Rosangela Novo

Influência da Exposição à Fumaça de Cigarro e da Suplementação da Dieta com β-Caroteno sobre a Comunicação Intercelular em Cardiomiócitos de Ratos

Tese Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina – Unesp, Campus de Botucatu, como Requisito para Obtenção do Título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva
Co-Orientador: Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Botucatu
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Novo, Rosangela.

Influência à exposição à fumaça de cigarro e da suplementação da dieta com β-caroteno sobra a comunicação intercelular em cardiomiócitos de ratos / Rosangela Novo. – 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva

Assunto CAPES: 50102010

1. Fisiopatologia. 2. Cigarros. 3. Fumo - Efeito fisiológico.

CDD 616.07

Palavras-chave: β-caroteno; Comunicação intercelular; Conexina 43, Efeito do paradoxal do fumo; Exposição à fumaça de cigarro.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original.

Albert Eistein

Dedicatória

A minha família, pelo apoio na realização de todos os meus objetivos.

Agradecimentos

A Deus...

Por se fazer presente em minha vida em todos os momentos, de modo especial naqueles em que as dificuldades surgiram em meu caminho, permitindo-me superá-las.

Ao meu Orientador...

Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp de Paiva, pela constante orientação no decorrer dessa pesquisa e por me proporcionar valiosa oportunidade de aprendizado e amadurecimento profissional.

Muito Obrigada!

Ao co-orientador...

Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff, pelo auxílio prestado nos trabalhos realizados durante o doutorado.

Aos professores Maeli Dal Pai Silva e Sérgio Felisbin, do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da Unesp/Botucatu pelo auxílio prestado nos experimentos de imunohistoquímica.

Ao Departamento de anatomia e a Faculdade de Medicina Veterinária, da Unesp/Botucatu pela utilização dos equipamentos necessários á realização dos experimentos de Imunohistoquímica.

A minha família, pelo apoio e encorajamento que contribuíram para realização desse trabalho.

A amiga de laboratório Cristiana Maria Murbach Freire pela colaboração na realização dos experimentos.

A Camila Renata Corrêa-Camacho pelo auxílio técnico durante o doutorado.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Clínica Médica: Corina Julieta Correa, Elenize Jamas Pereira, José Carlos Georgette, Mário Bruno, Sandra Fabio, Vitor, Sueli Clrara, pelo auxílio técnico na realização dessa pesquisa.

A todos os pós-graduandos do Centro de Pesquisas Experimentais, pela amizade e convivência agradável no decorrer de todo o período da pós-graduação.

1. Sumário

Introdução 13

Objetivo.....23

Material e Métodos.....25

Resultados.....38

Discussão.....59

Conclusão.....66

Referências.....68

Resumo.....77

Abstract.....80

Introdução

2. Introdução

2.1. Doenças do Sistema Cardiovascular

As doenças do aparelho circulatório estão em primeiro lugar entre as causas de morte no Brasil, correspondendo a 31,50% (quase um terço de todas as causas) e em todas as regiões. Afetadas por doenças circulatórias, mais de um milhão de pessoas são internadas anualmente no país (Datasus 2005). Dentro do grupo das doenças circulatórias, o infarto do miocárdio é uma das patologias com maiores índices de mortalidade (Caramelli, 2001).

A associação entre o hábito de fumar e a doença arterial coronariana é universalmente aceita. Dessa forma, o tabagismo exerce influência na prevalência de infarto do miocárdio por meio de diversos mecanismos, como trombose, aterosclerose, agregação plaquetária, vasoconstrição, indução de hipóxia e arritmias (Smith & Fischer, 2001; Ambrose & Barua, 2004).

Entretanto, tem sido descrito a existência de efeito paradoxal do fumo, correspondente à redução da mortalidade de fumantes após infarto agudo do miocárdio, quando comparado a não fumantes (Zornoff et al., 2002; Ruiz-Bailen 2004; Katayama et al., 2006). A proteção proveniente da exposição à fumaça de cigarro pode ser conseqüência do precondicionamento induzido pelo fumo (Birbaumm et al., 1996).

O precondicionamento corresponde ao fenômeno cardioprotetor por meio do qual um ou mais episódios breves de isquemia limitam o tamanho do infarto ou reduzem a ocorrência de

arritmias, causados por subseqüente insulto isquêmico sustentado (Yellon & Downey, 2003; Schulz & Heusch, 2004;).

2.2. Exposição à Fumaça de Cigarro

2.2.1. Estresse Oxidativo

O cigarro contém uma mistura complexa de mais de 4700 constituintes identificados, sendo considerado fonte rica de radicais livres como espécies reativas de oxigênio. Convencionalmente, o cigarro é dividido em duas partes: a fase particulada, cujos radicais livres

compreendem semiquinonas relativamente estáveis, nicotina, anabatina, fenol, catecol, hidroquina, entre outros componentes e a fase gasosa, onde existem radicais livres de vida curta como óxido de nitrogênio, espécies reativas de oxigênio, aldeídos, além de monóxido de carbono, produzido pela queima do cigarro (Smith & Fischer, 2001; Ambrose & Barua, 2004; Muscat et al., 2004).

Evidências sugerem que os radicais livres do cigarro contribuem para os efeitos adversos do fumo à saúde e de modo especial ao coração (Church & Pryor, 1985; Sandhir et al., 2003; Ambrose & Barua, 2004). Os radicais livres induzem danos funcionais e estruturais aos miócitos cardíacos e podem ter participação importante nas síndromes coronarianas agudas e na insuficiência cardíaca (Kinugawa et al., 2000; Siwik et al., 2001; Shiomi et al. 2004), situações nas quais alterações no sistema redox do organismo estão presentes (Li et al., 2003).

2.2.2. Remodelação Cardíaca

O processo de remodelação cardíaca é definido como o conjunto de alterações no tamanho, composição, massa, geometria e função cardíaca que ocorre em resposta a agressão miocárdica ou às alterações nas condições de carga (Pfeffer et al.,1985; Conh et al., 2000). Uma das características mais marcantes da remodelação é que o processo resulta invariavelmente em queda progressiva da função ventricular. Primeiramente, em conseqüência do crescimento celular, a remodelação pode contribuir para manter ou restaurar a função cardíaca.

Cronicamente, entretanto, ocorrem alterações bioquímicas, genéticas e estruturais que irão resultar em disfunção ventricular progressiva (Pfeffer et al.,1985; Conh et al., 2000).

Diversos estudos realizados em nosso laboratório têm analisado os efeitos cardíacos da exposição à fumaça de cigarro. Em um desses trabalhos, a exposição ao fumo por 30 dias causou depressão da função sistólica do ventrículo esquerdo, avaliada por ecocardiograma (Paiva et al., 2003). Em outro estudo, a fumaça de cigarro induziu aumento dos ventrículos esquerdo e direito, além de causar alterações ultraestruturais no coração de ratos

(Zornoff et al., 2006a). Outro efeito da exposição ao fumo observado foi a intensificação da emodelação ventricular após o infarto do miocárdio, caracterizada por aumento da área dos miócitos e depressão da função diastólica (Zornoff et al., 2006 b). Esses estudos mostram ação direta da fumaça de cigarro sobre o coração, resultando em remodelação ventricular, caracterizada por alterações cardíacas tanto morfológicas como funcionais.

2.2.2.1. Comunicação Intercelular

Outra alteração característica da remodelação cardíaca é a remodelação das junções comunicantes com conseqüente alteração na comunicação intercelular dos cardiomiócitos. Diversos estudos mostram ocorrência de remodelamento na distribuição das junções comunicantes bem como remodelamento na expressão de suas proteínas constituintes, as conexinas 43 (Cx43), (Severs et al., 2004) em situações como hipertrofia ventricular direita e esquerda induzida em ratos (Uzzaman et al., 2000; Emdad et al.,2001), hipertensão (Fialová et al., 2007) ou após infarto agudo do miocárdio (Kostin et al., 2003; Vetterlein et al., 2006).

Junções comunicantes ou *gap junctions* são regiões especializadas de contato intercelular que conectam o citoplasma de células adjacentes permitindo tanto o acoplamento elétrico como o metabólico (Söhl & Willecke, 2004). As junções comunicantes localizam-se no disco intercalar dos cardiomiócitos, juntamente com outros tipos de junções celulares, como as

junções aderentes e demossomos. Enquanto essas últimas são responsáveis pela adesão mecânica e transdução de força contrátil entre cardiomiócitos, as junções comunicantes fazem o acoplamento elétrico das células cardíacas (Fialová et al., 2007).

Cada junção comunicante é formada por dois hemicanais ou conexônios, provenientes de células vizinhas. Esses hemicanais são formados por várias unidades de conexina 43.

Quando um hemicanal de uma célula se comunica com outro, de célula adjacente, forma-se um póro que comunica os citoplasmas dessas duas células (Söhl & Willecke, 2004).

O acoplamento metabólico pelas junções comunicantes é importante na manutenção da organização celular e regulação de processos biológicos, como homeostase tecidual, desenvolvimento embrionário, secreção glandular, além de diferenciação e crescimento celulares (Quist et al., 2000; Lampe et al., 2006). A comunicação intercelular pelas junções comunicantes permite troca entre células vizinhas de moléculas hidrofílicas, íons com baixo peso molecular (até 1000 Da) como sódio, potássio, cálcio e segundos mensageiros como AMPc/GMPc, ADP/ATP e inositol trifosfato (King & Bertram, 2005).

Quanto à condução elétrica mediada pelas junções comunicantes, essa tem relevante participação em tecidos excitáveis, como o músculo cardíaco, onde é mediada pela passagem de íons através desses canais (van Veen et al., 2002; Formigli et al., 2003).

Em corações de mamíferos, os cardiomiócitos expressam junções comunicantes compostas por conexina 40 (Cx40), conexina 43 e conexina 45 (Cx45) (Severs et al., 2004). No miocárdio adulto, as Cx40 são expressas nos átrios e as Cx45 nos sistemas de condução enquanto as Cx43 expressam-se predominantemente nos ventrículos (van Veen et al., 2001; Schulz et al., 2007).

As características bioquímicas e elétricas das junções comunicantes dependem de suas proteínas constituintes, as conexinas (Musil & Goodenough, 1991). Assim, alterações no estado de fosforilação (Beardslee et al., 1998; Matsushita et al., 2006), na quantidade (Saffitz et al.,

2000a) e na localização das Cx43 (Yeh & Hu, 2003; Kostin et al., 2003) podem afetar a comunicação intercelular.

Nesse contexto, alterações na quantidade de conexinas podem ter implicações na eletrofisiologia do coração e no aparecimento de arritmias em miocárdio agudamente isquêmico ou cronicamente infartado (Smith et al., 1995; Peters et al.,1997; Saffitz et al., 2000a). Uma diminuição na quantidade de Cx43 tem sido associada a anormalidades de condução e arritmias

de reentrada em corações cronicamente hipertrofiados (Formigli et al., 2003). Por outro lado, diminuição no nível de expressão gênica de Cx43 em camundongos transgênicos ($Cx43^{+/-}$) tem efeito protetor por promover redução no tamanho do infarto (Kanno et al., 2003). Entretanto, um aumento na expressão de Cx43 intensifica a comunicação intercelular. Com o aumento na comunicação intercelular, as junções comunicantes permanecem abertas por maior tempo após o início de isquemia, (Ruiz-Meana et al., 2001) permitindo sobrecarga de íons sódio, de cardiomiócitos isquêmicos para células adjacentes, o que contribui para aumento da lesão e do tamanho final do infarto (Garcia-Dorado et al., 1997; Yasui et al., 2000; Ruiz-Meana et al., 2001).

Outro aspecto relevante refere-se ao fato de que o estado de fosforilação regula o mecanismo de abertura e fechamento do canal (gate) das junções comunicantes (Beardslee et al., 1998; Saffitz et al., 2000b; Leykauf et al., 2003). Assim, a Cx43 fosforilada, acelera o fechamento das junções comunicantes (Lampe & Lau, 2000), impedindo a sobrecarga química responsável pela expansão da área infartada (Miura et al., 2004). Por outro lado, a manutenção do estado de fosforilação da Cx43 durante situações de isquemia retarda o início do não acoplamento elétrico dos cardiomiócitos, protegendo contra a ocorrência de arritmias (Jain et al., 2003).

Ainda, alterações na localização das Cx43 podem interferir na comunicação intercelular (Yeh & Hu, 2003) sendo substratos anatômicos ao surgimento de arritmias (Peters et al., 1997; Uzzaman et al., 2000; Severs et al., 2004). Isso tem sido observado em diversas situações, como

hipóxia ou insuficiência cardíaca humana, de origem inflamatória, idiopática ou isquêmica, em que ocorre redistribuição das Cx43, que deixam o disco intercalar, transferindo-se para regiões fora do disco intercalar, ou seja, para a membrana plasmática (Kostin et al., 2003; Matsushita et al., 2006).

2.3. β-caroteno e Exposição ao Fumo

Introdução

O β-caroteno é um carotenóide com atividade de pró-vitamina A, presente na dieta de seres humanos, em frutas e vegetais coloridos (Yeum & Russell, 2002). Apresenta variedade de funções, incluindo ação antioxidante (Paiva & Russell, 1999; Palozza et al., 2006), ativação do sistema imune (Alvarado et al., 2005) e aumento da comunicação intercelular pelas junções comunicantes, por induzir expressão da proteína Cx43 (Yeh & Hu, 2003).

Os efeitos benéficos de frutas e vegetais ricos em β-caroteno sobre a redução do risco de doenças cardiovasculares têm sido relatados em uma série de estudos epidemiológicos experimentais (Peto et al., 1981; Ziegler et al., 1996; Mayne, 1996). Entretanto, estudos de intervenção, delineados para testar a hipótese de que o β-caroteno protegeria os humanos contra o desenvolvimento de câncer ou de doenças cardiovasculares, mostraram resultados diferentes dos esperados. Assim, no estudo denominado "Alpha Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study" (ATBC), observou-se maior mortalidade por doenças cardiovasculares em subgrupo de indivíduos que recebeu suplementação com β-caroteno (The Alpha-tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study Group, 1994). No estudo "Beta Carotene and Retinol Efficacy Trial" (CARET), no qual se avaliou população sob risco de desenvolver câncer ou doença cardiovascular, isto é, homens e mulheres com história de hábito de fumar ou de exposição ao asbesto também ocorreu aumento de 26% na mortalidade por causas cardíacas (Omenn et al., 1996). Em terceiro estudo com voluntários médicos (The Physicians Health Study – PHS), no qual 11% da população estudada era fumante, a suplementação com β-caroteno não trouxe benefício

ou dano em termos de incidência de câncer e doenças cardiovasculares (Hennekens et al., 1996).

Os mecanismos pelos quais o β-caroteno induziu maior mortalidade por doenças cardiovasculares, como observado nos estudos de intervenção, não foram, até o presente momento, elucidados. Rapola et al., (1997) formularam a hipótese de que tais efeitos fossem devidos a alterações na contratilidade miocárdica, instabilidade da placa aterosclerótica induzida

pelo β-caroteno ou ainda poderiam ser decorrentes da perda da proteção induzida pelo precondicionamento.

Na tentativa de esclarecer os mecanismos pelos quais o β-caroteno induziu maior mortalidade por doenças cardiovasculares, nosso laboratório tem realizado alguns trabalhos. Em um desses estudos, observamos que ratos expostos à fumaça de cigarro apresentaram menor mortalidade após infarto agudo do miocárdio em relação ao grupo controle, o que foi chamado de efeito paradoxal protetor do fumo. Entretanto, quando esses animais fumantes receberam β-caroteno ocorreu perda do efeito protetor (Paiva et al., 2005).

