutrófilos, causando remodelação tecidual. CXCL1, ligante 1 de quimiocina (motivo C-X-C); LTB4, leucotrieno B4; CC, Quimiocina (motivo C-C); IFN, interferão gama; TGF, fator de crescimento transformador; FGF, fator de crescimento de fibroblastos; TNF-, fator de necrose tumoral alfa; IL, interleucinas; ROS, espécies reativas de oxigênio; MMPs, metaloproteinases.

A DPOC também é causada por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). Uma compilação das alterações envolvendo reguladores do estresse oxidativo é mostrada na Figura 3 (YOSHIDA; TUDER, 2007). O tabagismo gera ERO nos pulmões e demais tecidos do organismo nos indivíduos expostos. A recorrente produção de ERO associada à inflamação persistente, podem causar extenso dano tecidual e promover a exacerbação da doença, amplificando outros mecanismos coparticipantes (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015) o que pode estar relacionado à maior suscetibilidade que os fumantes crônicos têm de desenvolver patologias, como o câncer e infecções respiratórias (HORN *et al.*, 2015).

As citocinas desempenham um papel fundamental na perpetuação de doenças crônicas como a DPOC, tornando-as alvos atraentes para o tratamento desses distúrbios (BARNES, 2018). As citocinas são proteínas secretadas que controlam as respostas imunes. Dentro do pulmão, eles podem controlar as respostas do hospedeiro a lesões ou infecções, resultando na eliminação do insulto, reparo do tecido pulmonar e retorno à homeostase. Podem surgir problemas quando esta resposta é mais exuberante e/ou a produção de citocinas torna-se desregulada (ATAMAS; CHAPOVAL; KEEGAN, 2013).



Fonte: Adaptado de YOSHIDA; TUDER, 2006.

Figura 3. Respostas ao estresse oxidativo na doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). O estresse oxidativo tem um papel central na patogênese da DPOC, pois os oxidantes medeiam a inflamação, a degradação extracelular e a falha na manutenção alveolar. Moléculas e vias de sinalização endógenas, como a ceramida, podem amplificar ainda mais a destruição alveolar apesar da cessação da fumaça do cigarro. GSH, glutatona reduzida; GSSG, glutatona oxidada; GSS, glutatona sintetase; GSL, glutamato cistenil ligase; GGC, -glutamilcisteína; AA, araquidonato; PLA2, fosfolipase A2; 8-IsoP, 8-isoprotano; PR, receptor de prostanóide; CuZnSOD, superóxido dismutase de cobre-zinco; MnSOD, SOD de manganês; ECSOD, SOD extracelular; LPO, peroxidação lipídica; 4HNE, 4-hidroxinonenal; BR, biliverdina redutase; NFkB, fator nuclear-kB; ERK1/2, quinase 1 e 2 regulada por sinal extracelular; JNK1/2, c-Jun NH2-terminal quinase 1/2; SPT, serina palmitoiltransferase; CS, ceramida sintetase; DH-, desidro-; S1-P, esfingosina-1-fosfato; SMase, esfingomielinase.

2.3. Cigarro Eletrônico

Os cigarros eletrônicos, também conhecidos como dispositivos eletrônicos para fumar (DEF) ou suas siglas em inglês *Electronic Nicotine Delivery Systems* (ENDS) (GRANA; BENOWITZ; GLANTZ, 2013), foram desenvolvidos inicialmente na China em 2003 e introduzidos no mercado chinês em 2004, seguido da Europa em 2006 e nos Estados Unidos em 2007 (BALLBÈ *et al.*, 2014; BULLEN, 2014; COLLACO; DRUMMOND; MCGRATH-MORROW, 2015). No Brasil, a ANVISA por meio da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 46, proibiu o comércio, a importação e a propaganda dos DEF, tanto como substituto ao cigarro, quanto como alternativa ao tratamento da cessação do tabagismo (ANVISA, 2009), essa iniciativa também segue sendo apoiada pelo INCA, o qual alerta sobre os Riscos dos DEFs (INCA, 2020b).

Os DEF são produtos destinados a entregar aerossol para o usuário aquecendo uma solução chamada e-líquido, normalmente composta de propilenoglicol e/ou glicerol (glicerina), nicotina (0-36mg) e aromatizantes (GRANA; BENOWITZ; GLANTZ, 2013). Existem 4 gerações de DEF (Quadro 1) (DA SILVA; MOREIRA, 2019), mas a estrutura básica é composta de um bocal de inalação, local do cartucho ou do tanque da solução (e-líquido), atomizador, microprocessador, compartimento da bateria e em alguns casos uma luz de led (Figura 4) (MCKENNA, 2017). O atomizador é responsável por aquecer e vaporizar o líquido. Durante a tragada, o sensor é acionado, o que deflagra a ação do microprocessador responsável por ativar tanto a bateria quanto a luz de led (MARTINS *et al.*, 2016). Desde sua introdução há mais de 15 anos, os cigarros eletrônicos passaram por grandes mudanças no design que permitem ao usuário maior controle sobre a composição do E-líquido e modificar a concentração de nicotina para forma o líquido que sera aerossolizado/vaporizado (GOTTS *et al.*, 2019).

Quadro 1. Característica dos DEF

Geração	Tipo de equipamento	Construção	Bateria (mAh)	Observações
1ª	DEF descartável	Peça única	90-200 Voltagem fixa	Cartucho
	Bateria recarregável	Bateria reutilizável/ Cartucho descartável	90-200 Voltagem fixa	
	Sistema Tanque de 3 peças	Bateria, atomizador e tanque separados	90-200 Voltagem fixa	Tanque
2ª	DEF reutilizável/ Reen-chível	Bateria e tanque sepa- rados	300 - 1100 Voltagem variável	Tanque/ Voltagem variável
	DEF reutilizável/ Reen- chível	Bateria e tanque sepa- rados	300 - 1100 Voltagem e potência baseado na saída da bateria	Tanque/ MODs (usuário enche o tan- que com solução que ele pode preparar)
3ª	DEF reutilizável/ Reen- chível	Bateria e tanque sepa- rados	300 - 1100 Voltagem e potência variáveis	Tanque
4ª	DEF reutilizável/ Reen- chível	Bateria e tanque sepa- rados	>1000 Voltagem, potência e temperatura variáveis	Tanque/ Controle de temperatura/ Alguns modelos possuem tecnologia Bluetooth

Fonte: SILVA; MOREIRA, 2019.

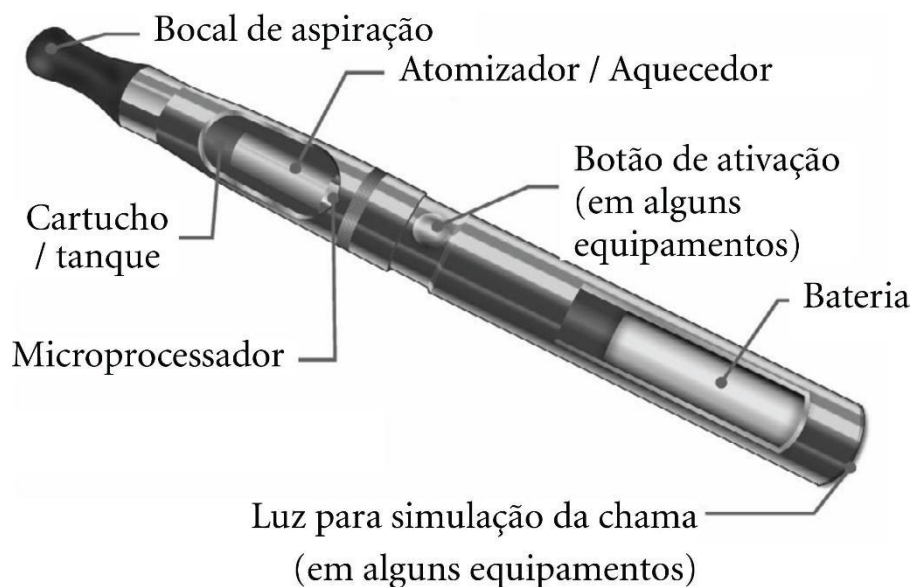


Figura 4. Estrutura de um dispositivo eletrônico Fonte: SILVA; MOREIRA, 2019.

Os fabricantes dos DEF sugerem que esses aparelhos representam uma alternativa segura para a saúde do fumante, além de serem menos poluentes em comparação com o cigarro convencional, já que não emitem fumaça (MARTINS *et al.*, 2016). Entretanto, diferente do sugerido pelos fabricantes, o cigarro eletrônico promove consequências à saúde. Recentemente o CDC

reconheceu as doenças pulmonares relacionadas ao cigarro eletrônico e designou a sigla EVALI, que significa lesão pulmonar associada ao uso de produtos eletrônicos ou *vaping* (SIEGEL *et al.*, 2019).

Estudos têm sido desenvolvidos para esclarecer o papel benéfico ou prejudicial do cigarro eletrônico na saúde humana. Neste sentido, um estudo agudo em humanos, os cigarros eletrônicos e os cigarros de tabaco geraram efeitos semelhantes nos níveis de cotinina sérica após o fumo ativo e passivo (FLOURIS *et al.*, 2013). O uso de cigarro eletrônico a longo prazo pode diminuir substancialmente o consumo de cigarros em fumantes que não desejam parar e é bem tolerado, embora os participantes relataram irritação na boca, irritação na garganta e tosse seca (POLOSA *et al.*, 2014).

Estudos em animais sugerem extensão muito semelhante de disfunção endotelial pelo cigarro eletrônico ou tabagismo, com estresse oxidativo e inflamação como atores centrais desse processo (MÜNDEL *et al.*, 2020). A exposição aguda de aerossóis em camundongos produz aumento de marcadores de estresse oxidativo pulmonar (GLYNOS *et al.*, 2018; SCHWEITZER *et al.*, 2015) e de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8 (LERNER *et al.*, 2015), também foi associado a um aumento significativo de IL-1 β (HUSARI *et al.*, 2016). Em outro estudo a exposição ao cigarro eletrônico causou danos às defesas antimicrobianas do pulmão (SUSSAN *et al.*, 2015). A exposição crônica ao aerossol de DEF em camundongos alterou a homeostase lipídica pulmonar em macrófagos alveolares e células epiteliais e diminuiu a imunidade inata contra vírus patógenos em macrófagos residentes (SCHWEITZER *et al.*, 2015). Um recente estudo mostrou que a exposição à aerossóis contendo nicotina induziu o influxo de células inflamatórias e a liberação de citocinas pró-inflamatórias de uma forma dependente do sexo (WANG *et al.*, 2019a).

A exposição ao aerossol de cigarro eletrônico, contendo nicotina, tem desencadeado efeitos associados ao desenvolvimento da DPOC, incluindo expressão de citocinas, hiper-reatividade das vias aéreas e destruição do tecido pulmonar. Esses efeitos foram dependentes da nicotina tanto em pulmão de camundongo quanto em células das vias aéreas humanas (Figura 5) (GARCIA-

ARCOS *et al.*, 2016). No entanto, os cigarros eletrônicos também emitem carbonilas voláteis, espécies reativas de oxigênio, furanos e metais (níquel, chumbo, cromo), muitos dos quais são tóxicos para o pulmão (EATON; KWAN; STRATTON, 2018). Embora já tenham sido observados alguns efeitos da exposição ao aerossol de cigarro eletrônico, quando se trata da exposição crônica, os efeitos ainda são incertos e necessitam de mais estudos.

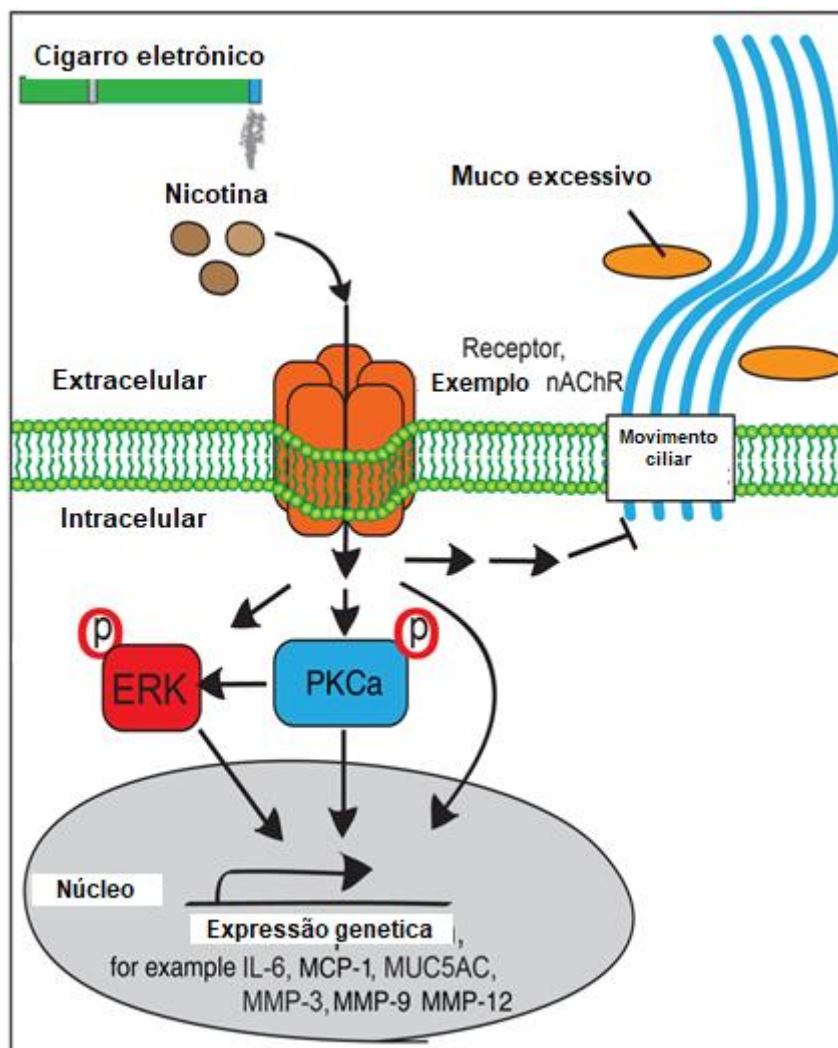


Figura 5. Possível mecanismo de sinalização para dano pulmonar induzido por cigarro eletrônico contendo nicotina. ERK, quinase regulada extracelular; IL, interleucina; nAChR, receptor nicotínico de acetilcolina. Fonte: GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016.

