



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO
DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Maria Angélica Martins Lourenço

**Influência da suplementação de cajá no processo de
remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça
do cigarro em ratos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci
Coorientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

**Botucatu
2017**

Maria Angélica Martins Lourenço

**INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE CAJÁ
NO PROCESSO DE REMODELAÇÃO CARDÍACA
INDUZIDO PELA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO
CIGARRO EM RATOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. *Marcos Ferreira Minicucci*

Coorientadora: Profa. Dra. *Paula Schmidt Azevedo Gaiolla*

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lourenço, Maria Angélica Martins.

Influência da suplementação de cajá no processo de remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça do cigarro em ratos / Maria Angélica Martins Lourenço. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Marcos Ferreira Minicucci
Coorientador: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla
Capes: 40101100

1. Cajá - Nutrição. 2. Remodelação ventricular. 3. Stress oxidativo. 4. Fumo - Vício. 5. Suplementos dietéticos. 6. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes; Cajá; Cardiologia; Estresse oxidativo; Tabagismo.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

“Não é sobre chegar ao topo do mundo
e saber que venceu.
É sobre escalar e sentir
que o caminho te fortaleceu”

(Ana Vilela)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais PAULO e MARA por serem incansáveis em me apoiar a realizar meus sonhos. Por me ensinarem a dar valor a cada conquista e esta em especial só foi possível graças a vocês!

Ao amor da minha vida, VINICIUS, por ser meu porto seguro e ter me incentivado em todos os momentos! Por ter acreditado em mim mesmo quando eu mesma duvidei! Você faz parte desta conquista!

À minha irmã MARIANA e meu cunhado LEONARDO pelo companheirismo e incentivo!

Às minhas avós THEREZINHA e MARIA DE LOURDES por todo conhecimento transmitido ao longo da minha vida!

Aos meus avôs LUIZ (*in memorian*) e BENEDITO (*in memorian*) por terem sido à base da família que me sustenta! Saudades!

Amo vocês!

Agradecimento especial

A DEUS por sempre estar ao meu lado, me dando forças pra superar as dificuldades. Sou grata por ter me guiado até aqui!

Ao meu orientador Prof. Dr. MARCOS F. MINICUCCI por ter me dado a oportunidade de realizar este sonho, por ter acreditado em mim e pela paciência e sabedoria com que me orientou nesse momento tão importante da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À minha coorientadora Profa. Dra. PAULA S. A. GAIOLLA pelo auxílio na realização deste trabalho.

Ao professor Dr. LEONARDO A. M. ZORNOFF pela contribuição durante toda execução do projeto e no exame geral de qualificação.

À professora Dr. BERTHA F. POLEGATO pelos conselhos e auxílio no estudo do coração isolado e também pela colaboração no exame geral de qualificação.

Ao professor Dr. SÉRGIO A. R. DE PAIVA pelos ensinamentos, colaboração e disponibilidade.

À professora ELIRIANE JAMAS pela análise das polpas de cajá.

À professora SILMÉIA G. Z. BAZAN pela valiosa colaboração na realização dos ecocardiogramas.

À professora ANA ANGÉLICA H. FERNANDES pela colaboração com as análises bioquímicas.

À professora MARIANA G. FERRAZ e equipe pela colaboração com as análises do teste do cometa.

À professora ADRIANE G. S. M. URIBE por ter despertado em mim a paixão pela pesquisa.

À minha companheira de todas as horas TATIANA F. B. PINELLI que com sua generosidade me ajudou no protocolo de exposição à fumaça do cigarro, com a dosagem de cotinina sérica e durante todo período de execução deste trabalho. Serei eternamente grata!

À BRUNA L. B. PEREIRA por sua valiosa ajuda e pela positividade e alegria com que me ensinou a encarar as dificuldades.

À ANA CAROLINA CARDOSO por seus conselhos e ajuda com o protocolo de exposição à fumaça do cigarro.

À PATRÍCIA H. C. ALEGRE pela valiosa companhia na rotina de laboratório.

Aos demais pesquisadores envolvidos direta ou indiretamente neste projeto: AMANDA, RENATA, BRUNA CAMARGO, ANDREA, BRUNA RAFACHO, RENAN, DIEGO, PRISCILA, LÍVIA, VANESSA, FERNANDA e PAMELA. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos funcionários da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS, PÓS-GRADUAÇÃO, DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA, UNIDADE DE PESQUISA EXPERIMENTAL e BIBLIOTECA por todo suporte prestado.

À FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP - PROCESSO 2014/21310-0) pela concessão da bolsa de estudos que possibilitou a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

Resumo	1
Abstract	5
Introdução	9
Hipótese	16
Objetivo	18
Materiais e Métodos.....	20
Resultados	41
Discussão	73
Conclusão	82
Referências	84

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados morfológicos do ecocardiograma em animais não fumantes	22
Tabela 2.	Resultados funcionais do ecocardiograma em animais não fumantes	22
Tabela 3.	Características da polpa de cajá	24
Tabela 4.	Dados referentes a peso corporal e consumo de ração	43
Tabela 5.	Resultados morfológicos do ecocardiograma	45
Tabela 6.	Resultados funcionais do ecocardiograma	46
Tabela 7.	Resultados do estudo do coração isolado	50
Tabela 8.	Resultados morfométricos	52
Tabela 9.	Resultados referentes a análise de HL e enzimas antioxidantes	55
Tabela 10.	Resultados do Teste do Cometa	59
Tabela 11.	Resultados referentes ao metabolismo energético	61
Tabela 12.	Resultados referentes à expressão proteica por Western Blot	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Delineamento experimental	23
Figura 2.	Fotografias do processo de homogeneização e armazenamento do cajá	25
Figura 3.	Técnica para EFC	26
Figura 4.	Visão geral da aparelhagem para realização do estudo do coração isolado	29
Figura 5.	Modo visual objetivo de classificação das imagens TI teste do cometa	32
Figura 6.	Peso Corporal final	42
Figura 7.	Cotínina	43
Figura 8.	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal	47
Figura 9.	Diâmetro do átrio esquerdo ajustado pelo peso corporal	47
Figura 10.	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal	48
Figura 11.	Área do átrio esquerdo	48
Figura 12.	Índice de massa do ventrículo esquerdo.....	49
Figura 13.	Peso do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal	53
Figura 14.	Área seccional do miócito	53
Figura 15.	Concentração de Hidroperóxido de Lipídio	56
Figura 16.	Atividade da Catalase	56
Figura 17.	Atividade da Superóxido Dismutase	57
Figura 18.	Atividade da Glutathione Peroxidase	57
Figura 19.	Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A Desidrogenase	62
Figura 20.	Atividade da Fosfofrutoquinase	62
Figura 21.	Atividade da Lactato Desidrogenase	63
Figura 22.	Atividade da Piruvato Desidrogenase	63
Figura 23.	Atividade da Citrato Sintase	64
Figura 24.	Atividade do Complexo I	64
Figura 25.	Atividade do Complexo II	65
Figura 26.	Atividade da ATP Sintase	65
Figura 27.	Expressão de NFkB Total	68
Figura 28.	Expressão de NFkB Fosforilado	68
Figura 29.	Razão da expressão de NFkB Total/ NFkB Fosforilado	69
Figura 30.	Expressão de SIRT-1	69
Figura 31.	Expressão de NRF-2	70
Figura 32.	Expressão de IL-10	70
Figura 33.	Expressão de IFN Gamma	71
Figura 34.	Expressão de Colágeno tipo I	71
Figura 35.	Expressão de Colágeno tipo III	72

LISTA DE ABREVIACÕES

% ENC	Porcentagem de encurtamento
+dP/dtmax	Derivada positiva máxima de pressão
AE/PC	Razão entre diâmetro do átrio esquerdo e peso corporal final
AGs	Ácidos graxos
AO/PC	Razão entre diâmetro da aorta e peso corporal final
ÁREA AE	Área do átrio esquerdo
ASM	Área da secção transversa dos miócitos
ATP	Adenina Trifosfato
CO	Grupo controle + ração padrão
C100	Grupo controle + cajá 100 mg/kg de peso/dia
C250	Grupo controle + cajá 250 mg/kg de peso/dia
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
Cul3	Cullin 3
DDVE	Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
DDVE/PC	Razão entre DDVE e peso corporal final
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNPB	Dinitrofenil-hidralazina
-dP/dtmax	Derivada negativa máxima de pressão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DSVE	Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
DSVE/PC	Razão entre DSVE e peso corporal final
E/A	Razão entre ondas E e A do fluxo transmitral
E/E´	Razão entre onda E e E´
E´	Velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole
EDPP	Espessura diastólica da parede posterior do VE
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFC	Exposição à fumaça do cigarro
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ENDO III	Endonuclease III
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Esp. Rel. VE	Espessura relativa do ventrículo esquerdo
F0	Grupo fumante + ração padrão
F100	Grupo fumante + cajá 100 mg/kg de peso/dia
F250	Grupo fumante + cajá 250 mg/kg de peso/dia
FC	Frequência cardíaca

FE	Fração de ejeção
FPG	Formamidopirimidina DNA glicosilase
GSH-Px	Glutationa peroxidase
HL	Hidroperóxido de lipídio
iECA	Inibidor da enzima conversora de angiotensina
IFN-γ	Intérferon gamma
IMVE	Índice de massa do ventrículo esquerdo
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ISP	Isoproterenol
ITAL	Instituto de Tecnologia dos Alimentos
Keap1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotideo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato
NFκB	Fator nuclear- κ B
NRF-2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
P Desenvolvida	Pressão desenvolvida
PC	Peso corporal final
PDH	Piruvato desidrogenase
PFK	Fosfofrutoquinase
PPAR- α	Receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa
PS	Pressão sistólica
RC	Remodelação cardíaca
S	Onda sistólica do anel mitral septal
SIRT-1	Sirtuína 1
SOD	Superóxido dismutase
β-OH acil CoA DH	β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase
TDE	Tempo de desaceleração da onda E
TI	Tail intensity
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TRIV c	Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela FC
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os efeitos da exposição à fumaça do cigarro (EFC) sobre o sistema vascular são amplamente conhecidos, entretanto, estudos recentes mostram que esta exposição resulta em efeitos maléficos diretos ao miocárdio levando à remodelação cardíaca (RC). Devido ao grande impacto sócio econômico e às altas taxas de mortalidade, torna-se relevante a identificação de fatores que modulem o processo de RC e podemos destacar a suplementação de alimentos com propriedades antioxidantes, como o cajá (*Spondias mombin*).

OBJETIVO: Avaliar a influência da suplementação de cajá no processo de remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça do cigarro em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS: O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram estudados três grupos não expostos à fumaça do cigarro: C0 (controle + ração padrão); C100 (controle + cajá 100 mg/kg de peso/dia); C250 (controle + cajá 250 mg/kg de peso/dia). Após dois meses de suplementação os animais foram submetidos a um ecocardiograma. Na segunda etapa, considerando não haver diferença na comparação entre C0, C100 e C250, as análises foram realizadas com os seguintes grupos: C0 (controle + ração padrão); F0 (fumo + ração padrão); F100 (fumo + ração padrão acrescida de cajá a 100 mg/kg de peso/dia) e F250 (fumo + ração padrão acrescida de cajá a 250 mg/kg de peso/dia). A suplementação de cajá foi realizada por meio da casca e polpa da fruta homogeneizadas e acrescidas na ração padrão. Após a suplementação por 2 meses foi realizado estudo funcional, morfométrico e bioquímico. Para as variáveis paramétricas, foi realizado o teste ANOVA de 1 (pós-teste de Tukey) e os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis (pós-teste de Dunn) e os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil. As variáveis foram consideradas não paramétricas quando não passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS: Os animais fumantes (F0, F100 e F250) apresentaram consumo de ração e peso corporal final (PC) inferior aos animais controle (C0). Considerando a dosagem de cotinina sérica, os animais fumantes apresentaram maior concentração em comparação com os animais controle. Entretanto, na comparação entre os grupos fumantes não houve diferença estatisticamente significativa. A EFC

induziu alterações morfológicas e morfométricas no ventrículo esquerdo (VE), visto pelos valores maiores de diâmetro diastólico e sistólico do VE ajustados pelo PC (DDVE/PC e DSVE/PC, respectivamente), área e diâmetro do átrio esquerdo ajustado pelo PC (ÁREA AE e AE/PC, respectivamente), índice de massa do VE (IMVE), peso do VE ajustado pelo PC (VE/PC) e área seccional do miócito (ASM) em relação aos animais controle. Já os animais suplementados com cajá a 250 mg/kg de peso/dia apresentaram menores valores de DDVE/PC, ÁREA AE e ASM em comparação com o grupo FO. Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis do estudo do coração isolado. Em relação ao estresse oxidativo, o grupo FO apresentou maior concentração de hidroperóxido de lipídico (HL) em comparação com o grupo CO e os animais suplementados com cajá a 100 e 250 mg/kg de peso/dia apresentaram menores valores em comparação com o grupo FO. Os animais fumantes apresentaram menor valor de atividade de catalase (CAT) em comparação com animais controle. O grupo FO apresentou menor valor de atividade de superóxido dismutase (SOD) em comparação com o grupo CO e os animais suplementados com cajá a 100 e 250 mg/kg de peso/dia apresentaram maiores valores de atividade de SOD em comparação com o grupo FO. Os animais fumantes apresentaram menor valor de atividade de glutathiona peroxidase (GSH-Px) em comparação com o grupo CO, sendo que os animais suplementados com cajá a 100 e 250 mg/kg de peso/dia apresentaram maior valor de atividade de GSH-Px em comparação com o grupo FO. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na concentração de proteína carbonila e no teste do cometa tanto em relação ao efeito da EFC quanto da suplementação de cajá. Em relação ao metabolismo energético, o grupo FO apresentou menor valor de atividade da enzima β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (β -OH Acil CoA-DH) quando comparado ao grupo CO. Já o grupo F100 apresentou valores maiores de β -OH AcilCoA-DH em comparação com o grupo FO. Considerando a atividade da fosfofrutoquinase (PFK) e lactato desidrogenase (LDH), os grupos FO e F100 apresentaram maior atividade destas enzimas em comparação com o grupo CO. O grupo F250, por sua vez, apresentou menor atividade de PFK e LDH em comparação ao grupo FO e F100. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à atividade da piruvato desidrogenase (PDH). Os grupos

fumantes apresentaram valores inferiores referentes à atividade da citrato sintase (CS) em comparação com o grupo C0. E o grupo F250 apresentou valores superiores de CS em comparação ao grupo F0. Em relação ao complexo I, os grupos fumantes obtiveram valores inferiores quando comparados ao grupo C0 e o grupo F250 apresentou maiores valores em relação ao grupo F0 e ao grupo F100. Considerando a análise da atividade do complexo II, os grupos F0 e F100 apresentaram menores valores quando comparados ao grupo C0 e o grupo F250 apresentou maiores valores em relação aos grupos F0 e F100. Já em relação à atividade da ATP sintase, os grupos fumantes apresentaram menores valores em comparação ao grupo C0. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes na expressão proteica de fator nuclear derivado de eritróide-2 (NRF-2), sirtuina 1 (SIRT-1), fator nuclear-kB total (NFkB), fator nuclear-kB fosforilado (pNFkB), relação NFkB/pNFkB, interleucina 10 (IL-10), intérferon gamma (IFN- γ), colágeno tipo I e tipo III.

CONCLUSÃO: A EFC resultou em RC, piorou o estresse oxidativo e alterou o metabolismo energético cardíaco. A suplementação de cajá atenuou o processo de RC, melhorou o estresse oxidativo e as alterações no metabolismo energético induzidos pela EFC em ratos.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The effects of exposure to tobacco smoke (ETS) on the vascular system are widely known, however, recent studies showed that this exposure results in direct myocardial effects leading to cardiac remodeling (CR). Due to the high socioeconomic impact and the high mortality rates, it is relevant to identify factors that modulate the CR process and we can highlight the supplementation of foods with antioxidant properties, such as cajá (*Spondias mombin*).

OBJECTIVE: The objective of this study is to evaluate the influence of cajá supplementation on the cardiac remodeling process induced by ETS in rats.

MATERIALS AND METHODS: The study was carried out in two stages. In the first stage, three groups not exposed to tobacco smoke were studied: C0 (control + standard chow); C100 (control + cajá 100 mg / kg of body weight / day); C250 (control + cajá 250 mg / kg of body weight / day). After two months of supplementation the animals were submitted to an echocardiogram. In the second step, considering that there was no difference in the comparison between C0, C100 and C250, the analyzes were performed with the following groups: C0 (control + standard chow); F0 (smoke + standard chow); F100 (smoke + cajá 100 mg / kg body weight / day) and F250 (smoke + cajá 250 mg / kg body weight / day). The cajá supplementation was carried out with the peel and pulp of the fruit homogenized and added in the standard chow. After 2 months of supplementation, a functional, morphometric and biochemical study was performed. For the parametric variables, we used one-way ANOVA test followed by Tukey's post-test and the values obtained were presented as mean \pm standard deviation. For the non-parametric variables, the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post-test was performed and the values obtained were presented as median and interquartile range. The variables were considered non-parametric when they did not pass the Kolmogorov-Smirnov normality test. The level of significance was 5%.

RESULTS: Smokers (F0, F100 and F250) presented lower chow intake and final body weight (BW) than control animals (C0). Considering the serum cotinine dosage, the smoked animals presented higher concentration in comparison to the control animals. However, in the comparison between smoking groups there was no statistically significant difference. The ETS induced morphological and morphometric changes in the left ventricle (LV), as seen by the higher values of

left ventricular diastolic and systolic diameter adjusted by BW (LVDD/BW and LVSD/BW, respectively), area and diameter of the left atrium adjusted by BW (area AL and AL/BW, respectively) LV mass index, LV weight adjusted by BW and myocardial sectional area (MSA) in relation to control animals. On the other hand, animals supplemented with cajá at 250 mg / kg of body weight / day presented lower values of, LVDD/BW, area AL and MSA compared to group F0. There was no statistically significant difference for the variables of the isolated heart study. In relation to oxidative stress, the F0 group had a higher lipid hydroperoxide (LH) concentration compared to the C0 group, and animals supplemented with 100 and 250 mg / kg body weight / day presented lower values when compared to the group F0. Smokers had lower values of catalase activity (CAT) compared to control animals. The F0 group had a lower value of superoxide dismutase activity (SOD) compared to the C0 group and the animals supplemented with cajá at 100 and 250 mg / kg of body weight / day had higher values of SOD activity compared to the group F0. Smokers had a lower value of glutathione peroxidase (GSH-Px) activity compared to the C0 group, and animals supplemented with cajá at 100 and 250 mg / kg of body weight / day showed higher values of GSH-Px activity in comparison with the F0 group. No statistically significant differences were observed in the carbonyl protein concentration and in the comet test both in relation to the effect of the ETS and the supplementation of cajá. In relation to the energetic metabolism, the F0 group had lower activity value of the enzyme β -hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase (β -OH Acyl CoA-DH) when compared to the C0 group. The F100 group presented higher values of β -OH Acyl CoA-DH compared to the F0 group. Considering the activity of phosphofructokinase (PFK) and lactate dehydrogenase (LDH), the F0 and F100 groups showed higher activity of these enzymes compared to the C0 group. The F250 group, on the other hand, had lower PFK and LDH activity compared to the F0 and F100 groups. No statistically significant differences were observed in relation to pyruvate dehydrogenase (PDH) activity. The smoking groups had lower values regarding citrate synthase activity (CS) compared to the C0 group. In addition, the F250 group had higher CS values than the F0 group. In relation to the complex I, the smoking groups obtained lower values when compared to the group C0 and the group F250 presented higher

values in relation to the group F0 and the group F100. Considering the analysis of the activity of the complex II, the groups F0 and F100 presented smaller values when compared to the group C0 and the group F250 presented higher values in relation to the groups F0 and F100. Regarding ATP synthase activity, the smoking groups had lower values in comparison to the C0 group. No significant differences were observed in protein expression of erythroid-2 nuclear factor (NRF-2), sirtuin 1 (SIRT-1), total nuclear-kB factor (NFkB), nuclear kB factor phosphorylated (pNFkB), NFkB / pNFkB, interleukin 10 (IL-10), gamma interferon (IFN- γ), type I and type III collagen.