Os mecanismos pelos quais a exposição à fumaça de cigarro induziu menor mortalidade e o β-caroteno atenuou esse efeito não são conhecidos. Na tentativa de elucidá-los, formulamos várias hipóteses. Dentre elas, a de que o β-caroteno e a exposição ao fumo influenciariam a remodelação cardíaca, o estresse oxidativo no miocárdio ou ainda, o efeito desses tratamentos sobre a comunicação intercelular dos cardiomiócitos.

2.4. Junções Comunicantes - Vitamina A, β-caroteno e Fumaça de Cigarro

A comunicação intercelular pelas junções comunicantes pode sofrer influência de várias substâncias. Dentre estas se destacam o β-caroteno (Epstein et al., 2003), a vitamina A (Naves et al., 2001) e condensados de cigarro (McKarns & Doolittle, 1991; Zwijsen et al., 1990; Tai et al., 2007).

O β-caroteno aumenta a expressão de Cx43 em diversos tecidos como fibroblastos de embrião de camundongo e fibroblastos de pele humana (Zhang et al., 1991; Frommel et al., 1994; Zhang et al., 1995; Hieber et al., 2000; Yeh & Hu, 2003), estimulando a comunicação intercelular (Cooper et al., 1999).

Quanto à vitamina A, seu efeito sobre a expressão de Cx43 varia em diferentes tecidos. Assim, a vitamina A, na forma de ácido retinóico, aumenta a expressão de Cx43 em culturas

de células epiteliais renais caninas expostas a carcinógenos enquanto diminui a expressão dessa proteína durante a diferenciação neuronal de células p19 de carcinoma embrionário e células de carcinoma pluripotencial humanas (Watanabe et al.,1999).

Em relação ao tecido cardíaco, a vitamina A atua atenuando a aumento na expressão de Cx43 em corações de embrião de rato expostos ao nitrofen (Belliveau et al., 1997; Bani-Yaghoub et al., 1997; Gonzalez-Reyes et al., 2006), influenciando a comunicação intercelular através das junções comunicantes. Além disso, a hipersinalização pelo ácido retinóico, induzida em corações de camundongos transgênicos com o subtipo α do receptor para o ácido retinóico retinóico (RARα) constitutivamente ativo, causa diminuição da expressão da Cx43 e conseqüentemente redução da comunicação intercelular (van Veen et al., 2002).

Quanto à exposição ao fumo, condensados de cigarro são inibidores da comunicação intercelular mediada pelas junções comunicantes em diversos tipos celulares como fibroblastos humanos, células de músculo liso vascular de humanos e de ratos, células hepáticas de rato e em células epiteliais de ducto pancreático humano (McKarns & Doolittle, 1991; McKarns et al., 2000; Tai et al., 2007), entretanto os mecanismos pelos quais essa diminuição ocorre ainda não são conhecidos.

Diante do exposto, é de interesse estudar a influência da exposição à fumaça de cigarro e da suplementação da dieta com β-caroteno sobre a comunicação intercelular e o estresse

oxidativo, na tentativa de elucidar mecanismos pelos quais a exposição ao fumo induziu menor mortalidade após o infarto, bem como a abolição desse efeito pelo β-caroteno.

3. Hipótese de Trabalho:

A fumaça de cigarro induziria estresse oxidativo que causaria efeito tipo precondicionamento cardíaco. O efeito tipo precondicionamento diminuiria a comunicação

intercelular pelas junções comunicantes. A suplementação da dieta com β-caroteno inibiria os efeitos provenientes da exposição à fumaça de cigarro.

Objetivo

4. Objetivo:

Investigar a influência da exposição à fumaça de cigarro e da suplementação da dieta com β-caroteno sobre a comunicação intercelular em cardiomiócitos de ratos.

Material e Métodos

5. Material e Métodos

5.1. Animais e Suplementação com β-caroteno

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Unesp/Botucatu, estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos provenientes do Biotério da Unicamp, pesando aproximadamente 100 gramas, condicionados ao Biotério do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Clínica Médica Unesp/Botucatu. Os animais foram alocados, ao acaso, em quatro grupos e expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura de 25 ± 1°C. Permaneceram em número de cinco por gaiola, com livre acesso à água e ração. A constituição dos quatro grupos foi a seguinte: 1) grupo controle (C) - formado por 30 animais, que receberam a dieta usada de rotina em nosso laboratório, sem suplementação com β-caroteno e sem exposição à fumaça de cigarro; 2) grupo β-caroteno (BC) - composto por 28 animais que receberam β-caroteno (na forma de cristal adicionado e misturado à dieta) na dose de 500 mg de β-caroteno/kg de dieta e não foram expostos ao fumo; 3) grupo exposto à fumaça de cigarro (EFC) composto por 28 animais, que receberam a dieta usada de rotina em nosso laboratório, sem suplementação com β-caroteno e que foram expostos à fumaça de cigarro; 4) grupo β-caroteno/EFC (BC/EFC) - formado por 28 animais que receberam o β-caroteno na mesma forma que o grupo BC e foram expostos à fumaça de cigarro. Os animais receberam os tratamentos descritos acima até que os ratos, com peso corpóreo inicial de 100 gramas atingissem entre 200 e 250 gramas (período de 4 a 5 semanas).

A dose de β-caroteno utilizada foi de 500 mg/kg dieta, o que corresponde a 50 mg de β-caroteno/kg peso corpóreo/dia. Esta dose garantiu a presença de β-caroteno no soro e tecido hepático (Zornoff et al., 2006a).

O β-caroteno tem atividade de pró-vitamina A e em roedores, quando ingerido, é clivado quase totalmente em retinal e retinol no intestino e fígado pela enzima β,β-caroteno 15,15' monooxigenase (Wyss, 2004). Isso faz com que muito pouco desse carotenóide seja absorvido intacto (Krinsky et al., 1990). Entretanto, estudos mostram que doses de β-caroteno, acima de 20 mg/kg peso corporal/dia Russell, (2004) e dieta com níveis apreciáveis de vitamina A aumentam o acúmulo de β-caroteno em tecidos de ratos (van Vliet et al., 1996). Além disso, a dieta utilizada continha 12000 UI de vitamina A/kg, permitindo que os animais absorvessem o β-caroteno intacto.

5.2. Exposição ao Fumo

Foi utilizado o método proposto por Wang et al. (1999) e previamente modificado por Paiva et al. (2003). Em resumo, os ratos foram colocados em câmara transparente, com as seguintes medidas: 95x80x65 cm e conectada ao dispositivo para produção de fumaça dos cigarros. A fumaça dos cigarros é aspirada por vácuo e é veiculada para câmara em que estão alojados os animais, durante período de 30 minutos. Após esse período, a fumaça é exaurida e o procedimento repetido. Na primeira semana, a fumaça é obtida a partir de cinco cigarros, duas vezes por dia no período da tarde, com intervalos de descanso de dez minutos. O número de cigarros é aumentado para o total de 10 cigarros/30minutos, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde. No fim do período experimental, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia. A quantidade total de fumaça correspondeu a 1190 cigarros durante o período de cinco semanas. O cigarro utilizado, de marca comercial comum, apresentou a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono. Quanto à eficiência da exposição ao cigarro, essa foi assegurada pela análise dos níveis de carboxihemoglobina em ratos fumantes, realizados em estudos anteriores em condições experimentais semelhantes as do presente estudo (Castardeli et al., 2005).

5.3. Coleta de Material Biológico

Após o fim do período de tratamento, os animais foram mortos por dose excessiva de anestésico (pentobarbital sódico – 50 mg/kg) e em seguida coletados fígado, coração e sangue (por punção dos ventrículos). Após esse procedimento, os corações foram rapidamente removidos e colocados por alguns segundos em soro fisiológico para remoção do sangue em seu interior. Em seguida, os ventrículos direito e esquerdo foram dissecados e pesados para análise morfométrica. O sangue foi colocado em tubos com gel separador sem anticoagulante e centrifugado (3000 rpm) por 10 minutos, para obtenção do soro, processo este realizado sob proteção de luz. A seguir as amostras de tecido e soro foram congeladas em tubos tipo *Eppendorf* e armazenadas à temperatura de -70°C.

5.4. Estudo Morfométrico

Após eutanásia dos animais, os corações foram removidos, dissecados e os átrios e ventrículos separados e pesados. O peso do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito foi ajustado pelo peso corporal final do rato e utilizado como índice de hipertrofia ventricular.

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol a 10% por período de 48 horas, segundo método já descrito (Matsubara et al., 2000). Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se a seguir cortes histológicos coronais de 4 μm. Os cortes histológicos foram corados em lâminas com solução hematoxilina - eosina (HE) para aferição das áreas da secção transversa dos miócitos, empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensurados 50 a 70 células por ventrículo analisado (Matsubara et al., 2006). Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma arredondada, núcleo visível no centro da célula e localizavam-se na camada sub-endocárdica da parede muscular do ventrículo esquerdo. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes

grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 5 μm e corados pela técnica de *Picro Sirius red*, específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. A leitura foi feita utilizando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo (Matsubara et al., 2006), utilizando objetiva de 40X. Os campos escolhidos estavam afastados da região perivascular.

5.5. Imunohistoquímica para Conexina 43

Os experimentos de imunohistoquímica foram realizados segundo Saffitz et al., (2000a) com algumas modificações. Depois de retirados dos animais, os corações foram cortados transversalmente. Os fragmentos obtidos foram fixados, sucessivamente em formaldeído a 10% por 24 horas, água corrente por 24 horas e álcool 70° por 24 horas. Após fixação, os fragmentos foram emblocados em parafina e em seguida, feitos cortes histológicos de 3 μm, dispostos em lâminas previamente tratadas com solução aderente de poly-d-lisine (Fluka). Em seguida, os cortes obtidos permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas, para melhor fixação. A desparafinização foi feita em banhos sucessivos de xilol, álcool 100°, álcool 95° e álcool 70°, seguida de hidratação em água destilada. Em seguida, os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0,01M pH 6,0 e submetidos a ambiente de microondas por 10 minutos para recuperação antigênica. Após descanso (resfriamento) de 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,2 e incubadas por trinta minutos em solução de albumina sérica bovina (BSA) a 3% (solução de BSA em PBS) para bloqueio de reações inespecíficas. Após os trinta minutos, os cortes foram incubados "overnight" a 4°C em câmara úmida com anticorpo primário (*policlonal anti-rabbit connexin 43*; Abcam). A diluição utilizada foi

de 1:100.

Após esse período, foi feita lavagem das lâminas em PBS e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (*Texas Red anti-rabbit IgG*; Vector), na diluição de 1:50, por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e cobertas com meio de montagem, composto de glicerina tamponada e lamínula. Para cada bateria de reações de imunohistoquímica realizada (dez lâminas), o controle negativo correspondeu a uma lâmina de ventrículo esquerdo em que se omitiu o anticorpo primário (Uzzaman et al., 2000).

A leitura foi feita utilizando-se microscópio equipado com unidade de epifluorescência (Carl-Zeiss, Inc. North America) acoplado a câmera de vídeo (AxioPlan 4.1; Carl-Zess Inc.) utilizando aumento de 40x. O filtro utilizado foi o verde (WG), com comprimento de onda de excitação a 550 nm e emissão a 650 nm.

Para cada coração, foram analisados dez campos (Kostin et al., 2003). As reações de imunohistoquímca foram analisadas quanto à localização da proteína no miócito (no disco intercalar ou fora do disco intercalar) e quanto à intensidade de marcação (no disco intercalar e fora do disco intercalar) de acordo com escores pré-estabelecidos.

Localização:

++++ Totalmente no disco intercalar
+++ Maioria no disco intercalar
++ Metade no disco intercalar e metade fora do disco
+ Minoria no disco intercalar
- Nenhuma marcação no disco intercalar

Intensidade de Marcação:

+++ Fortemente marcado
++ Moderadamente marcado
+ Fracamente marcado

5.6. Western Blotting para Conexina 43

Os experimentos de western blotting foram realizados segundo Rolim et al., (2007), com algumas modificações. Amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax^{TM} T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0; sucrose 0,3 M; DTT 0,5 mM; EDTA 1 mM pH 8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4^{o}C e o sobrenadante obtido transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer a -80^{o}C.

A concentração de proteína presente em cada amostra foi analisada pelo método de Bradford, utilizando curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão e as leituras feitas em espectrofotômetro a 595 nm de absorbância. As amostras de proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM; SDS 0,8%; glicerol 40%; azul de bromofenol 0,02% e β-mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8; poliacrilamida 30%; APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8; poliacrilamida 30%; APS e Temed), na concentração de 10%. No primeiro poço do gel foi aplicado padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. Nos demais pocinhos aplicou-se a quantidade de 50 μg de proteína em cada um. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por duas horas e dez minutos com tampão de corrida (Tris 0,25M; glicina 192 mM e SDS 1%).

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão

TBS pH 7,4 (Tris-HCl 20mM; NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 2 horas em temperatura ambiente sob constante agitação para bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos para o anticorpo primário.

Após esse período, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH 2,8; NaCl 5M e Tween 20) e incubada com os anticorpos primários diluídos na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por duas horas em temperatura ambiente sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal.

Por fim, a imuno-detecção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co,. USA) por período de dez minutos em ambiente sem luz. Em seguida, os filmes foram incubados sucessivamente em solução de revelador, água e fixador, por tempo de um minuto em cada uma delas.

Anticorpos Primários para a Proteína Conexina 43

- ✓ *Mouse Monoclonal to GJA1 (Abcam).* Na concentração de 1:250, especifico para os aminoácidos 130 - 143 da cadeia polipeptídica da Cx43 total (fosforilada + não fosforilada).
- ✓ *Mouse monoclonal anti-connexin 43 (Zymed).* Na concentração de 3 μg/mL, específico para o resíduo de serina 368 não fosforilado da proteína Cx43.

Anticorpo Secundário

- ✓ *IgG anti-mouse HRP* (Sigma). Na concentração de 1:10000.

Anticorpo de Normalização

- ✓ *GAPDH, Mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Na Concentração de 1:10000.

As análises quantitativas dos blots obtidos foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço http://www.scioncorp.com/.

5.7. Dosagens de β-caroteno:

As concentrações do β-caroteno foram analisadas utilizando-se a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com a descrição a seguir.