3. JUSTIFICATIVA

A sociedade atual tem utilizado excessivamente o cigarro convencional, o que pode levar a diferentes transtornos de saúde crônico e até a morte. Esse consumo excessivo acontece em diferentes faixas etárias como adolescentes e adultos, e não tem uma preferência clara por um gênero específico, portanto o consumo provavelmente seria semelhante para homens e mulheres. Considerando os danos causados pelo cigarro, foi desenvolvido um dispositivo alternativo para pessoas fumantes chamado cigarro eletrônico. Entretanto, já foi demonstrado que a exposição ao aerossol de cigarro eletrônico apresenta efeitos adversos à saúde, principalmente no pulmão, assim como o cigarro convencional. Consequentemente, estudos experimentais relacionados ao consumo de cigarro eletrônico são necessários para aprofundar os conhecimentos e estabelecer os possíveis danos que o cigarro eletrônico pode causar à saúde humana.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro e ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos machos e fêmeas adultos C57BL/6.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar alterações nos parâmetros biométricos (massa corporal, massa relativa e densidade pulmonar) e parâmetros ventilatórios (frequência respiratória, volume minuto e volume corrente) em camundongos machos e fêmeas;
- Mensurar a contagem total e diferencial de leucócitos no sangue periférico de camundongos de ambos os sexos;
- Quantificar o influxo de células inflamatórias para as vias aéreas em camundongos machos e fêmeas;
- Avaliar o dano oxidativo em camundongos de ambos os sexos;
- Analisar a atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD) no tecido pulmonar de camundongos machos e fêmeas;
- Mensurar os níveis de marcadores inflamatórios em camundongos machos e fêmeas;
- Mensurar os níveis de expressão das metaloproteinases (MMP-2 e MMP-9) no tecido pulmonar de camundongos de ambos os sexos.
- Realizar histopatologia das estruturas pulmonares de camundongos machos e fêmeas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

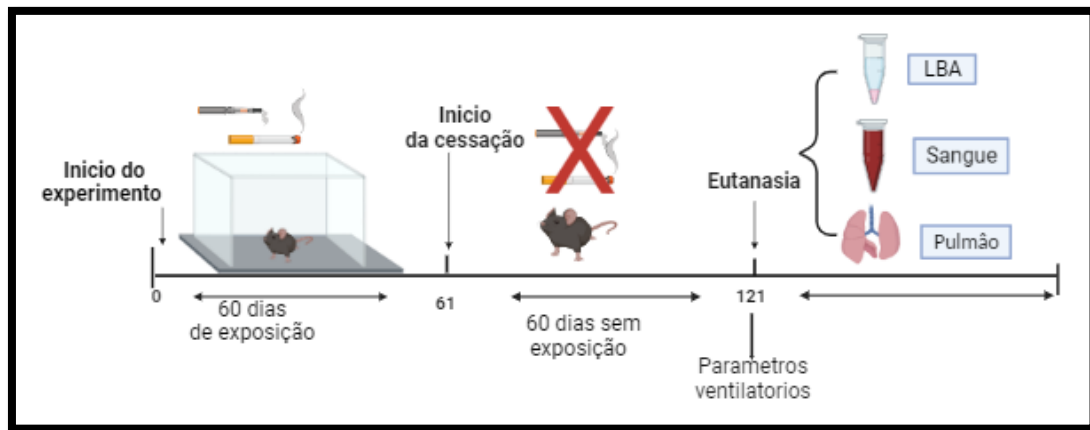
5.1. Animais

Foram utilizados 48 camundongos da linhagem C57BL/6, machos (n=24) e fêmeas (n = 24), com idade entre 8-10 semanas, provenientes do biotério do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto (CCA-UFOP), mantidos sob condições controladas de temperatura e umidade ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $50 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos ao ciclo claro/escuro de 12/12h. Todos os procedimentos experimentais foram feitos de acordo com as normas e princípios Éticos de Experimentação Animal estabelecidos pela Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e o protocolo foi aprovado sob o número CEUA nº 3287111120 (ID 000485).

Os animais foram divididos em seis grupos experimentais:

- Grupo controle fêmeas (GCF) (n=8): animais expostos ao ar ambiente;
- Grupo cigarro convencional fêmeas (GCCF) (n=8): animais expostos ao cigarro convencional;
- Grupo cigarro eletrônico fêmeas (GCEF) (n=8): animais expostos ao aerossol de cigarro eletrônico;
- Grupo controle machos (GCM) (n=8): animais expostos ao ar ambiente;
- Grupo cigarro convencional machos (GCCM) (n=8): animais expostos ao cigarro convencional;
- Grupo cigarro eletrônico machos (GCEM) (n=8): animais expostos ao aerossol de cigarro eletrônico.

O desenho experimental foi composto de dois períodos: no primeiro período foi feita a exposição durante 60 dias à fumaça de cigarro ou aerossol de cigarro eletrônico, o segundo período foi de cessação, os camundongos ficaram sem exposição por 60 dias. 24 horas após conclusão dos períodos, foram medidos os parâmetros ventilatórios e foi feita a eutanásia para coleta de amostras (pulmão, sangue e LBA) (Figura 6).



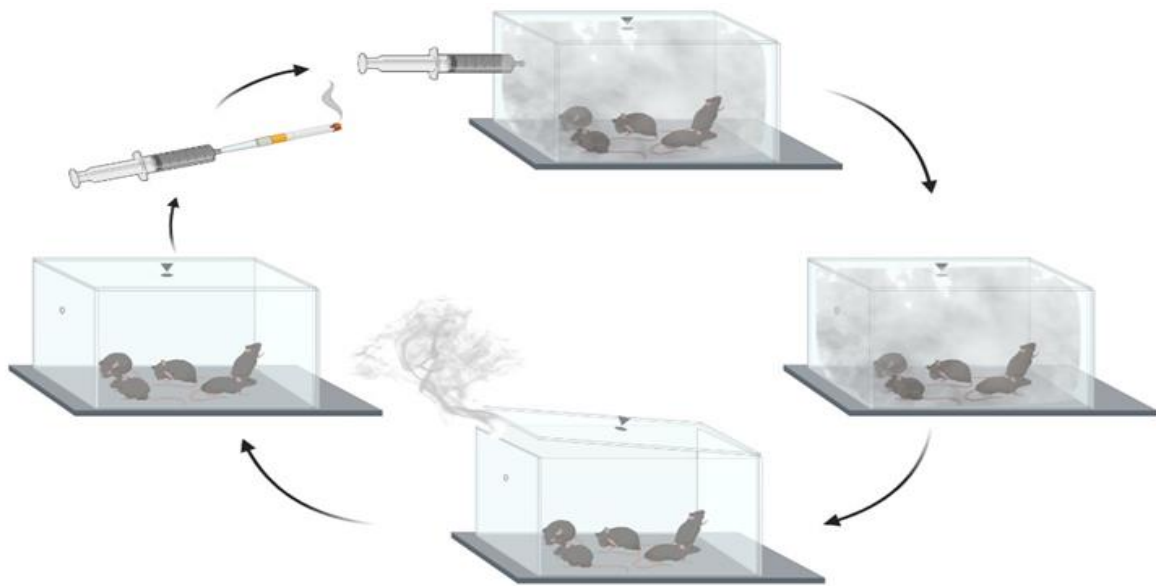
Fonte: Autor

Figura 6. Desenho experimental de exposição ao cigarro convencional e cigarro eletrônico.

5.2. Exposição à fumaça ou aerossol de cigarros

5.2.1. Exposição à fumaça de cigarro convencional

Durante 60 dias os animais dos grupos GCCF e GCCM, foram expostos a um total de 12 cigarros comerciais Virginia Marlboro por dia (10 mg de alcatrão, 0,9 mg de nicotina e 10 mg de monóxido de carbono por cigarro) divididos em três períodos: manhã, tarde e noite (quatro cigarros por inalação). Inicialmente os animais foram posicionados em uma câmara de inalação (40 cm x 30 cm x 25 cm) dentro de uma capela de exaustão. Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 50 ml com a qual foi injetada a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa resultou na queima do cigarro até o seu terço final, que dura em média 3 minutos. Um cigarro gera aproximadamente 1 L de fumaça que é diluída em 30 L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça no interior da câmara é de 3%. Os animais foram mantidos em contato com a fumaça durante 6 minutos por cigarro (que produz concentrações de CO que variam entre 250 para 350 ppm no interior da câmara). Após este período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça, este procedimento foi repetido com os demais cigarros. (ARAÚJO *et al.*, 2022; RODRIGUES, 2018; VALENÇA *et al.*, 2004).



Fonte: Adaptado de Araújo *et al.*, 2022.

Figura 7. Esquema da Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).

5.2.2. Exposição ao aerossol de cigarro eletrônico

Durante 60 dias os animais dos grupos GCEF e GCEM foram expostos a 12 ciclos de cigarro eletrônico (correspondente a 12 cigarros comerciais por dia) divididos em três períodos: manhã, tarde e noite. Para a realização das exposições foi utilizado o cigarro eletrônico *Vype eTank Pro 2* e o líquido *Tobacco 100 naked american patriots* (65VG/35PG; 6mg/ml de nicotina), utilizou-se 1,33ml por dia para um total de 8 mg de nicotina por dia. Para as exposições foi empregado o protocolo adaptado de (VALENÇA *et al.* 2004; CAMPOS *et al.*, 2019), onde, inicialmente os animais foram posicionados em uma câmara de inalação (40 cm x 30 cm x 25 cm) dentro de uma capela de exaustão. O cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 50 ml com a qual foi extraído o aerossol e direcionado para o interior da câmara de inalação durante 3min. Os animais foram mantidos sob essas condições por 6 minutos. Após esse período, a tampa da câmara foi removida por um minuto para a total exaustão do aerossol (ARAÚJO *et al.*, 2022; RODRIGUES, 2018; VALENÇA *et al.*, 2004).

5.3. Parâmetros biométricos

Utilizando balança padrão, os animais foram pesados em três momentos, o dia 1 antes das exposições, dia 60 após a última exposição à fumaça de cigarro ou aerossol, e o dia 121 após 60 dias de cessação. Para a determinação do volume e densidade pulmonar, foi utilizado o método de Scherle, determinando que o órgão deve ser imerso em um recipiente inócuo de vidro com salina fisiológica, suspenso por um fio, proibindo o contato com os contornos do recipiente e desse modo determinando o peso do órgão (SCHERLE, 1970).

5.4. Parâmetros ventilatórios

A análise dos parâmetros ventilatórios foi realizada 24 horas após o último dia de repouso de todos os grupos, foram avaliados os seguintes parâmetros: fluxo, volume corrente, frequência respiratória e volume minuto. Para a realização da coleta os camundongos foram individualmente anestesiados com uma mistura de cetamina (100 mg/kg), xilazina (20 mg/kg), e acepromazina (3 mg/kg) mistura que promove uma adequada sedação e tolerância cirúrgica (ARRAS *et al.*, 2001). Posteriormente foi realizada uma incisão no pescoço, a traqueia foi canulada com auxílio de cateter (18G). O cateter foi acoplado a um tubo de 2 cm de comprimento para conectar a traqueia ao cabeçal de fluxo (MLT1L) que está interligado ao espirômetro para pequenos animais (ADInstruments, Bella Vista, NSW, Austrália). Os parâmetros ventilatórios de cada camundongo foram registrados por um período de 60 segundos, com três repetições. Todo sinal gerado foi amplificado (Octal Bridge Amp modelo ML228; Powerlab 4/35 modelo ML 870; AD Instruments) e gravado em um programa de gravação de dados (LabChart, Windows, versão v8.1.11) usando um computador de mesa (ARAÚJO *et al.*, 2022).

5.5. Coleta do sangue e esfregaço sanguíneo

A coleta de sangue foi feita por meio de punção cardíaca, as alíquotas sanguíneas dos animais foram coletadas em tubos de polipropileno com 15 µL com anticoagulante. Uma alíquota, foi destinada para as análises de contagem

total e diferencial de leucócitos no sangue periférico através do esfregaço sanguíneo (DE SOUZA *et al.*, 2022).

Foi colocada uma gota de sangue na extremidade de uma lâmina histológica, depois utilizando uma lâmina extensora em posição de 45° foi espalhado o conteúdo (gota) sobre a lâmina histológica para deixar homogeneamente uma fina camada de sangue. As lâminas foram secadas por um período de 24h e após esse período foram coradas através de banhos de imersão de 30s em uma das três soluções presentes no kit rápido de corantes para uso hematológico (RenyLab, Minas Gerais, BR). Em seguida, as lâminas foram lavadas com água de uso comum e deixadas para secagem em temperatura ambiente por 24 h. As amostras de lâminas de esfregaço sanguíneo foram utilizadas para contagem diferencial de leucócitos. A análise foi concretizada através de uma contagem diferencial de 100 leucócitos em cada lâmina, que foram caracterizados em linfócitos, monócitos e neutrófilos de acordo com a coloração, morfologia nuclear e citoplasmática (KOZIMA *et al.*, 2020).

5.6. Coleta do lavado broncoalveolar (LBA)

Imediatamente após coleta do sangue, o tórax de cada animal foi aberto para a coleta do lavado broncoalveolar. Se acoplou uma seringa de 1 mL no cateter e realizou-se a perfusão dos pulmões com solução salina. O procedimento de perfusão foi realizado 2 vezes totalizando um volume final de 2 mL. As amostras foram mantidas no gelo até o final do procedimento, a fim de evitar lise celular. Após o término do procedimento, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5415R; Eppendorf®, Hamburgo, Alemanha) com velocidade de 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado e estocado em freezer de -80°C.

5.7. Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA

A contagem total de leucócitos no LBA foi realizada na câmara de Neubauer. Após a centrifugação o *pellet* foi ressuspensão com 100 µL de solução salina, para a contagem foi utilizado 20 µL da solução ressuspensa de LBA que

foram colocados em tubo contendo 180 μ L da solução de Turk. Posteriormente, os leucócitos foram contados em microscópio óptico no aumento de 400x.

Para a contagem diferencial de células no LBA, 50 μ L das amostras foram citocentrifugadas (INBRAS equipamentos para saúde, SP, BR). Após obtenção das lâminas, estas foram coradas com o kit Panóptico Rápido (Renylab química e farmacêutica Ltda., Barbacena, MG, 57 BR), através de um banho de imersão em três soluções distintas: metanol, eosina e azul de metileno. Um total de 100 células por lâmina foram contadas utilizando os critérios morfológicos padrões. Para realização da contagem diferencial de leucócitos foi utilizado microscópio óptico com imersão em óleo, com aumento de 1000x, e duas pessoas realizaram a contagem em momentos distintos (DA SILVA *et al.*, 2020).

5.8. Processamento e homogeneizado tecidual

Após a coleta do lavado broncoalveolar, o ventrículo direito foi perfundido com solução salina para remoção do sangue nos pulmões. O brônquio principal direito foi clampeado para que fosse instilada, apenas no pulmão esquerdo, via traquéia, formalina tamponada 4% (pH 7,2) a uma pressão de 25 cm H₂O por 2 minutos. O pulmão esquerdo foi removido e imerso em solução de fixação por 48h para posterior análises histológicas. Após a retirada do pulmão esquerdo para histologia, o pulmão direito foi imediatamente removido e armazenado em gelo picado em tubos devidamente etiquetados. Posteriormente o órgão foi homogeneizado (Homogeneizador Novatécnica mod. NT136, Piracicaba, Brasil) em 1 ml de tampão fosfato de potássio pH 7,5 e centrifugado a 4°C a uma velocidade de 13.000 RPM por 10 minutos (MIKRO 200R; Hettich lab technology, Tuttlingen, Alemanha) e o sobrenadante foi coletado. Essas amostras foram armazenadas em freezer a -80° C para posteriores análises bioquímicas (ARAÚJO *et al.*, 2020).