CONCLUSION: ETS resulted in CR, worsening oxidative stress, and altered cardiac metabolism. Cajá supplementation attenuated the cardiac remodeling process, improved oxidative stress, and changes in energetic metabolism induced by ETS in rats.

INTRODUÇÃO

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, o tabagismo é uma das maiores ameaças a saúde pública mundial. Apesar do declínio na prevalência do tabagismo nos últimos 50 anos, a exposição à fumaça do cigarro (EFC) continua sendo a principal causa evitável de morte no mundo, sendo responsável pelo óbito de mais de 6 milhões de pessoas por ano. No Brasil, ocorrem 200 mil óbitos por ano. Caso a atual situação não seja modificada, a previsão para o ano 2.020 é ocorrerem, no mundo, 10 milhões de óbitos, sendo 7 milhões nos países em desenvolvimento (1,2).

Mais de 4 mil substâncias químicas foram identificadas na fumaça do cigarro, divididas em 2 fases: a fase gasosa, onde encontra-se principalmente monóxido de carbono e dióxido de carbono e a fase particulada, cujo componente principal é a nicotina (3).

No sistema cardiovascular, a EFC é fator de risco conhecido para aterosclerose, disfunção endotelial, ruptura da placa de ateroma, síndrome coronariana aguda e morte súbita (4,5). Entretanto, estudos têm avaliado seus efeitos diretos ao miocárdio. Em estudos clínicos, observou-se que a EFC é fator de risco para hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) e disfunção cardíaca independente da presença de aterosclerose e hipertensão (6-8). Em estudos experimentais, observou-se que a EFC leva a alterações cardíacas e prejuízo da função ventricular em ratos (9-11).

De fato, estes estudos têm mostrado que a EFC induz o aumento das câmaras cardíacas e hipertrofia do VE, resultando em remodelação cardíaca (RC), com conseqüente diminuição da função ventricular (9-11).

A RC é caracterizada por variações gênicas, moleculares, celulares e intersticiais, que irão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão (12).

Inicialmente, a RC tem como objetivo manter a função cardíaca, porém com a progressão e continuidade da agressão leva a disfunção ventricular progressiva, insuficiência cardíaca e morte súbita (12,13).

Os mecanismos potenciais para estas alterações incluem mudanças hemodinâmicas e neurohormonais, aumento do estresse oxidativo, inflamação, biodisponibilidade do óxido nítrico, alterações geométricas, ativação de proteínas

quinases ativadas por mitógenos (MAPK), entre outros (14). Dentre estes mecanismos as alterações no metabolismo energético, estresse oxidativo e processo inflamatório se destacam.

Sob condições normais os ácidos graxos (AGs) são os principais substratos utilizados para produção de energia via β -oxidação mitocondrial. No entanto, em situações de agressão cardíaca como na RC, o coração passa a utilizar outros substratos importantes para produção de energia como carboidratos, tais como glicose, lactato e piruvato (15). Tal evento pode ser notado pelo aumento da atividade de fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH) e piruvato desidrogenase (PDH), enzimas importantes do metabolismo glicolítico, assim como pela diminuição da atividade de β -hidroxiacil Coenzima A desidrogenase (β -OH acil CoA DH), uma das principais enzimas envolvidas na β -oxidação (9).

Nos estágios iniciais, as alterações no metabolismo energético são consideradas cruciais para proteção do coração de danos irreversíveis. Porém, cronicamente, gera déficit de energia o que contribui para a disfunção cardíaca (16).

De fato, os AGs que deixam de ser oxidados passam a ser acumulados no interior do miócito, processo conhecido como lipotoxicidade (9). A lipotoxicidade cardíaca causada pela EFC é considerada indutor potencial de apoptose e disfunção ventricular (17).

É importante mencionar que a respiração mitocondrial não é só importante para a geração de ATP, mas também está envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). De fato estudos anteriores sugerem que a EFC aumenta a atividade da NADPH oxidase, fonte importante de EROs, resultando em estresse oxidativo (11,18).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre as EROs e as defesas antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GSH-Px) (19).

Estudos mostraram que o estresse oxidativo induzido pela EFC é importante mecanismo para o desenvolvimento de alterações cardíacas (20,21). De fato, além da EFC gerar danos mitocondriais com consequente aumento da formação de EROs, a fumaça do cigarro é rica em metabólitos e espécies reativas,

umentando ainda mais este desequilíbrio (20). O estresse oxidativo está associado à peroxidação lipídica, danos a proteínas e ao DNA, gerando anormalidades na matriz extracelular, nas proteínas contráteis dos miócitos, levando a hipertrofia e, até mesmo, a morte dos miócitos (19).

Em modelos experimentais, a EFC induziu aumento do hidroperóxido de lipídio (HL), marcador importante de peroxidação lipídica, e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GSH-Px, o que foi relacionado com aumento na espessura da parede posterior e massa do VE (9,20).

Embora as EROs sejam responsáveis por uma série de eventos patológicos, estudos mostram que em concentrações nanomolares desempenham papel importante em processos fisiológicos, principalmente em vias de transdução de sinal, nas quais atuam como segundo mensageiro, além de modular fatores de transcrição gênica como fator nuclear derivado de eritróide 2 (NRF-2), sirtuína 1 (SIRT-1) e fator nuclear- κ B (NF κ B) (22-25).

O NRF-2 é um relevante fator de transcrição que ativa genes codificantes de proteínas antioxidantes, podendo ser agente protetor cardíaco via regulação negativa das MAPKs, reduzindo a ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios (22). De fato, estudos experimentais mostraram que a deficiência de NRF-2 tem papel importante na patogênese da RC e da insuficiência cardíaca em diferentes modelos de agressão (23).

A SIRT-1 é uma histona desacetilase dependente de NAD, que emergiu como regulador crítico em resposta ao estresse oxidativo. Através do antagonismo da lesão celular e da manutenção da homeostase metabólica, SIRT-1 parece bloquear a lesão do sistema cardiovascular. Estes fatores transcricionais parecem estar diminuídos na lesão cardíaca e desta forma, tem sido aceito que as espécies reativas podem intensificar o processo de RC e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (24).

Já em relação ao processo inflamatório, em modelos de falência cardíaca observou-se que o aumento da produção de citocinas está relacionado ao processo de RC. Além disso, observou-se que altas concentrações de interferon gamma (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão relacionadas à

disfunção do VE, caquexia, ativação do programa genético fetal, apoptose, hipertrofia e fibrose (26).

Neste aspecto a ativação da via NF κ B tem papel central na inflamação. O NF κ B é responsável por regular genes que codificam citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, quimiocinas, fatores de crescimento, enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (27). Além disso, NF κ B é um fator de transcrição sensível ao estresse oxidativo, de modo que o estado redox intracelular é extremamente importante na regulação da atividade de NF κ B (25).

Mediante ao exposto, torna-se importante o estudo dos mecanismos envolvidos na RC e de intervenções com o objetivo de atenuar este processo. Estudos mostram que a suplementação de substâncias com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios tem atenuado a RC induzida pela EFC (20,28,29).

Em estudo experimental sobre o papel da vitamina D na RC induzida pela EFC, observou-se que a vitamina D modula a RC pela ação de sua capacidade antioxidante na hipertrofia cardíaca, já que diminuiu as concentrações de HL e aumentou a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (20). Do mesmo modo, a suplementação de betacaroteno após um mês de EFC reduziu o estresse oxidativo, visto pela redução da concentração de HL, e atenuou o processo de RC, visto pela melhora da morfologia e função cardíaca (29).

Dentre os alimentos com potencial anti-inflamatório e antioxidante, destaca-se o cajá (*Spondias mombin*), pequeno fruto de forma ovóide (aproximadamente 3-4cm de diâmetro) caracterizado por apresentar suco doce/amargo de sabor e aroma característicos. Este fruto vem apresentando crescente aceitação no mercado nacional e internacional. No Brasil, é encontrado principalmente nos estados do norte e nordeste, onde recebe diferentes denominações, tais como: cajá, cajá verdadeiro, cajá-mirim ou taperebá (30-32).

Postula-se que os componentes bioativos com capacidades antioxidantes presentes no cajá podem contribuir para menor incidência de doenças cardiovasculares (33).

A suplementação com extrato metanólico da folha de cajá vem sendo vinculada aos potenciais efeitos antioxidantes, com redução significativa de espécies

reativas, provavelmente devido ao conteúdo fitoquímico, tornando a planta potencial agente quimioprolático natural (34).

Estudo realizado com o objetivo de investigar os efeitos do extrato metanólico da folha de cajá sobre a inflamação e seus possíveis mecanismos, sugere que a suplementação com cajá pode atenuar as respostas inflamatórias, por aumentar a atividade sequestradora de radicais livres, observada pela alta porcentagem de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e, assim, diminuir as concentrações de TNF- α e iNOS, o que poderia ser uma via de supressão da produção de mediadores pró-inflamatórios (34).

É importante mencionar que grande parte dos estudos foram realizados com o extrato da folha do cajá, porém sabe-se que todas as partes da planta apresentam potenciais efeitos medicinais (35).

De fato, a polpa do cajá possui elevado teor de carotenóides como a β -criptoxantina, luteína e alfa e betacaroteno, sendo a β -criptoxantina o principal carotenóide encontrado no fruto (65 μ g/250g de cajá), representando alta atividade pró-vitamina A, de modo que uma porção de 100g de polpa de cajá pode fornecer mais de 37% da dose diária recomendada de vitamina A (36).

Estudo que avaliou o efeito da suplementação de β -criptoxantina no pulmão de animais fumantes observou que a β -criptoxantina tem efeitos benéficos contra a inflamação pulmonar e lesão oxidativa do DNA induzida pela EFC, além de ser um agente quimiopreventivo potencialmente eficaz contra o desenvolvimento de câncer de pulmão (37).

Também são encontrados no cajá compostos fenólicos. Vasco *et al.* analisaram o conteúdo fenólico do cajá e encontraram valores totais próximos de 249mg/100g (38). Os compostos fenólicos potencialmente envolvidos nos efeitos antioxidantes do cajá são o ácido gálico, os hidroxicinamatos (incluindo o ácido cumárico) e o ácido cafeico e seus derivados (como o ácido clorogênico) (39).

Além disso, o cajá apresenta flavonóides em sua composição, sendo que a quercetina e o ácido elágico parecem ter maior relevância. Estudo sobre a composição química, a atividade antioxidante e anti-bactericida de duas espécies de cajá mostrou que a quercetina (2,36 \pm 0,01mg/g) e ácido elágico (41,56 \pm 0,01mg/g) eram os principais flavonóides presentes (40).

Sabendo que estes compostos antioxidantes presentes no cajá se caracterizam por eliminar as espécies reativas, reduzindo o grau de estresse oxidativo e, desta forma, previnem a oxidação de biomoléculas, que pode desencadear na deterioração de funções fisiológicas, como no caso de doenças cardiovasculares (33) estes resultados permitem classificar o cajá como fruto com ótima atividade antioxidante (40).

Entretanto, a ação cardioprotetora do cajá ainda é pouco discutida na literatura. Em estudo pioneiro, foi avaliado o efeito cardioprotetor da suplementação do extrato da folha de cajá (100mg/kg/dia e 250mg/kg/dia) em modelo de infarto agudo do miocárdio induzido por isoproterenol (ISP), comparado ao efeito do ramipril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (iECA). Os autores concluíram que a suplementação com cajá antes da agressão miocárdica, protegeu significativamente contra o estresse oxidativo induzido pelo ISP, tanto a nível sistêmico quanto diretamente no tecido cardíaco. Houve redução da concentração de malondealdeído, efeito comparado ao da administração de ramipril. Além disso, o significativo aumento na atividade da SOD e CAT nos grupos tratados com cajá em comparação com o grupo que recebeu ISP reforça ainda mais a propriedade antioxidante deste fruto (41).

Os mecanismos de cardioproteção do cajá parecem envolver a melhora da função contrátil cardíaca, a prevenção do rompimento de miofibrilas cardíacas, a integridade da membrana de cardiomiócitos e a redução do estresse oxidativo (41). Entretanto, ainda não há estudos sobre suplementação de cajá no modelo de RC induzido por EFC.

HIPÓTESE

Mediante ao exposto, acreditamos que, por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, a suplementação de cajá possa atenuar o processo de RC induzido pela EFC em ratos.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da suplementação de cajá no processo de RC induzido pela EFC em ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento

O protocolo deste trabalho (1116-2015) foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, estando de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g, provenientes do Biotério da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água, controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 25° C) e de umidade.

O estudo foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foram estudados três grupos, a fim de identificar possíveis efeitos da suplementação de cajá em animais não expostos à fumaça do cigarro:

- 1) Grupo C0 (n=20), formado por animais alimentados com ração comercial padrão;
- 2) Grupo C100 (n=20), formado por animais alimentados com ração comercial acrescida de cajá (100 mg de extrato/kg de peso corporal/dia);
- 3) Grupo C250 (n=20), formado por animais alimentados com ração comercial acrescida de cajá (250 mg de extrato/kg de peso corporal/dia).

Após dois meses de suplementação os animais foram submetidos a um ecocardiograma, em que não foram observadas alterações significativas de morfologia e função cardíaca, conforme representado pelas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Resultados morfológicos do ecocardiograma em animais não fumantes

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo C100 (n=20)	Grupo C250 (n=20)	Valor p
PC (g)	410,8± 15,60	409,5± 19,74	410,5 ±17,70	0,973
DDVE (mm)	6,885± 0,600	7,007± 0,717	6,806± 0,589	0,605
DDVE/PC (mm/kg)	16,75± 1,099	17,13± 1,770	16,61± 1,631	0,542
DSVE (mm)	2,894± 0,558	3,064 ±0,639	3,009± 0,495	0,627
DSVE/PC (mm/kg)	7,025± 1,209	7,482± 1,496	7,346± 1,246	0,536
AE/PC (mm/kg)	11,38 (11,12-12,22)	11,50 (11,02- 12,42)	11,17 (10,75-12,37)	0,755
AE/Ao	1,386 (1,239- 1,434)	1,317 (1,226- 1,386)	1,370 (1,296- 1,417)	0,352
EDPP (mm)	1,530 (1,530- 1,790)	1,530 (1,280- 1,605)	1,530 (1,530- 1,790)	0,243
Esp. Rel. VE	0,464 (0,415-0,498)	0,415 (0,379-0,480)	0,456 (0,428- 0,483)	0,133
IMVE (g/kg)	1,815± 0,346	1,726± 0,308	1,782± 0,422	0,736

Grupo C0: animais alimentados com dieta padrão; Grupo C100: animais alimentados com dieta padrão acrescida de cajá (100 mg/kg/dia); Grupo C250: animais alimentados com dieta padrão acrescida de cajá (250 mg/kg/dia); PC: peso corporal final; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE/PC: diâmetro diastólico do VE ajustado pelo PC; DSVE: diâmetro sistólico do VE; DSVE/PC: diâmetro sistólico do VE ajustado pelo PC; AE/PC: diâmetro do átrio esquerdo (AE) ajustado pelo PC; AE/Ao: relação entre os diâmetros do AE e da aorta; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do VE. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Tabela 2. Resultados funcionais do ecocardiograma em animais não fumantes

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo C100 (n=20)	Grupo C250 (n=20)	Valor p
FC(bpm)	295,5 (275,5- 345,5)	290,0 (271,0- 318,5)	290,0 (258,0- 325,0)	0,537
FE(%)	0,929 (0,903- 0,947)	0,909 (0,886- 0,944)	0,913 (0,900- 0,934)	0,350
%ENC(%)	58,16± 5,820	56,49± 6,335	55,93± 4,871	0,442
S(cm/s)	5,500 (5,200- 5,700)	5,500 (5,200- 5,700)	5,200 (5,150- 5,400)	0,084
E/A	1,589 (0,144- 0,032)	1,673 (0,187- 0,042)	1,663 (0,168- 0,038)	0,232
E/E'	13,32 (12,242- 14,65)	13,89 (11,96- 15,80)	13,99(12,54- 14,99)	0,643
TDE(ms)	49,20 (5,288- 1,182)	49,50 (7,023- 1,570)	51,80 (4,561- 1,020)	0,298
TRIVc(ms)	0,089± 0,020	0,090± 0,025	0,093± 0,026	0,803

Grupo C0: animais alimentados com dieta padrão; Grupo C100: animais alimentados com dieta padrão acrescida de cajá (100 mg/kg/dia); Grupo C250: animais alimentados com dieta padrão acrescida de cajá (250 mg/kg/dia); FC: frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; %ENC: porcentagem de encurtamento; S:onda sistólica do anel mitral septal; E/A: relação entre as ondas E e A; E/E': relação entre onda E e velocidade do pico do Doppler tissular na protodiástole; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico ajustado pela FC. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Na segunda etapa, considerando não haver diferença em relação à suplementação de cajá no coração de ratos não expostos à fumaça do cigarro, as análises foram realizadas com os seguintes grupos:

- 1) Grupo C0 (n=20), formado por animais não expostos à fumaça do cigarro e alimentados com ração comercial padrão;
- 2) Grupo F0 (n=20), formado por animais expostos à fumaça do cigarro e alimentados com ração comercial padrão;
- 3) Grupo F100 (n=20), formado por animais expostos à fumaça do cigarro e alimentados com ração comercial acrescida de cajá (100 mg de extrato/kg de peso corporal/dia);
- 4) Grupo F250 (n=20), formado por animais expostos à fumaça do cigarro e alimentados com ração comercial acrescida de cajá (250 mg de extrato/kg de peso corporal/dia);

Como mostrado na figura a seguir.