Soro: a análise dos carotenóides foi realizada em alíquotas de 200 μL de soro. Estes nutrientes foram extraídos pelo método descrito por Yeum et al., (1996). Os soros foram tratados com dois mL de solução clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Foi adicionado 150 μL padrão interno (equinenona; Sigma, St. Louis, MO, USA) em etanol e, depois, 500 μL de solução fisiológica (8,5 g NaCl/L água). Os tubos contendo a solução soro-clorofórmio-metanol-soro fisiológico foram agitados, por um minuto, em agitador "vortex" e a seguir, centrifugados (3500 rpm) a 4ºC, por dez minutos. A seguir, a película de clorofórmio foi transferida para tubo de vidro de 13x100 mm e, no restante da amostra, isto é, na película aquosa, foi adicionado hexano (três mL). Os tubos contendo hexano-soro fisiológico foram agitados durante um minuto e centrifugados em 3500 rpm a 4ºC, por 10 minutos e a película de hexano foi transferida para o mesmo tubo de vidro de 13x100 mm, contendo a película de clorofórmio. Os tubos contendo as películas de clorofórmio e de hexano foram colocados em banho a 40°C e os solventes evaporados por meio de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspendido em 150 μL de etanol; o tubo foi agitado e "sonicado" por 30 segundos; 50 μL da amostra foram injetados em cromatógrafo Waters 2695, com detector Waters 2996 – fotodiodo. Para determinação do β-caroteno utilizou-se coluna C30, específica para carotenóides (Waters –YMC carotenoid: 4,6x150 mm; 3,0 μm) acoplada a pré-coluna de mesma constituição. O comprimento de onda do detector foi fixado em 455 nm. Duas soluções foram utilizadas com a finalidade de se estabelecer um gradiente: solvente A - água: metanol: metil tert butil éter (20:83:150, v/v/v com acetato de amônio 1% na água); solvente B - água: metanol: metil tert butil éter (20:80:900, v/v/v com acetato de amônio 1% na água). O fluxo total

foi de 0,6 mL/min durante todo o procedimento analítico, à temperatura de 25ºC. Inicialmente, após a injeção da amostra, do tempo zero até oito minutos, foi bombeada a fase móvel na proporção de 100% de solvente A; no fim do oitavo minuto ocorreu aumento linear da infusão da bomba B de modo que sua concentração passou a 30% e foi mantida até o tempo de vinte e um minutos; nesse momento ocorreu outro aumento linear na concentração do solvente B, que passou a 55% e foi mantido até o tempo de trinta e três minutos; quando a infusão do solvente B foi novamente aumentada para 95%, o que foi mantido até o tempo de trinta e sete minutos. Nesse tempo a concentração do solvente B sofreu outro aumento linear chegando a 100% e permanecendo até o fim da corrida. A corrida terminou no tempo de 50 minutos. Aguardaram-se, então, mais nove minutos, que foi o tempo suficiente para estabilizar novamente a coluna, possibilitando novas determinações. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar ($C=D/\epsilon^{1\%}_{1cm}$).

Fígado e Coração: o β-caroteno foi extraído segundo método descrito por Yeum et al. (1998). O tecido foi pesado para se obter peso de aproximadamente 150 mg e em seguida cortado em pequenos fragmentos. Em seguida, adicionaram-se 100 μL de pirogalol a 12% (em etanol), 300 μL de hidróxido de potássio a 30% (em água) e um mL de etanol, agitando-se a mistura durante 10 segundos em baixa velocidade em agitador "vortex". Logo após, as amostras foram incubadas a 37°C durante duas horas, sob agitação contínua, estando os tubos cobertos com parafilme. Passado esse tempo, resfriou-se a mistura em temperatura ambiente e adicionou-se um mL de água, então, imediatamente, as amostras foram agitadas por 10 segundos. Na seqüência, adicionou-se 100 μL de padrão interno (equinenona) e três mL de éter-hexano (2:1, com 1% de etanol); a mistura foi agitada por 40 segundos e, posteriormente, centrifugada (3000 rpm) por 5 minutos. Logo após este período, transferiu-se a película de éter-hexano para outro tubo de vidro e novamente adicionou-se dois mL de éter-hexano; após centrifugação, obteve-se, a mesma película de éter-hexano. Adicionou-se dois mL de água ao extrato de éter-hexano, agitou-se e centrifugou-se (3000 rpm) o material por cinco minutos. Transferiu-se a película de éter-hexano obtida para o mesmo tubo de vidro contendo a primeira película. Os tubos contendo

a película éter-hexano foram colocados em banho-maria 40°C e os solventes evaporados por meio de gás nitrogênio. O resíduo foi ressuspenso em 100 μL de etanol; o tubo foi agitado e sonicado por 30 segundos; 50 μL de amostra foram injetados no cromatógrafo. A análise por HPLC foi realizada usando-se o mesmo procedimento descrito para a dosagem do soro. Todo o procedimento de manipulação e extração das amostras foi realizado sob condições de pouca luminosidade, com utilização de luz vermelha.

5.8. Estudo do Estresse Oxidativo

O estudo do estresse oxidativo foi realizado segundo Diniz et al. (2005). Amostras de aproximadamente 200 mg de tecido (ventrículo esquerdo ou fígado) foram homogeneizadas com cinco mL de tampão fosfato de sódio 0,1M; pH 7,0, sob gelo, em homogeneizador. Os homogeneizados foram centrifugados (10000 rpm) por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para determinação da concentração de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e hidroperóxidos de lipídeos. As leituras espectrofotométricas foram obtidas em leitor ELISA (Biotek Instruments, INC) e em espectrofotômetro Pharmacia Biotech (England). Todos os reagentes foram de procedência da Sigma (St. Louis, MO, USA).

5.8.1. Determinação dos Hidroperóxidos de Lipídeos

Os hidroperóxidos de lipídeos foram determinados pela oxidação do Fe^{+2} (sulfato ferroso amoniacal). O Fe^{+3} formado reage com alaranjado de xilenol formando composto colorido. Leituras foram realizadas com comprimento de onda a 560 nm. (Jiang et al. 1991).

5.8.2. Determinação da GSH e GSSG

A concentração de glutationa reduzida (grupos SH-não protéicos) foi determinada em tampão tris-HCl pH 8,9 e 5,5'-dithiobis(2-nitro-ácido benzóico), (DTNB) após prévia precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 50%. Como padrão foi utilizada GSH 1mM (Sedlak & Lindsay,

1968). A concentração de GSSG foi determinada pela diferença entre GSH total e GSH reduzida, sendo a proporção estequiométrica (2GSH:GSSG) (Okamoto et al. 2001).

5.8.3. Determinação de Proteínas Totais

A determinação de proteínas totais foi realizada segundo Lowry et al. (1951), que utiliza o reativo de Folin-Ciocalteau. Como padrão foi utilizada solução de albumina bovina.

5.9. Método Estatístico

Os resultados de cada variável para cada grupo experimental foram submetidos à verificação da normalidade e de igualdade de variância. Quando essas condições foram atendidas foi realizado teste t de *Student* para análise dos níveis de β-caroteno e para as demais variáveis estudadas, a análise de variância (ANOVA) de dois fatores.

Na ANOVA de dois fatores, o primeiro fator correspondeu à exposição à fumaça de cigarro e o segundo fator, à suplementação da dieta com β-caroteno. Esse teste estatístico avaliou os efeitos de cada fator sobre as variáveis estudadas, independentemente do efeito do outro fator, bem como a interação dos dois fatores.

Quando ocorre interação significativa entre os fatores ($P \leq 0,05$), torna-se importante identificar os grupos que apresentam diferença estatística entre si. Para tanto, utiliza-se o teste de comparações múltiplas de Tukey. Quando não existe interação entre os tratamentos, o que importa é saber se os grupos EFC diferem dos Não EFC e se os suplementados com BC diferem dos Não BC.

Para a variável GSH/GSSG no fígado e coração foi observada interação estatisticamente significante entre os tratamentos. Em relação às demais variáveis analisadas nesse estudo não existiu interação estatisticamente significante entre os dois fatores. Sendo

assim, a relação GSH/GSSG nesses órgãos foi apresentada em gráfico tridimensional, que permite melhor visualização da influência de um fator sobre o efeito do outro. Todas as demais variáveis, para as quais não se observou interação entre BC e EFC, foram apresentadas em três gráficos, designados A, B e C, onde: A = representa os grupos em relação à ausência ou presença de BC (grupos Não BC e BC); B = representa os quatro grupos experimentais (C, BC, EFC, BC/EFC) e C = representa os grupos em relação à ausência ou presença de EFC (grupos Não EFC e EFC).

Considerando-se que o tempo de tratamento variou de quatro a cinco semanas devido ao fato dos animais fumantes necessitarem de maior período para atingirem a faixa de 200 a 250 gramas de peso corporal, foi realizado o teste de análise de covariância (ANCOVA). Na ANCOVA, além dos fatores exposição à fumaça de cigarro e suplementação com β-caroteno a co-variável tempo de tratamento foi acrescentada com a finalidade de corrigir os valores das variáveis estudas de modo a anular a influência da diferença do tempo de tratamento sobre elas.

Este teste estatístico aumenta o poder da ANOVA de dois fatores, pois ajusta estatisticamente os valores das variáveis dependentes por remover os efeitos da co-variável sobre essas variáveis dependentes. A ANCOVA mostrou que a co-variável tempo de tratamento não exerceu influência sobre os valores das variáveis estudadas, de modo que essa análise não foi mencionada nos resultados do presente estudo.

No caso dos valores das variáveis não preencherem os critérios de normalidade e de igualdade de variância, foram realizadas as transformações matemáticas necessárias. Para realização dos referidos testes estatísticos foi empregado o pacote estatístico SigmaStat for Windows v2.03 da SPSS. O nível de significância (α) adotado foi de 0,05 para todos os testes.

Resultados

6. Resultados

6.1. Caracterização dos Animais

6.1.1. Peso Corpóreo

A Figura 1 apresenta os dados referentes ao peso corpóreo dos ratos. Todos os animais apresentaram peso entre 200 e 250 gramas após o período de tratamento, não existindo diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais.

6.1.2. Estudo Bioquímico: Níveis de β-caroteno

A Tabela 1 sumariza os níveis de β-caroteno nos ratos. Não existiu interação estatisticamente significante entre os tratamentos. Os animais suplementados com β-caroteno (grupos BC e BC/F) apresentaram níveis semelhantes desse carotenóide no fígado (P>0,05). No soro e coração, não foi detectada presença de β-caroteno.

6.2. Estudo Morfométrico e Histológico

Os dados relativos ao estudo morfométrico e histológico estão representados nas Tabelas 2 e 3 e nas Figuras 2, 3, 4, 11 e 12. Não existiu interação estatisticamente significante entre os tratamentos (P>0,05). As relações VD/PC (Figura 2) e VE/PC (Figura 3) foram menores nos animais suplementados com β-caroteno. Os valores de VD/PC (Figura 2) foram maiores nos grupos EFC. Os níveis de colágeno foram menores nos animais suplementados com β-caroteno (Figura 4). Em relação às outras variáveis estudadas, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes.

6.3. Estudo do Estresse Oxidativo

Os dados referentes ao estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 4 e Figuras 5 e 6. Para as variáveis glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e hidroperóxidos de

lipídeos (HP) não existiu interação estatisticamente significante entre os fatores EFC e BC. Os níveis de GSH sérico foram maiores nos ratos EFC em relação aos Não EFC (Figura 5). Para a relação GSH/GSSG no fígado e coração foi observada interação estatisticamente significante entre EFC e BC. No fígado a relação GSH/GSSG foi maior nos grupo BC (BC Sim EFC Não) em relação ao grupo controle (BC Não EFC Não). No coração os valores de GSH/GSSG foram menores no grupo BC/EFC em relação aos grupos BC (BC Sim EFC Não) e EFC (BC Não EFC Sim) (Figura 6).

6.4. Estudo da Comunicação Intercelular: Imunohistoquímica para Cx43

As Figuras 7, 8 e 13 representam os resultados relativos à imunohistoquímica da Cx43. Não existiu interação estatisticamente significante entre os tratamentos (exposição ao fumo e suplementação com β-caroteno). Nos ratos EFC a distribuição e intensidade de marcação da Cx43 no disco intercalar foi menor. Quanto à suplementação com β-caroteno, não se detectou diferença significante entre os grupos suplementados e não suplementados.

6.5. Estudo da Comunicação Intercelular: Western Blotting para Conexina 43.

Os resultados relativos à expressão de Cx43 estão representados nas Figuras 9, 10 e 14. Não existiu interação estatisticamente significante entre os tratamentos. A expressão da forma não fosforilada da Cx43 foi maior nos ratos expostos à fumaça de cigarro. O conteúdo de Cx43 total foi maior nos animais suplementados com β-caroteno.

Tabela 1. β-caroteno em Soro e

	Controle (n = 5)	β-caroteno (n= 5)	Fumante (n = 5)	β-caroteno/Fumante (n = 5)
Soro (μmol/l)	ND	ND	ND	ND
Fígado (μg/kg)	ND	288,0 ± 94,7	ND	256,5 ± 59,2
Coração (μg/kg)	ND	ND	ND	ND

Níveis de β-caroteno em soro e tecidos de ratos dos quatro grupos experimentais: controle, β-caroteno, fumante, β-caroteno/fumante. Os dados são expressos como média ± erro padrão. Teste t de *Student*. Não existiu diferença estatisticamente significante entre os grupos experimentais (P = 0,78). ND = nível de β-caroteno não detectado.

Tabela 2. Dados

Grupos Experimentais	n	Peso corporal (g)	VE/PC (g/kg)	VD/PC (g/kg)
Controle	30	237±3,8	2,21±0,03	0,64±0,01
β-caroteno	28	237±4,0	2,16±0,03	0,59±0,01
Fumante	28	230±4,0	2,27±0,03	0,67±0,02
β-caroteno/Fumante	28	239±4,0	2,14±0,03	0,62±0,01
P1 (BC)		0,29	**0,004**	**0,002**
P2 (EFC)		0,57	0,50	**0,03**
P3 (BCxEFC)		0,33	0,12	0,76

Dados morfométricos dos quatro grupos experimentais: controle, β-caroteno, fumante, β-caroteno/fumante. Os dados foram expressos em média ± erro padrão. n= número de ratos; EFC = exposição à fumaça de cigarro; BC = suplementação com BC. Não ocorreu interação estatisticamente significante entre os fatores EFC e BC. VE/PC = peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal; VD/PC = peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal. P1 = valor de P para o efeito do BC; P2 = valor de P para o efeito da EFC; P3 = valor de P para a interação BC e EFC. ANOVA de dois fatores.

Tabela 3. Dados

Grupos Experimentais	n	Área Miócito(μm^2)	Colágeno (%)
Controle	5	190±10,31	4,3±0,55
β-caroteno	5	186±8,01	2,6±0,24
Fumante	5	185±6,42	4,4±0,20
β-caroteno/fumante	5	187±3,64	1,8±0,15
P1 (BC)	0,88	0,88	**<0,001**
P2 (EFC)	0,77	0,77	0,24
P3 (BCxEFC)	0,69	0,69	0,17

Dados Histológicos dos quatro grupos experimentais: controle, β-caroteno, fumante, β-caroteno/fumante. Os dados foram expressos em média ± erro padrão. n= número de ratos; EFC = exposição à fumaça de cigarro; BC = suplementação com BC. Não ocorreu interação estatisticamente significante entre os fatores EFC e BC. P1 = valor de P para o efeito do BC; P2 = valor de P para o efeito da EFC; P3 = valor de P para a interação BC e EFC. ANOVA de dois fatores.

