

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO CIGARRO DE PALHA ARTESANAL E CIGARRO INDUSTRIAL SOBRE MÚSCULO DIAFRAGMA DE CAMUNDONGOS SWISS

Evaluation of the toxicity of the cornhusk cigarette and industrial cigarette on muscle diaphragm of swiss mice

Giulia Piaia Quissini¹; Fernanda Dal'Maso Camera²; Silvane Souza Roman³; Ana Cristina Roginski⁴; Elvis Wisniewski²; Miriam Salete Wilk Wisniewski²; Paulo Cesar Lock Silveira⁵; Ricardo Aurino de Pinho⁶.

¹ Egressa do Curso de Fisioterapia URI Erechim. E-mail: giulia_quissini@yahoo.com.br

² Fisioterapeuta, Doutora Docente URI Erechim. E-mail: ferdalmaso@hotmail.com

³ Bióloga, Doutora, Docente da URI Erechim. E-mail: roman@uri.com.br

⁴ Acadêmica do Curso de Farmácia da URI Erechim. E-mail: ana_roginski@hotmail.com

⁵ Fisioterapeuta, Doutor, Docente da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) - Criciúma. E-mail: psilveira@unesc.net

⁶ Educador Físico, Doutor, Docente da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) - Criciúma. E-mail: rap@unesc.net

Data do recebimento: 22/08/2017 - Data do aceite: 30/09/2017

RESUMO: O cigarro de palha artesanal é um tipo de tabaco que predomina nas áreas rurais. Sabe-se dos malefícios causados pelo cigarro industrial, porém não há dados na literatura sobre os efeitos tóxicos do cigarro de palha artesanal no músculo diafragma. Teve-se como objetivos avaliar a toxicidade do cigarro de palha artesanal e cigarro industrial no músculo diafragma de camundongos Swiss. Estudo do tipo experimental. Foram utilizados 30 camundongos Swiss, machos e os grupos foram distribuídos em (GC= 10), cigarro industrial (CI=10) e cigarro de palha artesanal (CPA=10). Os grupos CPA e CI foram expostos a 4 cigarros/sessão, 3x/dia, durante 30 dias. No 31º dia, os animais foram eutanasiados para extração do músculo diafragma e posterior análise histológica e de peroxidação lipídica. Não verificou-se atrofia do músculo diafragma nem inflamação nos grupos (CPA) e (CI), quando comparados ao grupo (GC), entretanto observou-se uma desestruturação da fibra e presença de edema citoplasmático nos grupos experimentais. Também

observou-se nos grupos (CPA) e (CI) um aumento significativo na peroxidação lipídica ($p < 0,02$). Concluiu-se que tanto o cigarro de palha artesanal quanto o cigarro industrial foram capazes de causar alterações morfológicas e dano oxidativo no músculo diafragma camundongos Swiss.

Palavras-chave: Tabagismo. Diafragma. Histologia. Substâncias Reativas com Ácido Tiobarbitúrico

Abstract: The craft cornhusk cigarette is a type of tobacco that predominates in rural areas. It is known that the malfunctions caused by the industrial cigarette, but there is no data in the literature about the toxic effects of the craft cornhusk cigarette in the diaphragm muscle. To analyze the toxicity of the craft cornhusk cigarette and industrial cigarette in the diaphragm muscle of Swiss mice. Experimental study. Thirty Swiss male mice were used and the groups were distributed in (GC = 10), industrial cigarette (CI = 10) and (CCC) craft cornhusk cigarette (CC= 10). The CCC and IC groups were exposed to 4 cigarettes / session, 3x / day, for 30 days. On the 31st day, the animals were euthanized for extraction of the diaphragm muscle and subsequent histological and peroxidation of membrane lipids analyzes. There was no diaphragmatic muscle atrophy or inflammation in the groups (CCC) and (CI), when compared to the group (CG). However, there was a disintegration of the fiber and presence of cytoplasmic edema in the experimental groups. Besides, the groups (CCC) and (CI) showed a significant increase in lipid peroxidation ($p < 0.02$). It was concluded that both the craft cornhusk cigarette and the industrial cigarette were able to cause morphological changes and oxidative damage in the diaphragm muscle Swiss mice.