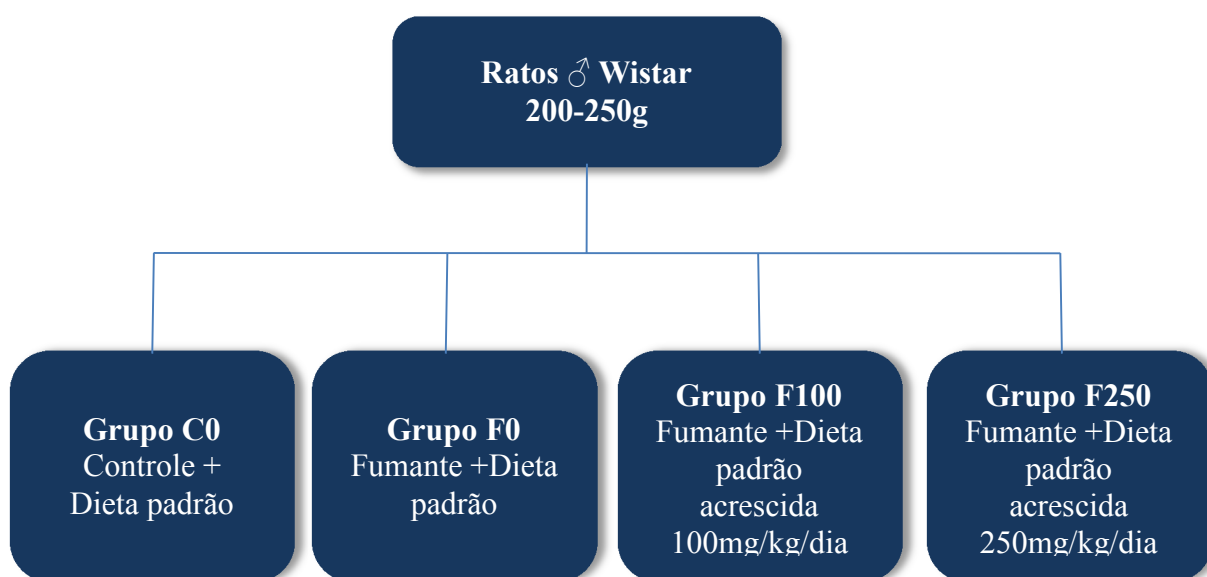


Figura 1. Delineamento experimental

Os animais foram observados por dois meses. Após esse período os animais foram submetidos a avaliações morfológicas, funcionais e bioquímicas. O tempo de observação foi definido baseado em trabalhos anteriores, onde esse tempo de EFC foi suficiente para induzir os efeitos deletérios característicos da RC (16). Em relação ao tamanho amostral, considerou-se 20 o número adequado de animais por

grupo, visto que esse número foi suficiente em estudos anteriores para mostrar as diferenças entre os grupos (11,16,20,29).

Suplementação com Cajá

A casca e a polpa do cajá foram adquiridas de uma única vez e então homogeneizadas (Figura 2) e acrescidas na ração padrão, descontando a porcentagem de água verificada através de análise prévia (Tabela 3). A suplementação do cajá ocorreu em duas diferentes dosagens de 100 e 250 mg de extrato seco/kg de peso corporal/dia. A análise de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e de carotenóides totais foram realizadas no Instituto de Tecnologia dos Alimentos (ITAL), baseada no método proposto por Kim e colaboradores (42), Brand-Williams e colaboradores (43) e Carvalho e colaboradores (44), respectivamente.

Para confeccionar a ração, foram utilizados como base a média de peso e de consumo de ração verificada em estudos anteriores (11,16,20,29). De modo que, nas dosagens de 100 e 250mg/kg/dia foi adicionado 21,5g e 54g de polpa de cajá em 1 kg de ração padrão, respectivamente. Esta dosagem foi baseada no estudo de Akinmoladun e colaboradores (41). De acordo com a fórmula proposta por Reagan-Shaw e colaboradores (45) é possível fazer a equivalência da suplementação em ratos para humanos. Desta forma, a suplementação de 100 e 250mg/kg/dia equivale a 329g e 610g/dia para um homem de 60 kg, respectivamente.

Tabela 3. Características da polpa de cajá

Característica	Resultado
Carboidrato (g/100g)	8,72
Proteína (g/100g)	0,87
Lipídios (g/100g)	1,51
Cinzas (g/100g)	0,70
Umidade (%)	88,2
Compostos fenólicos totais expressos em ácido gálico (mg/100g)	96,74
Atividade Antioxidante (DPPH) (g DPPH/Kg)	12,84
Carotenóides totais expressos como beta caroteno (mg/100g)	4,28

É importante mencionar que a suplementação de 100 e 250 mg de extrato seco/kg de peso corporal/dia equivale a 26 μ g e 65 μ g de β -criptoxantina, respectivamente (46), e que estas quantidades de carotenóides apresentaram efeitos antioxidantes em estudos experimentais prévios (47).

A ingestão da dieta foi avaliada diariamente e o peso semanalmente. Em relação ao consumo de ração dos animais é importante mencionar, que durante todo o experimento a oferta de ração dos animais do grupo controle foi baseada no consumo dos animais fumantes.



Figura 2. Fotografias do processo de homogeneização e armazenamento do cajá.

Exposição à fumaça do cigarro

Para expor os animais à fumaça de cigarro, foi utilizado o método proposto por Wang *et al* (48), já padronizado em nosso laboratório (11,16,20,29). Os ratos foram colocados em câmara transparente, cujas medidas são, aproximadamente, 95x80x65 cm; a câmara foi conectada ao dispositivo para produção de fumaça dos cigarros (Figura 3). A fumaça dos cigarros foi então aspirada por vácuo e veiculada para câmara em que estavam alojados os animais, durante período de 30 minutos. Após esse período, a fumaça foi exaurida e o procedimento repetido. Na primeira semana, a fumaça foi obtida a partir de cinco cigarros, duas vezes por dia no período da manhã, com intervalos de descanso de

10 minutos. O número de cigarros foi aumentado para o total de 10 cigarros/30 minutos, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde a partir da segunda semana. Assim, durante o restante do período de estudo experimental, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia. O cigarro utilizado, cigarro comercial comum, apresenta a seguinte composição: 0,8 mg de nicotina, 10 mg de alcatrão e 8 mg de monóxido de carbono.

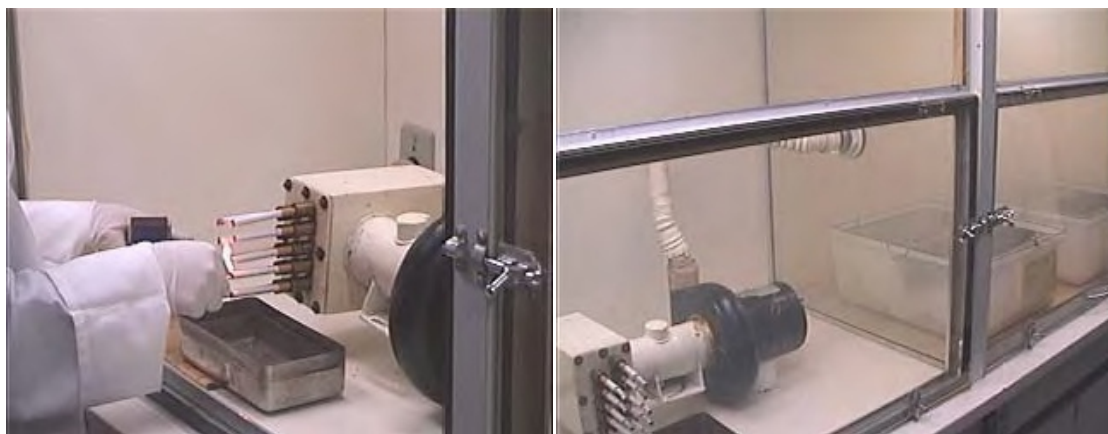


Figura 3. Técnica para EFC.

Avaliação funcional "in vivo" – Estudo ecocardiográfico

Após os dois meses de suplementação, nos dois ecocardiogramas realizados, os ratos foram anestesiados com cloridrato de quetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg) por via intraperitoneal. A seguir, realizou-se a tricotomia da região anterior do tórax e os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel), dotado de transdutor multifrequencial de 5,0 a 11,5MHz. A avaliação dos fluxos transvalvar mitral e aórtico foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0MHz e as estruturas do coração foram medidas em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. Todas as variáveis foram obtidas de acordo com as recomendações da *American Society of Echocardiography* (49).

Foram avaliadas as seguintes variáveis estruturais:

- Razão diâmetro do átrio esquerdo (AE) e peso corporal final (AE/PC);
- Razão AE e diâmetro da aorta (AE/Ao);
- Diâmetro diastólico do VE (DDVE);
- Razão DDVE/PC;
- Diâmetro sistólico do VE (DSVE);
- Razão DSVE/PC;
- Área do átrio esquerdo (ÁREA AE);
- Espessura diastólica da parede posterior (EDPP) do VE;
- Espessura relativa do VE (Esp. Rel. VE) ($2 \times \text{EDPP} / \text{DDVE}$);
- Índice de massa do VE (IMVE), (MVE/PC), sendo que $\text{MVE} = [(\text{DDVE} + \text{EDPP} + \text{EDSIV})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04$.

A função sistólica do VE foi avaliada pelas seguintes variáveis:

- Frequência cardíaca (FC);
- Onda sistólica do anel mitral septal (S);
- Fração de ejeção ($\text{FE} = [(\text{DSVE}^3 - \text{DDVE}^3) / \text{DDVE}^3] \times 100$);
- % de encurtamento ($\% \text{ ENC} = [(\text{DDVE} - \text{DSVE}) / \text{DDVE}] \times 100$);

A função diastólica do VE foi analisada por:

- Razão de onda E/A do fluxo transmitral (E/A);
- Razão entre onda E e velocidade de pico do Doppler tissular miocárdico na protodiástole (E/E');
- Tempo de desaceleração da onda E (TDE);
- Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado para a frequência cardíaca ($\text{TRIV} = \text{TRIV} / \text{RR}^{0,5}$, onde RR é a distância de um batimento a outro).

Avaliação funcional "in vitro" - Estudo do Coração Isolado

Após a realização do ecocardiograma, 8 animais de cada grupo, receberam tiopental (80 mg/kg) e heparina (2000 UI) por via intraperitoneal e foram ventilados com pressão positiva e oxigênio a 100%. A seguir, o tórax foi aberto, a aorta cateterizada com cânula de metal número 15 e foi iniciada a

perfusão miocárdica retrógrada, com solução nutriente de Krebs-Henseleit, com a seguinte composição, em mmol/l: 115 NaCl; 5,4 KCl; 1,2 MgSO₄; 2,5 CaCl₂; 1,15 NaH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 11 glicose. A solução acima foi acrescida de manitol, na concentração de 8 mmol, para assegurar maior preservação miocárdica (50). Os corações foram removidos da caixa torácica e colocados em aparelho de estudo de coração isolado, tamanho 3 tipo 830 (Hugo Sacks Eletronic-Germany), com pressão de perfusão constante de 75 mmHg (Figura 4). A solução nutriente foi continuamente oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de CO₂, mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 500-600 mmHg, à temperatura de 37°C, pH entre 7,3 e 7,4. A avaliação foi realizada conforme método previamente descrito e padronizado em nosso laboratório (50,51).

Por meio da técnica descrita, foram obtidas curvas de *Starling* com infusão de líquido no balão, que permitiu variar a pressão diastólica no VE de 0 a 25 mmHg, por meio de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se a pressão sistólica correspondente a cada variação de volume. Nesta técnica em que o coração opera em condições isovolumétricas, a pressão desenvolvida (pressão sistólica menos a pressão diastólica) foi utilizada como indicadora da capacidade contrátil. Foram registradas também a primeira derivada positiva de pressão (+dP/dtmax) e a derivada negativa de pressão (-dP/dtmax). Esses índices servem, respectivamente, como parâmetros de função sistólica e diastólica do VE (50,51).



Figura 4. Visão geral da aparelhagem para realização do estudo do coração isolado.

Eutanásia e coleta do material biológico

Após o estudo funcional, os animais foram anestesiados com dose excessiva de tiopental para a eutanásia. Logo após, os animais foram decapitados e o coração foi coletado e dissecado em VE e ventrículo direito (VD). O sangue dos animais também foi coletado e centrifugado para a obtenção do soro. As amostras de VE e soro foram armazenadas a -80°C para as posteriores análises.

Estudo morfológico

Os ventrículos foram pesados separadamente no momento da eutanásia e depois a razão entre o peso de cada estrutura do coração e o PC foi calculada. Também foram pesados o fígado e pulmão dos animais.

Estudo histológico

Após estudo morfológico os corações tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice. Em seguida, esse fragmento de 3 mm de espessura foi fixado em solução de formol a 10% e incluído em bloco de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes coronais que foram corados com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para aferição da área da secção transversa dos miócitos (ASM).

Foram mensuradas de 30 a 50 células por ventrículo analisado empregando-se microscópio *LEICA DM LS* acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens *Image Pro-plus* (*Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA*). Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente e apresentaram forma redonda e núcleo visível no centro da célula. 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.

Cotina

A cotina, metabólito da nicotina, é um excelente marcador de EFC. Sua dosagem a partir do soro dos animais foi realizada por ensaio imunoenzimático de competição (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA), de acordo com as recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA).

Teste do cometa para avaliação de dano no DNA

O teste do cometa foi utilizado para a avaliação de danos de material genético no DNA em amostras de sangue periférico e de tecido cardíaco, de acordo com as metodologias descritas por Singh e colaboradores (52) e Tice e colaboradores (53), com pequenas modificações.

Para aumentar a sensibilidade do teste, enzimas de reparo também foram utilizadas para detecção de danos oxidativos no DNA. A enzima endonuclease

III (ENDOIII) detecta pirimidinas oxidadas enquanto a formamidopirimidina DNA glicosilase (FPG) reconhece purinas oxidadas.

Imediatamente após a coleta do VE, sob luz amarela, o fragmento foi colocado em solução contendo HBSS e DMSO a 4°C. O tecido cardíaco foi lavado com solução salina - PBS, por três vezes, em placa de petri. Em seguida, em solução enzimática (5,5 mg de proteinase K, 3 mg de colagenase Tipo I e 3 mL de HBSS), o tecido cardíaco foi picotado com lâmina de bisturi. Ao final desse processo, a solução foi colocada em tubo de 15 mL, a qual permaneceu por 30 minutos em estufa a 37°C. Decorrido esse tempo, acrescentou-se, no mesmo tubo, HBSS até completar 6 mL que foi centrifugado por 15 minutos a 800 rpm. O sobrenadante então foi retirado restando apenas 0,5 mL da suspensão celular.

As lâminas foram realizadas em duplicata e as amostras foram codificadas. Alíquotas de 5 µL e 20 µL de sangue periférico e da suspensão celular de cardiomiócitos, respectivamente, foram misturadas a 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e colocadas sobre lâmina previamente coberta com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Após este processo a lâmina foi recoberta com lamínula e colocada a 4°C, por 5 minutos, para solidificação da agarose. Em seguida, a lamínula foi cuidadosamente removida e a lâmina transferida para solução de lise gelada e recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 10; 1% laurilsarcosinato de sódio; 1% triton-X e 10% DMSO).

Em seguida as lâminas que receberam tratamento enzimático (FPG ou ENDO III) ou controle (tampão sem enzimas), foram retiradas da solução de lise e colocadas em solução salina PBS (1x) por 5 minutos e em seguida transferidas para outra cubeta contendo solução de Flare (1x) por 15 minutos. De acordo com o tratamento (enzimático ou controle), as lâminas foram preparadas em câmara úmida e foram cobertas com lamínula e deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos, para atuação das enzimas. Após esse período, as lâminas foram colocadas na geladeira por 10 minutos para solidificação e as lamínulas foram retiradas para realização de corrida eletroforética.

As lâminas que não foram tratadas (avaliação de danos basais) foram tiradas da solução de lise e mergulhadas em PBS 1x por 5 minutos e transferidas

para cuba de acrílico horizontal, em solução de eletroforese, juntamente com as outras lâminas por 40 minutos, com tampão alcalino gelado e recém preparado (1 mM EDTA e 300 mM NaOH, pH > 13). Após período de 20 minutos para desespiralização do DNA e expressão dos sítios álcali-lábeis, a eletroforese foi conduzida a 25 V e 300 mA, por 30 minutos. Finalizada a eletroforese, as lâminas foram colocadas em solução de neutralização (0,4 M de Tris, pH 7,5) por 15 minutos, fixadas em etanol absoluto e secas à temperatura ambiente.

As lâminas permaneceram a 4°C até o momento de análise, quando foram coradas e analisadas em microscópio de fluorescência, utilizando-se o sistema de análise de imagem *Comet Assay IV* (*Perceptive Instruments, UK*), em aumento de 400x. Foram analisados 50 nucleóides por amostra (sangue ou células cardíacas) por animal e como parâmetro para avaliação de danos oxidativos no material genético foi considerado o *tail intensity* (TI) (Figura 5).

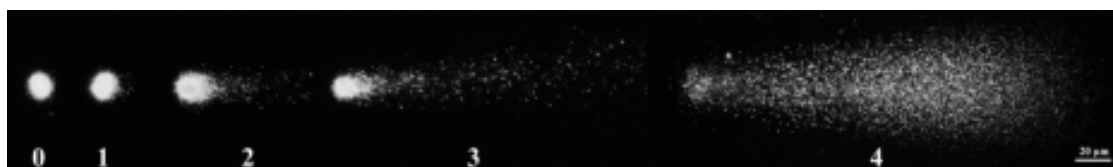


Figura 5. Modo visual objetivo de classificação das imagens TI teste do cometa, em que 0 representa baixo nível de dano e 4 dano total.

Análise de HL e enzimas antioxidantes

As análises de HL e enzimas foram realizadas após a determinação das proteínas totais no tecido. As amostras de aproximadamente 100 mg do VE foram descongeladas e homogeneizadas em *Potter Elvehjem*, com pistilo de teflon, com 5ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0. Os homogeneizados foram centrifugados a 10000 rpm por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (54).

- **Determinação da concentração de hidroperóxido de lipídio (HL)**

O HL foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal (Fe^{2+}) medida por hidroperóxido, com 100 μl da amostra e 900 μl de mistura reagente de sulfato ferroso (FeSO_4) 250 μM , ácido sulfúrico (H_2SO_4) 25 mM, xilenolorange 100 μM e butilhidroxitolueno 4 mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida por espectrofotometria (54).

- **Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT foi determinada em tampão fosfato (pH 7,0), utilizando-se 0,5mL de amostra e peróxido de hidrogênio (30%). A leitura espectrofotométrica foi realizada a 240 nm(54).

- **Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD foi determinada tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução de NBT por radicais superóxido gerados pela mistura hidroxilamina em meio alcalino (pH 10,0). A hidroxilamina gera fluxo de O_2^- do NBT para blue-formazana em temperatura ambiente. Quando a amostra foi adicionada, a velocidade de redução do NBT foi inibida, conforme a porcentagem de SOD presente na amostra (55).

- **Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GSH-Px)**

A atividade da GSH-Px foi determinada em presença de peróxido de hidrogênio. A mistura da reação foi preparada com tampão fosfato de sódio, azida sódica, EDTA, glutathiona reduzida e glutathiona redutase. Por meio da oxidação do metilenotetraidrofolato redutase a 340 nm na presença de glutathiona redutase, a qual catalisa a redução da glutathiona oxidada, foi determinada a atividade da GSH-Px (56).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas no espectrofotômetro *Pharmacia Biotech* (com software *Swift II, England*) e em leitor de microplaca (μ Quant-MQX 200 com Kcjunior software, Bio-Tec Instruments, USA).