		Soro				Fígado				Coração			
	n	HP*	GSH	GSSG	GSH/GSSG	HP*	GSH	GSSG	GSH/GSSG	HP*	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Controle	06	4,76±0,11	21,82±0,14	1,79±0,03	12,21±0,20	0,29±0,03	20,87±0,22	0,50±0,05	42,59±1,62	3,34±0,31	45,37±2,44	0,38±0,02	117,39±1,02
BC	06	4,92±0,16	22,18±0,40	1,84±0,04	12,06±0,23	0,27±0,01	26,28±0,27	0,45±0,05	57,40±5,9	2,52±0,21	49,41±1,22	0,40±0,01	121,81±1,33
EFC	06	4,92±0,21	22,31±0,20	1,84±0,02	12,13±0,10	0,27±0,03	31,27±0,23	0,59±0,03	51,93±3,70	2,68±0,41	47,43±0,97	0,40±0,01	117,43±2,97
BC/EFC	06	4,91±0,01	22,83±0,11	1,86±0,01	12,26±0,10	0,30±0,04	25,78±0,18	0,54±0,03	47,24±1,80	2,92±0,39	45,88±0,79	0,42±0,01	109,04±2,45
P1(BC)		0,63	0,09	0,20	0,95	0,88	0,99	0,55	0,19	0,41	0,42	0,19	0,36
P2(EFC)		0,63	**0,03**	0,22	0,71	0,78	0,28	0,28	0,91	0,71	0,63	0,22	**0,01**
P3(BCxEFC)		0,57	0,75	0,60	0,40	0,41	0,24	0,97	**0,02**	0,14	0,08	0,94	**0,01**

Dados referentes ao estudo do estresse oxidativo dos quatro grupos experimentais: controle, β-caroteno, fumante, β-caroteno/fumante. Os dados são expressos em média ± erro padrão. n= número de ratos; EFC = exposição à fumaça de cigarro; BC = suplementação com β-caroteno. Interação estatisticamente significante entre EFC e BC (P<0,05). HP= hidroperóxidos de lipídeos; GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada. *μmol/l no soro ou nmol/mg tecido em

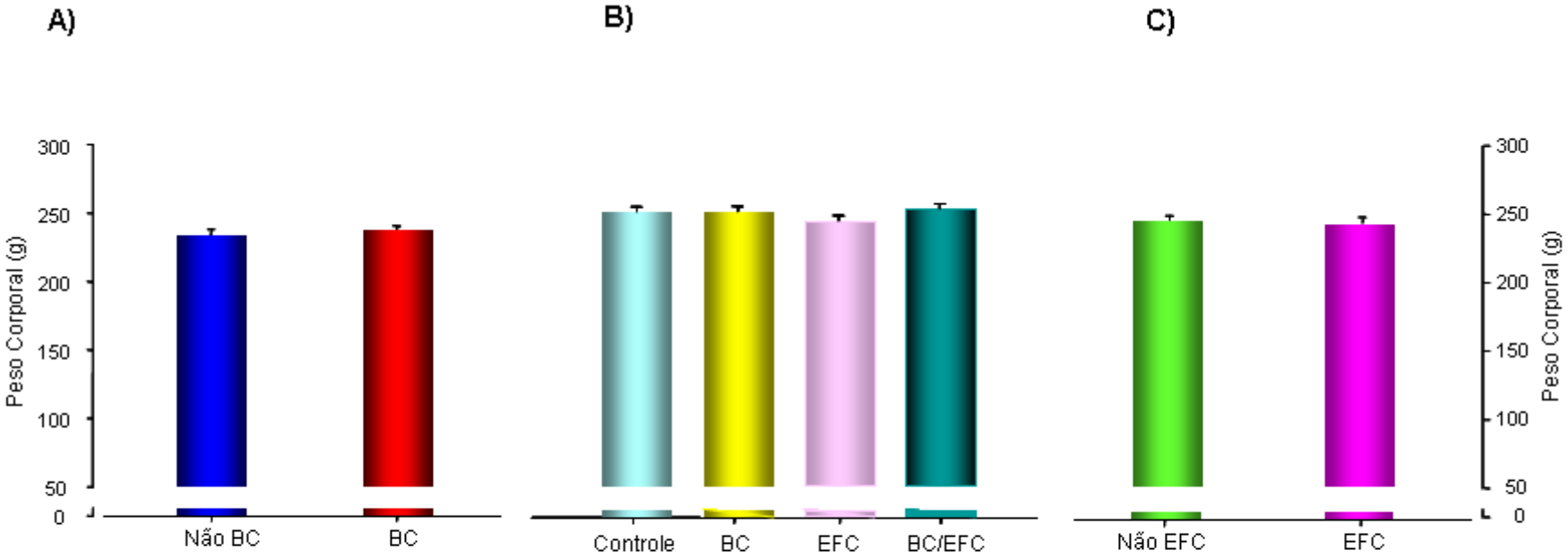

Figura 1. Peso corporal dos ratos após o período de tratamento. BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. N = 30-58. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

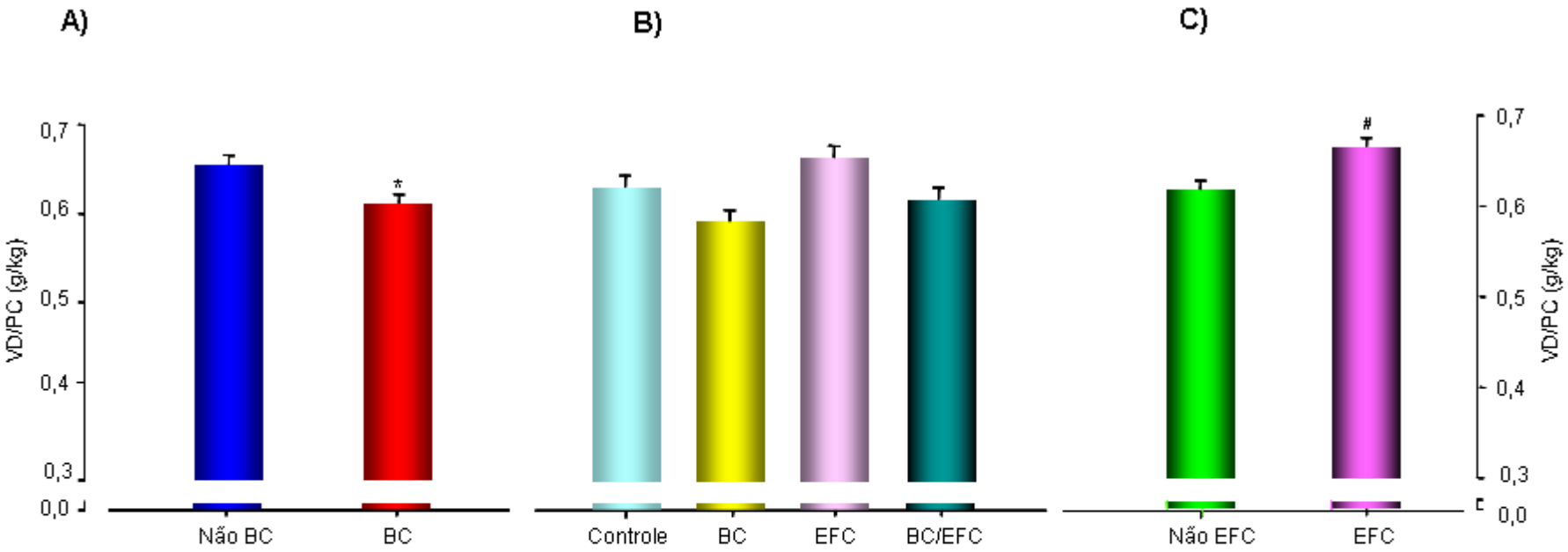

Figura 2. Peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal. VD/PC = peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal. BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não BC; #: P<0,05 em relação ao grupo Não EFC. N = 30-58. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

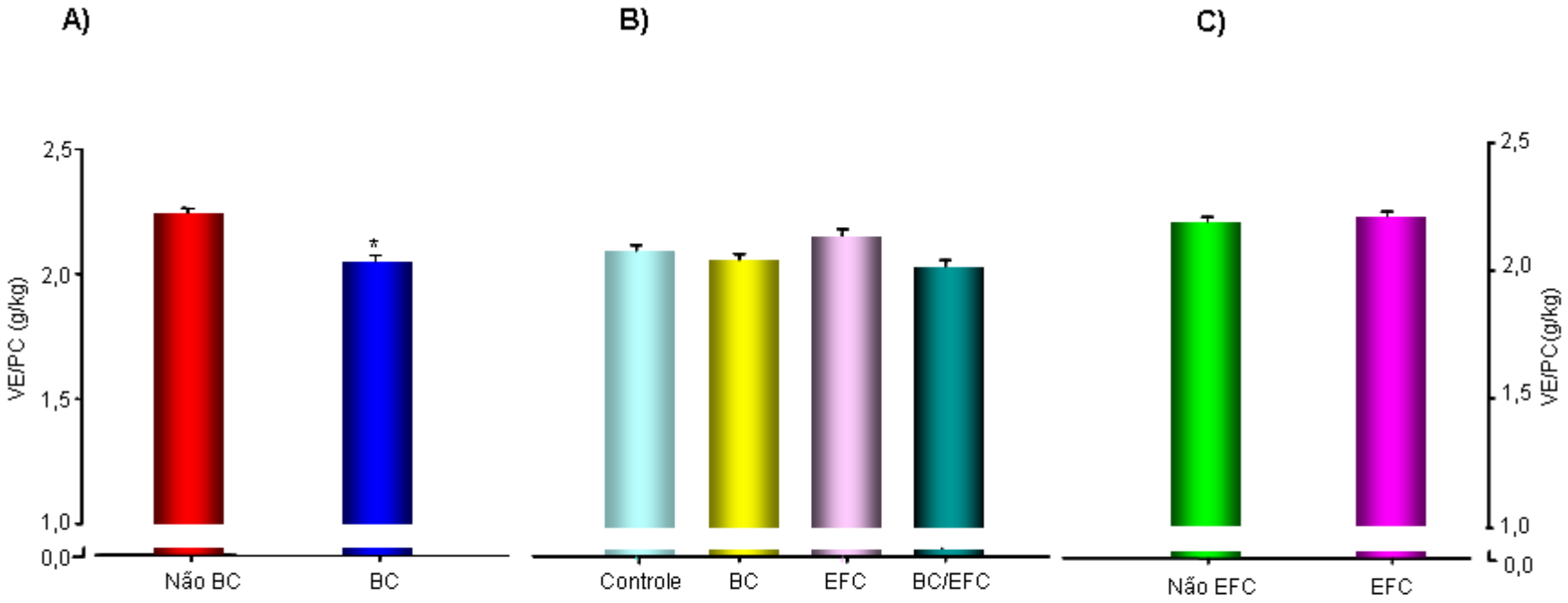

Figura 3. Peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal. VE/PC = peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal. BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não BC. N = 30-58. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

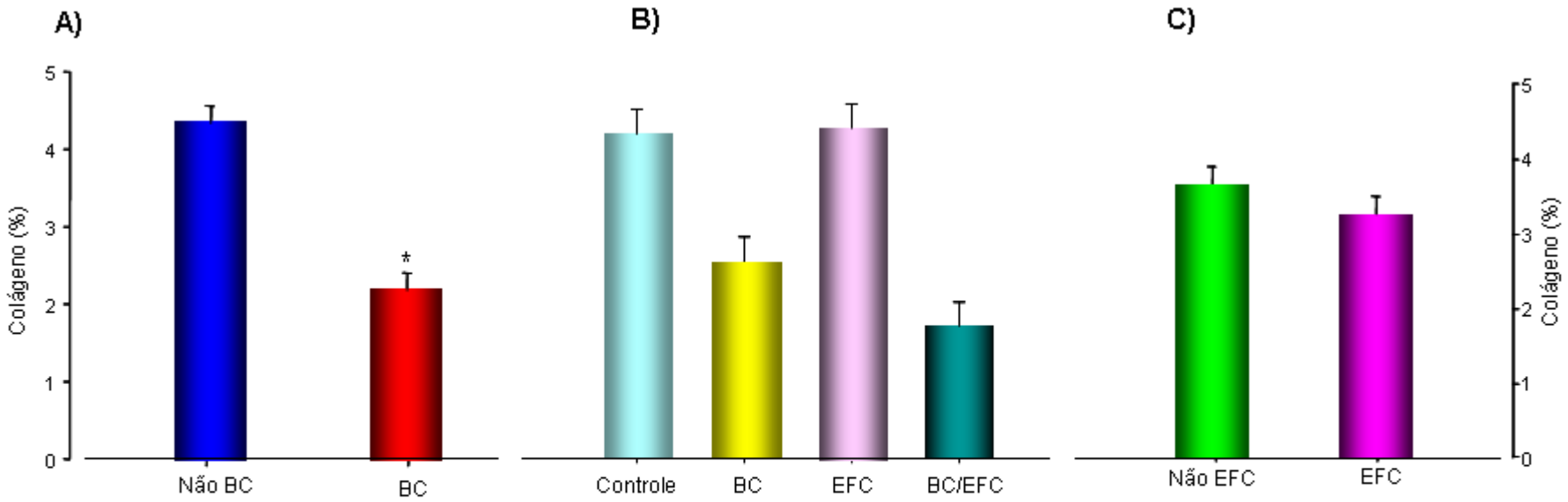

Figura 4. Porcentagem de colágeno em miocárdio de ratos. BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P <0,05 em relação ao grupo Não BC. N = 5-10. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

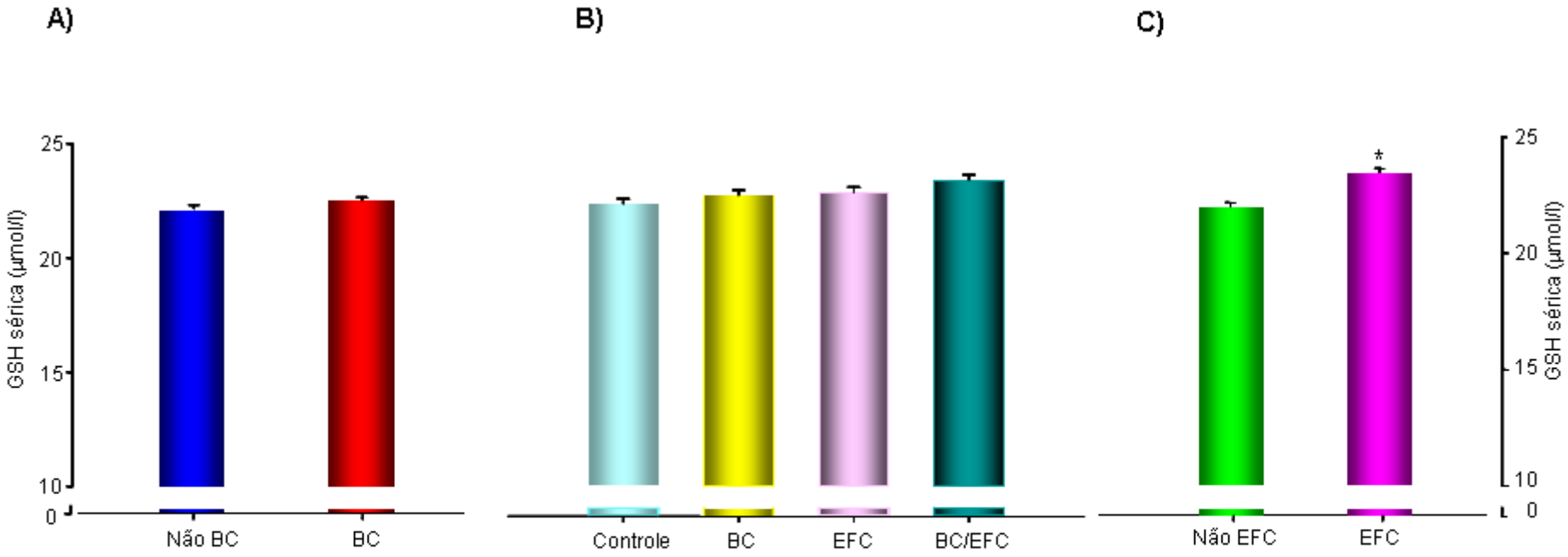

Figura 5. Nível de glutationa reduzida no soro de ratos. GSH = glutationa reduzida. BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não EFC. N = 6-12. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