5.9. Marcadores de defesas antioxidantes

5.9.1. Proteínas totais

A dosagem de proteínas foi realizada nas amostras do homogeneizado tecidual pelo Método de Bradford. O reagente de Bradford contém como principal

componente o corante Coomassie brilhante azul, que em solução ácida se liga às proteínas da amostra, alterando sua absorvância de 465 nm para 595 nm, medida através do leitor de ELISA (Bio-Rad mod. 550, Hercules, EUA). Uma curva padrão foi produzida através de concentrações crescentes da proteína albumina (0,5-10 µl) em triplicata, concentrações utilizadas para a construção da curva de calibração. Durante a realização do ensaio, pipeta-se 10 µL de albumina em cada ponto da curva (0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05 mg/mL) e 190 µL de Corante Coomassie Blue Diluído. Em seguida, foi pipetado na placa 10 µL de amostra diluída (2 µL amostra + 8 µL de água mili-Q) e 190 µL de Corante Coomassie Blue Diluído. Incubou-se a placa em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, a leitura foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 595 nm. A análise de regressão linear simples foi realizada para determinação das equações da reta que foram utilizadas para determinar a concentração de proteínas totais no homogenato pulmonar (BRADFORD, 1976).

5.9.2. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi analisada utilizando o método espectrofotométrico descrito por Marklund e Marklund, 1974, essa técnica baseia-se na sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol. Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação do pirogalol. SOD compete com o O₂ formado pela auto-oxidação do pirogalol, que é responsável pela redução do MTT em cristais de formazana. Foram utilizados os reagentes de potássio monobásico (KH₂PO₄), fosfato de sódio dibásico (Na₂HPO₄), Pirogalol, MTT e dimetilsulfóxido (DMSO). A realização da dosagem foi realizada através de fragmentos do tecido homogeneizado com tampão fosfato e foi utilizada a placa de ELISA para confecção das dosagens.

A placa foi incubada por 5 minutos a 37°C, logo após 150 µL de DMSO foram adicionados para cessar a reação. Posteriormente, a placa foi lida em espectrofotômetro de placas à 570 nm. Em seguida, o valor de absorvância foi convertido em unidade de SOD pela subtração do valor de absorvância da amostra pelo valor do branco, seguido pela divisão desse valor pelo encontrado na subtração do padrão pelo branco (MARKLUND; MARKLUND, 1974). Os

resultados foram expressos em U de SOD/g tecido (CARBONARI, 2005), onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50 % da redução do MTT.

5.9.3. Atividade de Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada utilizando o método descrito por AEBI em 1984. Esse método baseia-se na decomposição do H_2O_2 pela enzima observada durante 1 minuto por espectrofotometria a 240 nm, com registros a cada 10 segundos. Desse modo, 100 mg do pulmão foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,2), em seguida centrifugado a 10000 xg por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante retirado foi utilizado como amostra biológica. Os reagentes usados foram: tampão fosfato e peróxido de hidrogênio. Após o preparo dos reagentes foi iniciada a leitura em espectrofotômetro. O tampão com o peróxido foi aliqotado juntamente com cada amostra em cubeta de quartzo (970 μ L e 30 μ L, respectivamente) e lidos a 240 nm durante 60 segundos, com registros a cada 10 segundos (AEBI, 1984).

5.10. Marcadores de dano oxidativo

5.10.1. Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi determinada através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) empregando o método descrito por (BUEGE; AUST, 1975). A determinação da concentração de TBARS se baseia na capacidade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em ligar-se a lipídeos oxidados, gerando malondialdeído. Resumidamente, 100 mg do parênquima pulmonar foram homogeneizados com 1 mL de tampão Tris HCL 20 mM (pH 7,4) e em seguida centrifugados por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e usado como amostra biológica. 200 μ L do sobrenadante do homogenato foi diluído em 300 μ L de tampão Tris HCL e misturados com ácido tricloroacético (TCA) (28% p/v no HCL 0,25N), TBA (1% no ácido acético 0,25M) e BHT (125 mM em etanol), aquecido por 15 min a 95° e em seguida colocado em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação a 1000 xg por 15 minutos a 4° C, e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A água destilada foi utilizada como branco. Os níveis de TBARS foram calculados utilizando o

coeficiente de extinção molar do MDA ($\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol/g tecido.

5.10.2. Carbonilação de proteínas

A oxidação de proteínas pelas espécies reativas de oxigênio leva a formação de derivados carbonílicos. Esses podem ser mensurados por métodos sensíveis, particularmente aqueles que utilizam o 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). A determinação da concentração sérica de proteína carbonilada consistiu em analisar espectrofotometricamente a reação do DNPH com grupos carbonílicos, gerando a hidrazona correspondentes (LEVINE *et al.*, 1994) e foi utilizado o protocolo modificado descrito por (REZNICK; PACKER, 1994), para isso, 500 μL do homogeneizado pulmonar foi colocado em tubos de polipropileno e adicionados e 500 μL de ácido tricloroacético (ATC) 10%, misturados no vórtex e em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi misturado com 500 μL de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente e no escuro, por uma hora e a cada 15 minutos foram misturadas no vórtex. Ao final do período foi acrescentado 500 μL de ATC e as amostras foram novamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm. O sobrenadante foi descartado e 1 mL da mistura de etanol/acetato de etila (1:1) foi adicionado aos tubos e misturados no vórtex e novamente centrifugados, essa etapa da reação foi repetida por duas vezes. Após a segunda lavagem com a solução de etanol/acetato de etila o sobrenadante foi descartado e adicionado 1 mL de Dodecil sulfato de sódio (DSS) 6% misturando no vórtex e centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram lidos no espectrofotômetro a 370 nm. A concentração de proteína carbonilada nas amostras foi determinada de acordo com a equação de Lambert Beer, obtendo os resultados em nmol/g. tecido.

5.11. Mensuração de marcadores inflamatórios

Foram realizadas avaliações dos marcadores biológicos: interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 13 (IL-13) e interleucina 15 (IL-15) no LBA. Os ensaios imunoenzimáticos foram aplicados para detecção dos níveis

das citocinas de acordo com as recomendações propostas pelo fabricante (R&D Systems, Minneapolis, USA). As amostras de sobrenadante, previamente padronizadas, foram aplicadas em um volume de 100 µl para cada poço. Paralelamente, a proteína investigada foi diluída em várias concentrações para o estabelecimento da curva padrão e, a seguir, realizada incubação por 12 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, os anticorpos secundários (anticorpo de detecção) foram diluídos em PBS-BSA 0.1% e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Finalmente, 100 µl de estreptavidina ligada à peroxidase na diluição de 1:4000 em PBS-BSA 0.1% foram adicionados à placa e a mesma mantida sob agitação por 30 minutos. O cromógeno escolhido para revelação foi o OPD (θ -phenylenediamine-SIGMA) ou tetrametilbenzidina (TMB), diluído em tampão citrato de acordo com recomendação do fabricante. No momento da aplicação de 100 µl desta solução nos poços, foi ainda adicionado 2 µl/placa de H₂O₂ 30 volumes como catalisador da reação. Após 20 minutos de incubação em ausência de luz, a reação sofreu bloqueio adicionando 50 µl de H₂SO₄ 3 M por poço. A leitura da intensidade de marcação foi realizada em leitor de ELISA utilizando-se o comprimento de onda de 490 nM (39,40).

5.12. Atividade da MMP-9 E MMP-2.

Foi avaliado a atividade da metaloproteinase 9 (MMP-9) e metaloproteinase 2 (MMP-2) através da técnica de zimografia no tecido pulmonar (SUNG *et al.*, 2007, LÚCIO *et al.*, 2018, RABELO *et al.*, 2018). A homogeneização das amostras foi realizada utilizando tampão RIPA (pH 8,0) 150mM de NaCl, 1% de IGEPAL VR CA-630 (Sigma-Aldrich, Co, St Louis, EUA), 0,5% de desoxicolato de sódio, 0,1% de SDS e 50mM de Tris. Em seguida, foi centrifugado a 10000 ug por 10 min, 4°C, e o sobrenadante foi retirado para preparação das amostras e logo depois foram inseridas em gel de poliacrilamida 8% copolimerizados com 2 mg/mL de gelatina. Posteriormente, esses géis foram lavados em Triton X-100 2,5% (3 x 20min) e incubados por 36 horas a temperatura de 37°C em tampão de 50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, e 0,05% NaN₃ (pH 7,5). A coloração dos géis foi realizada com 0,05% de Coomassie Brilliant blue G-250 por 3h e depois branqueadas em 4% de metanol com 8% de solução de ácido acético.

5.13. Histopatologia pulmonar

5.13.1. Análises estereológico

A análise estereológico da densidade de volume do septo alveolar V_v [sa] foi realizada em um sistema-teste composto por 16 pontos e em uma área-teste conhecida onde a linha proibida foi considerada como delimitação, a fim de evitar uma superestimação no número de estruturas. O sistema teste foi acoplado a um monitor ligado a um microscópio. Os números de pontos (PP) que atingiram os septos alveolares (V_v [sa]) e os espaços alveolares (V_v [a]) foram avaliados de acordo com os números total de pontos de um sistema teste (Pt). Então temos que $V_v = P_p / P_r$. Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 18 campos e um sistema ciclóide de ensaio sobreposto sobre a tela do monitor. O volume de referência foi estimado pela contagem de pontos de utilização dos sistemas de ponto de teste (PT). Uma área total de 1,94 mm² foi analisada para determinar as densidades de volumes dos septos alveolares (V_v [sa]) e dos espaços alveolares (V_v [a]) em cortes corados em HE (BEZERRA *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2019).

5.13.2. Medidas do Intercepto Linear Médio (Lm)

Para avaliar a extensão da lesão pulmonar (enfisema), foi realizada a análise morfométrica das seções coradas com hematoxilina-eosina. Foi calculada a Medida do Intercepto Linear Médio (Lm), um indicador do tamanho do espaço aéreo. Para se obter amostras uniformes e proporcionais do pulmão, foram analisados aleatoriamente 16 campos e um sistema de ensaio sobreposto sobre a tela do monitor. Esta técnica morfométrica consiste na determinação do número de vezes que estruturas do parênquima de troca gasosa, coradas com HE, interceptam um conjunto de retas coerentes, por meio de um retículo junto ao ocular do microscópio com um sistema de 21 linhas e 42 pontos (CHURG *et al.*, 2004; MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Portanto, se houver degeneração do tecido dos animais dos grupos expostos à fumaça de cigarro convencional ou aerossol de cigarro eletrônico, o número de interceptos das estruturas alveolares será menor com relação ao dos animais controle, por conseguinte, o Lm será maior. (DA SILVA *et al.*, 2020). A partir das contagens de número de interceptos em cada lâmina histológica determinou-se o valor de LM a partir da equação:

$$Lm=Ltot/Li$$

Onde:

Ltot- comprimento total das retas do retículo, considerando-se o aumento (200X – 1250 nm);

Li- o número de interceptos de estruturas alveolares com as retas do retículo.

5.14. Análise estatística

A normalidade das variáveis quantitativas foi realizada pelo teste Shapiro Wilk. Após confirmação do teste de normalidade os dados foram expressos em média \pm desvio padrão ou mediana e interquartil (25% e 75%). A diferença entre os dados contínuos dos grupos foi avaliada pelo teste de análise de variância (ANOVA) seguido do Pós-teste de Tukey e a diferença entre os dados discretos dos grupos foi realizada através do Teste Kruskal-Wallis seguido do Pós-teste de Dunns. Em ambos os casos, diferença significativa foi considerada quando o valor de α for menor a 0,05 (Graphpad Prism 8 Software).

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação de parâmetros biométricos

Na figura 8, foram apresentados os dados referentes à massa corporal mensurada em todos os grupos de estudo em três momentos diferentes (0, 60 e 120 dias). No GCF houve um ganho de massa corporal [$F_{(2,21)} = 83,95$; ANOVA, $p < 0,0001$] nos dias 60 e 120, marcando uma diferença em relação ao dia 0 ($p < 0,0001$). No GCCF [$F_{(2,21)} = 65,01$; ANOVA, $p < 0,0001$] apenas no dia 120 houve uma diferença de ganho de peso em relação aos dias 0 e 60 ($p < 0,0001$). Para o GCEF somente foi evidenciado um ganho de massa corporal com diferenças estatísticas [$F_{(2,21)} = 13,27$; ANOVA, $p = 0,0002$] até o dia 120 em relação aos dias 0 ($p = 0,0003$) e 60 ($p = 0,0019$), não foram observadas diferenças de massa corporal entre 0 e 60 dias.

No caso do GCM, foi evidenciado um ganho de peso [$F_{(2,21)} = 47,46$; ANOVA, $p < 0,0001$] no dia 60 e 120 com diferenças estatísticas em relação ao dia 0 ($p < 0,0001$), assim, no dia 120 obteve-se também uma diferença quando comparado com o dia 60 ($p = 0,0009$). No GCCM [$F_{(2,21)} = 68,74$; ANOVA, $p < 0,0001$] não houve diferenças em ganho de peso entre o dia 0 e 60, apenas no dia 120 ($p < 0,0001$) apresentaram diferenças tanto com o dia 0 e 60. Referente ao GCEM [$F_{(2,21)} = 35,51$; ANOVA, $p < 0,0001$] não foram encontradas diferenças significativas de massa corporal entre os dias 0 e 60, porém, o dia 120 ($p < 0,0001$) conseguiu se observar um aumento significativo de peso quando comparado com 0 e 60 dias.

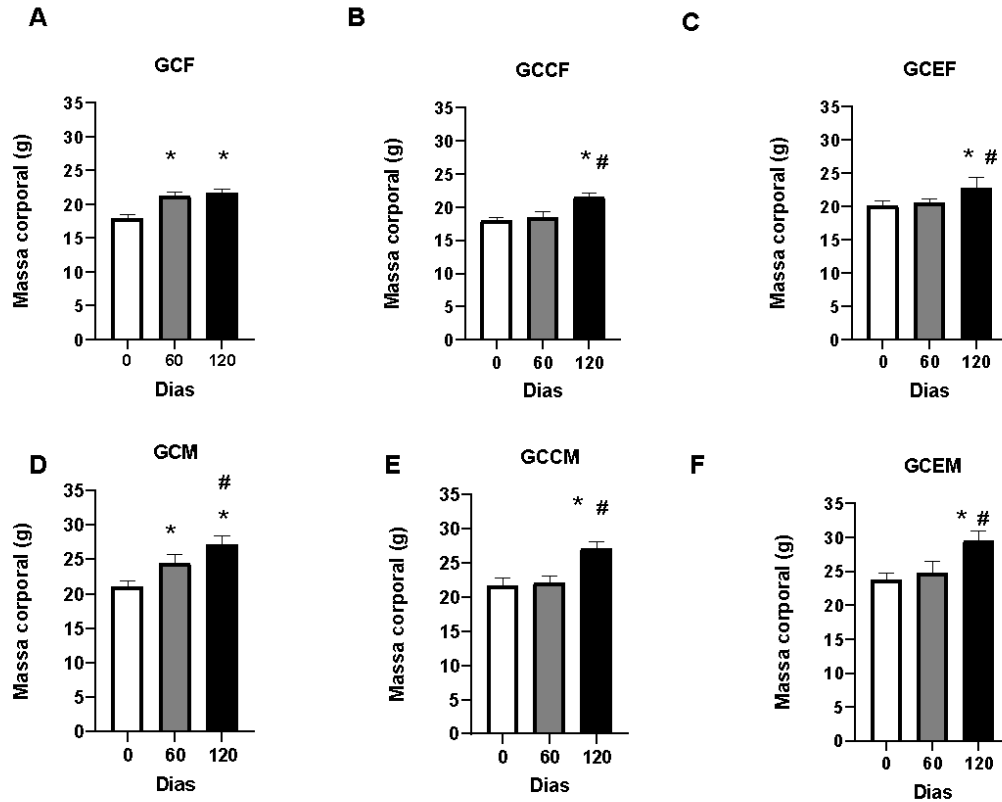


Figura 8. Massa corporal dos animais em três momentos diferentes (0, 60 e 120 dias). (A) GCF: grupo controle fêmeas; (B) GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; (C) GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; (D) GCM: grupo controle machos; (E) GCCM: grupo cigarro convencional machos; (F) GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para a análise estatística foi realizado o ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de *Tukey*, $p < 0.05$, $n = 8$ animais por grupo. (*) denota diferença estatística com 0 dias; (#) denota diferença estatística com os 60 dias.