Determinação de grupos carbonila

As concentrações de grupos carbonila nas proteínas foram analisadas baseadas na reação com dinitrofenil-hidralazina (DNPH) e na formação das bases de Schiff de acordo com método descrito por Reznick e Packer (57). A concentração dos grupos carbonila foi quantificada por espectrofotômetro a 360nm usando coeficiente de $22000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Avaliação do metabolismo energético

Aproximadamente 100mg de amostras do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,1M pH 7,0) e centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas e a atividade das enzimas do metabolismo energético. A atividade dos complexos enzimáticos da cadeia transportadora de elétrons foi determinada após ressuspensão e centrifugação do pellet com tampão fosfato de sódio (0,1M) contendo 250mM de sacarose e 2mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (58). As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplaca com controle por software (os mesmos utilizados para a análise de estresse oxidativo). Todos os reagentes foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

- **Determinação da atividade da β - OH acil CoA DH**

Determinada na presença de tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,0), EDTA, acetoacetil-CoA e NADH (59).

- **Determinação da atividade da citrato sintase (CS)**

Avaliada pela reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela CS, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA, oxaloacetato e dithiobis-2-nitrobenzoato em tampão fosfato Tris-HCl (50mM pH 8,0) (59).

- **Determinação da atividade do complexo I**

A atividade do complexo I foi determinada em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio (80mM pH 7,4), EDTA e NADH, onde se monitorou a velocidade de oxidação do NADH (60).

- **Determinação da atividade do complexo II**

A atividade enzimática do complexo II foi medida em meio com tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e 2,6-diclorofenolindofenol, o qual teve absorbância a 600nm (61).

- **Determinação da atividade da ATP sintase**

A atividade da ATP sintase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM pH 8,0), na presença de MgCl₂, NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, lactato desidrogenase e piruvato quinase (62).

- **Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK)**

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50mM pH 8,0), MgCl₂, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH₂(59).

- **Determinação da atividade da lactato desidrogenase (LDH)**

A atividade da LDH foi determinada com a utilização do método UV otimizado, onde foi medido o consumo de NADH_2 , que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra.

- **Determinação da atividade da piruvato desidrogenase (PDH)**

Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM pH 7,4) foi determinada a atividade da PDH em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditioneitol, MgCl_2 , nitro blue tetrazolium (NBT), piruvato de sódio e fenasina metassulfato, onde mediu-se a conversão do piruvato em acetil coenzima A através da velocidade de redução do NAD (59).

Determinação da expressão proteica por Western Blot

Foi realizada a determinação da expressão das proteínas: NRF-2, SIRT-1, NFkB total (NFkB) e fosforilado (pNFkB), Interleucina 10 (IL-10), IFN- γ , colágeno tipo I (COL I) e III (COL III) pela técnica Western Blot.

a) Extração do lisado celular total

Para determinação de todas as proteínas estudadas, exceto o NRF-2, a extração proteica foi realizada utilizando-se amostras de 80 mg do VE homogeneizadas com 1ml de tampão de extração RIPA contendo NaCl 100 mM, Triton X-100 1%(v/v), de oxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v), Tris 10 mM (ph7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax TM T25 Basic, Wilmington USA). Após, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, a 12.000 rpm e a 4° C. O sobrenadante foi coletado e armazenado

em freezer a -80°C . A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

b) Extração nuclear

Para determinação do NRF-2, amostras de 60 mg de VE foram homogeneizadas com 500 μl de tampão de extração (10mM HEPES, 1,5mM MgCl_2 , 10mM KCl, 0,5mM DTT, 0,05% NP40). As amostras foram homogeneizadas manualmente, com auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi separado (fração citoplasmática) e o pellet ressuscendido com tampão (5mM HEPES, 1,5mM MgCl_2 , 0,2mM EDTA, 0,5mM DTT, 26% glicerol (v/v)) e NaCl. As amostras foram homogeneizadas por 10 segundos, 2 vezes em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax TM T25 Basic, Wilmington USA). Após aguardar 30 minutos em gelo, as amostras foram novamente centrifugadas a 15.000 rpm, por 20 minutos 4°C e coletado o sobrenadante (fração nuclear), que foi utilizado para a quantificação do NRF-2. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando curva de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

c) Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração de proteína, as amostras foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul debromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e aquecidas a 100°C por 5 minutos. Posteriormente, as amostras (contendo 50 μg de proteína total) foram 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 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed).

A concentração do gel de empilhamento utilizada foi de 10% e a concentração do gel de resolução variou de acordo com o peso molecular da

proteína determinada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio - Rad, Hercules, CA, USA) e nos poços seguintes os grupos foram pipetados de maneira alternada. A corrida eletroforética foi efetuada a 30 min a 50V e 2 horas a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

d) Transferência e Bloqueio

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose 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%).

Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 60 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação.

e) Incubação com os anticorpos primário e secundário

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários específicos para cada proteína analisada, diluídos em solução de 3% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20). As membranas permaneceram incubadas durante a noite à temperatura de 4°C, sob constante agitação. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas em solução basal pH 8,0 e incubadas com os anticorpos secundários específicos, diluídos em solução de 1% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0. As membranas permaneceram incubadas por 90 minutos, à temperatura ambiente, sob agitação constante. Posteriormente, a membrana foi lavada em solução basal pH 8,0 e a imunodeteção

foi realizada por meio do método de quimioluminescência utilizando o Kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA.

Os anticorpos primários utilizados foram os seguintes:

- NRF-2, rabbit policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 722), diluição 1:400.
- SIRT-1, rabbit policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 15404), diluição 1:200
- NF-kB total, mouse monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8008), diluição 1:200.
- NF-kB fosforilado, rabbit monoclonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 3302), diluição 1:200.
- IL-10, mouse monoclonal IgG (Abcam plc, Inc, Massachusetts, US, ab 133566), diluição 1:2000
- IFN- γ , mouse monoclonal IgG1 (Abcam plc, Inc, Massachusetts, US, ab 133566), diluição 1:2500
- Colágeno I, rabbit policlonal IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 8784), diluição 1:100.
- Colágeno III, mouse monoclonal IgG1 (Abcam plc, Inc, Massachusetts, US, ab 6310R), diluição 1:5.000.
- GAPDH, mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233), diluição 1:10.000.

Os anticorpos secundários utilizados foram os seguintes:

- Goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2005).
- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004).

As imagens foram fotografadas no analisador de imagens Carestream Molecular Imaging (Carestream Health, Inc, USA).

A análise das imagens foi realizada no programa de análise de imagens Gel Pro Image 32 versão 3.1.00 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA), que mede as bandas escuras em fundo claro do *blot* em unidade de imagem denominada pixel.

A expressão de todas as proteínas analisadas foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Uma vez com os dados gerados pelo analisador de imagens, a quantificação foi realizada da seguinte maneira: 1) as proteínas de interesse foram normalizadas pela amostra de um animal repetido em todos os géis; 2) o GAPDH, da mesma forma, foi normalizado pelo animal repetido em todos os géis; 3) as proteínas foram então normalizadas pelo GAPDH, para ser obtido o resultado da expressão por Western Blot.

Análise estatística

Para as variáveis paramétricas, foi realizado o teste de análise de variância de 1 via (ANOVA) com pós-teste de Tukey e os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão. Para as variáveis não paramétricas, foi realizado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e os valores obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil. As variáveis foram consideradas não paramétricas quando não passaram pelo teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

O nível de significância adotado foi de 5%. Para análise dos dados e construção dos gráficos foi utilizado o pacote estatístico GraphPad Prism versão 5.01 (GraphPad Software Inc).

RESULTADOS

Mortalidade, peso dos animais e média do consumo de ração

Quanto à mortalidade, apenas um animal pertencente ao grupo F250 morreu. O óbito ocorreu após a realização do estudo ecocardiográfico. Os animais não apresentaram diferença significativa em relação ao peso corporal inicial. Quanto ao peso corporal final houve diferença significativa na comparação entre os grupos fumantes (F0, F100 e F250) e o grupo controle (C0). Os animais fumantes apresentaram peso corporal final inferior aos animais controle (Figura 6). Da mesma forma, o consumo médio diário de ração dos animais fumantes foi inferior ao dos animais controle. Não foi encontrada diferença significativa entre os três grupos fumantes, tanto para o peso corporal final quanto para o consumo de ração. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

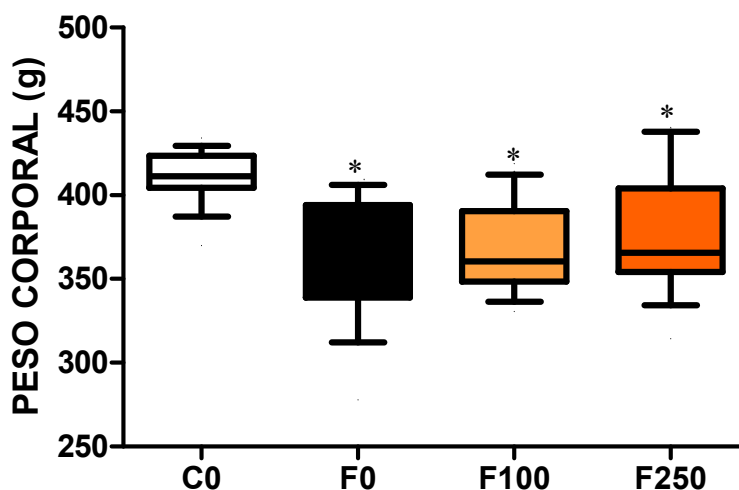


Figura 6. Peso Corporal final (g). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.

* diferente de C0 ($p < 0,0001$)

Tabela 4. Dados referentes a peso corporal e consumo de ração

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo F0 (n=20)	Grupo F100 (n=20)	Grupo F250 (n=20)	Valo p
PC Inicial (g)	297,8± 29,93	292,3± 26,94	286,2± 23,18	293,2± 28,75	0,6119
PC Final (g)	411,4 (404,5-423,4)	368,7 (338,8-394,0)*	360,5 (348,5-390,6)*	365,7 (354,3-404,1)*	< 0,0001
Consumo de Ração (g)	20,47 ±0,187	19,89± 0,725*	19,74± 0,627*	19,81± 0,541*	0,0003

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. PC Inicial: Peso corporal no início do experimento; PC final: peso corporal no final do experimento. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

* diferente de C0

Cotina

Considerando a dosagem de cotinina sérica (ng/mL) dos animais, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (C0=0,0± 0,0) em relação aos grupos fumantes (F0= 56,62 ± 17,57; F100= 50,58 ± 15,68 e F250= 57,00 ± 16,61, p=0,0039). Entretanto, entre os grupos fumantes (F0, F100 e F250) não houve diferença estatística, como representado na Figura 7.

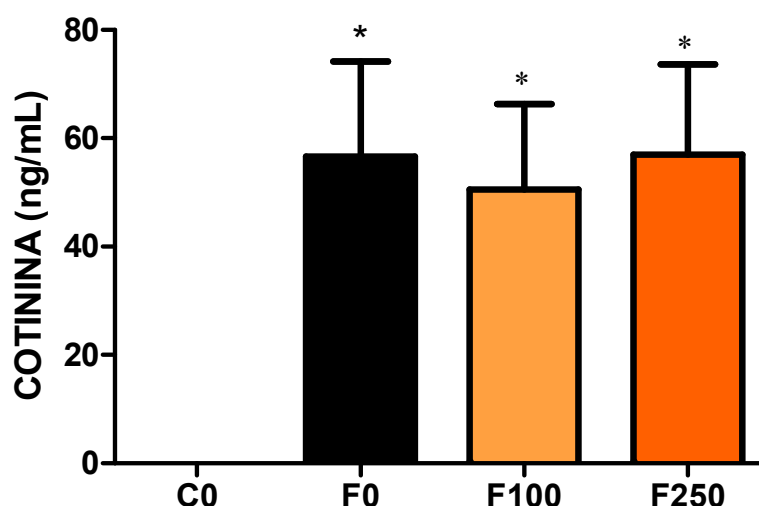


Figura 7. Cotinina (ng/mL): dosagem sérica de cotinina. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0 (p=0,0039)

Avaliação funcional "in vivo" – Estudo ecocardiográfico

No ecocardiograma, os animais fumantes (F0, F100 e F250) apresentaram maiores valores de: DDVE/PC (Figura 8), AE/PC (Figura 9) e DSVE/PC (Figura 10), quando comparados ao grupo C0. Entretanto, o grupo F250 apresentou menor valor de DDVE/PC quando comparado ao grupo F0. Já em relação à ÁREA do AE (Figura 11) e IMVE (Figura 12) apenas o grupo F0 apresentou valores superiores em comparação ao grupo C0. Sendo que o grupo F250 apresentou menor valor de ÁREA do AE em comparação com o grupo F0. Os dados morfológicos estão apresentados na Tabela 5. Com relação às variáveis funcionais não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nas variáveis relacionadas à função sistólica e diastólica. Os dados funcionais do ecocardiograma estão representados na Tabela 6.

Tabela 5. Resultados morfológicos do ecocardiograma

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo F0 (n=20)	Grupo F100 (n=20)	Grupo F250 (n=20)	Valor p
PC(g)	411,4 (404,5-423,4)	368,7 (338,8-394,0)*	360,5 (348,5-390,6)*	365,7 (354,3-404,1)*	< 0,0001
AE/PC(mm/kg)	11,38 (11,12-12,36)	14,56 (13,13-15,97)*	14,56 (13,58-15,15)*	12,84 (12,23-15,01)*	< 0,0001
AE/Ao	1,386 (1,226-1,436)	1,355 (1,285-1,490)	1,427 (1,362-1,529)	1,386 (1,243-1,580)	0,4224
DDVE(mm)	6,90 (6,19-7,41)	7,41 (6,70-7,92)	6,90 (6,64-7,41)	6,64 (6,64-7,15)	0,2091
DDVE/PC(mm/kg)	16,75 ±1,099	20,33 ±2,575*	18,95± 1,480*	18,53± 1,571* #	< 0,0001
DSVE(mm)	2,81 (2,36-3,07)	3,19 (2,61-4,09)	3,07 (2,81-3,51)	3,07 (2,81-3,32)	0,2149
DSVE/PC(mm/kg)	6,84 (5,99-7,42)	8,35 (7,28-11,09)*	8,76 (7,49-9,83)*	8,18 (7,54-8,68)*	0,0009
AREA AE(cm ²)	22,04±3,844	25,59 ±5,218*	24,13±2,760	22,22±3,530 #	0,0168
EDPP(mm)	1,530 (1,530-1,790)	1,530 (1,530-1,790)	1,530 (1,530-1,790)	1,530 (1,530-1,790)	0,5391
Esp. Rel. VE	0,4664±0,04877	0,4325±0,07267	0,4579±0,06323	0,4763±0,05222	0,1335
IMVE(g/kg)	1,811 (1,525-1,99)	2,10 (1,90-2,38)*	1,98 (1,82-2,18)	1,98 (1,85-2,25)	0,0121

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de café a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de café a 250 mg/kg/dia. PC: peso corporal final; AE/PC: diâmetro do átrio esquerdo (AE) ajustado pelo PC; AE/Ao: relação entre os diâmetros do AE e da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DDVE/PC: diâmetro diastólico do VE ajustado pelo PC; DSVE: diâmetro sistólico do VE; DSVE/PC: diâmetro sistólico do VE ajustado pelo PC; Área AE: área do átrio esquerdo; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; Esp. Rel. VE: espessura relativa do VE; IMVE: índice de massa do VE. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

* diferente de C0; # diferente de F0.

Tabela 6. Resultados funcionais do ecocardiograma

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo F0 (n=20)	Grupo F100 (n=20)	Grupo F250 (n=20)	Valor p
FC (bpm)	313,1± 54,08	302,1± 50,01	298,0± 33,68	302,5±51,20	0,7808
FE(%)	0,929 (0,903-0,947)	0,911 (0,862-0,942)	0,908 (0,890-0,932)	0,915 (0,889-0,928)	0,1557
%ENC(%)	58,57 (54,09-62,48)	55,35 (48,36-61,38)	54,83 (52,08-59,28)	56,03 (51,96-58,40)	0,1573
S(cm/s)	5,50 (5,20-5,75)	5,25 (4,92-5,60)	5,50 (5,20-5,67)	5,50 (5,20-5,80)	0,3709
E/A	1,620 (1,438-1,694)	1,685 (1,484-1,966)	1,754 (1,527-1,950)	1,658 (1,450-1,843)	0,2306
E/E'	13,71 ±2,797	15,59 ±3,452	16,35± 3,383	14,54± 4,030	0,0869
TDE(ms)	49,20 ±5,288	48,35± 8,387	48,70± 5,141	50,21± 4,492	0,7904
TRIVc(ms)	0,08885 ±0,01977	0,08844± 0,02618	0,08361± 0,02415	0,09429± 0,02246	0,5633

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. FC: frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; %ENC: porcentagem de encurtamento; S: onda sistólica do anel mitral septal; E/A: relação entre as ondas E e A; E/E': relação entre onda E e velocidade do pico do Doppler tissular na protodiástole; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico ajustado pela FC. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

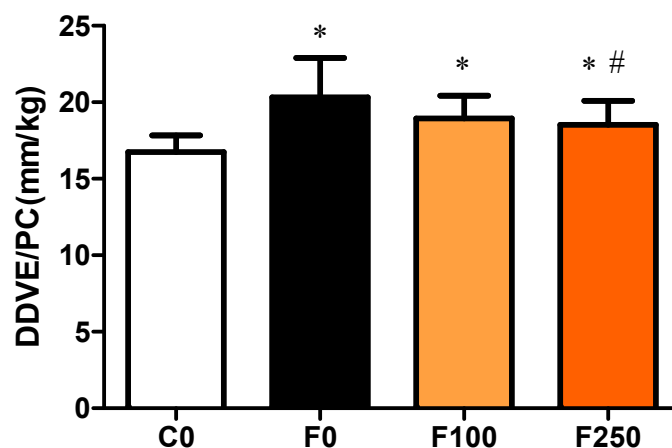


Figura 8. DDVE/PC: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal (mm/kg). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de CO; # diferente de FO ($p < 0,0001$)

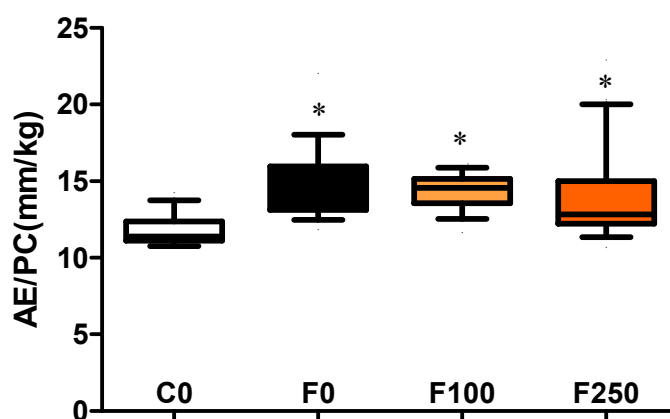


Figura 9. AE/PC: diâmetro do átrio esquerdo ajustado pelo peso corporal (mm/kg). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.