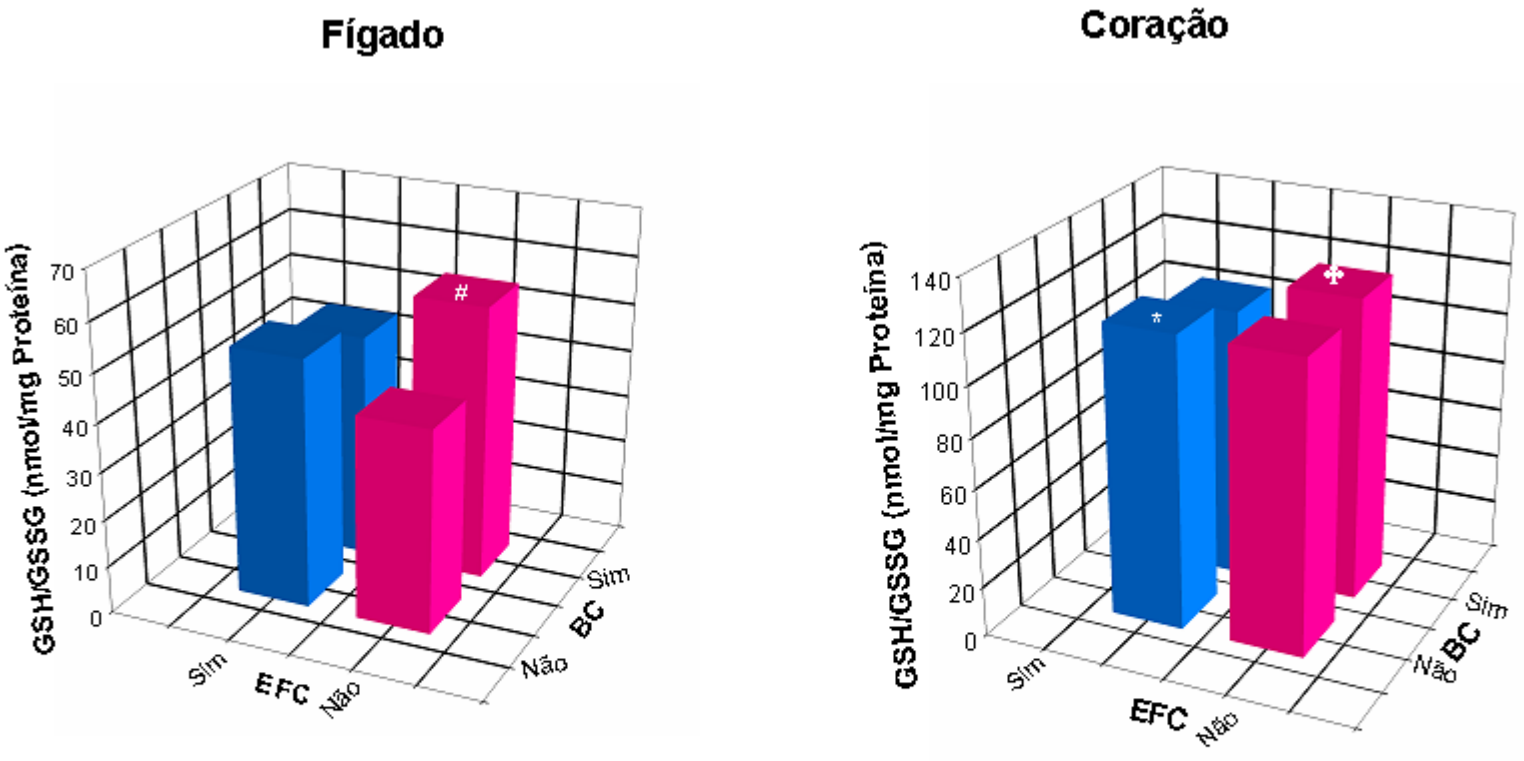

Figura 6. Relação GSH/GSSG em fígado e coração de ratos. GSH = glutationa reduzida; GSSG = glutationa oxidada; BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. Interação esttisticamente significante entre EFC e BC (P<0,05). #: P<0,05 em relação ao grupo Controle (Não BC Não EFC); ♠: P<0,05 em relação ao grupo BC/EFC (BC Sim EFC Sim); *: P<0,05 em relação ao grupo BC/EFC.

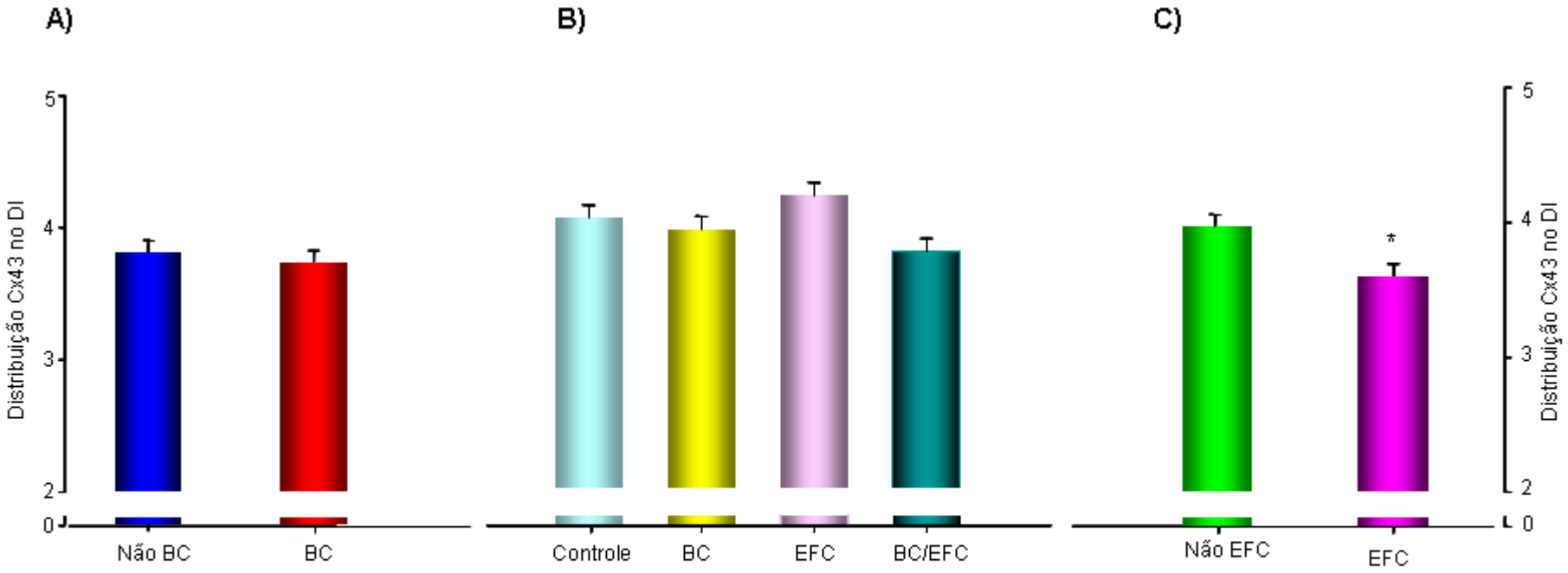

Figura 7. Distribuição de Conexina 43 no disco intercalar. Cx43 = conexina 43; DI = Disco intercalar; BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não EFC. N = 10-20. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

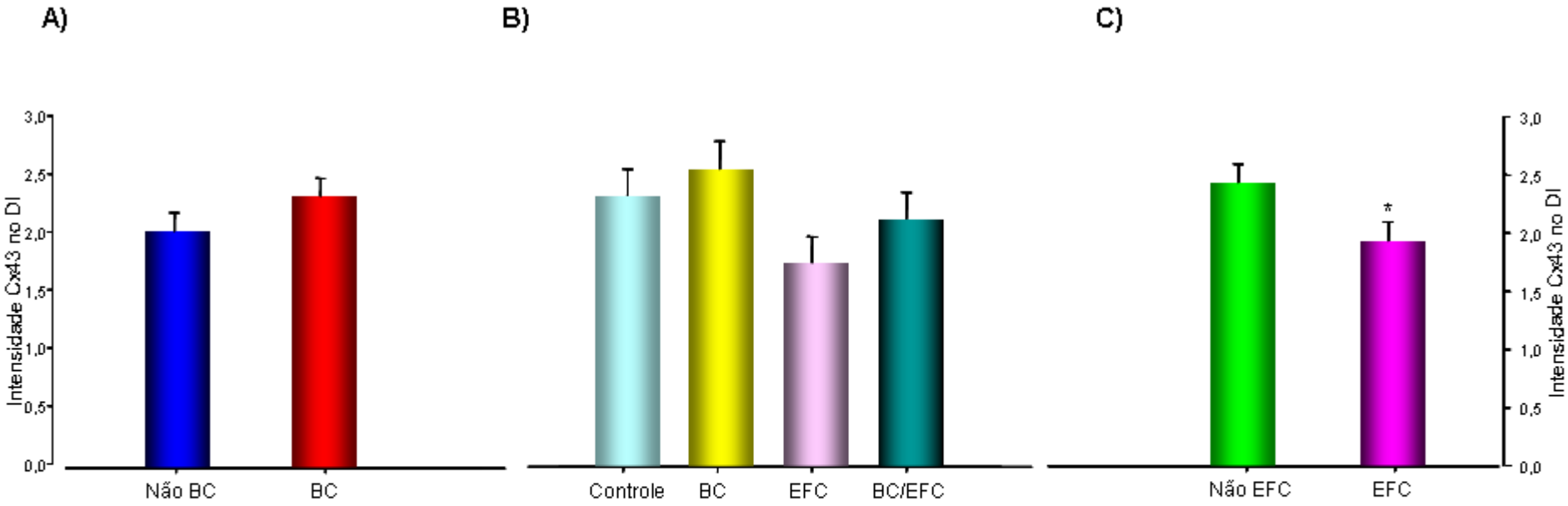

Figura 8. Intensidade de marcação de Conexina 43 no disco intercalar. Cx43 = conexina 43; DI = Disco intercalar; BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não EFC. N = 10-20. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

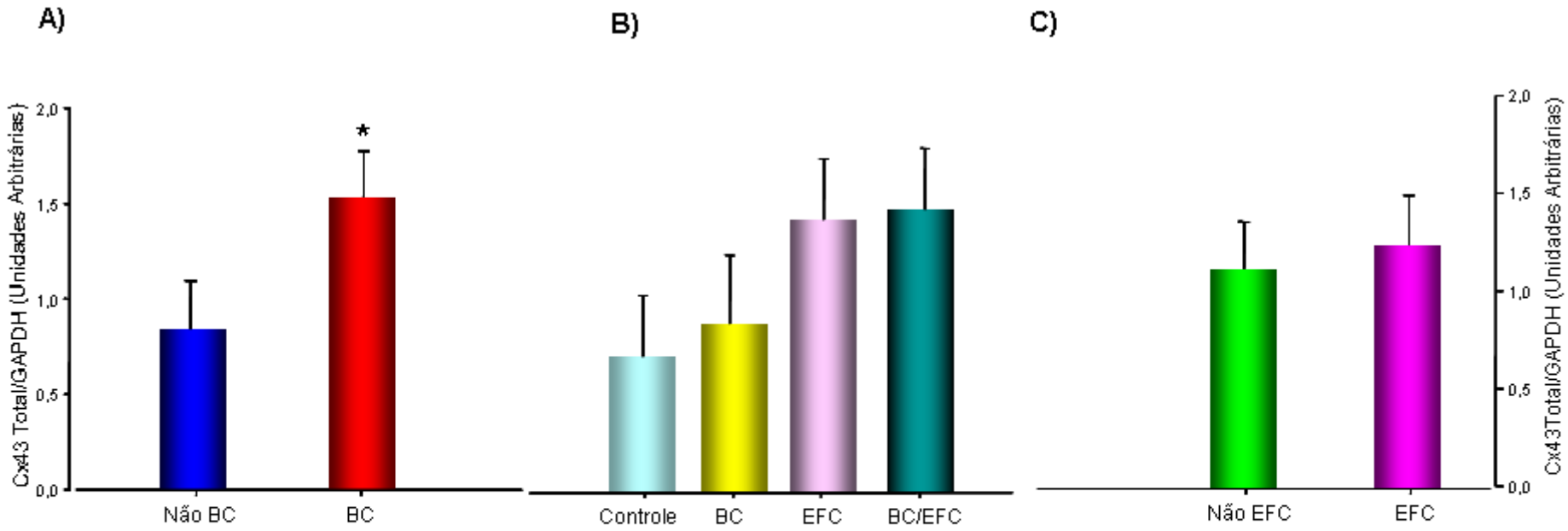

Figura 9. Expressão de Cx43 total (fosforilada + não fosforilada) em cardiomiócitos de ratos. Cx43 = conexina 43; BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não BC. N = 5-10. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

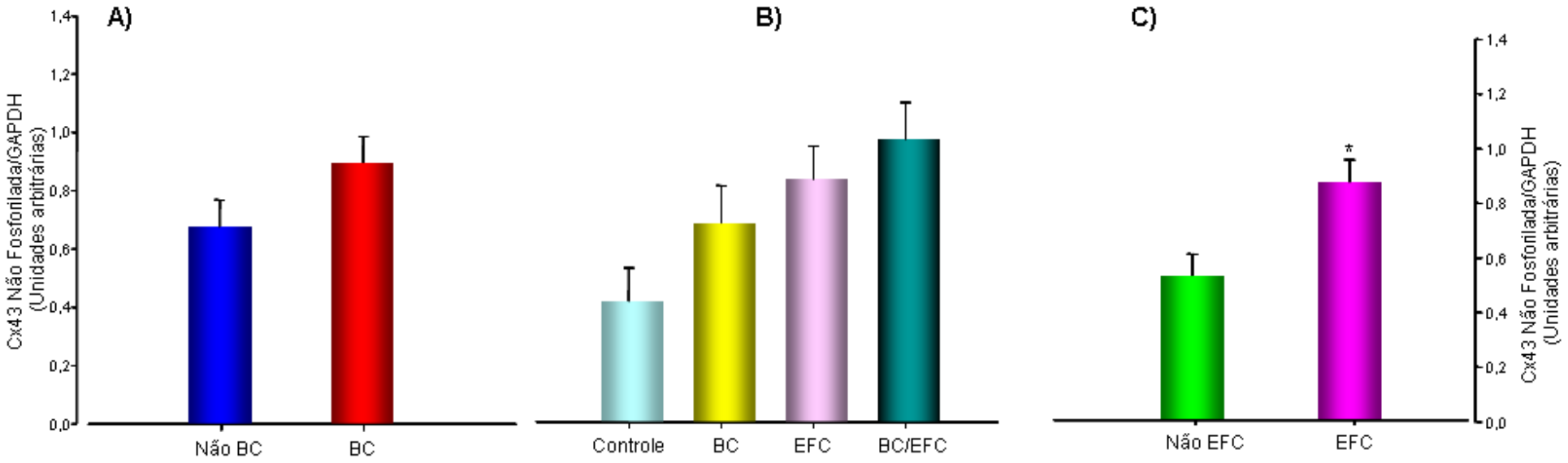

Figura 10. Expressão de Cx43 não fosforilada em cardiomiócitos de ratos. Cx43 = conexina 43; BC = suplementação da dieta com β-caroteno; EFC = exposição à fumaça de cigarro. ANOVA de dois fatores. *: P<0,05 em relação ao grupo Não EFC. N = 5-10. A = Representação dos grupos na ausência ou presença de BC; B = Representação dos quatro grupos experimentais; C = Representação dos grupos na ausência ou presença de EFC.