Quanto à densidade pulmonar (tabela 1) foi observado diferenças estatísticas [$F_{(2,21)} = 24$; $p < 0,0001$] entre todos os grupos de fêmeas: GCF, GCCF e GCEF, sendo que o GCEF ($p < 0,001$) apresentou a menor densidade pulmonar. No caso dos machos foram encontradas diferenças significativas [$F_{(2,21)} = 3.62$; $p = 0,04$], onde a densidade pulmonar diminuiu no GCEM quando comparado com GCCM ($p = 0,04$).

Tabela 1. Densidade pulmonar e Massa relativa do pulmão

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
Densidade Pulmonar (g/cm³)	0,63±0,12	0,47±0,13 ^a	0,23±0,07 ^{a,b}
Massa relativa do pulmão (%)	1,75±0,16	1,84±0,16	1,82±0,13
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
Densidade Pulmonar (g/cm³)	0,91±0,06	0,92±0,05	0,85±0,05 ^d
Massa relativa do pulmão (%)	1,38±0,08	1,51±0,08	1,44±0,05

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM; os dados estão expressos em média ± desvio padrão e foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$) com $n=8$ animais por grupo.

6.2. Avaliação de parâmetros ventilatórios

Na tabela 2 são exibidos os parâmetros ventilatórios, identificando um aumento $F_{(2,15)} = 16,13$; ANOVA, $p=0,0002$] da frequência respiratória de GCEF quando comparado com os grupos GCCF ($p=0,001$) e GCF ($p=0,0002$), também houve aumento na frequência respiratória [$F_{(2,15)} = 3,73$; ANOVA, $p=0,0484$] em GCEM quando comparado com o GCM ($p=0,0467$).

No volume corrente foram encontradas diferenças entre os machos [$F_{(2,15)} = 7,74$, ANOVA, $p=0,0049$]. Os grupos GCCM ($p=0,0230$) e GCEM ($p=0,0056$) apresentaram um aumento no volume corrente quando comparado com GCM. Por outro lado, entre os grupos correspondentes às fêmeas, não foram encontradas diferenças estatísticas [$F_{(2,15)} = 0,7461$; ANOVA, $p=0,4910$].

Na avaliação do Volume Minuto (VM) [$F_{(2,15)} = 12,93$; ANOVA, $p=0,0005$], GCEF apresentou maior VM quando comparado com GCCF ($p=0,0028$) e GCF ($p=0,0008$). Da mesma forma, para os machos [$F_{(2,15)} = 18,82$; ANOVA, $p < 0,0001$] os grupos GCCM ($p=0,0031$) e GCEM ($p < 0,0001$) apresentaram aumento de VM quando comparado com o GCM.

Tabela 2. Parâmetros ventilatórios dos grupos experimentais

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
FR (IRPM)	173,2±5,81	176,2±3,37	189,8±6,55 ^{a,b}
VC (mL)	0,28±0,02	0,28±0,01	0,29±0,01
VM (mL/min)	48,50±3,93	49,50±1,87	55,99±2,0 ^{a,b}
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
FR (IRPM)	168,8±9,94	171,7±4,96	179±5,35 ^c
VC (mL)	0,28±0,03	0,33±0,03 ^c	0,35±0,01 ^c
VM (mL/min)	47,42±4,98	57,85±5,19 ^c	63,12±3,03 ^c

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. FR: frequência respiratória; IRPM: Incursões respiratórias por minuto; VC: volume corrente; VM: volume minuto. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM; os dados estão expressos em média ± desvio padrão e foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de *Tukey* ($p < 0,05$), $n = 6$ por grupo.

6.3. Avaliação dos leucócitos no sangue periférico

A contagem total e diferencial de células inflamatórias (Tabela 3) foi realizada para todos os grupos experimentais do estudo. Para as fêmeas o número total de leucócitos [$F_{(2,21)} = 8,62$; ANOVA, $p = 0,0018$] foi maior em GCEF ($p = 0,0111$) e GCCF (0,0024) comparado com o GCF. Em relação à contagem diferencial GCCF apresentou maior número de linfócitos [$F_{(2,21)} = 4,14$; ANOVA, $p = 0,0304$] em relação ao GCF ($p = 0,0279$). O número de monócitos [$F_{(2,21)} = 19,70$; ANOVA, $p < 0,0001$] foi maior em GCEF quando comparado com GCCF ($p = 0,0051$) e GCF ($p < 0,0001$). O número de neutrófilos [$F_{(2,21)} = 5,805$; ANOVA, $p = 0,0098$] foi maior em GCEF ($p = 0,0115$) e GCCF ($p = 0,0410$) quando comparado com o grupo GCF.

Em relação aos machos, a contagem total de leucócitos [$F_{(2,21)} = 8,62$; ANOVA, $p = 0,0018$] foi maior em GCEM comparado ao GCCM ($p = 0,0017$).

GCCM apresentou um número inferior referente ao GCM ($p=0,0226$). O número de linfócitos foi maior em GCCM quando comparado com o GCM ($p=0,0282$). Não houve diferenças estatísticas [$H=3,12$; $p=0,2096$] entre os grupos de machos GCM, GCCM e GCEM para a contagem de monócitos. Foi observado maior número de neutrófilos [$H=15,48$; ANOVA, $p=0,0004$] em GCEM quando comparado com o GCM ($p=0,0015$) e GCCM ($p=0,0026$).

Tabela 3. Contagem total e diferencial de células do sangue.

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1,43 \pm 0,26	1,86 \pm 0,24 ^a	1,79 \pm 0,14 ^a
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1,19 \pm 0,23	1,47 \pm 0,18 ^a	1,27 \pm 0,18
Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,11 \pm 0,02	0,19 \pm 0,02 ^a	0,29 \pm 0,09 ^{a,b}
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,12 \pm 0,03	0,20 \pm 0,07 ^a	0,22 \pm 0,05 ^a
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1,93 \pm 0,26	1,65 \pm 0,12 ^c	2,08 \pm 0,15 ^d
Linfócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	1,67 \pm 0,21	1,41 \pm 0,09 ^c	1,51 \pm 0,21
Monócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,12 (0,11-0,18)	0,12 (0,09-0,16)	0,19 (0,12-0,25)
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,09 (0,05-0,16)	0,10 (0,07-0,12)	0,31 ^{c, d} (0,24-0,37)

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA ou Kruskal Wallis, seguido pelo pós-teste de *Tukey* ou pelo pós-teste de *Dunn's* ($p<0,05$), $n=8$ por grupo.

6.4. Contagem total e diferencial dos leucócitos no lavado broncoalveolar

Foi realizada uma contagem total e diferencial de células no LBA para detectar quantidades de células inflamatórias nas vias aéreas (Tabela 4). Os resultados da contagem total de leucócitos [$F_{(2,21)}=61,19$; ANOVA, $p<0,0001$] demonstraram que houve maior influxo de células para as vias aéreas nos grupos GCEF ($p<0,0001$) e GCCF ($p<0,0001$) comparado com GCF. A contagem

diferencial revelou maior influxo de macrófagos [$F_{(2,21)} = 53,16$; ANOVA, $p < 0,0001$] nos grupos GCEF ($p < 0,0001$) e GCCF ($p < 0,0001$) comparados com o grupo GCF. Para a contagem de linfócitos ($H = 20,50$; $p < 0,0001$), GCEF ($p < 0,0001$) apresentou maior influxo celular comparado com o controle. A contagem de neutrófilos ($H = 15,44$; $p = 0,0004$) foi maior nos grupos GCEF ($p = 0,0015$) e GCCF ($p = 0,0028$) em comparação com o grupo GCF.

Em relação aos machos, a contagem total de leucócitos [$F_{(2,21)} = 36,61$; ANOVA, $p < 0,0001$] foram maiores nos grupos GCEM ($p < 0,0001$) e GCCM ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo GCM. Para a contagem diferencial, o influxo de macrófagos [$F_{(2,21)} = 23,56$; ANOVA, $p < 0,0001$] foi maior em GCEM ($p < 0,0001$) e GCCM ($p < 0,0001$) quando comparados com GCM. O recrutamento de linfócitos foi maior nos grupos GCEM ($p = 0,0071$) e GCCM ($p = 0,0005$) quando comparados com o grupo GCM. Nos machos ($H = 18,01$, $p = 0,0001$) foi observado um maior recrutamento de neutrófilos no grupo GCCM quando comparado com o GCM ($p < 0,0001$) e GCEM ($p = 0,0390$).

Tabela 4. Contagem total e diferencial de células no LBA.

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
Leucócitos (x10⁵ /mL)	3,90±0,87	8,59±0,82 ^a	9,21±1,50 ^a
Macrófagos (x10⁵ /mL)	3,82±0,86	7,23±0,67 ^a	5,63±0,72 ^{a, b}
Linfócitos (x10⁵ /mL)	0,06±0,02	0,92±0,17 ^a	3±1,06 ^{a, b}
Neutrófilos (x10⁵ /mL)	0,02 (0,00-0,037)	0,42 (0,24-0,57) ^a	0,44 (0,26-0,74) ^a
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
Leucócitos (x10⁵ /mL)	4,12±0,92	10,03±1,50 ^c	9,03±1,84 ^c
Macrófagos (x10⁵ /mL)	3,55±1,69	7,53±1,16 ^c	7,15±0,84 ^c
Linfócitos (x10⁵ /mL)	0,06 (0,02-0,16)	1,05 (0,72-1,5) ^c	1,33 (1,02-1,53) ^c
Neutrófilos (x10⁵ /mL)	0,01 (0,00-0,03)	1,71 (0,86-1,77) ^c	0,18 (0,09-0,20) ^d

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM; os dados estão expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA OU Kruskal Wallis, seguido pelo *post-hoc* de Tukey ou pelo *post-hoc* de Dunn 's ($p < 0,05$), $n=8$ por grupo.

6.5. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar

O dano à membrana celular foi avaliado através da peroxidação lipídica e a oxidação de proteínas. Nas fêmeas expostas aos diferentes cigarros foi observada maior peroxidação lipídica [$F_{(2,21)} = 32,55$; ANOVA $p < 0,0001$] no grupo GCEF em relação ao grupo GCCF ($p=0,0018$) e GCF ($p < 0,0001$). Na avaliação de oxidação proteica [$F_{(2,21)} = 10,79$; ANOVA $p=0,0006$], nos grupos de fêmeas, maiores níveis de oxidação foram observados nos grupos GCEF ($p=0,0016$) e GCCF ($p=0,0018$) quando comparados com o grupo controle GCF. Os machos expostos aos cigarros apresentaram maior oxidação lipídica ($H=14,92$; $p=0,0006$) nos grupos GCEM ($p=0,0008$) e GCCM ($p=0,0100$) quando comparados com o GCM. Também foram observados nos machos maiores

níveis de oxidação proteica [$F_{(2,21)} = 11,41$; ANOVA $p=0,0004$] nos grupos GCEM ($p=0,0003$) e GCCM ($p=0,0281$) em relação ao grupo GCM.

Foram avaliadas as enzimas antioxidantes CAT e SOD. Os resultados demonstram maior atividade da SOD [$F_{(2,21)} = 58,34$, ANOVA, $p < 0,0001$] nas fêmeas no grupo GCCF quando comparado com GCEF e GCF. Não foram observadas diferenças para a atividade catalase entre os grupos de fêmeas. A atividade da SOD [$F_{(2,21)} = 48,12$, ANOVA, $p < 0,0001$] foi menor em GCEM quando comparado com GCCM e GCM. A atividade de catalase [$F_{(2,21)} = 25,06$, ANOVA, $p < 0,0001$] foi maior em GCEM quando comparado com o GCCM e GCM ($p < 0,0001$).

A presença de concentração de proteínas totais no tecido pulmonar foi avaliada, e foi evidenciado aumento da concentração de proteínas totais para ambos os sexos de machos [$F_{(2,21)} = 36,84$, ANOVA, $p < 0,0001$] e fêmeas [$F_{(2,21)} = 44,02$, ANOVA, $p < 0,0001$] expostos a cigarro eletrônico, sendo que o grupo GCEF apresentou maior concentração de proteínas totais quando comparado com GCF ($p < 0,0001$) e GCCF ($p < 0,0001$). Da mesma forma, o GCEM obteve diferenças significativas em comparação com GCM ($p < 0,0001$) e GCCM ($p < 0,0001$).

Tabela 5. Biomarcadores do estresse oxidativo no parênquima pulmonar dos grupos experimentais

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
Proteínas totais (mg/mL)	0,73 ±0,18	0,97±0,17	1,98±0,41 ^{a,b}
CAT (U/g tec.)	2754±477,5	2386±479,3	2728±477,5
SOD (U/g tec.)	12892±529,2	16962±1430 ^a	12260±595,4 ^b
TBARS (nmol/g tec.)	129,7±16,49	216,6±32,40 ^a	301,7±64,32 ^{a, b}
PTN Carbonilada (nmol/g tec.)	2462±280,1	3035±296,7 ^a	3040±281,7 ^a
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
Proteínas totais (mg/mL)	0,72±0,23	0,73±0,10	2,06±0,56 ^{c, d}
CAT (U/g tec.)	1510±268,3	1231±504,5	2551±369,8 ^{c, d}
SOD (U/g tec.)	18272,43±1200	18073±2242	11947±1515 ^{c, d}
TBARS (nmol/g tec.)	141,3 (137,2-166,9)	225,7 (213,2-235,6) ^c	231,8 (211,2-327,4) ^c
PTN Carbonilada (nmol/g tec.)	1635±168,8	2306±789,1 ^c	2776±200,6 ^c

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA e Kruskal Wallis, seguido pelo *post-hoc* de *Tukey* ou pelo *post-hoc* de *Dunn* 's ($p < 0,05$), $n = 8$ por grupo.

6.6. Análise dos níveis de citocinas no LBA

Foram determinados os níveis de citocinas no LBA (Tabela 6). No grupo de fêmeas foi observado maiores níveis de IL-6 [$F_{(2,18)} = 5,52$; ANOVA $p = 0,0135$] no grupo GCEF em comparação com GCF ($p = 0,0108$). Os níveis de IL-6 [$F_{(2,18)} = 5,88$; ANOVA $p = 0,0094$] nos machos expostos aos cigarros foi maior no grupo exposto ao cigarro eletrônico (GCEM) comparado com GCM ($p = 0,0071$).