* diferente de CO ($p < 0,0001$)

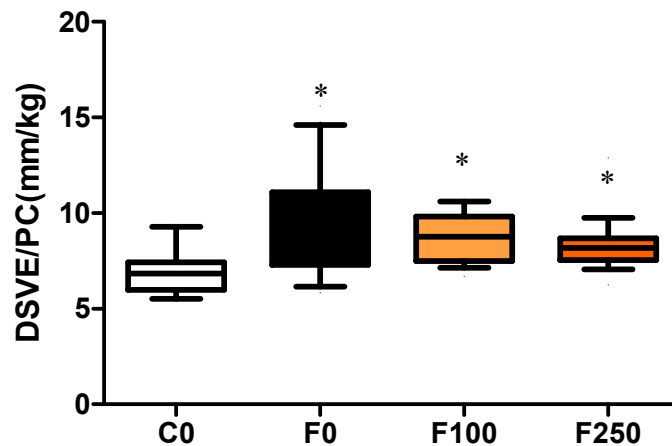


Figura 10. DSVE/PC: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal (mm/kg). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.
* diferente de C0 (p=0,0009)

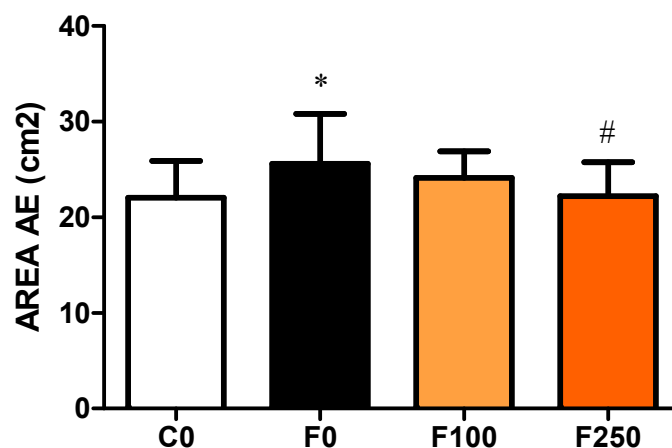


Figura 11. Área AE: área do átrio esquerdo (cm²). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de C0; # diferente de F0 (p=0,0168)

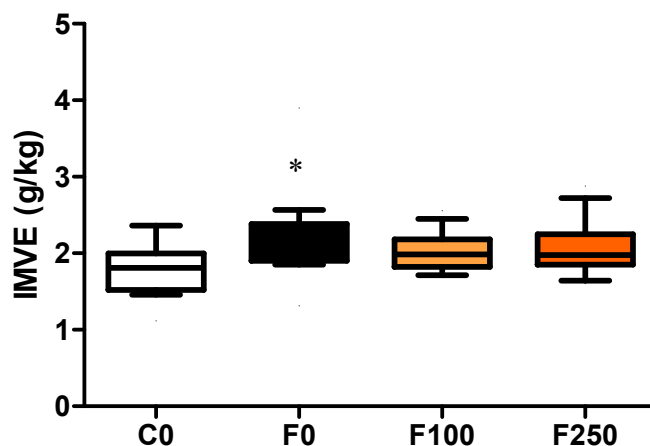


Figura 12. IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo (g/kg). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75. * diferente de CO (p=0,0121)

Avaliação funcional "in vitro" - Estudo do Coração Isolado

No estudo do coração isolado não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à pressão sistólica (PS), derivada positiva máxima de pressão (+dp/dtmax), derivada negativa máxima de pressão (- dp/dtmax) e pressão desenvolvida (P Desenvolvida). Os dados do estudo do coração isolado estão representados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados do estudo do coração isolado

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo F0 (n=20)	Grupo F100 (n=20)	Grupo F250 (n=20)	Valor p
PS(mmHg)	130,5± 12,53	130,6± 14,50	126,9 ±21,45	133,4 ±28,50	0,9345
+dp/dt max(mmHg/s)	2375 ±378,0	2469 ±382,1	2359 ±599,2	2661± 874,1	0,7430
- dp/dt max(mmHg/s)	1797 ±238,0	1914 ±315,1	1734 ±414,2	2000± 629,3	0,6116
P Desenvolvida(mmHg/s)	99,22± 11,51	104,0± 16,41	96,88 ±20,65	104,4 ±27,73	0,8461

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de café a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de café a 250 mg/kg/dia. PS: pressão sistólica; +dp/dt Max: derivada positiva máxima de pressão; -dp/dt Max: derivada negativa máxima de pressão; P Desenvolvida: pressão desenvolvida. Os dados são expressos em média ± desvio padrão.

Dados Morfométricos

Os dados de morfometria estão apresentados na Tabela 8. Os animais do grupo FO apresentaram maiores valores do peso do VE quando ajustado pelo PC em relação aos animais do grupo CO (Figura 13). Os animais fumantes que foram suplementados com cajá (F100 e F250) tiveram seus valores iguais aos animais não fumantes (grupo CO). Não foi observada nenhuma alteração em relação ao peso do fígado e pulmão dos animais.

O grupo controle (CO) apresentou menor ASM em relação aos animais fumantes (FO, F100 e F250), entretanto o grupo suplementado com cajá a 250 mg/kg/dia apresentou menores valores da ASM em relação aos animais do grupo FO (Figura 14).

Tabela 8. Resultados morfométricos

Variáveis	Grupo C0 (n=20)	Grupo F0 (n=20)	Grupo F100 (n=20)	Grupo F250 (n=20)	Valor p
VE(g)	0,867± 0,1091	0,898 ±0,1429	0,840± 0,09310	0,862± 0,1141	0,4999
VE/PC	2,113± 0,2655	2,492 ±0,4797*	2,281± 0,1959	2,303± 0,2582	0,0051
VD(g)	0,229 (0,198-0,265)	0,236 (0,191-0,273)	0,203 (0,187-0,226)	0,217 (0,191-0,271)	0,3699
VD/PC	0,564 (0,485-0,639)	0,625 (0,516-0,863)	0,561 (0,519-0,641)	0,6073 (0,530-0,652)	0,3322
Pulmão(g)	1,586 (1,557 -1,821)	1,583 (1,466- 1,890)	1,640 (1,378-1,950)	1,562 (1,468- 1,780)	0,9220
Fígado(g)	12,80 ±1,401	12,11± 1,668	12,14± 1,671	11,80± 1,851	0,2825
ASM(µm ²)	266,6± 23,18	347,5± 15,08*	302,5± 5,239*	294,7± 8,562 *#	< 0,0001

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. VE: peso do ventrículo esquerdo (VE); VE/PC: peso do VE ajustado pelo peso corporal (PC); VD: peso do ventrículo direito (VD); VD/PC: peso do VD ajustado pelo PC. ASM: área seccional do miócito. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

* diferente de C0; # diferente de F0.

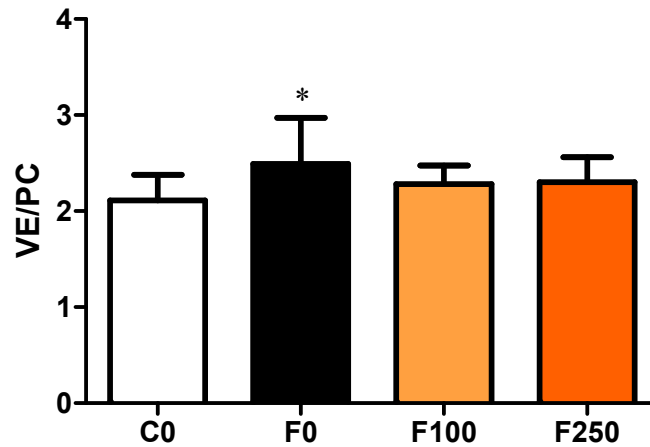


Figura 13. VE/PC: peso do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso corporal. Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de CO (p=0,0051)

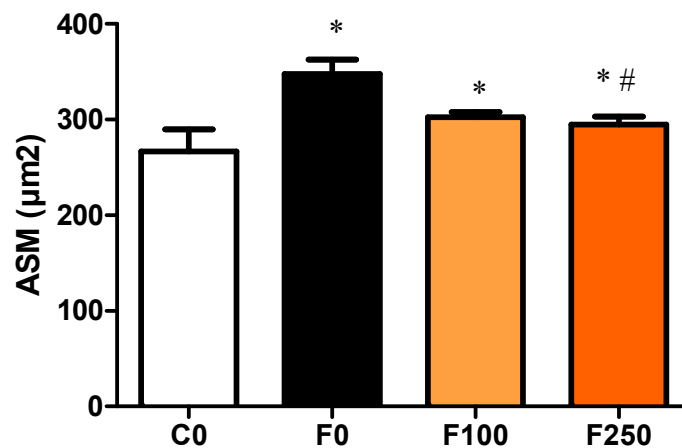


Figura 14. ASM: área seccional do miócito (μm²). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de CO; # diferente de FO (p=<0,001)

Análise de HL e enzimas antioxidantes

Os dados referentes a análise de HL e das enzimas antioxidantes estão apresentados na Tabela 9. Os animais do grupo F0 apresentaram maior concentração de HL em relação aos animais do grupo C0. Já os animais dos grupos suplementados com cajá (F100 e F250) apresentaram concentração menor de HL em relação ao grupo F0 (Figura 15).

Em relação à atividade da enzima CAT, os animais dos grupos fumantes (F0, F100 e F250) apresentaram menor valor de atividade de CAT em relação ao grupo controle (C0) (Figura 16).

Os animais do grupo F0 apresentaram menor valor de atividade da enzima SOD em relação aos animais do grupo C0. Os animais suplementados com cajá a 100 e 250 mg/kg/dia (F100 e F250) apresentaram maior valor de atividade de SOD em relação ao grupo F0 (Figura 17).

A atividade da enzima GSH-Px no grupo C0 foi superior em relação aos grupos fumantes (F0, F100 e F250). Entretanto, os grupos suplementados com cajá a 100 e 250 mg/kg/dia (F100 e F250) apresentaram maiores valores de atividade de GSH-Px em relação ao grupo F0 (Figura 18).

Tabela 9. Resultados referentes a análise de HL e enzimas antioxidantes

Variáveis	Grupo C0(n=8)	Grupo F0(n=8)	Grupo F100(n=8)	Grupo F250(n=8)	Valor p
HL(nmol/g)	196,4 ±51,50	331,9± 52,92*	207,2 ±52,98#	165,1± 40,32#	< 0.0001
CAT(micromol/g)	75,81±7,809	53,98± 7,283*	59,60 ±5,836*	61,08 ±6,458*	< 0.0001
SOD(nmol/mgpt)	7,867± 0,4176	5,748± 0,3966*	7,536 ±0,8505#	7,785± 0,8601#	< 0.0001
GSH-Px(nmol/mg)	39,23± 5,582	18,78± 3,415*	29,94± 5,565*#	31,11± 4,326*#	< 0.0001

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. HL: hidroperóxido de lipídio; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutathione peroxidase. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0; # diferente de F0.

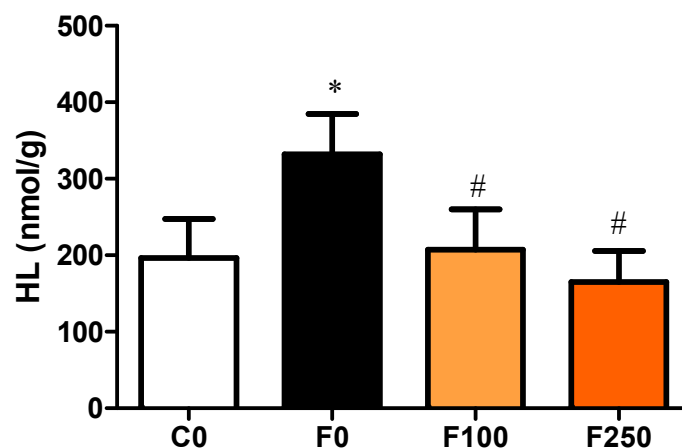


Figura 15. HL: Concentração de Hidroperóxido de Lipídio (nmol/g). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0; # diferente de F0 ($p < 0,0001$)

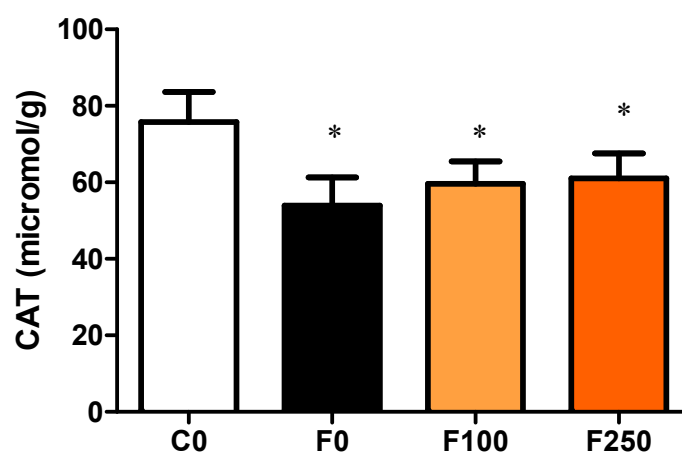


Figura 16. CAT: Atividade da Catalase (micromol/g). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0 ($p < 0,0001$)

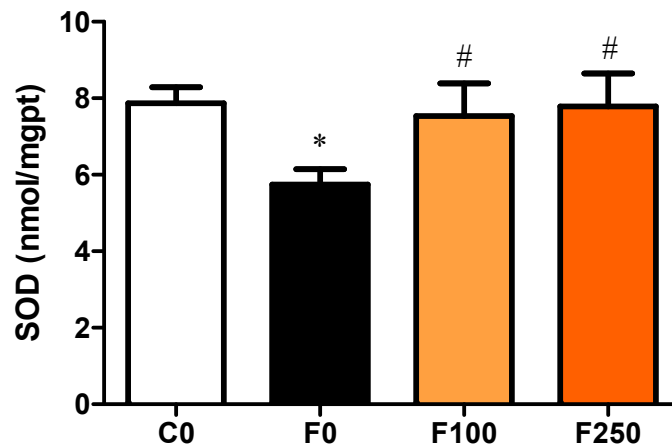


Figura 17. SOD: Atividade da Superóxido Dismutase (nmol/mgpt). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0; # diferente de F0 ($p < 0,0001$)

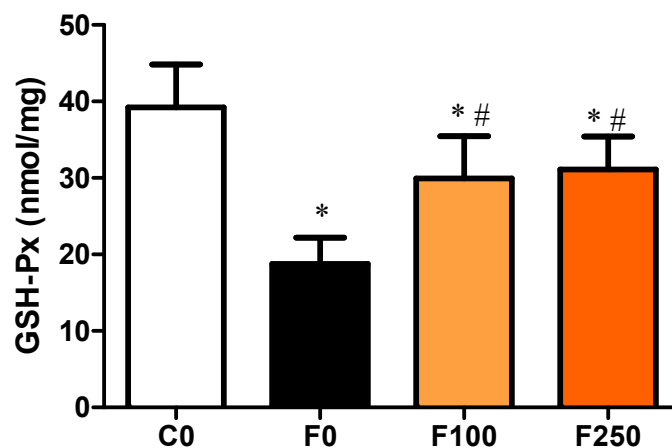


Figura 18. GSH-PX: Atividade da Glutathione Peroxidase (nmol/mg). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0; # diferente de F0 ($p < 0,0001$)

Determinação de grupos carbonila

Considerando a análise de determinação de grupos carbonila (nmol/mgt), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos [CO= 2,521 (1,799-3,282); FO=3,104 (3,054-3,634); F100=2,996 (1,691-3,857) e F250=2,647 (2,198-3,306); $p = 0,5724$].

Teste do cometa para avaliação de dano no DNA

Considerando a análise de dano ao DNA pela técnica de cometa, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma variável estudada. Os dados referentes ao teste do cometa estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados do Teste do Cometa

Variáveis	Grupo C0 (n=6)	Grupo F0 (n=6)	Grupo F100 (n=6)	Grupo F250 (n=6)	Valor p
TI Tampão (%)	18,88±15,60	24,03±25,86	13,62±8,062	12,52±8,323	0,5960
TI FPG (%)	9,434 ±4,813	10,38 ±7,128	12,30 ±6,104	10,57 ±4,717	0,8987
TI EndoIII(%)	9,352±5,989	9,022±7,033	9,593±4,280	9,370±6,413	0,9470
TI Sangue (%)	23,46 (19,21-24,97)	30,47 (16,22-31,14)	14,97 (10,36-37,80)	21,11 (18,08-39,85)	0,7562

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. TI: *tail intensity*; Tampão: tampão sem enzimas; FPG: formamidopirimidina DNA glicosilase; Endo III: endonuclease III. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

Avaliação do metabolismo energético

Os dados referentes ao metabolismo energéticos estão apresentados na Tabela 11. Considerando os dados relativos à análise do metabolismo energético, o grupo FO apresentou menor valor de atividade da enzima β -OH Acil CoA-DH quando comparado ao grupo CO. Já o grupo F100 apresentou valores maiores de β -OH Acil CoA-DH em comparação com o grupo FO (Figura 19).

Em relação à atividade da PFK e LDH, os grupos FO e F100 apresentaram maior atividade destas enzimas em comparação com o grupo CO. O grupo F250, por sua vez, apresentou menor atividade de PFK e LDH em comparação ao grupo FO e F100 (Figura 20 e 21).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação à atividade da PDH (Figura 22).

Os grupos fumantes (FO, F100 e F250) apresentaram valores inferiores referentes à atividade da CS em comparação com o grupo CO. E o grupo F250 apresentou valores superiores em comparação ao grupo FO (Figura 23).

Em relação ao complexo I, os grupos fumantes (FO, F100 e F250) obtiveram valores inferiores quando comparados ao grupo CO e o grupo F250 apresentou maiores valores em relação ao grupo FO e ao grupo F100. (Figura 24).

Considerando a análise da atividade do complexo II, os grupos FO e F100 apresentaram menores valores quando comparados ao grupo CO e o grupo F250 apresentou maiores valores em relação aos grupos FO e F100 (Figura 25).

Já em relação à atividade da ATP sintase, os grupos fumantes (FO, F100 e F250) apresentaram menores valores em comparação ao grupo CO (Figura 26).