Keywords: Smoking. Diaphragm. Histology. Thiobarbituric Acid Reactive Substances

Introdução

O tabagismo é considerado um importante problema de saúde pública, devido à alta prevalência de fumantes, além da mortalidade causada pelas doenças relacionadas ao tabaco. (SANTORO; JAMNIK, 2010).

Há em torno de 1,3 milhões de usuários de tabaco no mundo. Mais de 14.500 mortes por dia são atribuídas ao seu uso, além do fato que muitas pessoas adoecem em sua consequência. A Organização Mundial da Saúde projetou para o ano de 2030 as mortes

secundárias relacionadas ao tabaco, estas estarão na ordem de 3 milhões/por ano em países industrializados e de 7 milhões/por ano em países em desenvolvimento. (SANTORO; JAMNIK, 2010).

De acordo com Pasupathi et al. (2006), o cigarro é considerado o modo mais prevalente nos hábitos sociais, sendo praticado em todo o mundo. Ainda, de acordo com os autores, o tabaco pode ser utilizado de várias maneiras, sendo este consumido pelos usuários na forma de cigarro de palha, cigarro industrial, charutos ou cigarrilhas. Os cigarros indus-

trializados são a forma mais comumente utilizada no mundo e foram responsáveis por 85% de todo o tabaco consumido no Brasil em 2000. (IBGE, 2010).

O cigarro de palha é conhecido pela população por ser um cigarro artesanal, sendo confeccionado pelo próprio usuário. É composto basicamente por um punhado de fumo de corda picado, envolto por uma palha de milho. Este tipo de cigarro está muito presente na região brasileira, desde a região norte a sul, com predomínio nas zonas rurais. (VIEGAS, 2008; SEPLAG, 2013). O cigarro de palha vem ganhando cada vez mais popularidade pela falsa ideia de que são menos danosos do que o cigarro comum, no entanto, têm mais nicotina e monóxido de carbono. (OLIVEIRA, 2010).

De acordo com Oliveira (2010), nas áreas rurais do Brasil, os cigarros de palha ou enrolados à mão são consumidos com maior prevalência em comparação com as áreas urbanas, com maior prevalência sob o sexo masculino (17%).

O diafragma é o principal músculo da respiração, apresenta-se em forma de cúpula e está inserido nas costelas inferiores, sendo encontrado apenas nos mamíferos. É um músculo estriado esquelético, composto por 58,9% de fibras do tipo I e por 41,1% de fibras do tipo II, sendo as fibras do tipo I de contração lenta e altamente resistentes à fadiga e as fibras do tipo II, de contração rápida e altamente fadigáveis. (NETTER, 2014; LESSA et al., 2012).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo alguns radicais livres derivados do oxigênio. Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO ou a redução da disponibilidade de antioxidantes, podendo-se citar a nutrição inadequada e a permanência dos

animais em condições de estresse. (ANDRADE et al., 2010).

A lesão muscular caracteriza-se pelo rompimento dos miofilamentos, anormalidade mitocondrial e do retículo sarcoplasmático, desequilíbrio hidroeletrolítico, necrose celular, reparo e produção de tecido fibroso. (TIDBALL, 1995; SVERZUT; CHIMELLI, 1999; PRISK; HUARD, 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do cigarro de palha artesanal e cigarro industrial no músculo diafragma de camundongos Swiss.

Material e Métodos

Este estudo caracterizou-se por ser do tipo experimental. A amostra foi composta por 30 camundongos jovens da linhagem Swiss, com 60 dias de idade e uma média de peso de 32,5 gramas, oriundos do Laboratório de Experimentação Animal da URI – Campus de Erechim.

Os animais foram acondicionados em caixas separadas, sob condições de temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e um ciclo de 12h claro/12h escuro, com acesso à água e alimentação à vontade. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos, contendo 10 animais cada: grupo controle (GC= 10), cigarro de palha artesanal (CPA= 10) e cigarro industrial (CI= 10).

Os animais dos grupos (CI) e (CPA), foram expostos aos cigarros em caixas e salas separadas, 3 x/dia, 7 dias/semana, durante 30 dias. O grupo de animais (CI) foi submetido à inalação do cigarro industrial da marca Marlboro Red e o grupo de animais (CPA) foram expostos à inalação do cigarro de palha artesanal. O grupo controle (GC) foi manipulado igualmente, porém sem a exposição da inalação da fumaça, permanecendo na caixa em temperatura ambiente. Todos os cigarros

de palha artesanal foram confeccionados pela pesquisadora. O cigarro industrial foi adquirido em uma tabacaria da cidade de Erechim.

Os animais foram expostos a quatro cigarros (CI) e (CPA) por sessão, totalizando 12 cigarros. Os animais foram alocados em uma câmara de inalação para roedores dentro de uma capela de exaustão. O cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60ml para captação da fumaça que era imediatamente expelida dentro da caixa. Os animais foram mantidos expostos à fumaça do cigarro durante 6 minutos, após a tampa da caixa de inalação era removida, o exaustor da capela ligado e a fumaça liberada durante 1 minuto. Os animais então eram novamente expostos à nova inalação da fumaça de um próximo cigarro. O grupo controle (GC) foi mantido em uma sala separada sob as mesmas condições, durante o mesmo período em ar ambiente, sem ser submetido à fumaça de cigarro.

No trigésimo primeiro dia, os animais foram anestesiados com Zoletil® 50 e submetidos à laparotomia para retirada do músculo diafragma e posterior análise histológica e bioquímica.

Para análise histológica, foi retirado o diafragma de cada animal e colocado em solução de formalina 10%, onde permaneceu até análise histológica. A confecção das lâminas foram realizadas pela técnica em parafina com cortes de 4mm de espessura e, posteriormente, colocados em lâminas previamente revestidas com albumina glicérica desparafinizadas, para posterior avaliação em microscopia de luz. Após, foram submetidas à coloração pelo método de Hematoxilina e Eosina.

A análise bioquímica foi realizada através do TBARS por espectrofotometria, no comprimento de onda de 532 nm. O músculo diafragma foi armazenado imediatamente após a coleta em eppendorfs e congelados em

freezer -80 C. Para cada análise individual, foram utilizadas 150 uL de homogeneizado de diafragma (análises em duplicata). O diafragma foi homogeneizado na proporção 1:10 (peso/volume) em tampão específico. O nível de TBARS foi normalizado em relação à quantidade de proteínas das amostras, uma vez que os resultados são expressos em nmol/mg de proteínas. O protocolo utilizado foi baseado na metodologia de Esterbauer e Cheeseman (1990). A análise estatística utilizada foi análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do teste post-hoc de Tukey. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. As análises foram realizadas mediante o programa SPSS. Foi considerado diferença significativa quando o ($p < 0,05$).

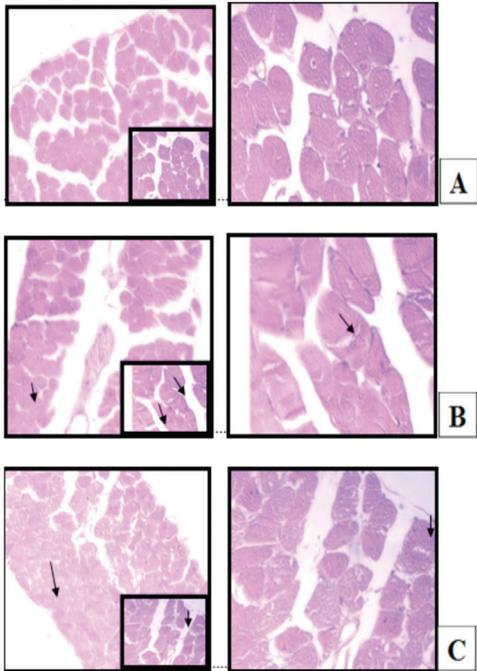
A realização do projeto esteve de acordo com as normas dos Princípios Éticos de Experimentação Animal, estabelecido pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL), pela Lei nº 11.794, de outubro de 2008 (LEI ARROUCA) e pela Resolução CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. Este estudo foi aprovado pelo CEUA da URI Erechim em 10 março de 2010.

Resultados

A análise histológica do músculo diafragma foi realizada de forma qualitativa e verificou-se que o (GC) apresentou morfologia normal, com presença de vários núcleos periféricos, bem como presença de endomísio e perimísio da célula.

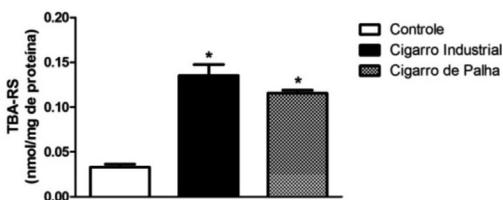
Ao avaliar as lâminas histológicas do músculo diafragma, não se observou atrofia muscular e inflamação nos grupos expostos aos (CPA) e (CI), quando comparados ao grupo (GC). Entretanto, verificou-se uma desestruturação da fibra muscular e presença de edema citoplasmático em ambos os grupos expostos aos cigarros, sendo estas alterações visíveis em algumas fibras, conforme Figura 1.

Figura 1- Fotomicrografia do músculo diafragma de camundongos machos, com detalhe à direita **A)** Grupo Controle (GC); **B)** Cigarro Industrial (CI) e **C)** Cigarro de Palha Artesanal (CPA) Observou-se a desestruturação da fibra muscular com presença de edema citoplasmático nas figuras B e C. H.E. 10x e 25x, respectivamente.



Em relação às Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) no músculo diafragma, observou-se que tanto o (CPA) quanto o (CI) causaram aumento significativo na peroxidação lipídica ($p < 0,02$), quando comparados ao grupo (GC), demonstrando assim, que ambos os cigarros causaram dano oxidativo significativo no músculo diafragma, conforme Figura 2.

Figura 2 - Níveis de TBARS no músculo diafragma, expressos em média e erro padrão médio. Grupo Controle (GC), Cigarro Industrial (CI) e Cigarro de Palha Artesanal (CPA). $*(p < 0,02)$ (CI) e (CPA) em relação ao (GC).



Discussão

Em estudo realizado por Lessa et al. (2012), foi verificado que a morfologia do músculo diafragma de mamíferos apresenta-se com feixes de fibras alongadas, com a extremidade arredondada, sendo esta multinucleada, com núcleos ovais situados na periferia da célula, denominando, assim, a morfologia normal do músculo, o que pode, também, ser visto em nosso estudo, conforme o grupo controle.

Camargo Filho et al. (2011) analisaram as adaptações na musculatura esquelética causadas pela exposição à fumaça do cigarro industrial em 32 ratos, durante 15 dias e verificaram que os animais submetidos à fumaça de cigarro apresentaram maior incidência de atrofia das fibras oxidativas tipo II, fagocitose e necrose muscular, alterando, assim, o padrão oxidativo do músculo. Ainda, sabe-se que estas alterações na fibra muscular ocorrem quando há baixo fornecimento de oxigênio ao organismo e o tecido muscular responde na tentativa de se adaptar e, portanto, sofre algumas alterações histológicas significativas. Dessa forma, o autor relata que o consumo de cigarro causa diminuição da massa muscular esquelética na secção transversa das fibras oxidativas, além de reduzir a resistência à fadiga de indivíduos tabagistas, influenciando negativamente na qualidade de vida dos usuários.

De acordo com Halliwell (2001), em organismos vivos, os níveis de radicais livres e outras espécies reativas são controlados por uma complexa teia de defesas antioxidantes, que minimizam, mas não previnem completamente o dano oxidativo das biomoléculas. Nas doenças humanas, esse desequilíbrio entre oxidante e antioxidante é inclinado em favor das espécies reativas, de modo que os níveis de dano oxidativo aumentem.

Portão de Carlos et al. (2014), afirmam que o dano oxidativo gerado pela exposição à fumaça do cigarro no músculo esquelético pode levar à perda de força muscular e maior suscetibilidade à fadiga. O estudo fornece evidências de alterações oxidativas induzidas pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) nas proteínas do músculo diafragma em animais cronicamente expostos à fumaça do cigarro, vindo de encontro com o resultado deste estudo, pois apesar de ser uma exposição subaguda, causou aumento dos níveis do TBARS dos animais expostos a ambos os cigarros.

O mesmo autor (2011) investigou a inflamação e o estresse oxidativo no sistema musculoesquelético de ratos expostos à fumaça de cigarro em diferentes períodos de exposição e verificou resultados semelhantes ao deste estudo quando verificou aumento no TBARS no músculo quadríceps ($p < 0,01$). Segundo o autor, o dano oxidativo ocorre primeiro no músculo esquelético e, posteriormente, no sistema pulmonar.

Em um estudo realizado por Portão de Carlos (2014), verificou-se que o dano oxi-

dativo induzido pela fumaça do cigarro durante 30 e 45 dias causa alterações tanto nos pulmões quanto no diafragma e foi suficiente para gerar maiores níveis de dano oxidativo no músculo diafragma. Ainda, o autor relata alterações histológicas significativas como aumento do número de macrófagos e neutrófilos no tecido pulmonar do grupo exposto à fumaça do cigarro durante 7 dias de exposição, o que pode ser demonstrado, também, por Ferrari et al. (2005), que a fase inflamatória aguda inicia-se nos primeiros 7 dias de exposição e consiste em um infiltrado de células inflamatórias, demonstrando, assim, um início do processo inflamatório causado pela exposição ao cigarro.

Conclusão

Concluiu-se que tanto o cigarro de palha artesanal quanto o cigarro industrial foram capazes de causar alterações morfológicas e dano oxidativo no músculo diafragma camundongos Swiss.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.
- CAMARGO FILHO, J. C. S. C. et al. Efeitos do exercício aeróbico no músculo esquelético de ratos expostos a fumaça do cigarro. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 6, p. 416-419, 2011.
- ESTERBAUER H, CHEESEMAN KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- FERRARI, R. J. et al. Processo de regeneração na lesão muscular: uma revisão. **Fisioterapia em Movimento**, v. 18, n. 2, p. 63-71, 2005.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD). Tabagismo, 2010. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2008/suplementos/tabagismo/pnad-tabagismo.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2014.

- HALLIWELL, B. Free Radical in Biology and Medicine. **Oxford**: University Press. p. 525-540, 2001.
- LESSA T.B, et al. Descrição morfológica do diafragma do sagui-de-tufo-branco e do sagui-de-cara-branca. **Biotemas**, v. 25, n. 1 p. 119-124, 2012.
- Netter F.H. Atlas de Anatomia Humana. 6. ed. p. 345-348, 2014.
- OLIVEIRA, M. V. C. Tabagismo e a Mulher. **Pneumologia Paulista**, v. 23, n.9, p. 1-11, 2010.
- PASUPATHI, T., et al. Cigarette smoke induces cellular senescence. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, n. 35, v. 6, p. 681-688, 2006.
- PRISK, V.; HUARD, J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. **Histology and Histopathology**, v.18, p. 1243-1256, 2003.
- PORTÃO DE CARLOS, S. et al Oxidative damage induced by cigarette smoke exposure in mice: impact on lung tissue and diaphragm muscle. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 40, n. 4, p. 1-34, 2014.
- SANTORO, I. L.; JAMNIK, S. Tabaco e Câncer. **Pneumologia Paulista**, v. 23, n. 9, p. 1-13, 2010.
- SEPLAG. Secretaria de Planejamento, Gestão e Participação Cidadã. **Atlas Socioeconômico Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS, 2013. Acesso em 20 agosto de 2013. Disponível em: http://www.scp.rs.gov.br/atlas/conteudo.asp?cod_menu_filho=791&cod_menu=790&tipo_menu=APRESENTACAO&cod_conteudo=1328. Acesso em: 25 set. 2014.
- SVERZUT, A. C. M.; CHIMELLI, L. O papel das células satélites nas respostas adaptativas do tecido muscular esquelético. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 6, n. 2, p. 132-139, 1999.
- TIDBALL, J.G. Inflammatory cell response to acute muscle injury. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 27, n. 7, p. 1022-1032, 1995.
- VIEGAS, C. A. A. Formas não habituais de uso do tabaco. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34 n. 12, p. 1069-1073, 2008.