Os níveis de IL-13 [$F_{(2,18)} = 9,69$; ANOVA $p=0,0010$] foram maiores nos grupos GCCF ($p=0,0026$) e GCEF ($p=0,0030$) quando comparado com o GCF. No caso dos machos não houve diferença significativa para a interleucina 13 [$F_{(2,18)} = 1,003$; ANOVA $p=0,3837$] entre os grupos experimentais. A análise da interleucina 15 não apresentou diferença entre os grupos de fêmeas (GCF, GCCF, GCEF). Entretanto, os níveis de IL-15 [$F_{(2,18)} = 11,68$; ANOVA $p=0,0004$] foram maiores em GCEM comparado com GCM ($p=0,0012$) e GCCM ($p=0,0012$). Em relação aos níveis da interleucina 10 não foram observadas diferenças significativas tanto entre as fêmeas (GCF, GCCF, GCEF) quanto machos GCM, GCCM, GCEM).

Tabela 6. Níveis de Citocinas no LBA dos grupos experimentais

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
IL-6 (pg/100mL)	696,4±65,70	764,3±58,93	804,8±59,11 ^a
IL-10 (pg/100mL)	449,2±107,2	436,8±33,30	454,7±66,07
IL-13 (pg/100mL)	265,6±22,56	315,9±31,06 ^a	315,2±24,20 ^a
IL-15 (pg/100mL)	401,5±81,19	446,7±66,05	492,6±34,24
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
IL-6 (pg/100mL)	764,3±48,38	854,0±111,2	982,5±185,4 ^c
IL-10 (pg/100mL)	442±64,59	471,2±60,80	472,6±99,37
IL-13 (pg/100mL)	298,1±17,66	285,0±17,21	295,0±22,93
IL-15 (pg/100mL)	422,0±42,76	422±45,15	521,7±54,28 ^{c,d}

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão. Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de *Tukey* ($p<0,05$), $n=7$ ou 8 animais por grupo.

6.7. Análise da expressão de metaloproteinases de matriz 2 e 9 no tecido pulmonar

Na tabela 7, se apresentam os níveis da atividade das enzimas MMP-2 e MMP9. Os níveis da enzima MMP-2 foram significativos entres os grupos das fêmeas [$F_{(2,12)} = 5,34$; ANOVA $p=0,0219$], onde o GCCF mostrou maior atividade que o GCF ($p=0,0440$), e GCEF ($p=0,0327$). Os machos não apresentaram diferença entre os grupos $F_{(2, 12)} = 3.124$, $p=0,0809$.

A enzima MMP-9 apresentou-se sem diferença no grupo das fêmeas [$F_{(2,12)} = 1.168$, $p=0,3441$]. Para os machos [$F_{(2,12)} = 4.588$, $p=0,0331$] apresentou-se maior atividade desta enzima no GCEF comparado com o grupo GCCF $p=0,0347$.

Tabela 7. Níveis da Expressão de MMP-2 e MMP-9 no tecido pulmonar

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
MMP-2 (Densidade da banda $\times 10^6$)	4,37 \pm 2,4	8,6 \pm 3,6 ^a	3,75 \pm 1,13 ^b
MMP-9 (Densidade da banda $\times 10^7$)	1,29 \pm 0,20	1,46 \pm 0,11	1,49 \pm 0,30
Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
MMP-2 (Densidade da banda $\times 10^6$)	9,05 \pm 3,9	5,34 \pm 1,11	8,12 \pm 1,19
MMP-9 (Densidade da banda $\times 10^7$)	1,67 \pm 0,55	0,97 \pm 0,55	1,85 \pm 0,44 ^d

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo *post-hoc* de *Tukey* ($p<0,05$), $n=5$ animais por grupo.

6.8. Análises morfométricas do parênquima pulmonar

Na Tabela 8 estão descritos os resultados das análises morfométricas. Nas fêmeas foi observado maior densidade de volume de espaço aéreo alveolar ($V_v[a]$) ($H=17,78$; $p=0,0001$) no grupo exposto ao cigarro eletrônico (GCEF) quando comparado com GCCF ($p=0,0267$) e GCF ($p<0,0001$). Além disso, foi observado menor densidade de volume de septos alveolares ($V_v[sa]$) ($H=18,62$; $p<0,0001$) no grupo GCEF quando comparado com GCF ($p<0,0001$) e GCCF ($p=0,0380$). Em relação aos machos, as análises demonstraram maior densidade de volume de espaço aéreo alveolar ($H=16,88$; $p=0,0002$) em GCCM e GCEM ($p=,0001$) comparado com o GCM. A análise de $V_v[sa]$ mostrou uma menor densidade nos grupos GCCM ($p=0,0173$) e GCEM ($p=0,0002$) quando comparado com o GCM.

A análise do intercepto linear médio (Lm), as fêmeas [$F_{(2,21)} = 79,82$; $p<0,0001$] apresentaram maior Lm nos grupos GCCF e GCEF comparado com o GCF ($p<0,0001$), GCEF apresentou maior Lm quando comparado com GCCF. Os machos [$F_{(2,21)} = 84,31$; $p<0,0001$], assim como as fêmeas, apresentaram maior Lm nos grupos GCCF e GCEF comparado com GCM. Além disso, GCEM apresentou maior Lm comparado com GCCM ($p=0,0295$).

Tabela 8. Análises estereológicas do parênquima pulmonar.

Fêmeas			
	GCF	GCCF	GCEF
Vv[a] (%)	57,27 (55,74-62,31)	62,60 (61,86-64,92)	77,50 (76,09-80,47) ^{a, b}
Vv[sa] (%)	42,58 (37,57-44,26)	34,16 (31,77-37,51)	19,30 (18,44-23,41) ^{a, b}
Lm (µm)	151,1±25,20	249,3±32,29 ^a	331,9±28,08 ^{a, b}

Machos			
	GCM	GCCM	GCEM
Vv[a] (%)	59,50 (58,25-60,75)	70,00 (63,50-74,75) ^c	77,00 (73,50-79,00) ^c
Vv[sa] (%)	39 (37,25-41,00)	28 (23,75-32,25) ^c	23 (20,25-26,25) ^c
Lm (µm)	215,9±23,60	381,4±34,70 ^c	429,2±42,50 ^{c,d}

GCF: grupo controle fêmeas; GCCF: grupo cigarro convencional fêmeas; GCEF: grupo cigarro eletrônico fêmeas; GCM: grupo controle machos; GCCM: grupo cigarro convencional machos; GCEM: grupo cigarro eletrônico machos. (a) representa diferença significativa quando comparado com GCF; (b) representa diferença significativa quando comparado com GCCF; (c) representa diferença significativa quando comparado com GCM; (d) representa diferença significativa quando comparado com GCCM. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão ou em mediana e intervalo interquartil (25 e 75%). Os dados foram analisados pela análise de variância *one-way* ANOVA e *Kruskal Wallis*, seguido pelo *post-hoc* de *Tukey* ou pelo *post-hoc* de *Dunn* 's ($p < 0,05$), $n = 8$ por grupo.

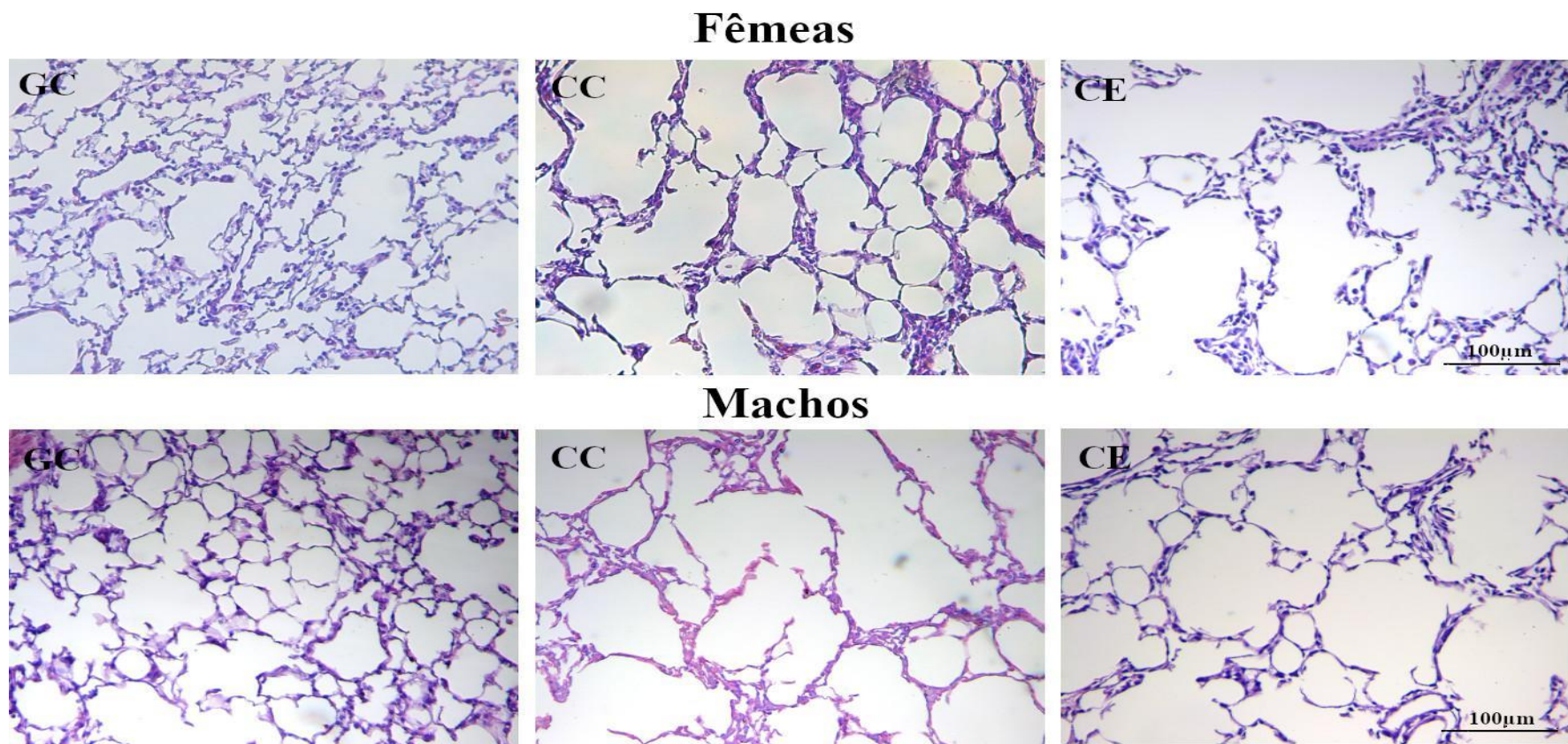


Figura 9. Fotomicrografias representativas de pulmão coradas com hematoxilina e eosina. Magnificação de 200x (Barra=100 µm). GC: grupo controle; GCC: grupo cigarro convencional; GCE: grupo cigarro eletrônico.



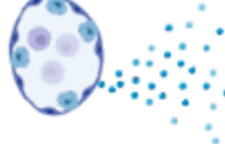



	♀		↑	FR; VM; Vv(a); Leucócitos em sangue e LBA; PT; PC; TBARS; IL-6; IL13; Lm
			↓	Densidade Pulmonar; Vv(sa)
	♂		↑	FR; VC; VM; Vv(a); Leucócitos LBA; PT; PC; TBARS; CAT; IL-6; IL15; Lm
			↓	SOD; Vv(sa)
	♀		↑	Leucócitos em sangue e LBA; PT; PC; TBARS; SOD; MMP-2; IL-6; IL13; Lm
			↓	Densidade Pulmonar
	♂		↑	VM; VC; Vv(a); Leucócitos LBA; PT; PC; TBARS; Lm
			↓	Leucócitos sangue ; Vv(sa)

Figura 10: Resumo dos principais resultados do estudo. **Fonte:** Autoria própria.

7. DISCUSSÃO

Os resultados encontrados evidenciam que o modelo crônico à exposição de fumaça de cigarro convencional (FCC) ou aerossol de cigarro eletrônico (ACE) a longo prazo (60 dias) em camundongos machos e fêmeas foi efetivo para observar alterações morfométricas pulmonares similares ao modelo experimental de enfisema em camundongos, incluindo processos inflamatórios e desequilíbrio redox de uma condição patológica irreversível apesar de ter um repouso de 60 dias sem exposição aos cigarros. Casos similares foram discutidos por PINHO-RIBEIRO, KENEDY-FEITOSA e colaboradores utilizando camundongos machos C57BL/6 e expostos à fumaça de cigarro (KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017).

O tabagismo está associado a um índice de massa corporal (IMC) mais baixo (WINSLØW; RODE; NORDESTGAARD, 2015) o que pode ser desencadeado por um aumento da taxa metabólica, pela diminuição da absorção calórica ou redução do apetite (CHIOLERO *et al.*, 2008). Os animais de ambos os sexos expostos a FC ou ACE não apresentaram ganho de peso ao final da exposição. Da mesma forma, estudos anteriores demonstraram que fêmeas expostas ao ACE não apresentaram ganho de massa corporal (KUMAR *et al.*, 2021). Valença e colaboradores em um estudo com camundongos expostos a FC não observaram impacto na massa corporal (VALENÇA *et al.*, 2004). Diferentemente dos resultados observados em nosso estudo, Campos e colaboradores demonstraram uma diminuição de massa corporal após 60 dias de exposição à FC (CAMPOS *et al.*, 2019). Tudo isso pode estar associado à nicotina contida nos cigarros convencionais e eletrônicos, pois já foi demonstrado em camundongos que essa substância se encontra relacionada à sensação de saciedade e subsequentemente diminui a ingestão de alimento (MINEUR *et al.*, 2011). Porém, Ponzoni e colaboradores (2015) demonstraram que os efeitos no peso corporal e na ingestão de alimentos foram diferentes para a exposição à FC e ACE, apesar de ter fornecido a mesma quantidade de nicotina (PONZONI *et al.*, 2015), uma explicação plausível poderia ser, que a entrega da nicotina através de aerossol de cigarro eletrônico neste trabalho mencionado anteriormente foi variada por conta da resistência e potência do

dispositivo, já que isso determina a quantidade de vaporização entregue para os animais e por sua vez de nicotina.

A nicotina aumenta o gasto energético tanto por efeitos diretos nos tecidos periféricos, amplamente mediados pelas catecolaminas, quanto por efeitos nos circuitos neuroendócrinos do sistema nervoso central. Os efeitos da nicotina no cérebro também levam à supressão do apetite, e fumar por si só pode servir como uma alternativa comportamental à alimentação (AUDRAIN-MCGOVERN; BENOWITZ, 2011), neste sentido, em fêmeas BALBc foi demonstrada uma taxa de ganho de peso lento quando expostas durante 4 semanas a ACE contendo nicotina quando comparado com aqueles que não continham nicotina (LARCOMBE *et al.*, 2017). Por outro lado, camundongos jovens expostos ao aerossol de cigarro eletrônico sem nicotina tiveram pesos corporais médios mais baixos do que os camundongos expostos à nicotina a 2,4% (SMITH *et al.*, 2015). Os achados contrastantes expostos com anterioridade, podem indicar que os efeitos da taxa de ganho de peso em camundongos, estaria associada pelos compostos adicionais que contém o cigarro eletrônico e não unicamente pela nicotina.