Tabela 11. Resultados referentes ao metabolismo energético

Variáveis	Grupo C0 (n=8)	Grupo F0 (n=8)	Grupo F100 (n=8)	Grupo F250 (n=8)	Valor p
β -OH ACIL CoA DH (nmol/mg/pt)	33,15± 7,844	20,35± 3,956*	32,54 ±7,302#	28,30± 7,000	0,0023
PFK (nmol/g)	135,9± 22,82	188,3 ±22,16*	188,3 ±21,69*&	148,5± 18,95#	< 0.0001
LDH (nmol/mg)	85,09± 8,824	140,1 ±10,25*	134,8 ±12,93*&	96,79± 12,18#	< 0.0001
PDH (nmol/g)	211,4± 32,16	169,3 ±23,19	178,2 ±40,62	198,3± 33,88	0,0668
CS (nmol/mgpt)	85,58± 8,112	35,70 ±8,101*	42,76 ±3,417*	52,52± 8,646*#	< 0.0001
COMPLEXO I (nmol/mgpt)	10,26± 1,364	2,792 ±0,4366*	3,259 ±0,4202*&	8,327± 1,204*#	< 0.0001
COMPLEXO II (nmol/mgpt)	3,742± 0,3288	1,893 ±0,4142*	2,137 ±0,3733*&	3,448± 0,1930#	< 0.0001
ATP SINTASE (nmol/mgpt)	32,34± 2,387	19,43 ±2,531*	19,45±3,016*	22,01± 3,067*	< 0.0001

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão;mGrupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cája a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cája a 250 mg/kg/dia. β -OH ACIL CoA DH: β hidroxiacil Coenzima A desidrogenase; PFK: fosfofrutoquinase; LDH: lactato desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; CS: citrato sintase. . Dados expressos em média e desvio padrão.

* diferente de C0; # diferente de F0; & diferente de F250

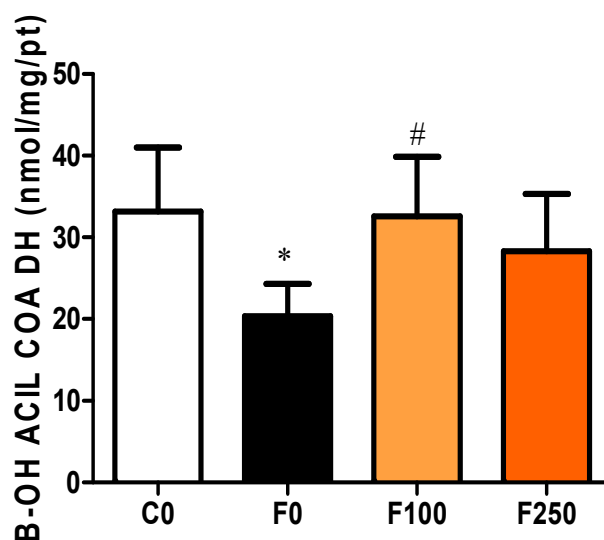


Figura 19. β -OH Acil CoA DH: Atividade da β -hidroxiacil Coenzima A Desidrogenase (nmol/mg/pt). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de CO; # diferente de FO (p=0,0023)

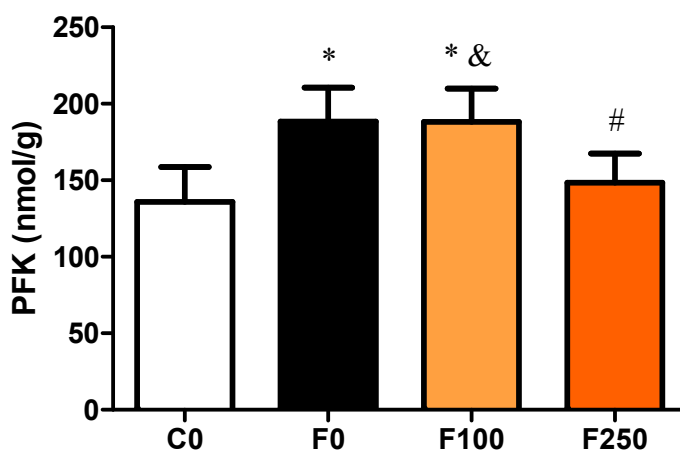


Figura 20. PFK: Atividade da Fosfofrutoquinase (nmol/g). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de CO; # diferente de FO; & diferente de F250 (p=<0,0001)

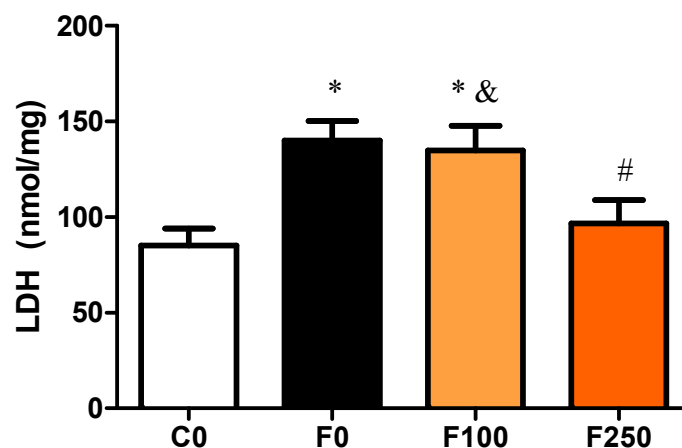


Figura 21. LDH: Atividade da Lactato Desidrogenase (nmol/mg). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão. * diferente de CO; # diferente de F0; & diferente de F250 ($p < 0,0001$)

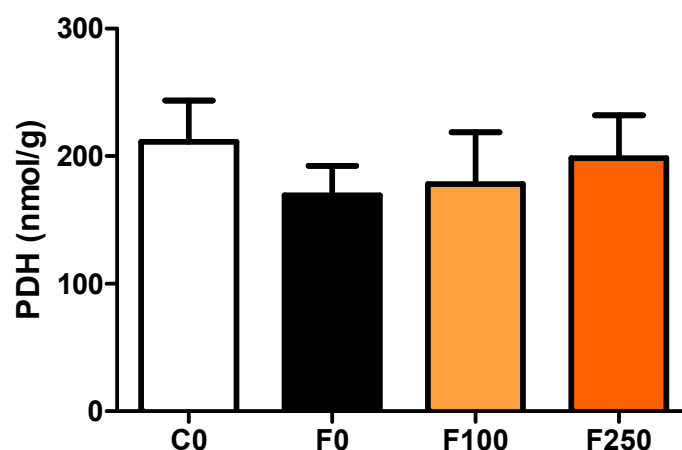


Figura 22. PDH: Atividade da Piruvato Desidrogenase (nmol/g). Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

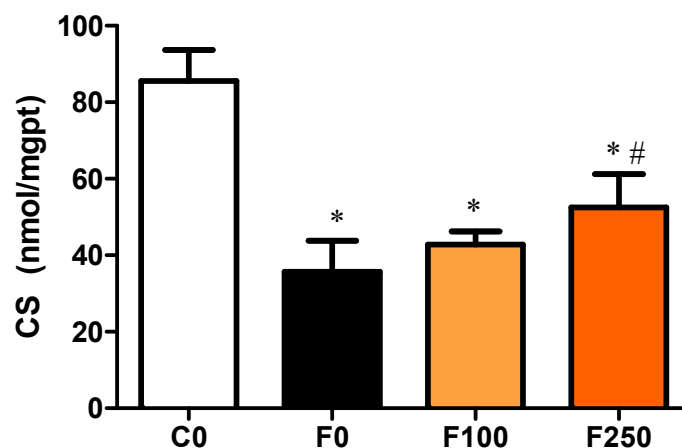


Figura 23. CS: Atividade da Citrato Sintase (nmol/mgpt). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de C0; # diferente de F0 ($p < 0,0001$)

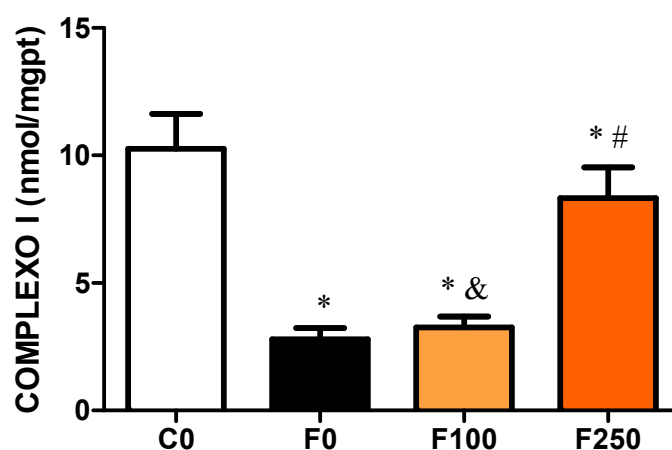


Figura 24. Atividade do Complexo I (nmol/mgpt). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.
* diferente de C0; # diferente de F0; & diferente de F250 ($p < 0,0001$)

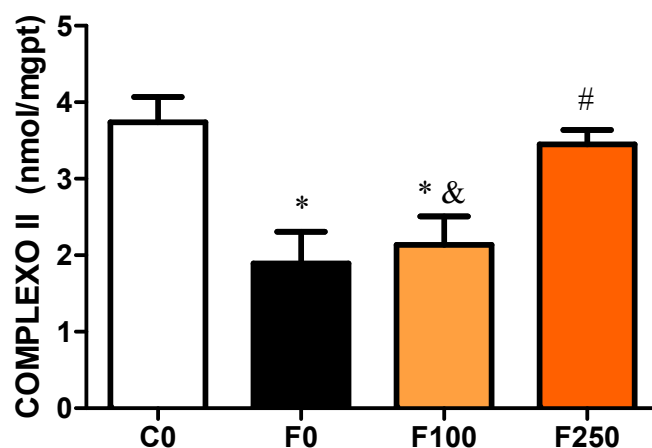


Figura 25. Atividade do Complexo II (nmol/mgpt). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão. * diferente de C0; # diferente de F0; & diferente de F250 ($p < 0,0001$)

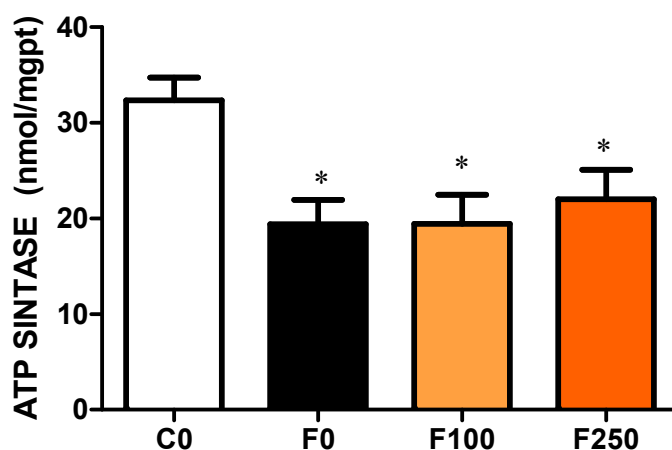


Figura 26. Atividade da ATP Sintase (nmol/mgpt). Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão. * diferente de C0 ($p < 0,0001$)

Determinação da expressão proteica por Western Blot

Considerando a análise da expressão proteica de NFkB e pNFkB, SIRT-1, NRF-2, IL-10, IFN- γ , COL I e COL III pela técnica de western blot, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos em nenhuma variável estudada. Dados apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados referentes à expressão proteica por Western Blot.

Variáveis	Grupo C0 (n=8)	Grupo F0(n=8)	Grupo F100(n=8)	Grupo F250(n=8)	Valor p
NFKB	1,400± 0,493	1,068± 0,269	1,171± 0,485	1,416± 0,463	0,31
pNFKB	1,106 (0,991-1,646)	1,140 (1,018-1,631)	1,136 (1,039-1,610)	1,180 (0,994-1,659)	0,98
NFKB/ p NFKB	1,329±0,828	0,923±0,380	0,985±0,488	1,174±0,435	0,47
SIRT-1	0,994 ±0,039	0,991 ±0,077	1,010± 0,033	1,007± 0,064	0,87
NRF-2	1,009± 0,015	1,003± 0,006	1,005± 0,011	1,007± 0,011	0,75
IL-10	0,816± 0,138	0,847± 0,099	0,746± 0,197	0,875± 0,093	0,30
IFN-γ	0,953 (0,915-0,976)	0,927 (0,463-0,965)	0,968(0,964-0,977)	0,948 (0,936-0,973)	0,19
COL I	0,983(0,917-0,988)	0,919 (0,804-1,005)	0,973 (0,903-0,994)	0,973 (0,943-0,982)	0,91
COL III	1,144± 0,206	1,133± 0,426	0,970± 0,055	1,004± 0,040	0,36

Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. NFKB: Fator nuclear-kB total; pNFKB: Fator nuclear-Kb fosforilado; SIRT-1: sirtuína 1; NRF-2: fator nuclear derivado de eritróide-2; IL-10: interleucina 10; IFN-γ: interferon gamma; COL I: colágeno tipo I; COL III: colágeno tipo III. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica).

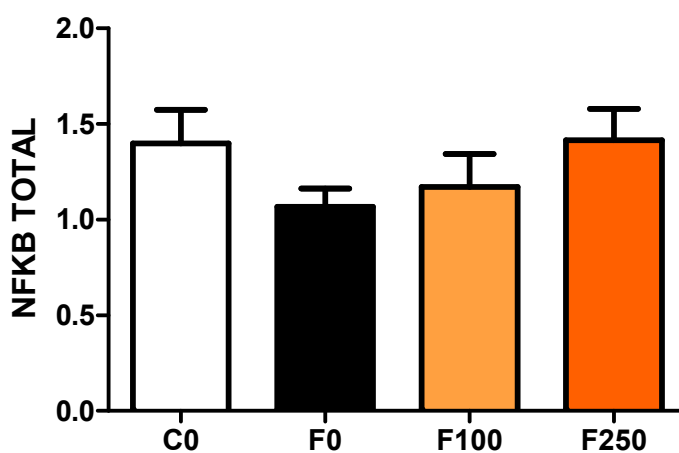
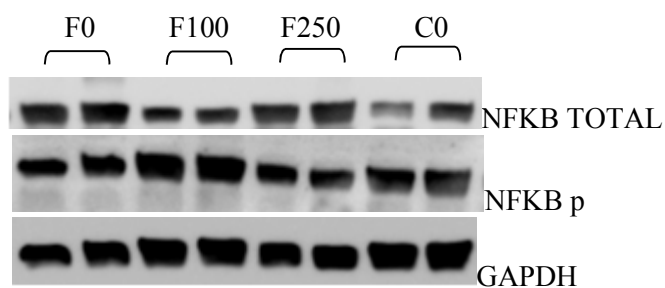


Figura 27. Expressão de NFκB Total. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

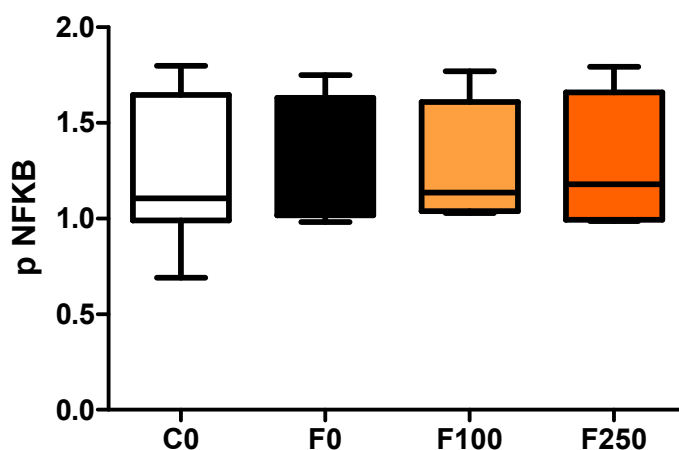


Figura 28. Expressão de NFκB Fosforilado. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.

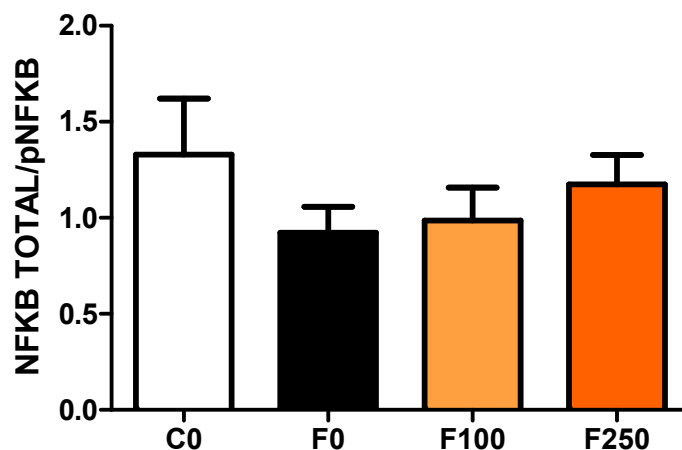


Figura 29. Razão da expressão de NFkB Total/ NFkB Fosforilado. Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

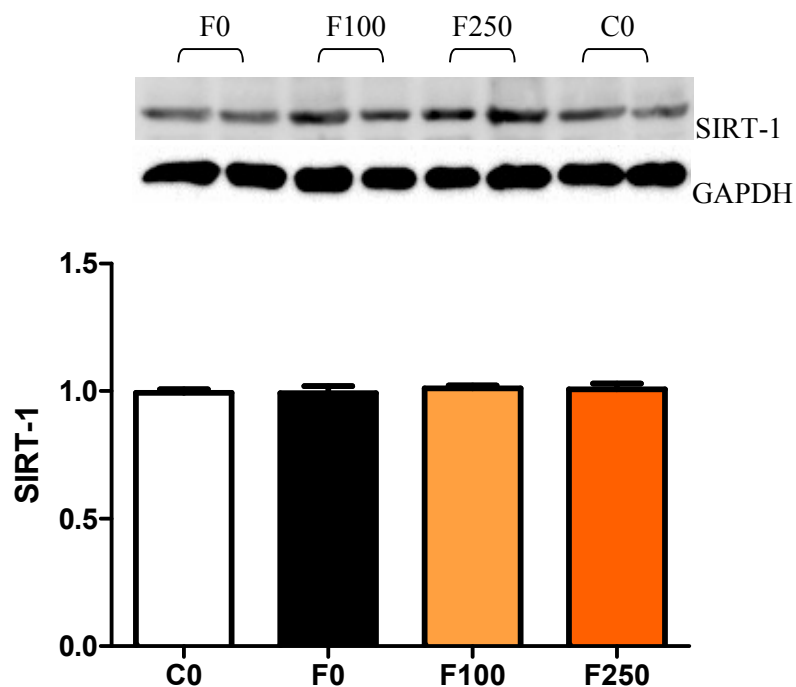


Figura 30. Expressão de SIRT-1. Grupo CO: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo FO: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

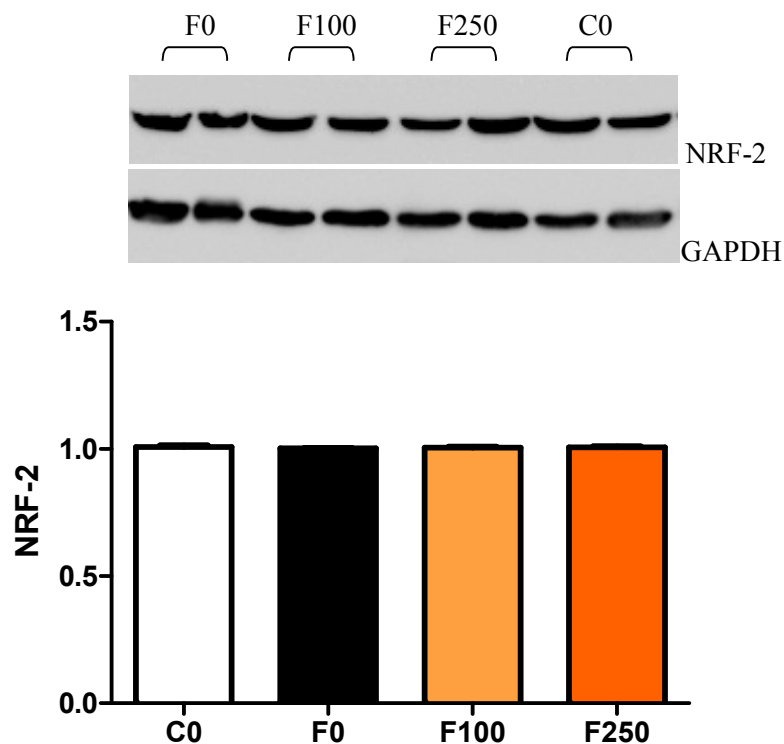


Figura 31. Expressão de NRF-2. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

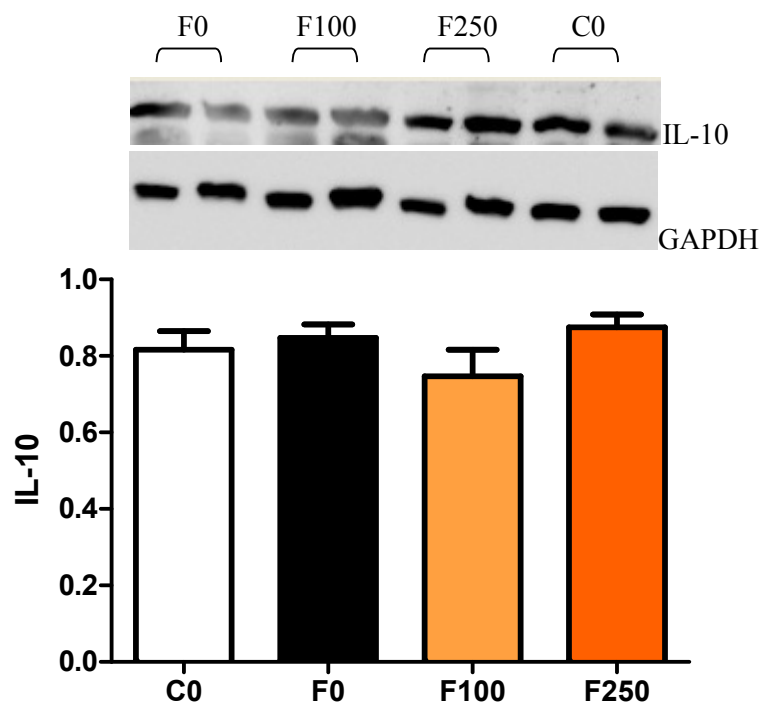


Figura 32. Expressão de IL-10. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

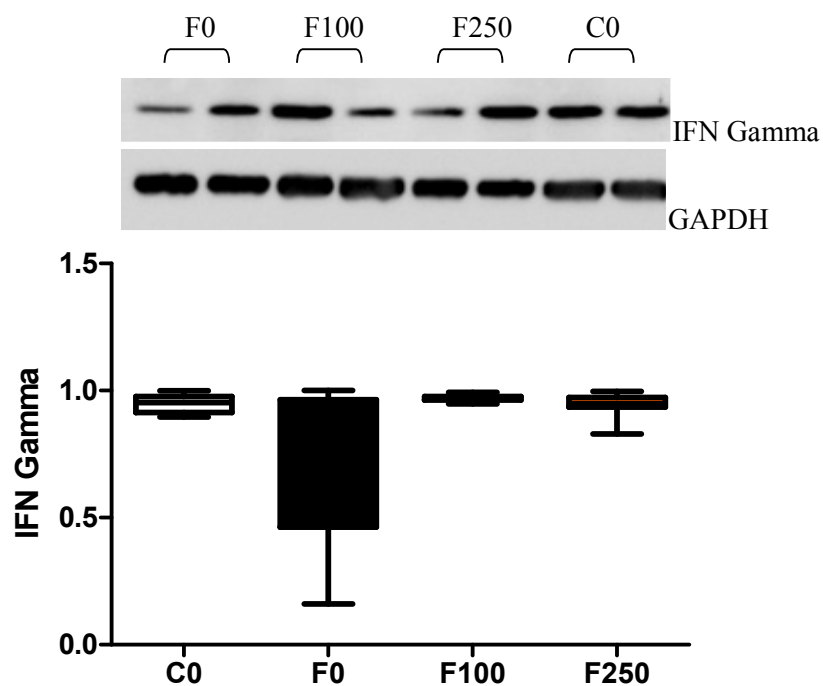


Figura 33. Expressão de IFN Gamma. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.

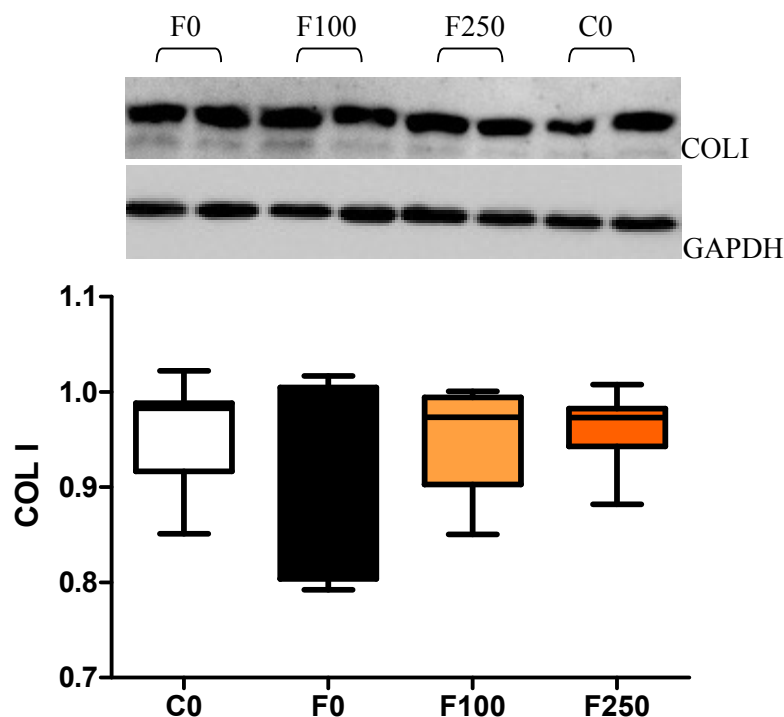


Figura 34. Expressão de Colágeno tipo I. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em mediana e percentil 25 e 75.

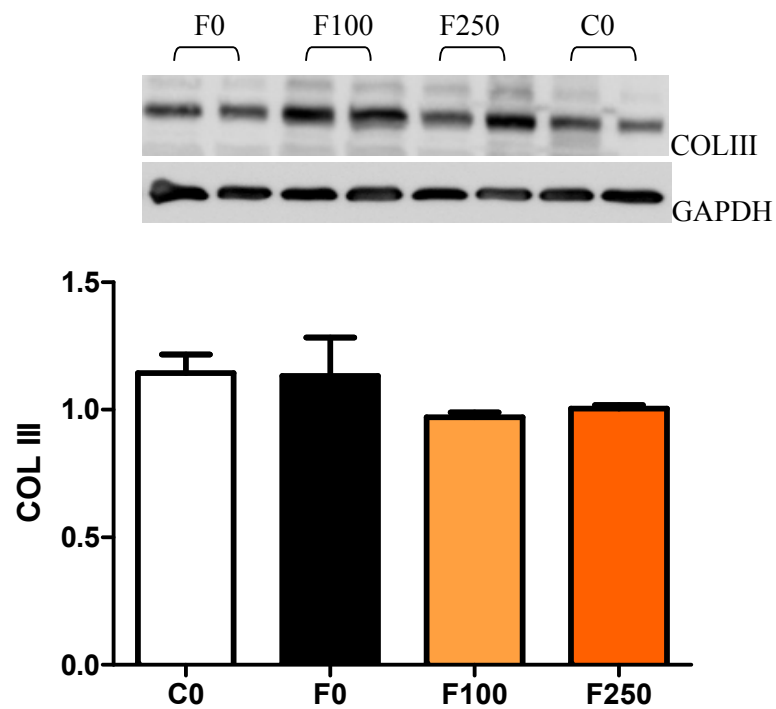


Figura 35. Expressão de Colágeno tipo III. Grupo C0: animais não fumantes com dieta padrão; Grupo F0: animais fumantes com dieta padrão; Grupo F100: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 100 mg/kg/dia; Grupo F250: animais fumantes com dieta acrescida de cajá a 250 mg/kg/dia. Dados expressos em média e desvio padrão.

DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi avaliar, de modo pioneiro, a influência da suplementação de cajá no processo de RC induzido pela EFC. Nossos dados mostram que a EFC induziu, como esperado, alterações morfológicas e morfométricas cardíacas, além de levar ao aumento do estresse oxidativo e a alterações no metabolismo energético. Já a suplementação de cajá atenuou a RC, assim como reduziu o estresse oxidativo e interferiu no metabolismo energético.

Diante do modelo utilizado para a agressão cardíaca, é importante avaliar nos animais fumantes a presença de cotinina, metabólito bem estabelecido da nicotina, para avaliar a eficiência do protocolo utilizado (63). A dosagem de cotinina sérica dos ratos fumantes mostrou sua presença em todos os animais avaliados pelo teste, enquanto que os animais que não foram expostos à fumaça do cigarro não apresentaram essa substância. Além disso, é importante ressaltar que a dosagem de cotinina sérica permitiu verificar que os animais foram submetidos à EFC de modo semelhante.

Em relação ao consumo de ração dos animais observamos que mesmo fazendo o controle da ração ofertada, a EFC induziu menor consumo de ração e, conseqüente menor peso corporal ao final do experimento. O que pode ser explicado pelo fato do cigarro ser altamente anorexígeno. Os mecanismos envolvidos ainda não são claros, mas há evidências mostrando que a dopamina e serotonina diminuem a ingestão alimentar. A nicotina eleva agudamente os níveis destes neurotransmissores no cérebro, causando menor necessidade de ingestão energética e diminuindo o apetite. Além disso, a nicotina tem efeito direto no metabolismo do tecido adiposo, influenciando a taxa de ganho ponderal (64).

No que diz respeito às alterações cardíacas, sabe-se que a EFC pode causar alterações complexas na arquitetura e função ventricular. De fato, as alterações induzidas pela fumaça do cigarro se caracterizam por hipertrofia de miócitos, aumento da cavidade ventricular e redução da função sistólica e diastólica (10,11).

Considerando os dados apresentados, a EFC resultou, conforme esperado, em aumento da ÁREA AE e AE/PC, assim como aumento dos diâmetros diastólicos e sistólicos do VE ajustados pelo PC, acompanhado por aumento do IMVE. Outro dado importante foi o aumento do VE/PC e da ASM, marcadores

importantes de hipertrofia cardíaca. Em nosso estudo, entretanto, não foram identificadas alterações funcionais tanto no ecocardiograma, como no estudo do coração isolado.

Alterações da geometria, volume, massa e constituição do coração, em resposta à agressão miocárdica ou às alterações nas condições da carga, têm sido estudadas com o nome de RC (12). Aceita-se que a hipertrofia e o aumento da cavidade ventricular cardíaca desempenham papel importante no processo de remodelação. Nossos dados confirmam estudos prévios em que a EFC foi acompanhada por aumento da cavidade ventricular e da ASM (9-11). Podemos então, concluir que nosso protocolo, mesmo não interferindo com variáveis funcionais, foi eficiente para a indução de RC após a EFC.

Outro fator que pode desempenhar papel fisiopatológico na progressão da RC é a fibrose. O tecido colágeno é um importante modulador tanto da função cardíaca diastólica quanto da função sistólica. As fibras de colágeno encontradas no interstício do tecido cardíaco são predominantemente dos tipos I e III (95% do colágeno total). Em condições patológicas, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular (65,66). No presente trabalho, não foi encontrado aumento significativo da expressão de colágeno tipo I e III após a EFC. Estudos anteriores já mostraram que não houve diferença na porcentagem de colágeno entre animais expostos e não expostos ao cigarro, apesar das alterações cardíacas encontradas nos animais fumantes (20,67).

Em virtude de a RC ser um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca e óbito, torna-se relevante identificar estratégias que modulem esse processo de remodelação (13,65) e, dentre esses fatores, destacam-se a suplementação de alimentos com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, como o cajá (*Spondias mombin*).

O cajá é uma fruta típica do norte e nordeste brasileiro, possui sabor exótico e boa qualidade e valor comercial principalmente sob a forma de sucos, polpas, sorvetes e geléias (46). Diversas propriedades da planta têm sido descritas, como antioxidantes, antibactericida, antidiabética, sedativa, antiepilética e antipsicótica, mas há escassos relatos na propriedade cardioprotetora (68).

Acredita-se que seus efeitos benéficos sejam atribuídos aos compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides presentes na fruta (33).

Dado importante encontrado no nosso estudo foi que a suplementação de cajá a 250 mg/kg/dia diminuiu o DDVE/PC e a ÁREA AE. Além disso, a suplementação de cajá a 250 mg/kg/dia reduziu a ASM, mostrando efeito relevante na redução da hipertrofia do VE. Estes achados nos permitem sugerir que o cajá atenuou a RC induzida pela EFC.

Os mecanismos pelos quais o cajá interfere nestas variáveis tendo implicações importantes na RC induzida pela EFC ainda não foram estudados. Akinmolabun e colaboradores relataram efeito cardioprotetor da suplementação do extrato da folha da cajazeira (100mg/kg e 250mg/kg) em modelo de lesão induzido por ISP, comparado ao efeito do ramipril. O extrato, administrado antes da agressão miocárdica, protegeu significativamente contra o estresse oxidativo induzido pelo ISP, tanto a nível sistêmico quanto diretamente no tecido cardíaco, visto pela melhora da função contrátil cardíaca, prevenção do rompimento de miofibrilas cardíacas, preservação da integridade da membrana dos cardiomiócitos e redução do estresse oxidativo. Houve redução das concentrações de glutathiona e malondialdeído, efeito comparado ao da administração de ramipril. O significativo aumento na atividade da SOD e CAT nos grupos tratados como extrato em comparação com o grupo que recebeu ISP reforçam ainda mais a propriedade antioxidante *in vivo* do extrato da folha da cajazeira (41).

Deste modo, acreditamos que o cajá, por sua ótima atividade antioxidante possa interferir no metabolismo energético, estresse oxidativo e inflamação cardíaca.

Em relação ao metabolismo energético, é importante mencionar, que a respiração mitocondrial depende da oxidação de substrato, além da massa e da função mitocondrial (9). Em corações normais, a utilização preferencial para síntese de ATP é a de AGs. Porém em situações de agressão cardíaca, é comum ocorrer desvio da utilização de AGs por glicose, juntamente com outras alterações da homeostase energética (16,69).

Em nosso estudo, observamos, como esperado, que a EFC levou a substituição de AGs pela glicose como fonte energética. Este fato pode ser

observado pela diminuição da atividade da enzima β -OH-acil CoA-DH. A β -OH-acil CoA-DH é a enzima responsável pela oxidação de AGs em acetil-CoA gerando NADH e FADH₂ para a cadeia transportadora de elétrons. Além disso, observamos aumento da atividade da PFK, enzima importante do metabolismo glicolítico (16).

Além da utilização preferencial de glicose, em condições de isquemia o coração passa a formar muito lactato, aumentando o metabolismo anaeróbico de carboidratos e a atividade da LDH (70), este fato também pode ser observado no nosso estudo.

Além disso, observamos diminuição da atividade da CS. A CS, enzima crucial no ciclo do citrato, parece estar diminuída na EFC, o que pode representar prejuízo na respiração e função mitocondrial, sendo este um mecanismo potencial para a diminuição da síntese de ATP na RC (9,18,71).

Neste sentido, defeitos no maquinário da cadeia respiratória e nos complexos da fosforilação oxidativa têm sido relacionados à progressão da insuficiência cardíaca (71). O que também pode ser observado neste estudo pela diminuição da atividade do complexo I e II e da ATP sintase, responsáveis pela via final da produção de ATP via fosforilação oxidativa.

Nos estágios iniciais da RC, essas alterações protegem o coração. Entretanto, cronicamente se tornam potenciais causas de lipotoxicidade e formação de EROs, contribuindo com a disfunção cardíaca (9).

Achado importante do nosso estudo foi que a suplementação de cajá, principalmente na dosagem de 250 mg/kg/dia mostrou ser eficiente em corrigir as alterações de substrato energético e função mitocondrial, visto pela diminuição da atividade da PFK e da LDH e aumento da atividade da CS e complexos I e II. Estas informações nos ajudam a entender a melhora da hipertrofia do VE com conseqüente repercussão morfológica cardíaca.

Como dito anteriormente, a respiração mitocondrial não é importante somente para a síntese de energia, mas está envolvida também na formação de EROs, tendo relação estreita com o aumento do estresse oxidativo (9).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção e remoção de agentes oxidantes no organismo, decorrente da geração

excessiva de radicais livres, principalmente EROs e nitrogênio, e/ou diminuição de antioxidantes endógenos (72).

O aumento do estresse oxidativo tem sido considerado um dos principais mecanismos de dano causado pela exposição ao cigarro (72,73). A fumaça do cigarro pode induzir produção aumentada de metabólitos e espécies reativas, além de enfraquecer o sistema de defesa antioxidante, causando desequilíbrio e aumentando o estresse oxidativo (74). Além disso, fumaça do cigarro pode ativar enzimas NADPH oxidase e xantina oxidase, principais fontes de radicais superóxido, além de induzir estresse mitocondrial por prejudicar a função da mitocôndria, no coração e em outros tecidos, contribuindo ainda mais com o aumento do estresse oxidativo (11).

Estudos experimentais têm mostrado que o estresse oxidativo pode induzir mudanças no tecido cardíaco, que contribuem com a RC, e afetar a matriz extracelular e proteínas contráteis por meio da lipoperoxidação, modificação do DNA e oxidação de proteínas (75,76).

Em nosso estudo, a exposição à fumaça do cigarro causou aumento do estresse oxidativo, com maior geração de HL, produto da lipoperoxidação, e depleção das defesas antioxidantes, sugerindo a participação do estresse oxidativo nas alterações encontradas. Considerando os dados apresentados, podemos concluir que a EFC levou tanto ao aumento da produção de espécies reativas quanto à diminuição das enzimas antioxidantes, mostrando que o estresse oxidativo é um mecanismo importante neste modelo. Além disso, observamos que a suplementação de cajá nas duas dosagens reduziu o estresse oxidativo, visto pela diminuição da concentração de HL e aumento da atividade de SOD e GSH-Px. Tal efeito foi também observado em estudo realizado com extrato da folha de cajá em modelo de agressão por isoproterol, como citado anteriormente (41).

Outros marcadores de estresse oxidativo são a proteína carbonila, marcador de dano oxidativo proteico, e o teste do cometa, marcador de dano ao DNA. Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nestes marcadores tanto no que diz respeito a alterações causadas pela fumaça do cigarro quanto pelo cajá. Nosso modelo avalia dano oxidativo

crônico, entretanto estes marcadores podem estar envolvidos em momentos diferentes, o que pode explicar os achados do nosso estudo.