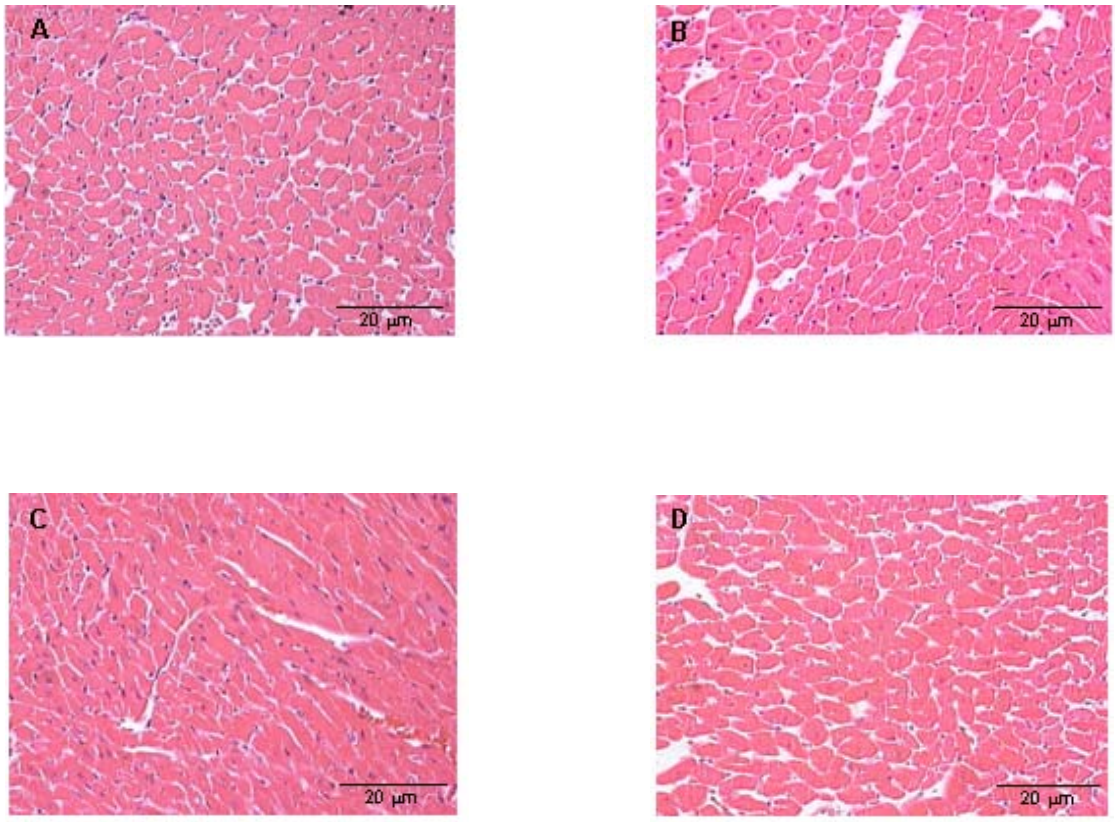

Figura 11. Miocárdio ventricular esquerdo de ratos corado com hematoxilina-eosina. A = Controle; B = Beta-caroteno; C = Fumante; D = BC/Fumante.

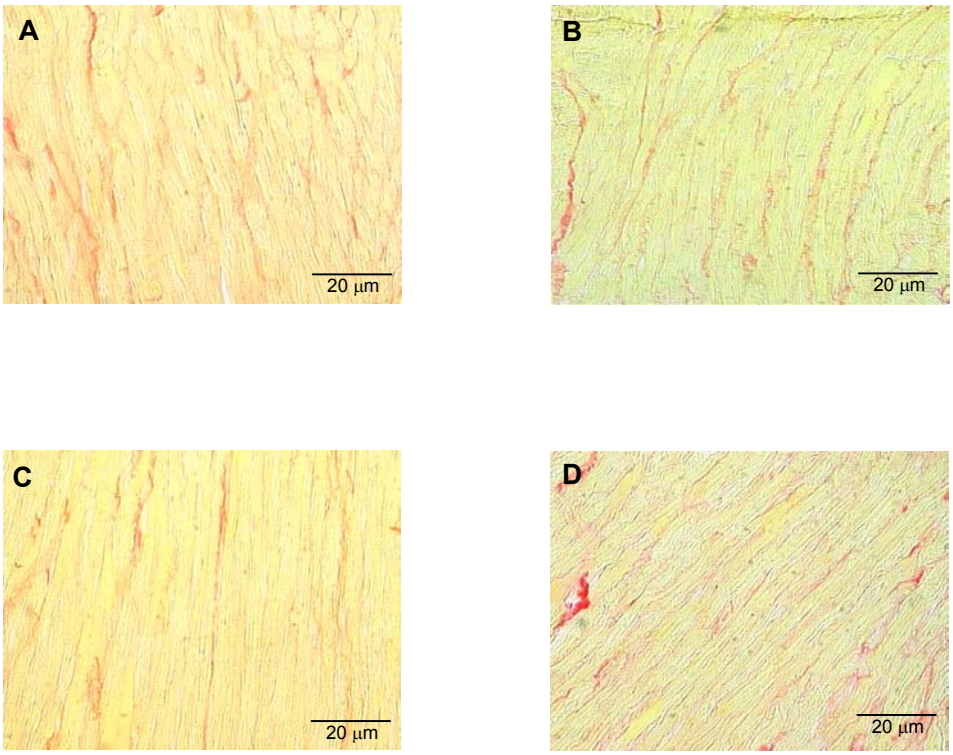

Figura 12. Miocárdio ventricular esquerdo de ratos corado com *picrosírius red.* A = Controle; B = Beta-caroteno; C = Fumante; D = BC/Fumante.

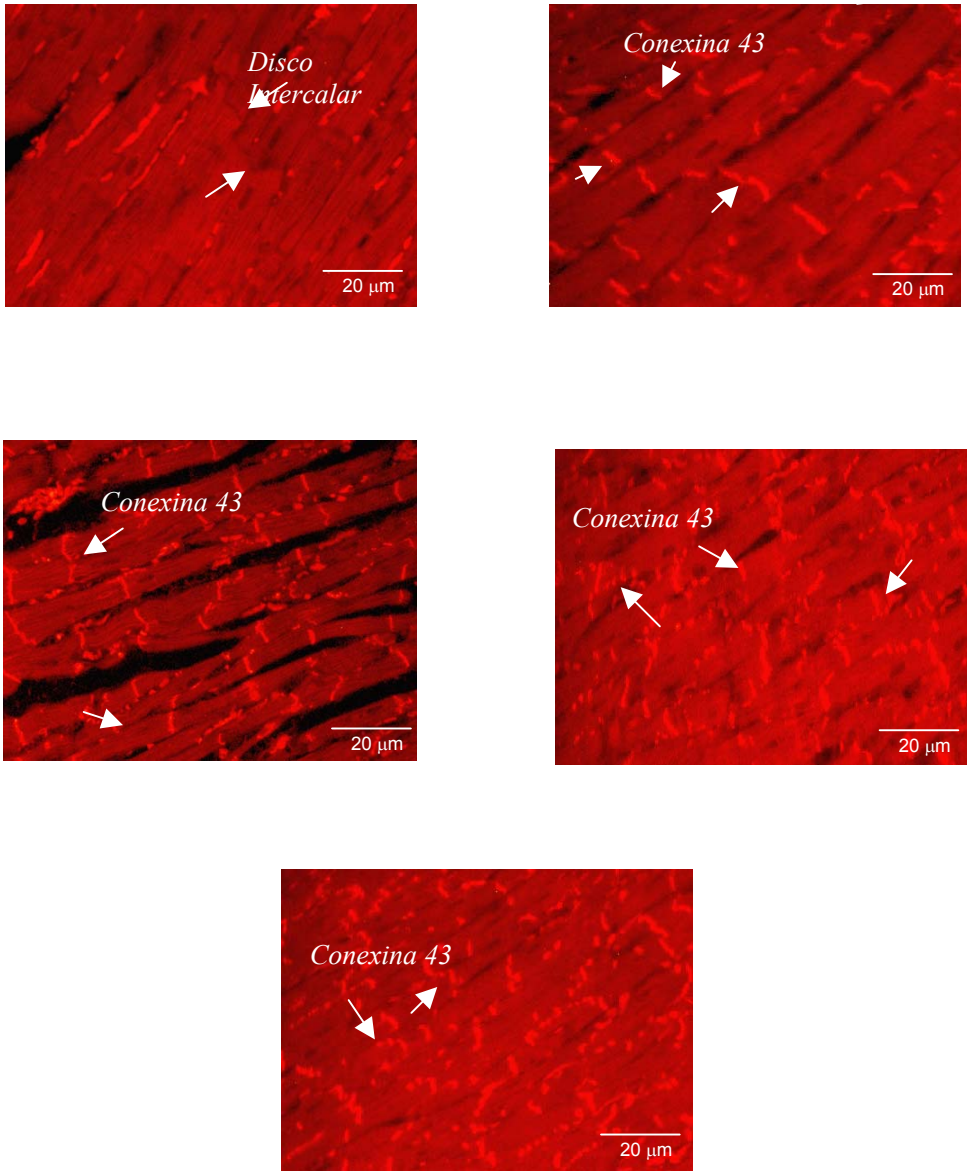

Figura 13. Imunofluorescência para conexina 43 em miocárdio ventricular esquerdo de ratos. A (Controle negativo): Discos intercalares livres de marcação para conexina 43; B (controle) e C (beta-caroteno): Conexinas 43 contidas nos discos intercalares marcados com anticorpo anti-conexina 43; D (Fumante) e E (BC/Fumante): Conexinas 43 em discos intercalares e em regiões fora do disco intercalar marcadas com anticorpo anti-conexina 43.

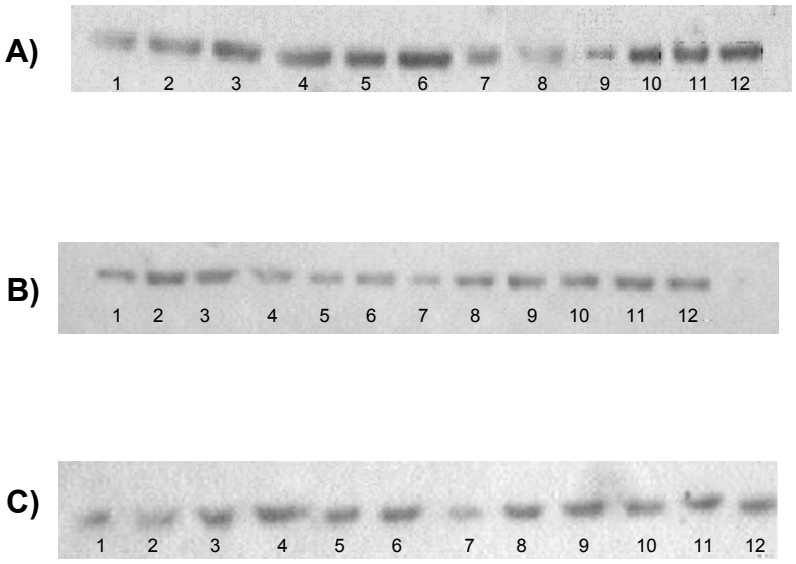

Figura 14. Western blotting para conexina 43 em miocárdio ventricular esquerdo. A: conexina 43 total; B: conexina 43 não fosforilada e C: GAPDH. 1-3: Controle; 4-6: Beta-caroteno; 7-9: EFC; 10-12: BC/EFC.

Discussão

7. Discussão

7.1. Exposição à Fumaça de Cigarro e Precondicionamento

O presente trabalho foi realizado para estudar os mecanismos pelos quais ratos fumantes apresentaram menor mortalidade após o infarto (Paiva et al., 2005), de modo que nosso delineamento experimental simula situação prévia ao infarto do miocárdio.

De acordo com a hipótese formulada inicialmente, pode ter ocorrido no grupo fumante efeito tipo precondicionamento isquêmico, que tem como alvo as junções comunicantes dos cardiomiócitos. Uma possível via pela qual a exposição à fumaça de cigarro poderia produzir esse efeito seria o aumento do estresse oxidativo, pois a literatura mostra evidências da participação desses radicais livres no precondicionamento cardíaco (Toufektsian et al., 2003; Das & Maulik, 2003).

Nesse contexto, curtos episódios de isquemia precondicionante promovem liberação de radicais livres, insuficientes para causar necrose das células, mas suficiente para ativar sistemas antioxidantes celulares (Das & Maulik, 2003) de modo a tornar o coração mais resistente a insultos isquêmicos subseqüentes. Além disso, as espécies reativas de oxigênio liberadas nos episódios de precondicionamento ativam diretamente proteínas quinases, mediadoras dos efeitos protetores do precondicionamento (Eisen et al., 2004). Ainda, tem sido observado que em presença de antioxidantes, o efeito protetor do precondicionamento é perdido (Chen et al., 1995; Tanaka et al., 1994).

No presente estudo, o estresse oxidativo induzido pela fumaça de cigarro foi evidenciado apenas pelo maior nível de glutationa reduzida no soro dos ratos fumantes (Tabela 4), provavelmente como resposta compensatória à exposição crônica aos radicais livres do cigarro (Richie et al., 1996), o que tem sido observado também por outros autores (Helen & Vijayammal, 1997; Muscat et al., 2004). Já em relação ao tecido cardíaco, não foi observado estresse oxidativo. Embora os achados do presente estudo, não se pode descartar a

possibilidade de que tenha ocorrido estresse oxidativo no coração por alteração de outros sistemas antioxidantes celulares não avaliados.

Outro possível mecanismo pelo qual o cigarro poderia produzir o efeito tipo precondicionamento isquêmico seria pela via dos receptores acoplados à proteína G. Nesse contexto, curtos episódios de isquemia promovem liberação de diversos mediadores, ligantes de receptores acoplados à proteína G, que agem em paralelo para iniciar uma cascata de sinalização de eventos que produz o precondicionamento (Yellon & Downey, 2003). Assim, durante períodos breves de isquemia precondicionante, o miocárdio libera agonistas como adenosina, bradicinina, norepinefrina, que ao ocuparem seus respectivos receptores acoplados à proteína G, induzem o precondicionamento isquêmico (Yellon & Downey, 2003).

Além disso, os miócitos cardíacos expressam outros receptores acoplados à proteína G, como receptores para endotelina 1 e angiotensina 1 que são também capazes de induzir precondicionamento, mas não participam desse processo em virtude de agonistas para esses receptores não serem produzidos no miocárdio durante situações de isquemia (Cohen et al., 2000; Yellon & Downey, 2003).

Estudos mostram que a fumaça de cigarro bem como alguns de seus componentes específicos causam aumento na expressão gênica de agonistas de receptores acoplados à proteína G. Assim, a exposição crônica ao monóxido de carbono (Loennechen et al., 1999) ou à fumaça de cigarro (Adachi et al., 2000) em ratos induz aumento da expressão de endotelina-1 no tecido cardíaco. É também conhecido que a fumaça de cigarro promove liberação de catecolaminas pelas terminações nervosas centrais e de endotelina 1.

Nesse contexto, em estudo realizado recentemente em nosso laboratório foi observado que a administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina atenuam as alterações de remodelação cardíaca induzidas pelo fumo, enquanto a administração de beta-bloqueadores não produz nenhuma influência sobre os efeitos da fumaça de cigarro no coração, permitindo concluir que o sistema renina-angiotensina, participa da remodelação ventricular induzida pela exposição à fumaça de cigarro (Zornoff et al., 2007).

Assim, esses mediadores poderiam ser sugeridos como possível mecanismo do efeito tipo precondicionamento induzido pelo cigarro.

Outro resultado do presente trabalho foi a remodelação cardíaca induzida pelo fumo. Isso tem sido observado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, onde se evidenciou remodelação caracterizada por alterações tanto morfológicas como funcionais (Castardeli et al., 2005; Paiva et, al. 2005; Zornoff et al., 2006a). No presente estudo, a remodelação induzida pela fumaça de cigarro foi caracterizada pelo maior valor da relação VD/PC, avaliada por meio de análise morfométrica.

Dentre os possíveis mecanismos responsáveis pela remodelação ventricular direita, a hipoxemia poderia ser suposta, entretanto, esse não foi o mecanismo, pois a pressão de oxigênio em ratos fumantes não foi alterada quando comparada a de não fumantes (Castardeli et al., 2005).