Após o período de cessação da exposição por 60 dias, os animais tanto fêmeas e machos apresentaram sua massa corporal aumentada, homologando os cenários humanos, que posterior ao cese da prática do tabagismo, conseguem um aumento de peso, que ocorre geralmente dentro dos primeiros três meses após o abandono. A variação na mudança de peso é grande, com aproximadamente 16% dos desistentes perdendo peso e 13% ganhando mais de 10 kg (AUBIN *et al.*, 2012).

O parâmetro biométrico de densidade pulmonar apresentou diminuição em nosso estudo, que foi afetado diretamente pela exposição ao FC e ACE em animais fêmeas e pelo ACE em machos. Esse parâmetro é relevante para identificação de enfisema pulmonar e fibroses em humanos (MASCALCHI; CAMICIOTTOLI; DICIOTTI, 2017). Em modelos animais geneticamente modificados de enfisema pulmonar, onde foi avaliado o parâmetro densidade pulmonar através de imagem computadorizada tridimensional e bidimensional, foi relatada uma diminuição desse parâmetro (FROESE *et al.*, 2007; ZUREK *et*

al., 2016), também, a densidade pulmonar é menor em pacientes com enfisema do que em indivíduos saudáveis (GUINAR *et al.*, 1992).

Em humanos, a fumaça de cigarro causa insuficiência respiratória, e está envolvida no desenvolvimento da DPOC (TANTISUWAT; THAVEERATITHAM, 2014). A prova de função pulmonar, ou espirometria, é fundamental para o diagnóstico e determinação da gravidade da DPOC (ZONZIN; CLEMENTE, RENA SIMÕES GERAIDINE; CORREIA; SILVEIRA, JULIO CEZAR DIAS FERENZINI; COSTA, 2017). Os elementos mais importantes da espirometria são a capacidade vital (CV) ou a capacidade vital forçada (CVF), o volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) e a relação entre eles (VEF1/CVF ou VEF1/CV). Tipicamente na DPOC temos uma redução de todos estes elementos, embora a CVF pode estar acima de 70% do previsto em pacientes com DPOC. Em modelos animais de exposição à fumaça ou ao aerossol de cigarro eletrônico tem sido mostrado alterações nesses parâmetros, similares com a DPOC de pacientes fumantes (LARCOMBE *et al.*, 2017). Em nosso estudo não avaliamos os parâmetros de função pulmonar, entretanto, foram avaliados parâmetros ventilatórios que também podem ajudar a compreender as mudanças na fisiologia pulmonar. Nosso estudo destaca um aumento na frequência respiratória nas fêmeas e machos expostos ao aerossol de cigarro eletrônico. Esses resultados sugerem que o ACE causa comprometimento da fisiologia respiratória. Em contraste com nosso achado a exposição à fumaça do cigarro altera a FR já seja induzindo aumento (ARAÚJO *et al.*, 2022), ou diminuindo-a (KUMAR *et al.*, 2021), nosso estudo passou por um período de cessação o que pode ter ajudado a uma adaptação dos pulmões e melhora da FR. Por outro lado, pode se evidenciar uma patologia crônica devido à dinâmica de VM e VC, onde, esses parâmetros foram encontrados alterados nos machos expostos a FCC e ACE, mas no caso das fêmeas apenas o VM foi alterado pelo ACE coincidindo parcialmente com Szafran e colaboradores, onde demonstrou que a exposição a VG/PG+baunilha aerossol de cigarro 2h por dia durante 6 semanas em camundongos fêmeas aumentou os volumes corrente e minuto do pulmão. Os volumes pulmonares fisiológicos aumentados estão associados a doenças pulmonares obstrutivas e hiperinsuflação (SZAFRAN *et al.*, 2020).

O desenvolvimento da DPOC em humanos envolve diferentes mecanismos e fatores como: a inflamação, estresse oxidativo, desequilíbrio entre protease/antiprotease, e fatores genéticos (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015). Modelos murinos de desenvolvimento da DPOC por exposição à FC têm mostrado mecanismos similares (GHORANI *et al.*, 2017; VALENÇA *et al.*, 2004; WRIGHT, JOANNE L.; CHURG, 2002), além disso compartilham genes significativamente modulados pela fumaça de cigarro, sugerindo uma resposta semelhante de ambas as espécies (MORISSETTE *et al.*, 2014). Assim, já há estudos experimentais em camundongos que associam a exposição ao ACE com nicotina para um desenvolvimento patológico similar a DPOC (GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016). Do mesmo modo, o nosso modelo experimental foi capaz de promover inflamação através do recrutamento de células inflamatórias para os pulmões, evidenciado na contagem total e diferencial no LBA em ambos os cigarros (CC e CE), apesar de submeter-se a uma cessação de um período de 60 dias. Além disso, pode se corroborar os nossos achados por Pinho-Ribeiro e colaboradores, que encontrou o número total de leucócitos no LBA dos machos do grupo FCC maior do que o encontrado no grupo controle, e tanto macrófagos quanto neutrófilos estavam aumentados, indicando que o processo inflamatório persiste mesmo na ausência de exposição ao FCC (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017).

Diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, células epiteliais, neutrófilos e linfócitos T, contribuem para a fisiopatologia da DPOC (RODRIGUES *et al.*, 2021) embora a liberação dessas células inflamatórias pode ocorrer com padrões diferentes em cada indivíduo (BARNES, 2018). O desenvolvimento inflamatório do recrutamento das células na contagem diferencial, comprovou dimorfismo sexual para ambos os cigarros, o que concorda com um estudo de exposição aguda ao aerossol de e-cig contendo nicotina induzindo o influxo de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos T CD8a+) no LBA de maneira dependente do sexo (WANG *et al.*, 2019b). Outro modelo agudo em fêmeas concorda com aumento de macrófagos, linfócitos e polimorfonuclear no LBA (SCHWEITZER *et al.*, 2015). Vários estudos crônicos em camundongos machos coincidem com um incremento de macrófagos e nenhuma alteração em neutrófilos no LBA devido a exposição de ACE, mas em

contraste com nosso estudo não se obteve alteração nos números de linfócitos (GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016; GLYNOS *et al.*, 2018; SUSSAN *et al.*, 2015). No caso de estudos agudos e crônicos com FC tem demonstrado em camundongos machos influxo de macrófagos, neutrófilos e linfócitos no LBA concordando com nossos achados (ARAÚJO *et al.*, 2020, 2022; GLYNOS *et al.*, 2018).

Além disso, nosso estudo mostrou aumento de leucócitos induzida pela FC ou ACE nas fêmeas, entretanto aconteceu o contrário nos machos, o que novamente corrobora o dimorfismo sexual na patologia de inflamação crônica. A fumaça de cigarro em humanos pode causar aumento de leucócitos, induzindo leucocitose associada a neutrofilia, linfócitose, monócitose e basófilia (MALENICA *et al.*, 2017; SMITH *et al.*, 2021). Também tem sido relacionada à leucocitose em pacientes com consumo assíduo de cigarro eletrônico (WORKS; STACK, 2020). No caso do tabagismo pode estar dado porque o consumo de tabaco crônico estimula a medula óssea, e causa alterações fenotípicas nos leucócitos polimorfonucleares (PMN), aumentando o tamanho dos pools mitóticos e pós-mitóticos de PMN e reduzindo o tempo que os PMN passam no pool pós-mitótico na medula (SCHWARTZ; WEISS, 1994; VAN EEDEN; HOGG, 2000). Por outro lado, têm sido relatadas mudanças na dinâmica de leucócitos que não estiveram fora dos escores normais, mas que indicam que o tabagismo afeta as células do sistema imunológico (ANDREOLI *et al.*, 2015), assim como aconteceu em nosso estudo que as fêmeas não apresentaram níveis de leucocitose segundo os valores de referência para camundongos C57BL/6 (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2016), mas sim aumento significativo de leucócitos em comparação com o grupo controle. Em outra perspectiva, o período de cessação pode ter levado a uma melhora dos níveis de leucócitos no sangue das fêmeas, situação análoga ocorrida em humanos (SMITH *et al.*, 2021). No caso dos machos a diminuição dos valores de leucócitos em sangue no grupo exposto à FC pode estar dada pelo recrutamento destas células no pulmão.

As espécies reativas de oxigênio (ERO), atuam com segundos mensageiros que desencadeiam respostas inflamatórias (CHEN *et al.*, 2016). A exposição à fumaça ou aerossol de cigarro causa um desequilíbrio redox, pelo acréscimo dos oxidantes contidos na fumaça/aerossol, levando a danos

tissulares nos órgãos principalmente no pulmão (BARREIRO *et al.*, 2010; CAI; WANG, 2017). Os oxidantes incluídos na fumaça do cigarro podem lesionar células e tecidos, inativar mecanismos de defesa e iniciar inflamação, o que eleva ainda mais o estresse oxidativo. No entanto, é difícil determinar se os oxidantes responsáveis pelo estresse são aqueles originalmente incluídos na fumaça do cigarro ou aqueles que resultam da resposta inflamatória associada (FISCHER; VOYNOW; GHIO, 2015).

A desregulação das enzimas antioxidantes SOD e CAT são respostas dos organismos submetidos a um estresse oxidativo, onde se pretende atingir o equilíbrio homeostático (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005). Diversos estudos relatam diferenças na atividade das enzimas SOD e CAT, em animais expostos à FC. Alguns estudos relatam níveis aumentados da atividade da CAT e SOD (PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017), enquanto outros estudos demonstraram uma diminuição da SOD (KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019) e CAT em camundongos machos expostos à FC (ARAÚJO *et al.*, 2022; CAMPOS *et al.*, 2019). Os achados do presente estudo, apontam para um aumento da atividade da SOD em camundongos fêmeas expostas à FC e no caso dos machos o ACE foi capaz de aumentar a atividade da enzima CAT e diminuir a SOD. Outro importante achado neste estudo relacionado ao desequilíbrio homeostático foi que o ACE em ambos os sexos, aumentou a concentração de proteínas totais no tecido pulmonar, o que representa uma valoração quantitativa de dano tissular e celular (MO *et al.*, 2020; WAN *et al.*, 2017), e isso pode induzir uma alta permeabilidade vascular pulmonar (QIU *et al.*, 2011). Em outros estudos o aumento de proteínas totais foi relacionado ao aumento inflamatório apresentando alterações de tecidos neoplásicos (HERDELBER, 1975) e também estando relacionado ao desenvolvimento da carcinogênese (SELVENDIRAN; PRINCE VIJEYA SINGH; SAKTHISEKARAN, 2006).

Outros estudos têm demonstrado em camundongos machos que o aerossol e a fumaça de cigarro causam peroxidação lipídica e oxidação protéica no tecido pulmonar (CAMPOS *et al.*, 2019; SUSSAN *et al.*, 2015) e no LBA (GLYNOS *et al.*, 2018) indicadores de estresse oxidativo, inclusive depois de período de cessação no caso de FC (KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017). Lerner e colaboradores comprovaram que as diferenças

na reatividade de oxidantes/espécies reativas de oxigênio (OX/ERO) em e-líquidos antes da vaporização estão associadas ao sabor do e-líquido. Os e-líquidos não vaporizados eram oxidativos de uma maneira dependente dos aditivos de sabor, enquanto os sabores doces ou de frutas eram oxidantes mais fortes do que os sabores de tabaco (LERNER *et al.*, 2015). No caso do presente estudo, nós encontramos uma peroxidação lipídica e oxidação proteica evidente para ambos os cigarros em contraste com os grupos controles. Embora os achados tenham sido distintos entre fêmeas e machos ambos apresentaram danos oxidativos. No caso particular da peroxidação lipídica ACE apresentou maior proeminência em fêmeas, sugerindo que o cigarro eletrônico causa um maior dano oxidativo no pulmão. O dano tecidual no sítio inflamatório é causado pela liberação do ERO e protease após o recrutamento, retenção e ativação de neutrófilos (JIANG *et al.*, 2016).

Produto do influxo de células inflamatórias e desequilíbrio redox, as citocinas começam a ser liberadas para agir no processo de inflamação. Uma das principais interleucinas pró-inflamatórias é a IL-6 e é produzida por células do sistema imune inato, como macrófagos, mastócitos, neutrófilos e linfócitos B (CHEN *et al.*, 2015) e também por células endoteliais, fibroblastos e células de músculo liso (PEDREIRA *et al.*, 2006). Os níveis de IL-6 no soro e escarro de pacientes com doença pulmonar crônica estão aumentados (KROMMIDAS *et al.*, 2010) e é o principal agente causador do enfisema e atua para induzir a apoptose no pulmão (RUWANPURA *et al.*, 2011). A IL-6 aumentou em camundongos de ambos os sexos expostos ao aerossol de cigarro. Em conformidade com nosso estudo, a literatura relata aumento de IL-6 tanto em modelos agudos como em crônicos para camundongos expostos a ACE (LERNER *et al.*, 2015) e em contraste, modelos de fumaça também relatam aumento desta citocina (HUSARI *et al.*, 2016; KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019; MADISON *et al.*, 2019; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017), contudo, as análises para determinação dos níveis de expressão da IL-6 em FC foram diferentes, pois foram avaliados em homogeneizado de tecido pulmonar, entretanto, em nosso estudo foi feito a partir de LBA, podendo ser sugerido que em fumantes com cessação, a produção de IL-6 está ligada a células epiteliais e não a células inflamatórias circundantes, e

no caso do cigarro eletrônico essas células como os macrófagos podem continuar gerando essa interleucina.

Em outro estudo, camundongos machos foram expostos por 6 h/d ao ar ambiente, ACE ou FC, por 3 dias e exibiram um aumento significativo na expressão de IL-6, mas o aumento na expressão de IL-6 foi mais significativo no FC quando comparado ao ACE (HUSARI *et al.*, 2016), concordando parcialmente com nossos achados, onde os níveis de IL-6 foram aumentados em animais submetidos a exposição de ACE, mas não para os grupos de FCC. Os níveis de IL-6 parecem voltar à normalidade após a cessação de cigarro convencional, o que concorda com a sua participação em fase aguda de inflamação, porém, no cigarro eletrônico continua sua produção, o que pode estar causando patologia crônica de inflamação mais severa do que no cigarro convencional.

No caso da IL-15 o ACE mostrou-se aumentada em machos e a IL-13 para ambos cigarros apresentaram aumento apenas em fêmeas, referindo que o cigarro eletrônico e o cigarro convencional podem ter vias distintas de cronificação da doença, além de ser diferente para machos e fêmeas. O que concorda com outro estudo onde a avaliação de mediadores inflamatórios em LBA mostrou um aumento significativo em várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias após uma exposição aguda ao aerossol ACE contendo propilenoglicol (PG) com nicotina em comparação com os grupos PG e controle de ar de maneira dependente do sexo (WANG *et al.*, 2019b). Neste mesmo sentido, níveis de IL-6, e IL-13 foram significativamente aumentados em camundongos expostos ao aerossol de ACE em comparação com controles do grupo ar (LERNER *et al.*, 2015).

A asma e alguns casos da DPOC são impulsionados principalmente por respostas imunes do tipo 2, que incluem aumento de eosinófilos nas vias aéreas, células T helper 2 (Th2) e células linfóides inatas do grupo 2 (ILC2s) e a secreção de IL-4, IL-5 e IL-13 (BARNES, 2018). A IL-13 inibe a atividade quimiotática e fagocitária de monócitos e macrófagos e reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 (VARELLA; FORTE, 2001), conseguindo explicar que os níveis altos de IL-13 em fêmeas expostas a FCC e ACE é uma tentativa de

diminuição da resposta inflamatória geral, porém, não sendo o suficiente para regular a atividade da IL-6 em ACE que se observou aumentada. Sugerindo que o efeito regulador da IL-6 é mais efetivo em camundongos fêmeas expostos a FC, já que os valores eram similares aos do controle.

A regulação do processo inflamatório em machos provavelmente passa pela regulação de outras células e citocinas, já que nesses animais foi observado níveis elevados de IL-15 após a exposição ao ACE. A expressão de IL-15 pode estar associada a doenças inflamatórias crônicas do pulmão mediadas por Th1 (MURO *et al.*, 2001) e seus principais alvos são linfócitos T e B ativados (VARELLA; FORTE, 2001). Outra explicação do aumento da IL-15 em camundongos expostos ao ACE pode estar dada ao aumento de macrófagos em LBA, já que esta citocina é produzida principalmente por essa célula (ABBAS *et al.*, 2019), além disso é importante para a sobrevivência das células T-CD8+ de memória.

A fumaça de cigarro e o aerossol de cigarro, além de causar inflamação por influxo de células, aumento de citocinas e desequilíbrio redox, também desregulou as metaloproteinases. A atividade catalítica destas enzimas está relacionada com a fisiologia pulmonar, uma vez que participa da morfogênese de ramificações, homeostase e reparo, entre outros eventos. Entretanto a superexpressão de MMP tem sido responsabilizada por grande parte da destruição tecidual associada à inflamação e doença pulmonar (PARKS; SHAPIRO, 2001). Por exemplo, as metaloproteinases contribuem substancialmente para a degradação da matriz pulmonar durante a evolução do enfisema induzido pela fumaça do cigarro (MCGARRY HOUGHTON, 2015).

A MMP-2 e a MMP-9 se encontram superexpressos em pacientes com DPOC (SANTOS *et al.*, 2009). A enzima MMP-9 é expressa principalmente por macrófagos alveolares e neutrófilos (NOSAWA *et al.*, 2006) que foram células recrutadas para as vias aéreas em nosso estudo. Embora só se encontrou uma maior expressão de MMP-9 em camundongos machos expostos a cigarro eletrônico em comparação com a fumaça de cigarro convencional, o que concorda com outro estudo onde a MMP-9 mostrou aumento da expressão de RNA mensageiro nos camundongos expostos a fluidos de cigarro eletrônico

contendo nicotina (GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016). O período de cessação pode ter contribuído a que a MMP-9 e MMP-2 nos outros grupos retornaram a níveis do grupo controle, concordando com outro estudo onde camundongos fêmeas B6C3F1 expostos à fumaça de cigarro durante 6 semanas e depois um período de 4 semanas de cessação, demonstrou que os aumentos induzidos por FC nos níveis de MMP-2 e MMP-9 em LBA são reversíveis com a cessação da exposição (SEAGRAVE *et al.*, 2004). Por outro lado, a enzima MMP-2 em nosso estudo foi observado um aumento em camundongos fêmeas expostos a FC, evidenciado também por Seagrave e colaboradores em 2004, que apresentou atividade alta da MMP-2 depois de 10 semanas de exposição a FC com a diferença que foi mensurado em LBA (SEAGRAVE *et al.*, 2004). A diferença da MMP-9 que é liberada por células inflamatórias e pode estar ligada à remodelação tecidual induzida pelo processo inflamatório, a MMP-2 é sintetizada por células estruturais, incluindo fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, e pode estar associada a uma remodelação tecidual cronicamente prejudicada, levando a alterações anormais de deposição de colágeno (LAGENTE *et al.*, 2005).

A inflamação persistente das vias aéreas promovida pelo tabagismo é o principal fator de risco para desenvolvimento da DPOC e para desenvolver alterações patológicas irreversíveis no pulmão, como enfisema pulmonar e remodelamento das vias aéreas (TUDER; YUN, 2008). Finalmente o desequilíbrio redox, desequilíbrio de enzimas MMP e o processo inflamatório desenvolvido pela exposição de FC e ACE levou a mudanças estruturais de maneiras distintas em fêmeas e machos. As fêmeas parecem ser mais suscetíveis a mudanças devido ao ACE, já que apresentaram aumento de intercepto linear médio (Lm) e volume do espaço aéreo alveolar Vv(a) e uma diminuição de densidade de volume do espaço septo alveolar Vv(as), porém, a FCC só promoveu aumento de Lm. Em concordância com nossos achados, o estudo de March e colaboradores, demonstrou que a fumaça de cigarro causou alterações estruturais no parênquima pulmonar dos camundongos fêmeas A/J (MARCH *et al.*, 2006). Em contraste com nosso estudo Kumar e colaboradores demonstraram que o cigarro eletrônico não foi capaz de causar alterações enfisematosas mas sim no modelo 3R4F de cigarro convencional após 7 meses

de exposição em camundongos fêmeas C57BL-6 (KUMAR *et al.*, 2021), neste sentido, outro trabalho de exposição crônica durante 4 meses mostrou resultados similares (MADISON *et al.*, 2019). Cabe mencionar que o modelo de cigarro e líquido utilizado é diferente ao do nosso trabalho, essa variabilidade de modelo de cigarro e a quantidade de líquidos no comércio pode trazer diferentes consequências para a saúde pública. Parece ser que a nicotina é o principal componente que causa hiperreatividade das vias aéreas e destruição do tecido pulmonar (GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016) embora outros estudos mostram que a exposição aguda aos veículos de cigarro eletrônico também são promotores de inflamação (WANG *et al.*, 2019b) e talvez a exposição crônica poderia levar a destruição de alvéolos. Portanto, é importante considerar mais profundamente a adaptação e regulação dos cigarros eletrônicos como alternativa ao tabagismo, uma vez que introduzem novos agentes tóxicos, cuja toxicidade é pouco conhecida (CAI; WANG, 2017).

Os machos foram afetados por mudanças estruturais ocasionado pela exposição de ambos cigarros (FC e ACE), onde o Lm e o Vv[a] aumentou e a densidade de Vv[sa] diminuiu, o que concorda com estudos prévios onde utilizaram o mesmo modelo crônico em camundongos machos C57BL/6 expostos à fumaça de cigarro por 60 dias de exposição e 60 dias de cessação (KENNEDY-FEITOSA *et al.*, 2019; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017), além disso, o presente trabalho também corroborou essas mudanças com exposição ao aerossol de cigarro eletrônico. Em um estudo em que não foi especificado o sexo dos animais foi observada alteração em parâmetros morfológicos nos camundongos expostos a fluidos de cigarro eletrônico contendo nicotina, onde o intercepto linear médio foi aumentado e a área de superfície/volume da unidade e o volume fracionado foram reduzidos (GARCIA-ARCOS *et al.*, 2016).

Os mecanismos que apresentaram tanto machos e fêmeas incluíram inflamação crônica, desequilíbrio redox, mudanças na atividade da MMP, e levaram a mudanças fisiológicas e estruturais do pulmão, assemelhando o desenvolvimento de uma patologia crônica tipo enfisema. Tudo isso, sobreveio sob condições de dimorfismo sexual, apresentando uma dinâmica diversa de alguns parâmetros avaliados, não se obtendo uma padronização nos resultados, propondo que as análises de patologia crônica de doenças pulmonares devem

ser estudadas de uma forma individualizada ou dependente do sexo, por outro lado, deve ser ressaltado que o cigarro convencional e o cigarro eletrônico possuem mecanismos diferenciados que podem estar ligados à sua composição.

As evidências apresentadas em nosso estudo são suportadas pela literatura e demonstram que o tabagismo e o cigarro eletrônico impactam na saúde pública. Para promover uma diminuição das incidências de enfermidades associadas ao tabagismo, a única alternativa é diminuir a utilização de tais produtos.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados conclui-se que:

Os animais expostos ao cigarro convencional e cigarro eletrônico, de ambos os sexos, desenvolveram uma condição tipo enfisema, depois de 60 dias de exposição, e apesar da cessação, a condição patológica foi mantida, apresentando: diminuição da densidade pulmonar, mudanças fisiológicas da frequência respiratória, volume corrente e volume minuto; alteração nos níveis de leucócitos de sangue; influxo de células inflamatórias como macrófagos, linfócitos e neutrófilos; desequilíbrio de enzimas antioxidantes, peroxidação de lipídios e peroxidação proteica; liberação de citocinas IL-6, IL-13, IL-15; e mudanças no parênquima pulmonar, sendo que todo o mencionado foi de maneira dependente do sexo.

9. REFERÊNCIAS

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, n. C, p. 121–126, 1984.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Brazilian Ministry of Health - Resolution of the Board of Directors - Nº 46, OF AUGUST 28, 2009. **Ministério da Saúde - MS, Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, v. 2009, p. 1–2, 2009.

AMERICAN LUNG ASSOCIATION. **What's in a Cigarette?** Disponível em: <<https://www.lung.org/quit-smoking/smoking-facts/whats-in-a-cigarette>>.

ANDREOLI, C. et al. Effects of cigarette smoking on circulating leukocytes and plasma cytokines in monozygotic twins. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 53, n. 1, p. 57–64, 2015.

ARAÚJO-JORGE, T. C. et al. Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental Coleta e Processamento de Órgãos e Tecidos para Avaliação da Infecção. In: FIOCRUZ (Ed.). . **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. [s.l.] Scielobooks, 2000. p. 368.

ARAÚJO, N. P. DA S. et al. Quercetin Attenuates Acute Lung Injury Caused by Cigarette Smoke Both In Vitro and In Vivo. **COPD: Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease**, v. 17, n. 2, p. 205–214, 2020.

ARAÚJO, N. P. DA S. et al. Quercetin Improves Pulmonary Function and Prevents Emphysema Caused by Exposure to Cigarette Smoke in Male Mice. **Antioxidants**, v. 11, n. 181, p. 1–13, 2022.

ARRAS, M. et al. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: Drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. **Comparative Medicine**, v. 51, n. 5, p. 443–456, 2001.

ATAMAS, S. P.; CHAPOVAL, S. P.; KEEGAN, A. D. Cytokines in chronic respiratory diseases. **F1000Prime Reports**, v. 5, n. February, p. 1–12, 2013.

AUDRAIN-MCGOVERN, J.; BENOWITZ, N. L. Cigarette smoking, nicotine, and

body weight. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 90, n. 1, p. 164–168, 2011.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, v. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.

BALLBÈ, M. et al. Cigarettes vs. e-cigarettes: Passive exposure at home measured by means of airborne marker and biomarkers. **Environmental Research**, v. 135, p. 76–80, 2014.

BARNES, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 3, p. 183–192, 2008.

BARNES, P. J. Targeting cytokines to treat asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, n. 7, p. 454–466, 2018.

BARREIRO, E. et al. Cigarette smoke-induced oxidative stress: A role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 182, n. 4, p. 477–488, 2010.

BEZERRA, F. S. et al. α -Tocopherol and ascorbic acid supplementation reduced acute lung inflammatory response by cigarette smoke in mouse. **Nutrition**, v. 22, n. 11–12, p. 1192–1201, 2006.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 71, n. May, p. 302–310, 1975.

BULLEN, C. Electronic Cigarettes for Smoking Cessation. **Current Cardiology Reports**, v. 16, n. 11, p. 1–8, 2014.

CAI, H.; WANG, C. Graphical review: The redox dark side of e-cigarettes; exposure to oxidants and public health concerns. **Redox Biology**, v. 13, n. May, p. 402–406, 2017.

CAMPOS, K. K. D. et al. Lycopene mitigates pulmonary emphysema induced by

cigarette smoke in a murine model. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 65, p. 93–100, 2019.

CARBONARI, K. A. Avaliação do potencial antioxidante (in vitro e in vivo) e antiinflamatório de ouratea parviflora, polymnia sonchifolia e marlierea obscura. 2005.

CHEN, T. et al. Protective Effect of Astragaloside IV Against Paraquat-Induced Lung Injury in Mice by Suppressing Rho Signaling. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 483–492, 2016.

CHIOLERO, A. et al. Consequences of smoking for body weight, body fat distribution, and insulin resistance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, n. 4, p. 801–809, 2008.

CHURG, A. et al. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, n. 5, p. 492–498, 2004.

COLLACO, J. M.; DRUMMOND, M. B.; MCGRATH-MORROW, S. A. Electronic cigarette use and exposure in the pediatric population. **JAMA Pediatrics**, v. 169, n. 2, p. 177–182, 2015.

DA SILVA, A. C. L. et al. Sigh maneuver protects healthy lungs during mechanical ventilation in adult Wistar rats. **Experimental Biology and Medicine**, v. 245, n. 15, p. 1404–1413, 2020.

DA SILVA, A. L. O.; MOREIRA, J. C. The ban of eletronic cigarettes in brazil: Success or failure? **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 24, n. 8, p. 3013–3024, 2019.

DE SOUZA, A. B. F. et al. Effects in vitro and in vivo of hesperidin administration in an experimental model of acute lung inflammation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 180, n. January, p. 253–262, 2022.

EATON, D. L.; KWAN, L. Y.; STRATTON, K. (EDS.). **Public Health Consequences of E-Cigarettes**. Washington (DC): [s.n.].

FISCHER, B. M.; VOYNOW, J. A.; GHIO, A. J. COPD: Balancing oxidants and antioxidants. **International Journal of COPD**, v. 10, p. 261–276, 2015.

FLOURIS, A. D. et al. Acute impact of active and passive electronic cigarette smoking on serum cotinine and lung function. **Inhalation Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 91–101, 2013.

FROESE, A. R. et al. Three-dimensional computed tomography imaging in an animal model of emphysema. **European Respiratory Journal**, v. 30, n. 6, p. 1082–1089, 2007.

GARCIA-ARCOS, I. et al. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. **Thorax**, v. 71, n. 12, p. 1119–1129, 2016.

GHORANI, V. et al. Experimental animal models for COPD: a methodological review. **Tobacco Induced Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2017.

GLOBAL INITIATIVE FOR CHRONIC OBSTRUCTIVE LUNG DISEASE. **Pocket guide to COPD diagnosis, management, and prevention: A guide for health care professionals**. [s.l.] Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, 2019.

GLYNOS, C. et al. Comparison of the effects of e-cigarette vapor with cigarette smoke on lung function and inflammation in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 315, n. 5, p. L662–L672, 2018.

GOTTS, J. E. et al. What are the respiratory effects of e-cigarettes? **The BMJ**, v. 366, p. 1–16, 2019.

GRANA, R.; BENOWITZ, N.; GLANTZ, S. A. Background paper on E-cigarettes (electronic nicotine delivery systems). **Center for Tobacco Control Research and Education, University of California, San Francisco, a WHO Collaborating Center on Tobacco Control. Prepared for World Health Organization Tobacco Free Initiative**, n. December, p. 1–109, 2013.

GRIPPI, M. A. et al. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. In: **Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 5e**. New York, NY: McGraw-Hill Education, 2015.

HORN, R. C. et al. Avaliação Dos Níveis De Estresse Oxidativo Em Pacientes Fumantes Crônicos. **Revista Contexto & Saúde**, v. 15, n. 29, p. 97–103, 2015.

HUSARI, A. et al. Acute Exposure to Electronic and Combustible Cigarette Aerosols: Effects in an Animal Model and in Human Alveolar Cells. **Nicotine and Tobacco Research**, v. 18, n. 5, p. 613–619, 2016.

INSTITUTO DE EFETIVIDADE CLÍNICA E SANITÁRIA. **A importância de aumentar os impostos do tabaco na Brasil**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.iecs.org.ar/tabaco>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-INCA. **Atlas de Mortalidade por Câncer - SIM**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-INCA. **Alerta do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA – sobre os Riscos dos Dispositivos Eletrônicos para Fumar (também conhecidos como cigarros eletrônicos)**Ministério da Saúde. [s.l: s.n.].

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER-INCA. **Doenças relacionadas ao tabagismo**. Disponível em: <[https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/doencas-relacionadas-ao-tabagismo#:~:text=O tabagismo ativo e a,e doenças cardiovasculares \(angina%2C infarto](https://www.inca.gov.br/observatorio-da-politica-nacional-de-controle-do-tabaco/doencas-relacionadas-ao-tabagismo#:~:text=O tabagismo ativo e a,e doenças cardiovasculares (angina%2C infarto)>. Acesso em: 10 jul. 2022.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA-INCA. **Tabaco e saúde pulmonar: dia mundial sem tabaco: manual 2019**. Instituto ed. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

JIANG, W. et al. Protective effect of chrysophanol on LPS/d-GalN-induced hepatic injury through the RIP140/NF-κB pathway. **RSC Advances**, v. 6, n. 44, p. 38192–38200, 2016.

KENNEDY-FEITOSA, E. et al. Eucalyptol promotes lung repair in mice following cigarette smoke-induced emphysema. **Phytomedicine**, v. 55, n. January 2018, p. 70–79, 2019.

KOZIMA, E. T. et al. Aluminum hydroxide nebulization-induced redox imbalance and acute lung inflammation in mice. **Experimental Lung Research**, v. 46, n. 3–4, p. 64–74, 2020.

KROMMIDAS, G. et al. Plasma leptin and adiponectin in COPD exacerbations: Associations with inflammatory biomarkers. **Respiratory Medicine**, v. 104, n. 1, p. 40–46, 2010.

KUMAR, A. et al. A 7-month inhalation toxicology study in C57BL/6 mice demonstrates reduced pulmonary inflammation and emphysematous changes following smoking cessation or switching to e-vapor products. **Toxicology Research and Application**, v. 5, p. 239784732199587, 2021.

LAGENTE, V. et al. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 10, p. 1521–1530, 2005.

LARCOMBE, A. N. et al. The effects of electronic cigarette aerosol exposure on inflammation and lung function in mice. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 313, n. 1, p. L67–L79, 2017.

LERNER, C. A. et al. Vapors produced by electronic cigarettes and E-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–26, 2015.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, n. C, p. 346–357, 1994.

MADISON, M. C. et al. Electronic cigarettes disrupt lung lipid homeostasis and innate immunity independent of nicotine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 10, p. 4290–4304, 2019.

MALENICA, M. et al. Effect of Cigarette Smoking on Haematological Parameters in Healthy Population. **Medical archives (Sarajevo, Bosnia and Herzegovina)**, v. 71, n. 2, p. 132–136, 2017.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 75, n. 4, p. 469–486, 2003.

MARCH, T. H. et al. Modulators of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema in A/J mice. **Toxicological Sciences**, v. 92, n. 2, p. 545–559, 2006.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARTINS, S. R. et al. **Cigarros eletrônicos: o que sabemos? Estudo sobre a composição do vapor e danos à saúde, o papel na redução de danos e no tratamento da dependência de nicotina**. [s.l.] Ministerio da Saúde, 2016.

MASCALCHI, M.; CAMICIOTTOLI, G.; DICIOTTI, S. Lung densitometry: Why, how and when. **Journal of Thoracic Disease**, v. 9, n. 9, p. 3319–3345, 2017.

MCGARRY HOUGHTON, A. Matrix metalloproteinases in destructive lung disease. **Matrix Biology**, v. 44–46, p. 167–174, 2015.

MCGRATH-MORROW, S. A. et al. The effects of electronic cigarette emissions on systemic cotinine levels, weight and postnatal lung growth in neonatal mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 2–11, 2015.

MCKENNA, L. A. J. **Electronic cigarette fires and explosions in the United States 2009-2016**. [s.l.: s.n.].

MEIRELLES, R. H. S. Tabagismo e DPOC-dependência e doença-fato consumado. Smoking and COPD-addiction and disease-real fact. **Pulmão RJ- Atualizações Temáticas**, v. 1, n. 1, p. 13–19, 2009.

MINEUR, Y. et al. Nicotine Decreases food intake through activation of POMC neurons. **Cellular and Molecular Neurophysiology: Fourth Edition**, v. 332, n. 6035, p. 1330–1332, 2011.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Doenças Respiratórias Crônicas**. [s.l.] Ministerio da Saúde, 2010.

MO, Y. et al. miR-21 mediates nickel nanoparticle-induced pulmonary injury and fibrosis. **Nanotoxicology**, v. 14, n. 9, p. 1175–1197, 2020.

MORISSETTE, M. C. et al. Impact of cigarette smoke on the human and mouse

lungs: A gene-expression comparison study. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–11, 2014.

MÜNDEL, T. et al. Effects of tobacco cigarettes, e-cigarettes, and waterpipe smoking on endothelial function and clinical outcomes. **European Heart Journal**, v. 41, n. 41, p. 4057–4070, 2020.

MURO, S. et al. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 108, n. 6, p. 970–975, 2001.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE OPAS/OMS. **Fatores de risco para doenças crônicas não transmissíveis nas Américas: Considerações sobre o fortalecimento da capacidade regulatória. Documento de Referência Técnica REGULA**. [s.l.] Organização Pan-Americana da Saúde, 2016, 2016.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE OPAS/OMS. **Folha informativa - Tabaco**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5641:folha-informativa-tabaco&Itemid=1097>. Acesso em: 25 set. 2020.

PEDREIRA, P. R. et al. Inflammatory response and apoptosis in acute pulmonary injury. **Medicina Intensiva**, v. 30, n. 6, p. 268–275, 2006.

PINHO-RIBEIRO, V. et al. Atorvastatin and Simvastatin Promoted Mouse Lung Repair After Cigarette Smoke-Induced Emphysema. **Inflammation**, v. 40, n. 3, p. 965–979, 2017.

POLOSA, R. et al. Effectiveness and tolerability of electronic cigarette in real-life: A 24-month prospective observational study. **Internal and Emergency Medicine**, v. 9, n. 5, p. 537–546, 2014.

PONZONI, L. et al. Different physiological and behavioural effects of e-cigarette vapour and cigarette smoke in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 10, p. 1775–1786, 2015.

QIU, X. et al. Hydrogen inhalation ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 12, p. 2130–2137, 2011.

REZNICK, A. Z.; PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 357–363, 1994.

RODRIGUES, K. K. D. C. **Efeitos do licopeno in vitro e in vivo sobre o desequilíbrio redox e a inflamação pulmonar induzida pela exposição à fumaça de cigarro** **Efeitos do licopeno in vitro e in vivo sobre o desequilíbrio redox e a inflamação pulmonar induzida pela exposição à fum.** [s.l: s.n.].

RODRIGUES, S. DE O. et al. Mechanisms, pathophysiology and currently proposed treatments of chronic obstructive pulmonary disease. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 10, 2021.

RUWANPURA, S. M. et al. Interleukin-6 promotes pulmonary emphysema associated with apoptosis in mice. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 45, n. 4, p. 720–730, 2011.

SANTOS, A. A. DOS et al. Expressão das metaloproteinases da matriz 2 e 9 na saliva de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 16, n. 4, p. 299–305, 2009.

SANTOS, E. W. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 2, p. 138–145, 2016.

SCHERLE, W. A simple methods for volumetry of organs in quantitative stereology. **Mikroskopie**, v. 26, p. 57–60, 1970.

SCHWARTZ, J.; WEISS, S. T. Cigarette smoking and peripheral blood leukocyte differentials. **Annals of Epidemiology**, v. 4, n. 3, p. 236–242, 1994.

SCHWEITZER, K. S. et al. Endothelial disruptive proinflammatory effects of nicotine and e-cigarette vapor exposures. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 309, n. 2, p. L175–L187, 2015.

SEAGRAVE, J. C. et al. Effects of cigarette smoke exposure and cessation on inflammatory cells and matrix metalloproteinase activity in mice. **Experimental**

Lung Research, v. 30, n. 1, p. 1–15, 2004.

SELVENDIRAN, K.; PRINCE VIJEYA SINGH, J.; SAKTHISEKARAN, D. In vivo effect of piperine on serum and tissue glycoprotein levels in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in Swiss albino mice. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 107–111, 2006.

SIEGEL, D. A. et al. Update: Interim guidance for health care providers evaluating and caring for patients with suspected e-cigarette, or vaping, product use associated lung injury — United States, October 2019. **American Journal of Transplantation**, v. 19, n. 12, p. 3420–3428, 2019.

SMITH, C. J. et al. Leukocytosis and Tobacco Use: An Observational Study of Asymptomatic Leukocytosis. **American Journal of Medicine**, v. 134, n. 1, p. e31–e35, 2021.

SMITH, D. et al. Adult behavior in male mice exposed to E-cigarette nicotine vapors during late prenatal and early postnatal life. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–14, 2015.

SOPORI, M. Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:372–377. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. May, p. 372–377, 2002.

SUSSAN, T. E. et al. Exposure to electronic cigarettes impairs pulmonary anti-bacterial and anti-viral defenses in a mouse model. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–15, 2015.

SZAFRAN, B. N. et al. Electronic-cigarette vehicles and flavoring affect lung function and immune responses in a murine model. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 17, p. 1–22, 2020.

TANTISUWAT, A.; THAVEERATITHAM, P. Effects of smoking on chest expansion, lung function, and respiratory muscle strength of youths. *J Phys Ther Sci*. 2014;26(2):167-170. doi:10.1589/jpts.26.167smoking on chest expansion, lung function, and respi. **Journal of Physical Therapy Science**, v. 26, n. 2, p. 167–70, 2014.

THOM, S. R. Carbon Monoxide Transport and Actions in Blood and Tissues.

Comprehensive Physiology, v. 1, n. January, p. 421–446, 2011.

TØNNESEN, P. et al. Smoking cessation in patients with respiratory diseases: A high priority, integral component of therapy. **European Respiratory Journal**, v. 29, n. 2, p. 390–417, 2007.

TSAI, M. C. et al. Effects of e-cigarettes and vaping devices on cardiac and pulmonary physiology. **Journal of Physiology**, v. 598, n. 22, p. 5039–5062, 2020.

TUDER, R. M.; YUN, J. H. It takes two to tango: Cigarette smoke partners with viruses to promote emphysema. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 8, p. 2689–2693, 2008.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN. The health consequences of smoking-50 years of progress: a report of the Surgeon General. **Medical Clinics of North America**, v. 76, n. 2, p. 305–331, 2014.

VALENÇA, S. S. et al. Emphysema and Metalloelastase Expression in Mouse Lung Induced by Cigarette Smoke. **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 3, p. 351–356, 2004.

VAN DEN BERGE, M. et al. Differential lung tissue gene expression in males and females: Implications for the susceptibility to develop COPD. **European Respiratory Journal**, v. 54, n. 1, 2019.

VAN EEDEN, S. F.; HOGG, J. C. The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking myeloperoxidase neutrophils polymorphonuclear leukocytes. **Eur Respir J**, v. 15, p. 915–921, 2000.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas : revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Immunopatologia**, v. 24, p. 146–154, 2001.

WAN, R. et al. Cobalt nanoparticles induce lung injury, DNA damage and mutations in mice. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 1–15, 2017.

WANG, Q. et al. Dysregulated repair and inflammatory responses by e-cigarette-derived inhaled nicotine and humectant propylene glycol in a sex-dependent manner in mouse lung. **FASEB BioAdvances**, v. 1, n. 10, p. 609–623, 2019a.

WANG, Q. et al. Dysregulated repair and inflammatory responses by e-cigarette-derived inhaled nicotine and humectant propylene glycol in a sex-dependent manner in mouse lung. **FASEB BioAdvances**, v. 1, n. 10, p. 609–623, 2019b.

WINSLØW, U. C.; RODE, L.; NORDESTGAARD, B. G. High tobacco consumption lowers body weight: A Mendelian randomization study of the Copenhagen General Population Study. **International Journal of Epidemiology**, v. 44, n. 2, p. 540–550, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on the global tobacco epidemic, 2021: 1: addressing new and emerging products**. [s.l: s.n.].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11)**. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse11/l-m/en>>.

WRIGHT, JOANNE L.; CHURG, A. Animal models of Cigarette Smoke-Induced COPD. **CHEST**, v. 122, n. 6, p. 301S-306S, 2002.

YOSHIDA, T.; TUDER, R. M. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 1047–1082, 2007.

ZONZIN, G. A.; CLEMENTE, RENA SIMÕES GERAIDINE; CORREIA, J. V.; SILVEIRA, JULIO CEZAR DIAS FERENZINI; COSTA, A. F. DA. O que é importante para o diagnóstico da DPOC? **Pulmão RJ**, v. 26, n. 1, p. 5–14, 2017.

ZUREK, M. et al. Assessing the relationship between lung density and function with oxygen-enhanced magnetic resonance imaging in a mouse model of emphysema. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–14, 2016.

ANEXOS

Anexo I. Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no uso de animais da UFOP



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos da exposição ao aerossol de cigarro eletrônico em camundongos adultos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 3287111120 (000048), sob a responsabilidade de **Frank Silva Bezerra** e equipe; *Andrea Jazel Rodríguez Herrera* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 11/12/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects to exposure of electronic cigarette aerosol in adult C57BL/6 mice.", utilizing 66 Isogenics mice (males and females), protocol number CEUA 3287111120 (000048), under the responsibility of **Frank Silva Bezerra** and team; *Andrea Jazel Rodríguez Herrera* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 12/11/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 02/2021 a 02/2023 Área: Ciências Biológicas

Origem: Centro de Ciência Animal
Espécie: Camundongos isogênicos sexo: Machos e Fêmeas idade: 6 a 8 semanas N: 66
Linhagem: C57BL/6 Peso: 20 a 25 g

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto e no Laboratório de Fisiopatologia Experimental do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Sala 53, ICEB 2 - Telefone: (31) 3559-1216

Ouro Preto, 11 de dezembro de 2020

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Anexo II. Certificado de apresentação em congressos



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Diretoria de Relações Internacionais

Certificamos que o trabalho AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO AEROSSOL DE CIGARRO ELETRÔNICO EM CAMUNDONGOS ADULTOS C57BL/6, de autoria de ANDREA JAZEL RODRIGUEZ HERRERA, FRANK SILVA BEZERRA, THALLES DE FREITAS CASTRO, MICHEL ANGELO DAS GRAÇAS SILVA OLIVEIRA, ANA BEATRIZ FARIAS DE SOUZA e PEDRO ALVES MACHADO JUNIOR, foi apresentado no VI MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 29 de Novembro a 05 de Dezembro de 2021.

Ouro Preto, 03 de Dezembro de 2021.

Autenticidade



Código: 163967123561bb65c353e36

Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knupp
Pró-Reitor de Extensão e Cultura

Prof.ª Dr.ª Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação

Rosalí Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Jacqueline Pinheiro Schultz
Diretora de Relações Internacionais

Natália de Souza Lisboa
Pró-reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