A fim de aprofundar os mecanismos envolvidos pelos quais a suplementação de cajá atenua o estresse oxidativo, estudamos também a expressão proteica do NRF-2 e SIRT-1.

O NRF-2 regula a expressão de enzimas antioxidantes e proteínas através do elemento de resposta antioxidante. Desta forma, tem sido aceito que NRF-2 é um componente importante nas defesas antioxidantes em doenças cardiovasculares, tais como aterosclerose, hipertensão e insuficiência cardíaca. Além disso, também está envolvido na proteção contra o estresse oxidativo durante os processos de lesão de isquemia-reperfusão e envelhecimento (77). Em condições normais, o NRF-2 é retido no citoplasma pelo Kelch-Like ECH-Associated Protein 1 (Keap1) e Cullin 3 (Cul3). Porém, em situações de estresse, o sistema Keap1-Cul3 é rompido e o NRF-2 livre migra para o núcleo, combinando-se com pequena proteína chamada Maf. Essa combinação forma um heterodímero e se liga à região promotora dos elementos de resposta antioxidante, iniciando a transcrição de genes da resposta antioxidante. Estudos experimentais mostraram que a deficiência de NRF-2 tem papel importante na patogênese da remodelação e da insuficiência cardíaca em diferentes modelos de agressão (23). Em nosso estudo, mesmo observando efeito importante do cajá na atividade das enzimas antioxidantes, não observamos alteração da expressão de NRF-2. Em estudos experimentais, observou-se que a ativação aguda do NRF-2 pode ter maior relação com efeito cardioprotetor, não havendo evidências suficientes sobre o papel da ativação crônica desta via (77).

Em relação à SIRT-1, histona desacetilase dependente de NAD, tem sido aceito que esta via participa da modulação da resposta ao estresse oxidativo no coração. Vários estudos em modelos de ratos demonstraram papel protetor da SIRT-1 contra estresse oxidativo e hipertrofia cardíaca (78,79). Por exemplo, a hiperexpressão de SIRT-1 protege contra a hipertrofia cardíaca e esta ação parece envolver a ativação do PPAR- α (80). Em outro estudo, SIRT-1 também demonstra ter papel protetor na insuficiência cardíaca induzida por doxorubicina, prevenindo o aumento do estresse oxidativo e da apoptose em cardiomiócitos (81). Em nosso estudo, porém, não foram identificadas alterações na expressão de

SIRT-1. Em estudo que avaliou os níveis de SIRT-1 em células MonoMac 6 expostas à fumaça do cigarro, observou-se diminuição dos níveis de SIRT-1 após 4 e 24h de EFC, associada a liberação de citocinas pró-inflamatórias (82). Desta forma, acreditamos que não identificamos tal alteração, pois nosso modelo de EFC avalia cronicamente as variáveis estudadas e não de modo agudo.

Em relação ao processo inflamatório, da mesma forma, não identificamos alteração na expressão de NFkB, IL-10 e IFN- γ . A presença de citocinas tem sido descritas por desempenhar papel na progressão da disfunção ventricular e na consequente piora da insuficiência cardíaca. Entretanto ainda não está claro sua participação no modelo de agressão cardíaca pela EFC. Os achados do nosso estudo estão em concordância com estudos anteriores que não evidenciaram alterações nas concentrações de citocinas pró-inflamatórias em animais expostos à fumaça do cigarro (20,76).

Os resultados encontrados neste estudo confirmam nossa hipótese, de que a suplementação de cajá pode atenuar a RC induzida pela EFC, principalmente por reduzir o estresse oxidativo e interferir no metabolismo energético cardíaco. Atualmente, tem-se proposto priorizar a seleção de alimentos e hábitos alimentares em geral ao invés do consumo de nutrientes isolados ou fatores dietéticos específicos (83) e a grande parte dos trabalhos descritos utiliza extrato da folha de cajá. Desta forma, acreditamos que os efeitos benéficos do cajá estejam relacionados à sinergia entre os vários compostos bioativos com propriedades antioxidantes presentes na polpa do cajá, como compostos fenólicos, flavonóides e carotenóides.

Estudos mostraram que a polpa de cajá é rica em compostos fenólicos. Os compostos fenólicos agem como antioxidantes, não somente por sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (84). Além disso, a polpa de cajá apresenta quantidade considerável de flavonóides. Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal (85). Os flavonóides apresentam propensão em inibir radicais livres devido às suas

estruturas químicas baseadas em seus núcleos, posições e tipos de substituintes que influenciam na atividade antioxidante (85). Em estudo que avaliou o efeito do suco de uva, importante fonte de flavonóides, em fumantes observou melhora do perfil inflamatório e do estresse oxidativo (86). Estes achados confirmam os efeitos favoráveis de flavonóides na saúde cardiovascular.

O cajá apresenta elevado teor de carotenóides que podem modular a produção de enzimas antioxidantes. O principal carotenóide encontrado no cajá é a β -criptoxantina. Em estudos epidemiológicos, a alta ingestão de β -criptoxantina tem sido associada a uma diminuição do risco de câncer de pulmão, especialmente entre os fumantes atuais (87,88). Liu e colaboradores observaram, em estudo experimental, que a suplementação com β -criptoxantina diminuiu significativamente a inflamação pulmonar induzida por fumaça de cigarro e metaplasia escamosa. A β -criptoxantina também reduziu a expressão de TNF- α e NF-kB (37).

Sabendo que os compostos antioxidantes presentes no cajá se caracterizam por eliminar as espécies reativas, reduzindo o grau de estresse oxidativo e, desta forma, previnem a oxidação de biomoléculas que podem desencadear a deterioração de funções fisiológicas, como no caso de doenças cardiovasculares (38), podemos sugerir que os benefícios encontrados pelo cajá como a melhora do estresse oxidativo e do metabolismo energético levando a repercussões cardiovasculares se devem a ótima atividade antioxidante do fruto.

CONCLUSÃO

A EFC resultou em RC, piorou o estresse oxidativo e alterou o metabolismo energético cardíaco. A suplementação de cajá atenuou o processo de RC, melhorou o estresse oxidativo e as alterações no metabolismo energético induzidos pela EFC em ratos.

REFERÊNCIAS

1. Xu X, Bishop EE, Kennedy SM, Simpson SA, Pechacek TF. Annual healthcare spending attributable to cigarette smoking: an update. *Am J Prev Med.* 2015;48(3):326-33.
2. World Health Organization. WHO global report: mortality attributable to tobacco [Internet]. Geneva: WHO; 2012 [cited 2016 Nov 24]. Available from: http://www.who.int/tobacco/publications/surveillance/rep_mortality_attributable/en/
3. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis.* 2000 ;158(2):257-67.
4. Morris PB, Ference BA, Jahangir E, Feldman DN, Ryan JJ, Bahrami H, et al. Cardiovascular Effects of Exposure to Cigarette Smoke and Electronic Cigarettes: Clinical Perspectives From the Prevention of Cardiovascular Disease Section Leadership Council and Early Career Councils of the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol.* 2015;66(12):1378-91.
5. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(10):1731-7.
6. Heckbert SR, Post W, Pearson GDN, Arnett DK, Gomes AS, Jerosch-Herold M, et al. Traditional cardiovascular risk factors in relation to left ventricular mass, volume, and systolic function by cardiac magnetic resonance imaging: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(11):2285-92.
7. Rosen BD, Saad MF, Shea S, Nasir K, Edvardsen T, Burke G, et al. Hypertension and smoking are associated with reduced regional left ventricular function in asymptomatic individuals the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(6):1150-8.

8. Andrews JO, Tingen MS. The effect of smoking, smoking cessation, and passive smoke exposure on common laboratory values in clinical settings: a review of the evidence. *Crit Care Nurs Clin North Am.* 2006;18(1):63-9, xii.
9. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VCMP, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *PloS One.* 2014;9(12):e113739.
10. Azevedo PS, Minicucci MF, Matsubara BB, Matsubara LS, Duarte DR, Paiva SAR, et al. Remodeling pattern and ventricular function in rats exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):224-8.
11. Rafacho BP, Azevedo PS, Polegato BF, Fernandes AA, Bertoline MA, Fernandes DC, et al. Tobacco smoke induces ventricular remodeling associated with an increase in NADPH oxidase activity. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(3-4):305-12.
12. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SAR, Zornoff LAM, Azevedo PS, et al. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016;106(1):62-9.
13. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(2):150-64.
14. Minicucci FM, S Azevedo P, F Polegato B, AR Paiva S, AM Zornoff L. Cardiac remodeling induced by smoking: concepts, relevance, and potential mechanisms. *Inflamm Allergy-Drug Targets Former Curr Drug Targets-Inflamm Allergy.* 2012;11(6):442-7.
15. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SAR, Zornoff LAM. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev.* 2013;21(3):135-40.

16. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation*. 2002;105(2):140-2.
17. Zhou X, Sheng Y, Yang R, Kong X. Nicotine promotes cardiomyocyte apoptosis via oxidative stress and altered apoptosis-related gene expression. *Cardiology*. 2010;115(4):243-50.
18. Eaton MM, Gursahani H, Arieli Y, Pinkerton K, Schaefer S. Acute tobacco smoke exposure promotes mitochondrial permeability transition in rat heart. *J Toxicol Environ Health A*. 2006;69(15):1497-510.
19. Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181-90.
20. Rafacho BPM, Santos P, Assalin HB, Ardisson LP, Roscani MG, Polegato BF, et al. Role of vitamin D in the cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Int J Cardiol*. 2012;155(3):472-3.
21. Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Novelli EL, et al. The Role of Oxidative Stress and Lipid Peroxidation in Ventricular Remodeling Induced by Tobacco Smoke Exposure after Myocardial Infarction. *Clin Sao Paulo Braz*. 2009;64(7):691-7.
22. Zakkar M, Van der Heiden K, Luong LA, Chaudhury H, Cuhlmann S, Hamdulay SS, et al. Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29(11):1851-7.
23. Zhou S, Sun W, Zhang Z, Zheng Y. The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:260429.
24. Chong ZZ, Wang S, Shang YC, Maiese K. Targeting cardiovascular disease with novel SIRT1 pathways. *Future Cardiol*. 2012;8(1):89-100.

25. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1317-27.
26. Torre-Amione G. Immune activation in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* 2005;95(11A):3C - 8C; discussion 38C - 40C.
27. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev.* 2006;86(2):515-81.
28. Khanna AK, Xu J, Mehra MR. Antioxidant N-acetyl cysteine reverses cigarette smoke-induced myocardial infarction by inhibiting inflammation and oxidative stress in a rat model. *Lab Investig J Tech Methods Pathol.* 2012;92(2):224-35.
29. 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 Off J Soc Toxicol.* 2006;90(1):259-66.
30. Ayoka AO, Akomolafe RO, Akinsomisoye OS, Ukponmwan OE. Medicinal and economic value of *Spondias mombin*. *Afr J Biomed Res [Internet].* 2008 [cited 2014 Nov 25];11(2). Available from: <http://www.ajol.info/index.php/ajbr/article/download/50714/39406>
31. Bora PS, Narain N, Holschuh HJ, da S. Vasconcelos MA. Changes in physical and chemical composition during maturation of yellow mombin (*Spondias mombin*) fruits. *Food Chem.* 1991;41(3):341-8.
32. Soares EB, Gomes RLF, Carneiro JG de M e, Nascimento FN do, Silva ICV, Costa JCL da. Physical and chemical characterization of yellow mombin fruits. *Rev Bras Frutic.* 2006;28(3):518-9.
33. Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marccone MF. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Res Int.* 2011;44:14-22.

34. Nworu CS, Akah PA, Okoye FBC, Toukam DK, Udeh J, Esimone CO. The leaf extract of *Spondias mombin* L. displays an anti-inflammatory effect and suppresses inducible formation of tumor necrosis factor- α and nitric oxide (NO). *J Immunotoxicol.* 2011;8(1):10-6.
35. Uchendu CN, Isek T. Antifertility activity of aqueous ethanolic leaf extract of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) in rats. *Afr Health Sci.* 2008;8(3):163-7.
36. Tiburski JH, Rosenthal A, Deliza R, de Oliveira Godoy RL, Pacheco S. Nutritional properties of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) pulp. *Food Res Int.* 2011;44(7):2326-31.
37. Liu C, Bronson RT, Russell RM, Wang X-D. β -Cryptoxanthin supplementation prevents cigarette smoke-induced lung inflammation, oxidative damage, and squamous metaplasia in ferrets. *Cancer Prev Res Phila Pa.* 2011;4(8):1255-66.
38. Vasco C, Ruales J, Kamal-Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* 2008;111(4):816-23.
39. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet.* Edited by Alan Crozier, Michael N Clifford, and Hiroshi Ashihara. *Q Rev Biol.* 2007;82(2):151-1.
40. Silva ARA da, Morais SM de, Marques MMM, Oliveira DF de, Barros CC, Almeida RR de, et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. *Pharm Biol.* 2012;50(6):740-6.
41. Akinmoladun AC, Obuotor EM, Barthwal MK, Dikshit M, Farombi EO. Ramipril-Like Activity of *Spondias Mombin* Linn Against No-Flow Ischemia and Isoproterenol-Induced Cardiotoxicity in Rat Heart. *Cardiovasc Toxicol.* 2010;10(4):295-305.

42. Kim D-O, Chun OK, Kim YJ, Moon H-Y, Lee CY. Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem*. 2003;22;51(22):6509-15.
43. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol*. 1995;28(1):25-30.
44. Carvalho PRN, Collins CH, Rodriguez-Amaya DB. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. 1992;33(3-4):133-7.
45. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2008;22(3):659-61.
46. Carvalho AV, Mattietto RA, Assis GT, Lourenço LFH. Evaluation of the effects of pectin, gelatin and sodium alginate combination on the characteristics of a mixed structured fruit gel from papaya and yellow moringa, by response surface methodology. *Acta Amaz*. 2011;41(2):267-74.
47. Ip BC, Hu K-Q, Liu C, Smith DE, Obin MS, Ausman LM, et al. Lycopene Metabolite, Apo-10'-Lycopenoic Acid, Inhibits Diethylnitrosamine-Initiated, High Fat Diet-Promoted Hepatic Inflammation and Tumorigenesis in Mice. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2013;6(12):1304-16.
48. Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst*. 1999;91(1):60-6.
49. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman A. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation*. 1978;58(6):1072-83.
50. Zornoff LA, de Paiva SA, Tornero MT, Carvalho MS, Tucci PJ. [Influence of mannitol added to the nutrient solution on the mechanical performance and

on the degree of myocardial edema of isolated hearts of rats]. *Arq Bras Cardiol.* 1995;64(3):225-9.

51. De Stefano LM, Matsubara LS, Matsubara BB. Myocardial dysfunction with increased ventricular compliance in volume overload hypertrophy. *Eur J Heart Fail.* 2006;8(8):784-9.
52. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175(1):184-91.
53. Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol.* 1991;283:157-64.
54. Pereira B, Costa-Rosa LFBP, Bechara EJH, Newsholme P, Curi R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenalectomized rats. *Braz J Med Biol Res.* 1998;31(6):827-33.
55. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GMP, Buse MG. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. *Diabetes.* 1981;30(3):235-41.
56. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta BBA - Enzymol.* 1974;358(2):251-61.
57. Reznick AZ, Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357-63.
58. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996;328(2):309-16.

59. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969;10(2):198-206.
60. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods Biochem Anal.* 1974;22:123-75.
61. Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1985;153(1):23-36.
62. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys.* 1996;333(1):145-51.
63. Gu F, Derkach A, Freedman ND, Landi MT, Albanes D, Weinstein SJ, et al. Cigarette smoking behaviour and blood metabolomics. *Int J Epidemiol.* 2015;dyv330.
64. Chatkin R, Chatkin JM. Smoking and changes in body weight: can physiopathology and genetics explain this association? *J Bras Pneumol.* 2007;33(6):712-9.
65. Zornoff LA, Cicogna AC, Paiva SA, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. 2002 Jan 1 [cited 2016 Dec 14]; Available from: <https://www.scienceopen.com/document?vid=c917ca6d-de0e-4d74-a12b-e44c1ec2c006>.
66. Matsubara BB, Ferreira AL dos A, Matsubara LS. Aspectos anatomopatológicos da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo.* 2002;12(3):361-70.
67. Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SAK, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodelling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(11):1057-64.

68. Akinmoladun AC, Obuotor EM, Farombi EO. Evaluation of antioxidant and free radical scavenging capacities of some Nigerian indigenous medicinal plants. *J Med Food*. 2010;13(2):444-51.
69. Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *J Physiol*. 2006;577(Pt 3):769-77.
70. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85(3):1093-129.
71. Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):234-42.
72. Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovasc Res*. 2009;81(3):482-90.
73. Yamada S, Zhang XQ, Kadono T, Matsuoka N, Rollins D, Badger T, et al. Direct toxic effects of aqueous extract of cigarette smoke on cardiac myocytes at clinically relevant concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009;236(1):71-7.
74. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291-5.
75. Duarte DR, Oliveira LC, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Effects of the administration of beta-blockers on ventricular remodeling induced by cigarette smoking in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(6):479-83.
76. Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuso-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Influence of lisinopril on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Med Sci Monit Basic Res*. 2010;16(8):BR255-9.
77. Howden R. Nrf2 and Cardiovascular Defense. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:e104308.

78. Vinciguerra M, Fulco M, Ladurner A, Sartorelli V, Rosenthal N. SirT1 in muscle physiology and disease: lessons from mouse models. *Dis Model Mech.* 2010;3(5-6):298-303.
79. Vinciguerra M, Santini MP, Claycomb WC, Ladurner AG, Rosenthal N. Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity. *Aging.* 2009;2(1):43-62.
80. Planavila A, Iglesias R, Giralt M, Villarroya F. Sirt1 acts in association with PPAR α to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):276-84.
81. Ruan Y, Dong C, Patel J, Duan C, Wang X, Wu X, et al. SIRT1 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the oxidative stress and p38MAPK pathways. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2015;35(3):1116-24.
82. Yang S-R, Wright J, Bauter M, Seweryniak K, Kode A, Rahman I. Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF-kappaB in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;292(2):L567-76.
83. Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang X-D. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer.* 2010;126(8):1788-96.
84. Scarfiotti C, Fabris F, Cestaro B, Giuliani A. Free radicals, atherosclerosis, ageing, and related dysmetabolic pathologies: pathological and clinical aspects. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP.* 1997;6 Suppl 1:S31-6.
85. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13(10):572-84.

86. Kokkou E, Siasos G, Georgiopoulos G, Oikonomou E, Verveniotis A, Vavuranakis M, et al. The impact of dietary flavonoid supplementation on smoking-induced inflammatory process and fibrinolytic impairment. *Atherosclerosis*. 2016;251:266-72.
87. Männistö S, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Albanes D, Anderson K, Brandt PA van den, et al. Dietary Carotenoids and Risk of Lung Cancer in a Pooled Analysis of Seven Cohort Studies. *Cancer Epidemiol Prev Biomark*. 2004;13(1):40-8.
88. Gallicchio L, Boyd K, Matanoski G, Tao X (Grant), Chen L, Lam TK, et al. Carotenoids and the risk of developing lung cancer: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2008;88(2):372-83.