Além disso, a remodelação cardíaca observada no presente trabalho não explica a menor mortalidade em ratos fumantes após o infarto, observada no estudo anterior. Nesse contexto, tem sido mostrado por outros autores que ratos com hipertrofia ventricular esquerda pré-existente ao infarto do miocárdio apresentam remodelação após o infarto mais intensa, com piora funcional e maior mortalidade dentro das primeiras 24 horas após o evento isquêmico (Nass et al., 2002).

O achado mais importante do presente estudo foi a alteração nas junções comunicantes, induzida pela exposição à fumaça de cigarro. Essa remodelação da comunicação intercelular foi caracterizada por alterações na distribuição, (conexinas 43 em regiões fora do disco intercalar) quantidade (menor quantidade de conexina 43 no disco intercalar) e fosforilação dessa proteína (aumento da Cx43 desfosforilada), com conseqüente redução da comunicação intercelular.

Nesse contexto, a ocorrência de mudanças na quantidade, localização e fosforilação de conexinas 43 têm sido observadas em diversas situações em que coração é submetido a algum tipo de agressão e conseqüentemente produz remodelação ventricular. Alguns exemplos

são sobrecarga de volume (Formigli et al., 2003), miocárdio hibernante (Kaprielian et al., 1998) e infarto agudo do miocárdio (Kostin et al., 2003), tanto na fase inicial após o infarto como nas fases

em que a insuficiência cardíaca apresenta-se estabelecida. Nessas situações observa-se redistribuição das Cx43 dos discos intercalares para regiões de membrana plasmática e aumento da forma desfosforilada da proteína.

Os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no presente estudo foram semelhantes aos efeitos causados pela isquemia, ou seja, a redistribuição celular da Cx43 bem como o aumento da desfosforilação dessa proteína.

A participação das Cx43 no precondicionamento isquêmico é bem descrita na literatura (Schulz & Heusch, 2004; Miura et al., 2004), entretanto, a função específica dessas proteínas no precondicionamento é incompletamente estabelecida. Até o presente momento não é conhecido se os efeitos benéficos do precondicionamento isquêmico resultam da abertura ou fechamento das junções comunicantes (Vetterlein et al., 2006; Papp et al., 2007). Quanto à isquemia, é consenso que causa fechamento da comunicação intercelular (Beardslee 2000) além de redução da Cx43 (Hatanaka et al., 2000).

Em relação à redistribuição das Cx43 induzida pela fumaça de cigarro, a literatura tem mostrado que o precondicionamento exerce seus efeitos protetores quanto à incidência de arritmias por promover a redistribuição celular dessas proteínas (Vetterlein et al., 2006). Assim, o precondicionamento isquêmico inicia processo de redistribuição das Cx43, que deixam os discos intercalares, migrando para regiões de membrana plasmática (Vetterlein et al., 2006), processo que melhora as chances de sobrevivência das células durante isquemia prolongada (Vetterlein et al., 2006).

Quanto ao aumento na desfosforilação das Cx43 observado nesse trabalho, esse efeito induz “não acoplamento” elétrico (*uncoupling*) dos cardiomiócitos (Beardslee et al., 1998; Jain et al., 2003). Nesse contexto, estudo recente mostra que agentes não acopladores das junções comunicantes, quando administrados previamente ao insulto isquêmico, produzem efeitos cardíacos (proteção) idênticos aos do precondicionamento (Papp et al., 2007). Esses autores

sugerem que o “não acoplamento”, parcial e reversível, dos cardiomiócitos, induzido por agentes não acopladores na ausência de isquemia induz efeito anti-arrítmico durante a fase de isquemia

prolongada, semelhante ao observado em corações precondicionados (Papp et al., 2007).

Dessa forma, pode-se sugerir que os efeitos decorrentes da exposição à fumaça de cigarro sobre a comunicação intercelular observados no presente trabalho são semelhantes aos da isquemia precondicionante, permitindo afirmar que o cigarro produziu efeito tipo precondicionamento isquêmico.

7.2. Exposição à Fumaça de Cigarro e β-Caroteno

As propriedades antioxidantes do β-caroteno são bem descritas na literatura, contribuindo para o sistema antioxidante não enzimático celular (Paiva & Russell 1999).

Dessa maneira, o β-caroteno, foi o carotenóide de escolha nesse estudo, tanto pela sua ação antioxidante quanto pelo fato de em estudo anterior, realizado em nosso laboratório, ter abolido o efeito do fumo de reduzir mortalidade após o infarto do miocárdio em ratos (Paiva et al., 2005). Além disso, estudos de intervenção, delineados para testar a hipótese de que o β-caroteno protegeria os humanos contra o desenvolvimento de câncer ou de doenças cardiovasculares mostraram aumento de mortalidade por doenças cardiovasculares (The Alpha-Tocopherol, Beta-carotene Cancer Prevention Study Group, 1994; Omenn et al., 1996).

Considerando-se as propriedades antioxidantes do β-caroteno, esperava-se, no presente estudo, que esse carotenóide atenuasse o estresse oxidativo proveniente do cigarro, conseqüentemente abolindo o efeito tipo precondicionamento isquêmico, caso esse efeito do cigarro tivesse como mecanismo o estresse oxidativo. Entretanto, o β-caroteno intensificou o estresse oxidativo nos corações dos ratos fumantes, efeito observado pelo menor valor da relação GSH/GSSG no grupo BC/EFC. Assim, pode-se sugerir que não é pelo aumento do estresse oxidativo que a exposição à fumaça de cigarro induziu o efeito tipo precondicionamento isquêmico no presente trabalho.

Além da ação antioxidante, o β-caroteno é capaz de regular a comunicação intercelular pelas junções comunicantes, pois aumenta a expressão gênica da Cx43, aumentando a

comunicação intercelular, efeito independente de suas atividades pró-vitamina A e antioxidante (Zhang et al., 1992; Paiva et al., 1999).

Devido a essas propriedades poder-se-ia esperar que o β-caroteno abolisse os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre as junções comunicantes, que nesse estudo foram caracterizados pela redução da comunicação intercelular.

No presente trabalho não existiu interação estatisticamente significante entre suplementação com β-caroteno e exposição à fumaça de cigarro nas variáveis distribuição e desfosforilação da Cx43. Entretanto, a estatística mostra tendência na interação entre os tratamentos quando se faz análise dessas variáveis. Essa tendência, embora sem significância estatística pode ter significado biológico, justificando a hipótese inicial, de que de o β-caroteno aboliria o efeito paradoxal protetor do cigarro no coração dos ratos. Outra possibilidade corresponde à ocorrência de ação sinérgica da redistribuição e desfosforilação das Cx43, que diferentemente de uma ação isolada de cada uma dessas alterações, esse sinergismo teria como conseqüência o efeito tipo precondicionamento.

Assim, os dados do presente estudo sugerem que o efeito tipo precondicionamento isquêmico induzido pelo fumaça de cigarro, que caracteriza o efeito paradoxal protetor do fumo, se deve às alterações na distribuição e fosforilação das Cx43. O mecanismo desse efeito não corresponde ao estresse oxidativo proveniente do cigarro.

Conclusão

8. Conclusão

1) A exposição à fumaça de cigarro causou efeito tipo precondicionamento isquêmico por meio de remodelação das junções comunicantes dos cardiomiócitos;

2) O efeito tipo precondicionamento isquêmico induzido pelo fumo não tem como mecanismo o aumento do estresse oxidativo no miocárdio.

Referências

8. Referências

Adachi C, Naruse M, Ishihara Y, Tanabe A, Takagi S, Yoshimoto T, et al. Effects of acute and chronic cigarette smoking on the expression of endothelin-1 mRNA of the cardiovascular tissues in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2000; 36:S198-S200.

Alvarado C, Alvarez P, Jiménez L, De La Fuente M. Improvement of leukocyte functions in young prematurely aging mice after a 5-week ingestion of a diet supplemented with biscuits enriched in antioxidants. Antioxid Redox Signal. 2005; 7:1203-10.

Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease. J Am Col Cardiol. 2004; 43:1731-7.

Bani-Yaghoub M, Bechberger JF, Naus CC. Reduction of connexin 43 expression and dye-coupling during neuronal differentiation of human NTera2/clone D1 cells. J Neurosci Res. 1997; 21:19-31.

Beardslee MA, Laing JG, Beyer EC, Saffitz JE. Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. Circ Res. 1998; 83:629-35.

Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. Circ Res. 2000; 87:656-62.

Belliveau DJ, Bechberger JF, Rogers KA, Naus CC. Differential expression of gap junctions in neurons and astrocytes derived from P19 embryonal carcinoma cells. Dev Genet .1997; 21:187-200.

Birbaumm Y, Hale SL, Kloner RA. Is preconditioning by nicotine responsible for the better prognosis in smokers with acute myocardial infarction? Basic Res Cardiol. 1996; 91:240-7.

Caramelli B. Avaliação de risco cardiovascular. [Monografia da Internet]. [Acesso: 06/12/2001]. Disponível em http://ids-saude.uol.com.br/psf/medicina/tema1/texto8 definicao.asp. 2001.

Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Miniccuci MF, Azevedo PS, et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. Arq Bras Cardiol. 2005; 84:320-4.

Chen W, Gabel S, Steenbergen C, Murphy E. A redox-based mechanism for cardioprotection induced by ischemic precondictioning in perfused rat heart. Circ Res. 1995; 77:424-9.

Church T, Pryor WA. Free radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. Environ Health Perspect. 1985; 64:111-26.

Conh JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling- concepts and clinical implications: a consensus paper from a international forum on cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000; 35:569-82.

Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: from adenosine receptor to K_{ATP} channel. Ann Rev Physiol. 2000; 62:79-109.

Cooper DA, Eldridge AL, Peters JC. Dietary carotenoids and lung cancer: a review of recent research. Nutr Ver. 1999; 57:133-45.

Datasus [Homepage da Internet]. Sistema de Informações. Brasília: Ministério da Saúde; 2005. [Acesso: 08/07/2005]. Disponível em: http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d13.def.

Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. Arch Biochem Biophys. 2003; 420:305-11.

Diniz YS, Faine LA, Galhardi CM, Rodrigues HG, Ebaid GX, Burneiko RC et al. Monosodium glutamate in standard and high-fiber diets: metabolic syndrome and oxidative stress in rats. Nutrition. 2005; 21:749-55.

Eisen A, Fisman EZ, Rubenfire M, Freimark D, McKechnie R, Tenenbaum A, et al. Ischemic preconditioning: nearly two decades of research. A comprehensive review. Atherosclerosis. 2004; 172:201-10.

Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y Honjo H, Uchida T, Severs NJ, et al. Gap junction remodelling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. J Mol Cell Cardiol. 2001; 33:219-31.

Epstein KR. The role of carotenoids on the risk of lung cancer. Semin Oncol. 2003; 30:86-93.

Fialová M, Dlugosová K, Okruhlicová L, Kristek F, Manoach M, Tribulová N. Adaptation of heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodelling. Physiol Res. 2007 2:1-13.

Formigli L, Ibba-Manneschi L, Perna AM, Pacini A, Polidori L, Nediani C, et al. Altered CX43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading. Histol Histopathol. 2003; 18:359-69.

Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, Gonzalez MA, Solares J, Julia M, et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. Circulation. 1997; 96:3579-86.

Gonzalez-Reyes S, Fernandez-Dumont V, Calonge WM, Martinez L, Tovar JA. Expression of Connexin 43 in the hearts of rat embryos exposed to nitrofen and effects of vitamin A on it. Pediatr Surg Int. 2006; 22:61-5.

Hatanaka K, Kawata H, Toyofuku T, Yoshida K-I. Down-regulation of connexin43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts *in vivo*. Jpn Heart J. 2004; 45:1007-19.

Helen A, Vijayammal PL. Vitamin C supplementation on hepatic oxidative stress induced by cigarette smoke. J Appl Toxicol. 1997; 17:289-95.

Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1996; 334:1145-49.

Hieber AD, King TJ, Morioka S, Fukushima LH, Franke AA, Bertram JS. Comparative effects off all-trans beta-carotene vs. 9-cis beta-carotene on carcinogen-induced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. Nutr Cancer. 2000; 37:234-44.

Houdi AA, Dowell RT, Diana JN. Cardiovascular responses to cigarette smoke exposure in restrained conscious rats. J Pharmacol Exp Ther. 1995; 275:646-53.

Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, et al. Mitocondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. Circ Res. 1999; 85:357-63.

Jain SK, Schnessler RB, Saffitz JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. Circ Res. 2003; 92:1138-44.

Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Lipids. 1991; 26:853-56.

Kanno S, Kovacs A, Yamada KA. Connexin43 as a determinant of myocardial infarct size following coronary occlusion in mice. J Am Coll Cardiol. 2003; 41:681-86.

Kaprielian RR, Gunning M, Dupont E, Sheppard MN, Rothery SM, Underwood R, et al. Downregulation of immunodetectable connexin 43 and decreased gap junction size in the pathogenesis of chronic hibernation in the human left ventricle. Circulation. 1998; 97:651-60.

Katayama T, Iwasaki Y, Yamamoto T, Yoshioka M, Nakashima H, Suzuki S, et al. "Smoker's paradox" in patients with acute myocardial infarction receiving primary coronary intervention. J Cardiol. 2006; 48:193-200.

King TJ, Bertram JS. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. Biochim Biophys Acta. 2005; 1719:146-60.

Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Ide T, Suematsu N, Satoh S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice. Role of oxidative stress. Circ Res. 2000; 87:392-8.

Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn W-P, et al. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. Mol Cell Biochem. 2003; 242:135-44.

Krinsky NI, Mathews-Roth MM, Welankiwar S, Sehgal PK, Lausen NC, Russet M. The metabolism of [14C]β-carotene and the presence of others carotenoids in rats and monkeys. J Nutr. 1990; 120:81-7.

Lampe PD, Lau AF. Regulation of gap junction by phosphorilation of connexins. Arch Biochem Biophys. 2000; 384:205-15.

Lampe PD, Cooper CD, King TJ, Burt JM. Analysis of connexin 43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. J Cell Sci. 2006; 119:3435-42.

Leykauf K, Durst M, Alonso A. Phosphorylation and subcellular distribution of connexin 43 in normal and stressed cells. Cell Tissue Res. 2003; 311:23-30.

Li D, Williams V, Liu L, Chen H, Sawamura T, Romeo F, et al. Expression of lecitin-like oxidized low-density lipoprotein receptors during ischemia-reperfusion and its role in determination of apoptosis and left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2003; 41:1048-55.

Loennechen JP, Beisvag V, Arbo I, Waldum HL, Sandvik AK, Knardahl S, et al. Chronic carbon monoxide exposure in vivo induces myocardial endothelin-1 expression and hypertrophy in rat. Pharmacol Toxicol. 1999; 85:192-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951; 193:265-75.

McKarns SC, Doolittle D. A quantitative approach to assessing intercellular communication: studies on cigarette smoke condensates. Toxicol Appl Pharmacol. 1991; 111:58-68.

McKarns SC, Bombick DW, Morton MJ, Doolittle DJ. Gap junction communication and cytotoxicity in normal human cells after exposure to smoke condensates from cigarettes that burn or primarily heat tobacco. Toxicol in Vitro. 2000; 14:41-51.

Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; 279:H1534-9.

Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira AL, Paiva SAR, Zornoff LAM, Matsubara BB. Myocardial remodeling in chronic pressure or volume overload in the rat heart. Arq Bras Cardiol. 2006; 86:126-30.

Matsushita S, Kurihara H, Watanabe M, Okada T, Sakai T, Amano A. Alterations of phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function. J Histochem Cytochem. 2006; 54:343-53.

Mayne ST. Beta-carotene, carotenoids and disease prevention in humans. Faseb J. 1996; 10:690-701.

Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, Tano M, Ichikawa Y, Nakamura Y, et al. Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 286:H214-21.

Muscat JE, Kleinman W, Colosimo S, Muir A, Lazarus P, Park J, et al. Enhanced protein glutathiolation and oxidative stress in cigarette smokers. Free Radic Biol Med. 2004; 36:464-70.

Musil LS, Goodenough DA. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junction plaques. J Cell Biol. 1991; 115:1357-74.

Nass O, Yang X-P, Liu Y-H, Carretero AO, Khaja F, Goldstein S, et al. Effects of pre-existing left ventricular hypertrophy on ventricular dysfunction and remodeling following myocardial infarction in rats. J Heart Lung Transplant. 2002; 21:1113-9.

Naves M, Silveira ER, Dagli LZ, Moreno FS. Effects of β-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat. J Nutr Biochem. 2001; 12:685-92.

Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. J Biol Chem. 2001; 276:2959-60.

Ommen GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med. 1996; 334:1150-5.

Paiva SAR, Russell RM. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. J Am Coll Nutr. 1999; 18:426-33.

Paiva SAR, Yeum K-J, Lee KS, Park IS, lee-Kim YC, Russell RM. Endogenous carotenoid concentrations in cancerous tissues of gastric cancer patients in Korea. Asia Pac J Clin Nutr. 1999; 8:160-6.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. Arq Bras Cardiol. 2003; 81:221-4.

Paiva SAR, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. β-carotene attenuates the paradoxical effect of the tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. J Nutr. 2005; 135:2109-13.

Palace VP, Hill MF, Khaper N, Singal PK. Mobilization of antioxidant vitamin pools and hemodynamic function after myocardial infarction. Circulation. 1999; 99:121-6.

Palozza P, Serini S, Trombino S, Lauriola L, Ranelletti FO, Calviello G. Dual role of β-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO2. Carcinogenesis. 2006; 27:2383-91.

Papp R, Gönczi M, Kovács M, Seprényi G, Végh A. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischaemic preconditioning. Cardiovasc Res. 2007; 74:396-405.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of captopril therapy on the infarcted left-ventricle of the rat. Circ Res. 1985; 57:84-95.

Peters NS, Coromilas J, Severs NJ, Wit AL. Disturbed connexin43 gap junction distributes correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia. Circulation. 1997; 95:988-96.

Peto R, Doll R, Buckley JD, Sporn MD. Can dietary beta-carotene maternally reduce human cancer rates? Nature. 1981; 290:201-8.

Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R. Physiological role of gap-junctional hemichannels: extracellular calcium-dependent volume regulation. J Cell Biol. 2000; 148:1063-74.

Rapola JM, Virtamo J, Ripatti S, Huttunen JK, Albanes D, Taylor PR, et al. Randomised trial of alpha-tocopherol and beta-carotene supplements on incidence of major coronary events in men with previous myocardial infarction. Lancet. 1997; 349:1715-20.

Richie JP, Skowronski L, Abraham P, Leutzinger Y. Blood glutathione concentrations in a large-scale hu man study. Clin Chem. 1996; 42:64-70.

Rolim NPL, Medeiros A, Rosa KT,Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. Physiol Genomics. 2007; 29:246-52.

Ruiz-Bailen M, de Hoyos EA, Reina-Toral A, Torres-Ruiz JM, Alvarez-Bueno M, Gomes Jimenez FL, et al. Paradoxical effect of smoking in the spanish population with acute myocardial infarction or unstable angina: results of the ARIAM register. Chest. 2004; 125:831-40.

Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Lane S, Pina P, Inserte J, Mirabet M, et al. Persistence of gap junction communication during myocardial ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001; 280:H2563-71.

Russell R. The enigma of β-carotene in carcinogenesis: What can be learned from animal studies. J Nutr. 2004; 134:262s-8s.

Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin 43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. Am J Physiol. 2000a; 278:H1662-70.

Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover: implications for cardiac excitability. Cir Res. 2000b; 86:723-8.

Sandhir R, Subramanian S, Koul A. Long-term smoking and ethanol exposure accentuates oxidative stress in hearts of mice. Cardiovasc Toxicol. 2003; 3:135-40.

Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem. 1968; 25:192-205.

Schulz R, Heush G. Connexin 43 and ischemic preconditioning. Cardiovasc Res. 2004; 62:335-44.

Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postcondictioning. Heart Fail Rev. 2007; 12:261-6.

Severs NJ, Coppen SR, Dupont E, Yeh H-I, Ko Y-S, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. Cardiovasc Res. 2004; 62:368-77.

Shiomi T, Tsutsui H, Matsusaka H, Murakami K, Hayashidani S, Ikeuchi M, et al. Overexpression of glutathione peroxidase prevents left ventricular remodeling and failure after myocardial infarction in mice. Circulation. 2004; 109:544-9.

Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol. 2001; 280:C53-60.

Smith WT, Fleet WF, Johnson TA, Engle CL, Cascio WE. The Ib phase of ventricular arrhytmias in ischemic in situ porcine heart is related to changes in cell-to-cell electrical coupling. Experimental Cardiology Group, University of North Carolina. Circulation. 1995; 92:3051-60.

Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. Atherosclerosis. 2001; 158:257-67.

Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. Cardiovasc Res. 2004; 62:228-32.

Tai M-H, Upham BL, Olson LK, Tsao M-S, Reed Jr DN, Trosko JE. Cigarette smoke components inhibited intercellular communication and differentiation in human pancreatic ductal epithelial cells. Int J Cancer. 2007; 120:1855-62.

Tanaka M, Fujiwara K, Sasayama S. Superoxide dismutase and N-2-mercaptopropionyl glycine attenuate infarct size limitation effect of ischaemic preconditioning in the rabbit. Cardiovasc Res. 1994; 28:980-6.

The Alpha-tocopherol Beta Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and Beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. N Engl J Med. 1994; 330:1029-35.

Toufektsian MC, Morel S, Tanguy S, Jeunet A, de Leiris J, Boucher F. Involvement of reactive oxygen species in cardiac preconditioning in rats. Antioxid Redox Signal. 2003; 5:115-22.

Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Embad L, Magee AI, Severs NJ, et al. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. Circ Res. 2000; 86:871-8.

van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. Cardiovasc Res. 2001; 51:217-29.

van Veen TA, van Rijen HV, Wiegerinck RF, Opthof T, Colbert MC, Clement S, et al. Remodeling of gap junctions in mouse hearts hypertrophied by forced retinoic acid signaling. J Mol Cell Cardiol. 2002; 34:1411-23.

van Vliet T, van Vlissingen MF, van Schaik F, van den Berg H. β-carotene absorption and cleavage in rats is affected by the vitamin A concentration of the diet. J Nutr. 1996; 126:499-508.

Vetterlein F, Mühlfeld C, Cetegen C, Volkmann R, Schrader C, Hellige G. Redistribution of connexin43 in regional acute ischemic myocardium: influence of ischemic preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291:H813-19.

Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russel RM. Retinoid signaling and ativator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. J Natl Cancer Inst. 1999; 91:60-6.

Watanabe J, Nomata K, Noguchi M, Satoh H, Kanda S, Kanetake H, et al. All-trans retinoic acid enhances gap junctional intercellular communication among renal epithelial cells in vitro treated with renal carcinogens. Eur J Cancer. 1999; 35:1003-8.

Wyss A. Carotene oxygenases: a new family of double bond cleavage enzymes. J Nutr. 2004; 134:246S-50S.

Yasui K, Kada K, Hojo M, Lee J-K, Kamiya K, Toyama J, et al. Cell-to-cell interaction prevents cell death in cultured neonatal rat ventricular myocytes. Cardiovasc Res. 2000; 48:68-76.

Yeh SL, Hu MH. Oxidized β-carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. Food Chem Toxicol. 2003; 41:1677-84.

Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. Physiol Rev. 2003; 83:1113-51.

Yeum K-J, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. Ann Rev Nutr. 2002; 22: 483-504.

Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. Am J Clin Nutr. 1996; 64:594-602.

Yeum K-J, Ahn S-H, Paiva SAR, Lee-Kim YC, Krinsky NI, Russell RM. Correlation between carotenoid concentrations in serum and normal breast adipose tissue of women with benign breast tumor or breast cancer. J Nutr. 1998; 128:1920-6.

Yeum K-J, Russell RM. Carotenoid bioavailability and bioconversion. Ann Rev Nutr. 2002; 22:483-504.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells. Relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis. 1991; 12:2109-14.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS. Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. Câncer Res 1992; 52: 5707-5712.

Zhang LX, Acevedo P, Guo H, Bertram JS. Upregulation of gap junctional communication and connexin43 gene expression by carotenoids in human dermal fibroblasts but not human keratinocytes. Mol Carcinog. 1995; 12:50-8.

Ziegler RG, Mayne ST, Swanson CA. Nutrition and lung cancer. Cancer Causes Control. 1996; 7:157-77.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Assalin VM, Pola PMS, Becker LE, Okoshi MP, et al. Perfil clínico, preditores de mortalidade e tratamento de pacientes após infarto agudo do miocárdio, em hospital terciário universitário. Arq Bras Cardiol. 2002; 78:396-400.

Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Dal Pai-Silva M, et al. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. Toxicol Sci. 2006a; 90:259-66.

Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campana AO, et al. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. Arq Bras Cardiol. 2006b; 86:276-82.

Zornoff LAM, Duarte DR, Paiva SAR. Remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo: potenciais mecanismos. [Base de dados da Internet]. Buenos Aires; Sociedade Iberoamericana de Informacion Científica; 2007. [Acesso: 5/12/2007]. Disponível em: http://www.siicsalud.com/dato/experto.php/92853.

Zwijsen RML, de Haan LHJ, Oosting JS, Pekelharing HLM, Koeman JH. Inhibition of intercellular communication in smooth muscle cells of humans and rats by low density lipoprotein, cigarette smoke condensate and TPA. Atherosclerosis. 1990; 85:71-80.

Resumo

9. Resumo

Em estudo anterior realizado em nosso laboratório ratos expostos à fumaça de cigarro apresentaram menor mortalidade após infarto agudo do miocárdio em relação ao grupo controle. Entretanto a mortalidade aumentou nos ratos fumantes quando receberam β-caroteno. Não se sabe qual o mecanismo da diminuição de mortalidade nos animais fumantes. Formulamos a hipótese de que a fumaça de cigarro induziria estresse oxidativo que causaria efeito tipo precondicionamento cardíaco. O efeito tipo precondicionamento diminuiria a comunicação intercelular pelas junções comunicantes. A suplementação da dieta com β-caroteno inibiria os efeitos provenientes da exposição à fumaça de cigarro. Foram estudados ratos Wistar, distribuídos em 4 grupos: grupo controle (C) - formado por 30 animais, que receberam a dieta usada de rotina em nosso laboratório; 2) grupo β-caroteno (BC) - composto por 28 animais que receberam β-caroteno (na forma de cristal adicionado e misturado à dieta) na dose de 500 mg de β-caroteno/kg de dieta; 3) grupo exposto à fumaça de cigarro (EFC) composto por 28 animais, que receberam a dieta usada de rotina em nosso laboratório e foram expostos ao cigarro; 4) grupo β-caroteno/EFC (BC/EFC) - formado por 28 animais que receberam o β-caroteno na mesma forma que o grupo BC e foram expostos à fumaça de cigarro. A suplementação com β-caroteno e a EFC foram realizados simultaneamente, até que ratos, com peso inicial de 100g,

atingissem peso corpóreo de 200-250g. Após esse período, os ratos foram mortos por dose excessiva de anestésico e os corações removidos e utilizados para as seguintes análises: 1) comunicação intercelular, por meio de imunohistoquímica e western blotting para Conexina 43 (Cx43); 2) estresse oxidativo, por meio de dosagens de glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e hidroperóxidos de lipídeos; 3) remodelação cardíaca, por meio de análise morfométrica, e histológica (*picro sírius red* e hematoxilina-eosina) e 4) estudos bioquímicos por meio de dosagem de β-caroteno em soro e tecidos. A análise estatística foi realizada pelo teste t de *student* para os níveis de β-caroteno e ANOVA de dois fatores para as demais variáveis. A exposição à fumaça de cigarro induziu remodelação da comunicação intercelular, caracterizada

por diminuição da distribuição de Cx43 no disco intercalar bem como menor intensidade de marcação dessa proteína no disco intercalar, além de aumento da forma desfosforilada da Cx43. A fumaça de cigarro induziu também remodelação ventricular observada pelo maior valor da relação peso do ventrículo direito normalizado pelo peso corporal (VD/PC). O β-caroteno induziu menor valor das relações VD/PC, peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal (VE/PC) além de intensificar o estresse oxidativo no coração dos ratos fumantes, pela diminuição da relação GSH/GSSG. Conclusões: 1) A exposição à fumaça de cigarro causou efeito tipo precondicionamento isquêmico por meio de remodelação das junções comunicantes dos cardiomiócitos; 2) O efeito tipo precondicionamento isquêmico induzido pelo fumo não tem como mecanismo o aumento do estresse oxidativo no miocárdio.

Palavras-chave: exposição à fumaça de cigarro, comunicação intercelular, conexina 43, efeito paradoxal do fumo, β-caroteno.

Abstract

10. Abstract

In previous study performed in our laboratory, we observed which the mortality rates were lower in exposure to tobacco smoke rats than in control rats. Moreover, when the exposure to tobacco smoke rats received β-carotene supplementation this reduction of mortality was abolished. The mechanisms of lower mortality in smokers are unknown. In this context we formulated the hypothesis of that the exposure to tobacco smoke produces oxidative stress which would induce precondictioning-like effect. This effect would cause reduction of gap junctional intercellular communication. The supplementation with β-carotene would abolish the effect of the tobacco smoke. Male Wistar rats were allocated in four experimental groups: 1) Control group (C), n=30: control rats were fed a standard diet without exposure tobacco smoke; *2*) β-carotene group (BC), n= 28: rats fed the same diet supplemented with 500 mg of β-carotene/kg diet (Sigma) milled in the feed; 3) Exposure to tobacco smoke group (ETS), n=28: rats exposed to tobacco smoke; 4) BC/ETS group (BC/ETS), n=28: rats exposed to tobacco smoke plus BC supplementation. The BC supplementation and tobacco smoke exposure were performed simultaneously until the rats weighed 200 to 250 g (approximately 5 weeks). After this period of treatment the rats were killed and the serum, livers and hearts storaged to -80°C for study of: 1) intercellular communication by immunohistochemistry and western blotting for Cx43; 2) oxidative stress by dosages of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and lipid

hidroperoxides; 3) cardiac remodeling by morphometrical and histological (*picro sirius red* and hematoxilin-eosin) analyses; 4) biochemical study by BC analysis in serum end tissues. The statistical analysis was performed by t students test for BC levels and two way ANOVA for the rest of variables. The exposure to tobacco smoke induced remodeling of gap junction intercellular communication, characterized by reduction of distribution of Cx43 in the intercalated disks, lower Cx43 stain intensities at intercalated disks and increase of dephosphorilated Cx43. The exposure to tobacco smoke also induced ventricular remodeling, observed by greater values of right ventricles weight normalized by body weight (RV/BW). The BC supplementation induced a

decrease of values of RV/BW and left ventricles weight normalized by body weight (LV/BW) and intensified the oxidative stress in the heart of smoking rats by reduction of GSH/GSSG relation. Conclusions: 1) The exposure to tobacco smoke induced the preconditioning like effect by remodeling of gap junction intercellular communication of cardiomyocytes; 2) This preconditioning like effect of smoke did not have as mechanisms the increase of oxidative stress in the myocardium of rats.

Key Words: exposure to tobacco smoke, intercellular communication, connexin 43, paradoxical effect of smoke, β-carotene.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo