



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

**Ana Carolina Cardoso**

**Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea*  
Mart.) na razão sobre remodelação cardíaca em ratos  
expostos à fumaça do cigarro**

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. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

**Botucatu  
2016**

Ana Carolina Cardoso

Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) na razão sobre remodelação cardíaca em ratos expostos à fumaça do cigarro

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. Titular Sergio Alberto Rupp de Paiva

Coorientadora: Profa. Dra. Bertha Furlan Polegato

Botucatu  
2016

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cardoso, Ana Carolina.

Influência da suplementação de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) na ração sobre remodelação cardíaca em ratos expostos à fumaça do cigarro / Ana Carolina Cardoso. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu  
Orientador: Sergio Alberto Rupp de Paiva  
Coorientador: Bertha Furlan Polegato  
Capes: 40500004

1. Fumantes de cigarro. 2. Fumo - Efeito fisiológico. 3. Fumaça. 4. Remodelação ventricular. 5. Stress oxidativo. 6. Açaí. 7. Suplementos dietéticos.

Palavras-chave: Açaí; Estresse oxidativo; Exposição à fumaça do cigarro; Remodelação cardíaca.

*Dedicatória*

*Aos meus pais Ester e João que sempre estiveram ao meu lado e são incansáveis em demonstrar seu amor infinito.*

*Aos meus irmãos André, Víctor e Lucas por serem meus exemplos de dedicação e generosidade.*

*Ao meu namorado Felipe pelo companheirismo, força e enorme paciência nessa jornada.*

*Agradecimientos*

## *Agradecimento especial*

*Ao meu orientador, Professor Sérgio Alberto Rupp de Paiva, por me mostrar o verdadeiro significado de mestre e por toda sua paciência, generosidade e calma.*

## *Agradecimento especial*

*Ao amigo Mário Batista Bruno (in memoriam) por me acolher,  
ajudar e fazer acreditar que daria tudo certo. Meu sincero e  
eterno agradecimento.*

## *Agradecimentos*

*A Deus que me ampara e dá força em todos os momentos.*

*À minha coorientadora Profa. Dra. Bertha F. Polegato pela disponibilidade e conselhos.*

*Aos professores Dr. Leonardo A. M. Zornoff e Dr. Marcos F. Minicucci pelo auxílio de sempre.*

*Às Professoras Dra. Paula S. A. Gaiolla e Dra. Silméia G. Z. Bazan pela incrível contribuição durante todo o projeto e no exame geral de qualificação.*

*À Professora Eliriane Jamas pela análise das polpas de açaí.*

*À Professora Ana Angélica H. Fernandes pelas análises bioquímicas.*

*À minha amiga e companheira de mestrado Amanda M. Figueiredo que desde o início se tornou inseparável e esteve presente em todas as etapas desse trabalho. Obrigada por não me deixar fraquejar.*

*À minha amiga e irmã Bruna L. B. Pereira por transmitir positividade e doçura nesses quase 20 anos de amizade.*

*À minha amiga Renata A. C. da Silva pelas horas e horas de conversa boa e por estar sempre disposta a me ajudar.*

*À Andréa F. Gonçalves por nunca hesitar ajuda e pelos desabaços.*

*À Priscila P. dos Santos por ser atenciosa e paciente.*

*À Bruna P. M. Rafacho por me auxiliar, principalmente, com o modelo experimental.*

*À Vanessa C. M. Pires pela colaboração e alegria.*

*À Tatiana F. B. Pinelli pela dosagem de cotinina.*

*Ao restante da equipe de alunos Bruna C. de Oliveira, Diego F. Batista, Livia M. Beraldo, Maria Angelica M. Lourenço, Pamela N. Modesto, Patricia H. C. Alegre e Renan F. T. Claro por somarem forças junto a mim nas várias etapas percorridas.*

*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.*

*Aos meus familiares e amigos que, por muitas vezes, entenderam minha ausência, mas nunca deixaram de vibrar a cada conquista.*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.*

*“Have courage and be kind”*

*- Cinderella*

## *Lista de abreviações*

1. A: onda A do fluxo transmitral
2. A: suplementação de polpa de açaí
3. AD: átrio direito
4. AE: átrio esquerdo
5. AM: onda diastólica tardia do anel mitral septal
6. ANOVA: análise de variância
7. AO: aorta
8. AT: onda diastólica tardia do anel tricúspide lateral
9. ATP: adenosina trifosfato
10. Bcl: B-cell lymphoma
11. CAT: catalase
12. CS: citrato sintase
13. Cul3: Cullin 3
14. DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo
15. DNA: ácido desoxirribonucleico
16. DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo
17. E: onda E do fluxo transmitral
18. EDPP: espessura diastólica da parede posterior do ventrículo esquerdo
19. EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular
20. EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
21. EFC: exposição à fumaça do cigarro

22. ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay
23. EM: onda diastólica inicial do anel mitral septal
24. ENC: encurtamento
25. ET: onda diastólica inicial do anel tricúspide lateral
26. EUA: Estados Unidos da América
27. FADH: dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido
28. FC: frequência cardíaca
29. FE: fração de ejeção
30. GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
31. GSH-Px: glutathione peroxidase
32. HDL: high-density lipoprotein
33. HL: hidroperóxido de lipídio
34. IC: índice cardíaco
35. IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo
36. Keap1: Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
37. LDH: lactato desidrogenase
38. LDL: low-density lipoprotein
39. MVE: massa do ventrículo esquerdo
40. NAD: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
41. NADH: dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
42. NBT: nitro blue tetrazolium
43. NEFC: não exposto à fumaça do cigarro
44. NF- $\kappa$ B: fator nuclear- $\kappa$ B

- 45. Nrf2: fator nuclear derivado de eritróide 2
- 46. PAS: pressão arterial sistólica
- 47. PC: peso corporal final
- 48. PDH: piruvato desidrogenase
- 49. PFK: fosfofrutoquinase
- 50. RIPA: radioimmunoprecipitation assay
- 51. SM: onda sistólica do anel mitral septal
- 52. SOD: superóxido dismutase
- 53. ST: onda sistólica do anel tricúspide lateral
- 54. TDE: tempo de desaceleração da onda E
- 55. TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico
- 56. UV: ultravioleta
- 57. VD: ventrículo direito
- 58. VE: ventrículo esquerdo
- 59.  $\beta$ -OH-acil CoA-DH:  $\beta$  hidroxiacil Coenzima A desidrogenase

## *Índice de Figuras*

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Técnica para EFC .....                                               | 16 |
| Figura 2: Homogeneização das polpas de açaí .....                              | 17 |
| Figura 3: Procedimentos para aferição da PAS .....                             | 18 |
| Figura 4: Dosagem de cotinina a partir do soro .....                           | 29 |
| Figura 5: Dosagem de cotinina a partir do soro .....                           | 30 |
| Figura 6: Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo/peso corporal final ..... | 33 |
| Figura 7: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo/peso corporal final .....  | 34 |
| Figura 8: Massa do ventrículo esquerdo .....                                   | 35 |
| Figura 9: Índice de massa do ventrículo esquerdo .....                         | 36 |
| Figura 10: Peso úmido do ventrículo esquerdo .....                             | 41 |
| Figura 11: Peso úmido do ventrículo esquerdo/peso corporal final .....         | 42 |
| Figura 12: $\beta$ hidroxiaxil Coenzima A desidrogenase .....                  | 45 |
| Figura 13: Citrato sintase .....                                               | 46 |
| Figura 14: Complexo I .....                                                    | 47 |
| Figura 15: Complexo II .....                                                   | 48 |
| Figura 16: ATP sintase .....                                                   | 49 |
| Figura 17: Lactato desidrogenase .....                                         | 50 |
| Figura 18: Complexo II .....                                                   | 51 |
| Figura 19: Citrato sintase .....                                               | 52 |
| Figura 20: Hidroperóxido de lipídio .....                                      | 55 |
| Figura 21: Catalase .....                                                      | 56 |
| Figura 22: Superóxido dismutase .....                                          | 57 |
| Figura 23: Glutathiona peroxidase .....                                        | 58 |
| Figura 24: Hidroperóxido de lipídio .....                                      | 59 |
| Figura 25: Catalase .....                                                      | 60 |

## *Índice de Tabelas*

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Peso corporal, consumo de ração, PAS e cotinina sérica ..... | 28 |
| Tabela 2. Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma .....   | 32 |
| Tabela 3. Dados de função sistólica pelo ecocardiograma .....          | 37 |
| Tabela 4. Dados de função diastólica pelo ecocardiograma .....         | 38 |
| Tabela 5. Variáveis morfométricas .....                                | 40 |
| Tabela 6. Metabolismo energético .....                                 | 44 |
| Tabela 7. Estresse oxidativo .....                                     | 54 |
| Tabela 8. NF-κB e caspase-3 (unidades arbitrárias) .....               | 62 |

## *Sumário*

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Resumo .....                | 2  |
| Abstract .....              | 4  |
| 1. Introdução .....         | 6  |
| 2. Hipótese .....           | 11 |
| 3. Objetivo .....           | 13 |
| 4. Material e Métodos ..... | 15 |
| 5. Resultados .....         | 27 |
| 6. Discussão .....          | 64 |
| 7. Conclusão .....          | 71 |
| 8. Referências .....        | 73 |

*Resumo*

**Introdução:** A exposição à fumaça do cigarro (EFC) promove alterações morfológicas e funcionais no coração, conhecidas pelo nome de remodelação cardíaca. O metabolismo energético, o estresse oxidativo e a inflamação são alguns dos mecanismos que modulam este processo, assim, torna-se relevante identificar medidas que possam atenuá-los. Neste contexto, o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) pode ser útil, principalmente, devido suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. **Objetivo:** Avaliar a influência da suplementação de polpa de açaí sobre a remodelação cardíaca em ratos EFC, por meio da análise de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas e moleculares cardíacas. **Material e Métodos:** Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando aproximadamente entre 200 e 250g. Os animais foram alocados em 6 grupos: 1) Grupo não EFC e alimentado com ração comercial (NEFCA0, n=10); 2) Grupo não EFC e alimentado com ração comercial suplementada com 2% de polpa de açaí (NEFCA2, n=10); 3) Grupo não EFC e alimentado com ração comercial suplementada com 5% de polpa de açaí (NEFCA5, n=11); 4) Grupo EFC e alimentado com ração comercial (EFCA0, n=9); 5) Grupo EFC e alimentado com ração comercial suplementada com 2% de polpa de açaí (EFCA2, n=10) e 6) Grupo EFC e alimentado com ração comercial suplementada com 5% de polpa de açaí (EFCA5, n=9). Após 2 meses, foram realizados: aferição da pressão arterial sistólica, estudo ecocardiográfico, eutanásia para coleta do material biológico e estudo morfométrico. Amostras de soro foram utilizadas para dosar cotinina e amostras de ventrículo esquerdo (VE) foram utilizadas para avaliação de: metabolismo energético [ $\beta$  hidroxiaxil Coenzima A desidrogenase ( $\beta$ -OH-acil CoA-DH), citrato sintase (CS), complexo I, complexo II, ATP sintase, fosfofrutoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH) e piruvato desidrogenase (PDH)], estresse oxidativo [hidroperóxido de lipídio (HL), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2)], inflamação [fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)] e morte celular [Caspase-3]. Os valores são apresentados como média  $\pm$  erro padrão e as comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste ANOVA de duas vias, com nível de significância adotado de 5%. **Resultados:** Os animais EFC apresentaram maior concentração de cotinina sérica; maiores valores de diâmetro diastólico do VE, diâmetro sistólico do VE, massa do VE e índice de massa do VE nos dados ecocardiográficos; maior peso do VE nos dados morfométricos; menor atividade de  $\beta$ -OH-acil CoA-DH, CS, complexos I e II e ATP sintase, além de maior atividade de LDH nos dados de metabolismo energético; e, por fim, maior concentração de HL e menor atividade de CAT, SOD e GSH-Px nos dados de estresse oxidativo. Em relação à influência da suplementação de polpa de açaí nos animais EFC, o grupo EFCA5 apresentou maior atividade da CAT do que os grupos EFCA2 e EFCA0 de forma dose-dependente. Além disso, a ação da suplementação de polpa de açaí foi observada nos ratos (EFC e NEFC) que receberam a dose de 2% e apresentaram menor atividade do complexo II quando comparados com os animais que não receberam suplementação. Já os ratos (EFC e NEFC) que foram suplementados com 5% de polpa de açaí apresentaram menor concentração de HL do que os animais que receberam as outras duas dietas. Por fim, a influência da suplementação de polpa de açaí nos animais NEFC foi observada no grupo NEFCA5 que apresentou maior atividade da CS do que os grupos NEFCA2 e NEFCA0 de forma dose-dependente. **Conclusão:** A EFC induz remodelação cardíaca nos animais e a suplementação de polpa de açaí parece atenuar os efeitos do cigarro no estresse oxidativo cardíaco de forma dose-dependente.

**Palavras-chave:** Açaí; Estresse oxidativo; Exposição à fumaça do cigarro; Remodelação cardíaca.

*Abstract*

**Background:** Exposure to tobacco smoke (ETS) promotes morphological and functional changes in the heart, known by the name of cardiac remodeling. The energy metabolism, oxidative stress and inflammation are some of the mechanisms involved in this process, so it becomes important to identify measures that can mitigate them. In this context, açai (*Euterpe oleracea* Mart.) may be useful, primarily, because its antioxidant and anti-inflammatory properties. **Objective:** To evaluate the influence of açai pulp supplementation on cardiac remodeling in rats ETS, through the analysis of morphological, functional, biochemical and molecular heart variables. **Methods:** Wistar rats were used, weighing approximately 200 to 250g. The animals were allocated into 6 groups: 1) no ETS and fed with commercial chow (NETSA0, n = 10); 2) no ETS and fed with commercial chow supplemented with 2% açai pulp (NETSA2, n = 10); 3) no ETS and fed with commercial chow supplemented with 5% açai pulp (NETSA5, n = 11); 4) ETS and fed with commercial chow (ETSA0, n = 9); 5) ETS and fed with commercial chow supplemented with 2% açai pulp (ETSA2, n = 10) and 6) ETS and fed with commercial chow supplemented with 5% açai pulp (ETSA5, n = 9). After two months, measurement of systolic blood pressure, echocardiography, euthanasia for collection of biological material and morphometric study were performed. Serum samples were used to dose cotinine and left ventricular (LV) samples were used to evaluate: energy metabolism [ $\beta$  hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase ( $\beta$ -OH-acyl CoA-DH), citrate synthase (CS), complex I, complex II, ATP synthase, phosphofructokinase (PFK), lactate dehydrogenase (LDH) and pyruvate dehydrogenase (PDH)], oxidative stress [lipid hydroperoxide (LH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2)], inflammation [nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)] and cell death [Caspase-3]. The values are presented as mean  $\pm$  standard error and comparisons among groups were performed by two-way ANOVA, with significance level of 5%. **Results:** The ETS animals presented higher serum cotinine concentration; higher LV diastolic diameter, LV systolic diameter, LV mass and LV mass index in echocardiographic data; higher LV weight in morphometric data; lower activity of  $\beta$ -OH-acyl CoA-DH, CS, complexes I and II and ATP synthase, in addition to increased LDH activity in the energy metabolism data; and, finally, increased LH concentration and lower CAT, SOD and GSH-Px activity in oxidative stress data. Regarding the açai pulp supplementation influence in ETS animals, ETSA5 group presented higher CAT activity than ETSA2 and ETSA0 groups in a dose-dependent manner. Furthermore, the açai pulp supplementation action was observed in rats (ETS and NETS) fed with 2% dose and showed lower complex II activity when compared to animals that received no supplementation. Already rats (ETS and NETS) which were supplemented with 5% açai pulp had lower LH concentration than the animals that received the other two diets. Finally, the açai pulp supplementation influence in NETS animals was observed in NETSA5 group with higher CS activity than NETSA2 and NETSA0 groups in a dose-dependent manner. **Conclusion:** ETS induces cardiac remodeling in animals and açai pulp supplementation appears to mitigate the effects of smoking on cardiac oxidative stress in a dose-dependent manner.

**Keywords:** Açai; Oxidative stress; Exposure to tobacco smoke; Cardiac remodeling.

# *Introdução*

## 1. Introdução

O tabagismo é a principal causa de morte evitável no mundo e, apesar da recente diminuição de sua prevalência, aproximadamente 6 milhões de óbitos por ano são atribuídos ao uso do tabaco (1, 2). Caso sua atual situação não seja modificada, estima-se que no ano de 2025 o número de tabagistas seja superior a 1 bilhão (2). No Brasil, a estimativa de indivíduos fumantes entre a população geral é de 13,7% (3).

A fumaça do cigarro contém mais de quatro mil substâncias químicas conhecidas e é composta de duas fases: a particulada e a gasosa. A fase gasosa apresenta alta concentração de espécies reativas, que podem ser oxidantes ou pró-oxidantes (4, 5). Entre os malefícios à saúde associados ao hábito de fumar, destacam-se as alterações cardiovasculares (6, 7). A fumaça do cigarro é aterogênica e pró-trombogênica, aumentando o risco de infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, aneurisma aórtico, doença vascular periférica e morte súbita, por meio de mecanismos associados à disfunção endotelial, aumento das LDL-colesterol, redução das HDL-colesterol, aumento da concentração de moléculas de adesão e fibrinogênio, aumento da agregação plaquetária e aumento de espasmo vascular. Mesmo doses muito pequenas de exposição à fumaça do cigarro (EFC) aumentam o risco dessas situações (8-10).

Além de seus efeitos vasculares bastante conhecidos, os componentes da fumaça do cigarro atuam também diretamente sobre o coração. Trabalhos de EFC em animais observaram alterações ultraestruturais, estruturais e funcionais cardíacas (11-28), dentre elas, alterações nas fibras musculares (desorganização ou ausência de miofilamentos, invaginação da membrana plasmática, dilatação do retículo sarcoplasmático e mitocôndria polimórfica e edemaciada associada com diminuição da crista), hipertrofia, aumento da dimensão diastólica do ventrículo esquerdo (VE) e redução da função sistólica (12-14, 20, 28). Essas alterações de tamanho, forma e funções são conhecidas pelo nome de remodelação cardíaca (29, 30). Portanto, a EFC pode levar à remodelação cardíaca e intensificar remodelação iniciada por outros estímulos, como o infarto do miocárdio (26).

Uma das características mais marcantes da remodelação cardíaca é que esse processo resulta, frequentemente, em queda progressiva da função ventricular (11, 29, 30). Assim, estratégias podem ser utilizadas para atenuar o processo de remodelação e alterar sua consequente mortalidade por doenças cardíacas.

Com relação ao metabolismo energético cardíaco, em condições normais, os ácidos graxos correspondem a 60-90% do substrato utilizado para produção de energia, situação essencial para o bom funcionamento do coração. No entanto, diante de uma agressão, a utilização preferencial de ácidos graxos pode se inverter pela de glicose (31-33). Estudos relatam alterações metabólicas na remodelação cardíaca, que levam a menor produção de energia, menor utilização de ácidos graxos livres e maior utilização de glicose. Essas mudanças estão associadas à diminuição de fosfocreatina, forma na qual o ATP é estocado. São observadas também, alterações funcionais da mitocôndria, associadas à progressão da insuficiência cardíaca (34, 35).

Estudos mostraram que o estresse oxidativo e a inflamação apresentam ligação entre EFC e alterações cardíacas (24, 25, 36). 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 (37). A importância das espécies reativas não se restringe a dano ao DNA, proteínas, lipídios e macromoléculas. Elas podem desempenhar papel em processos fisiológicos, principalmente em vias de transdução de sinal, nas quais atuam como segundo mensageiro. Além disso, as espécies reativas podem modular fatores de transcrição (37, 38). Já o estresse oxidativo pode induzir disfunção mitocondrial, ativação de metaloproteases de matriz, hipertrofia, fibrose e morte celular (26, 39). Desta forma, o aumento do estresse oxidativo pode estar envolvido na remodelação cardíaca induzida por EFC.

Além do sistema antioxidante enzimático, o organismo possui diferentes mecanismos de resposta antioxidante, entre eles, os scavengers de espécies reativas, enzimas de fase II e elementos de resposta antioxidante na sua região promotora. O fator nuclear derivado de eritróide 2 (Nrf2) é o regulador mestre da via de sinalização do estresse oxidativo e dos elementos de resposta antioxidante (40). O Nrf2 coordena respostas compensatórias transcricionais que induzem rede de vias antioxidantes e enzimas de detoxificação, prevenindo danos patológicos. Em condições normais, o Nrf2 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 Nrf2 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. Entretanto, na fase crônica a via do Nrf2 pode estar exaurida ou suprimida pela expressão gênica anormal do Nrf2, causando a falha na manutenção da homeostase redox por meio das enzimas mediadas pelos elementos de resposta antioxidante.

Estudos experimentais mostraram que a deficiência de Nrf2 tem papel importante na patogênese da remodelação e da insuficiência cardíaca em diferentes modelos de agressão (41).

O estresse oxidativo pode ativar a produção de citocinas inflamatórias e em modelos de falência cardíaca esta produção modulou a remodelação cardíaca. Concentrações elevadas de interleucinas, interferon- $\gamma$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$  estão associadas com disfunção do VE, caquexia, ativação do programa genético fetal, hipertrofia, fibrose e apoptose (42-44).

O fator nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) é importante fator transcricional relacionado tanto ao estresse oxidativo, quanto ao processo inflamatório. Além disso, é o principal fator de transcrição anti-apoptose, regulando a expressão de genes como os inibidores celulares de apoptose e membros da família Bcl-2. No estudo de Zhong e colaboradores, a inibição da atividade do NF- $\kappa$ B e da regulação de proteínas anti-apoptóticas dependentes de NF- $\kappa$ B, resultou na ativação da caspase e induziu apoptose no pulmão de ratos EFC (45).

Considerando o papel do cigarro no metabolismo energético, no estresse oxidativo e na inflamação, é importante entender os mecanismos envolvidos e identificar medidas que possam atenuar estas agressões no coração.

Suplementos com ações antioxidantes e anti-inflamatórias podem ser benéficos após agressão ao miocárdio, por exemplo: estudo com probucol mostrou proteção da função cardíaca no modelo de cardiomiopatia induzida por adriamicina e maior sobrevida após infarto experimental (46). Em estudos com modelo de EFC, nutrientes como ácido retinóico, beta-caroteno e vitamina D, exerceram efeito protetor contra danos ao tecido cardíaco (22, 23, 25, 28).

Neste contexto, grande interesse tem sido focado nas ações antioxidantes e anti-inflamatórias de produtos naturais, fontes de compostos cardioprotetores (47).

O Brasil tem a maior biodiversidade do planeta, o que inclui grande número de espécies de frutas (48). Diversos autores relacionam o açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de atividades pró-apoptóticas e antiproliferativas contra células de leucemia (49-56). Em estudo sobre a ação antioxidante de frutas e vegetais brasileiros, foi possível verificar que a fruta e a polpa de açaí possuem alta capacidade antioxidante (57). A atividade antioxidante da polpa de açaí é relacionada com os compostos bioativos (vitamina C, carotenóides, antocianinas e compostos fenólicos) presentes

em sua composição. O açaí também representa importante fonte de lipídios, proteínas, fibras, vitaminas e minerais (58, 59).

Em alguns trabalhos experimentais, foi possível observar a ação antioxidante do açaí. Em ratos diabéticos, a suplementação da fruta reverteu as condições de estresse oxidativo no fígado e, no modelo de hipercolesterolemia, a suplementação melhorou o estado antioxidante no soro dos animais (49, 60). Já no modelo de EFC em camundongos, a suplementação de açaí reduziu a ação oxidante da fumaça do cigarro no pulmão (61). Não foram encontrados estudos relacionados à influência da suplementação de açaí e o estado antioxidante no coração.

Até o momento, não foi descrita a melhor dose de suplementação de açaí para que se possa fazer alegações de saúde em animais experimentais e seres humanos. Não se sabe ainda a dose de açaí de maior efeito no coração, apesar de existir estudos com modelos em outros órgãos, como no caso de Souza e colaboradores que, ao trabalharem com hipercolesterolemia em ratos, utilizaram suplementação de 2% (60). Além deles, Fragoso e colaboradores, ao tratarem câncer de bexiga em camundongos, preferiram observar a ação do açaí nas doses de 2,5 e 5% (62). Já Mertens-Talcott e colaboradores, suplementaram em humanos saudáveis polpa de açaí em dosagem dez vezes superior às doses utilizadas pelos autores anteriores (52). É possível verificar na literatura a utilização de variadas doses de suplementação, além de misturas de frutas e não o açaí puro. Diante do exposto, é interessante investigar diferentes doses de suplementação, a fim de avaliar a melhor dose e um possível efeito dose-dependente.

Assim, com base nas alterações cardíacas induzidas pelo fumo e na ação antioxidante do açaí, a sua suplementação pode atenuar a remodelação cardíaca induzida em ratos EFC.

*Hipótese*

## **2. Hipótese**

A suplementação de polpa de açaí na ração atenua o processo de remodelação cardíaca induzida pela EFC em ratos Wistar de forma dose-dependente, principalmente por ação no estresse oxidativo.

*Objetivo*

### **3. Objetivo**

Avaliar a influência da suplementação de polpa de açaí sobre a remodelação cardíaca em ratos EFC, por meio da análise de variáveis morfológicas, funcionais, bioquímicas e moleculares cardíacas.

## *Material e Métodos*

## 4. Material e Métodos

### *Animais*

O protocolo deste trabalho (1046-2013) 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 aproximadamente entre 200 e 250g, provenientes do Biotério Central da nossa instituição. Os animais foram acondicionados em gaiolas individuais, com livre acesso à água e monitorização dos ciclos de luz (claro/escuro), temperatura e umidade. A ingestão dos animais não EFC (NEFC) foi controlada e fornecida diariamente de acordo com a menor média de ração consumida dentre os grupos EFC. Os ratos foram pesados uma vez por semana. Os animais foram alocados nos seis grupos descritos a seguir:

- NEFCA0 (n=10): grupo não exposto à fumaça do cigarro açaí dose 0% (ração comercial)
- NEFCA2 (n=10): grupo não exposto à fumaça do cigarro açaí dose 2% (ração comercial suplementada com 20g de polpa de açaí/kg de ração)
- NEFCA5 (n=11): grupo não exposto à fumaça do cigarro açaí dose 5% (ração comercial suplementada com 50g de polpa de açaí/kg de ração)
- EFCA0 (n=9): grupo exposto à fumaça do cigarro açaí dose 0% (ração comercial)
- EFCA2 (n=10): grupo exposto à fumaça do cigarro açaí dose 2% (ração comercial suplementada com 20g de polpa de açaí/kg de ração)
- EFCA5 (n=9): grupo exposto à fumaça do cigarro açaí dose 5% (ração comercial suplementada com 50g de polpa de açaí/kg de ração)

### *Exposição à fumaça do cigarro*

Para expor os animais à fumaça do cigarro utilizou-se o método descrito por Simani (63), adaptado por Wang (64) e padronizado em nosso laboratório (15) (Figura 1). Castardeli e colaboradores estudaram a remodelação cardíaca em animais EFC por dois meses e já puderam verificar alterações cardíacas significativas, portanto, optamos em observar os animais por esse período de tempo (13). Os ratos foram alojados em câmara transparente, conectada a aparato, situado em outra câmara, que aspirava por vácuo a fumaça a partir da queima dos cigarros e liberava-a para a câmara com os animais. Na primeira semana, a fumaça foi obtida a partir da queima de 5 cigarros, durante 30 minutos, duas vezes por dia no período da manhã e com intervalo de 10 minutos para que a fumaça fosse exaurida. Da segunda semana em diante, o número de cigarros utilizados foi aumentado para 10, durante os mesmos 30 minutos. Esse procedimento ocorreu duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde, com os intervalos de descanso de 10 minutos, totalizando uma exposição à fumaça de 40 cigarros por dia, o que é equivalente a um fumante pesado. O cigarro comercial escolhido apresentava a seguinte composição: 0,8mg de nicotina, 10mg de alcatrão e 8mg de monóxido de carbono.



Figura 1: Técnica para EFC.

### ***Suplementação de polpa de açaí***

A ração utilizada para adição da polpa de açaí foi a Nuvilab (Nuvital®) farelada. As polpas congeladas foram adquiridas comercialmente e logo após a compra, foram homogeneizadas e estocadas à temperatura de -80°C (Figura 2). No momento do preparo da ração, a polpa já em estado líquido foi adicionada ao farelo e a seguir a mistura foi peletizada. Depois de pronta, o armazenamento foi realizado em freezer a -20°C. As doses da suplementação de polpa de açaí foram escolhidas com base nos estudos de Souza e colaboradores (2%) e Fragoso e colaboradores (5%) (60, 62).



Figura 2. Homogeneização das polpas de açaí.

### ***Aferição da pressão arterial sistólica***

Duas semanas antes do fim do experimento, a pressão arterial sistólica (PAS) dos animais foi aferida indiretamente pela cauda (65) e não houve EFC no dia anterior à medição. Para promover a vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos com o calor gerado por duas lâmpadas em uma caixa de madeira. Posteriormente, os animais foram transferidos para um suporte cilíndrico de ferro, a fim de permitir uma completa exposição da cauda, na qual foram acoplados sensor e manguito. As medidas foram determinadas por plestimografia, utilizando-se o eletroesfigmomanômetro Narco Bio-System® modelo 709-

0610 (International Biomedical, Austin, EUA). Um polígrafo também foi usado para o registro (Figura 3).



Figura 3. Procedimentos para aferição da PAS.

### *Estudo ecocardiográfico*

Após os dois meses de suplementação, os ratos foram anestesiados com quetamina (50mg/kg) e xilazina (1mg/kg) por via intramuscular. 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 (66).

Foram avaliadas as seguintes estruturas: diâmetro do átrio esquerdo (AE), diâmetro da aorta (AO), razão AE/AO, razão AE/peso corporal final (PC), área do átrio esquerdo (área AE), área do átrio direito (área AD), diâmetro diastólico do VE (DDVE), razão DDVE/PC, diâmetro sistólico do VE (DSVE), razão DSVE/PC, espessura diastólica da parede posterior (EDPP) do VE, espessura relativa da parede do VE (Esp. Rel. VE  $\rightarrow [(2 \times \text{EDPP}) / \text{DDVE}]$ ) e espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV). A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula  $[(\text{DDVE} + \text{EDPP} + \text{EDSIV})^3 - \text{DDVE}^3] \times 1,04$ , onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio (67) e o índice de massa do VE (IMVE) deu-se pela razão MVE/PC.

A função sistólica do VE foi avaliada pelas seguintes análises: frequência cardíaca (FC), onda sistólica do anel mitral septal (SM), fração de ejeção (FE  $\rightarrow [(\text{DDVE}^3 - \text{DSVE}^3 / \text{DDVE}^3) \times 100]$ ), % de encurtamento (% ENC  $\rightarrow [(\text{DDVE} - \text{DSVE} / \text{DDVE}) \times 100]$ ) e

índice cardíaco (IC), obtido pela razão débito cardíaco/PC. A função sistólica do VD foi avaliada pela onda sistólica do anel tricúspide lateral (ST).

A função diastólica do VE foi analisada por: onda E do fluxo transmitral (E), onda A do fluxo transmitral (A), razão E/A, ondas diastólicas inicial e tardia do anel mitral septal (EM e AM), razão E/EM, tempo de desaceleração da onda E (TDE), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e por fim TRIV normalizado para a frequência cardíaca ( $\text{TRIV/R-R}^{0,5}$ , onde R-R é a distância de um batimento a outro). Já a função diastólica do VD foi analisada por: ondas diastólicas inicial e tardia do anel tricúspide lateral (ET e AT).

### ***Eutanásia e coleta do material biológico***

Após o estudo ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com dose excessiva de pentobarbital para a eutanásia. Logo após, o coração foi coletado e dissecado em AE, AD, VE e ventrículo direito (VD). O sangue dos animais também foi coletado e centrifugado para a obtenção do soro. VE e soro foram armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para as posteriores análises.

### ***Estudo morfométrico***

Os átrios e 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, a fim de avaliar hipertrofia nas estruturas cardíacas.

### ***Dosagem da cotinina sérica***

A cotinina, 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).

### *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) (68). As leituras foram realizadas em leitor de microplaca com controle por software. Todos os reagentes foram obtidos do laboratório Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA).

- Determinação da atividade da  $\beta$ -OH-acil CoA-DH

Determinada na presença de tampão Tris-HCl (0,1M pH 7,0), EDTA, acetoacetyl-CoA e NADH (69).

- Determinação da atividade da citrato sintase (CS)

Avaliada pela reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetyl-CoA e oxaloacetato, reação catalisada pela CS, cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetyl-CoA, oxaloacetato e dithiobis-2-nitrobenzoato em tampão fosfato Tris-HCl (50mM pH 8,0) (69).

- 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 (70).

- 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 (71).

- 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  $MgCl_2$ , NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, lactato desidrogenase e piruvato quinase (72).

- Determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK)

A atividade da PFK foi determinada em meio contendo tampão Tris-HCl (50mM pH 8,0),  $MgCl_2$ , gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do  $NADH_2$  (69).

- 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, ditiotreitól,  $MgCl_2$ , 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 (69).

### ***Avaliação do estresse oxidativo***

A avaliação do estresse oxidativo no VE foi feita a partir da análise bioquímica da concentração de hidroperóxido de lipídio (HL), da atividade das enzimas antioxidantes e da quantificação da expressão protéica de Nrf2.

As análises de HL e enzimas foram realizadas após a determinação das proteínas totais no tecido. Amostras de 100mg do VE foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (0,01M pH 7,4) e a seguir centrifugadas. O sobrenadante foi utilizado para determinar a concentração de proteínas totais (73).

- Determinação da concentração de HL

O HL foi medido por meio da oxidação do sulfato ferroso amoniacal ( $\text{Fe}^{2+}$ ) medida por hidroperóxido, com 100µl da amostra e 900µl de mistura reagente de sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4$ ) 250µM, ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 25mM, xilenol orange 100µM e butil-hidroxitolueno 4mM em 90% (v/v) metanol. A intensidade da coloração da reação foi medida por espectrofotometria (73).

- 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 240nm (73).

- 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  $\text{O}_2^-$  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 (74).

- Determinação da atividade da glutathione 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, glutathione reduzida e glutathione redutase. Por meio da oxidação do metilenotetraidrofolato redutase a 340nm na presença de glutathione redutase, a qual catalisa a redução da glutathione oxidada, foi determinada a atividade da GSH-Px (75).

### ***Determinação da expressão de Nrf2, NF-κB e caspase-3 por Western blot***

Para quantificação do Nrf2, as proteínas nucleares das amostras de VE foram extraídas e separadas por meio de extração com tampão para extrato nuclear. A concentração de proteína dos extratos foi analisada pelo método de Bradford (76). Em relação à NF-κB fosforilada, NF-κB total e caspase-3, para extrair as proteínas realizou-se a extração de células totais com tampão radioimmunoprecipitation assay (RIPA). As proteínas presentes nas amostras homogeneizadas foram aplicadas em géis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato

de sódio 10% para eletroforese (sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell®: Bio-Rad, Hercules, EUA). Após a eletroforese, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (sistema Mini Trans-Blot®: Bio-Rad, Hercules, EUA). As membranas foram bloqueadas por 2 horas, com 0,5% de solução de leite em pó desnatado em temperatura ambiente. A seguir, as membranas foram incubadas por uma noite a 4 °C com os anticorpos primários [(Nrf2: sc-722 rabbit IgG; NF-κB fosforilada: sc-33020 rabbit IgG; NF-κB total: sc-8008 mouse IgG<sub>1</sub> (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e Caspase-3: rabbit IgG (Cell Signaling Technology®, Danvers, EUA)]. Após três lavagens com solução basal (Tris 1M pH 8,0; NaCl 2,5M e detergente Tween 20), as membranas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente com os anticorpos secundários [sc-2004 goat anti-rabbit IgG-HRP e sc-2005 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] e novamente lavadas três vezes em solução basal. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência. Como controle interno, foi utilizada a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) [sc-32233 mouse IgG<sub>1</sub> e sc-2005 goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)]. A banda de interesse foi localizada por meio de marcador de peso molecular (57kDa para o Nrf2, 65kDa para as duas formas de NF-κB, 17kDa para a caspase-3 ativa e 37kDa para o GAPDH). O fotodocumentador utilizado foi o Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, EUA) e as imagens geradas foram analisadas pelo programa Gel-Pro® 32 (Media Cybernetics, Rockville, EUA), que mede em pixel as bandas escuras em fundo claro.

### *Análise estatística*

Os dados foram apresentados em média ± erro padrão. As variáveis com distribuição não normal foram normalizadas por meio de transformação matemática para serem analisadas no teste ANOVA de duas vias. Para os dados que não conseguiram ser normalizados, foram utilizados:

- Na comparação de dois grupos → testes de Mann-Whitney ou t
- Na comparação de três grupos → testes de Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via
- Valor de p ajustado pelo método de Bonferroni (valor de p multiplicado por cinco, visto que foram realizadas cinco comparações)

Foram analisados os efeitos da exposição à fumaça do cigarro (EFC), da suplementação de polpa de açaí (A) e a interação entre os dois fatores (EFC x A) pelo teste de análise de variância (ANOVA) de dois fatores independentes. O teste ANOVA de duas vias avaliou os efeitos de cada fator sobre as variáveis estudadas, independente do efeito do outro, bem como a interação entre os dois fatores. Quando ocorreu diferença significativa, tornou-se importante identificar os animais e/ou os grupos que apresentaram diferença entre si. Para tanto, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak. No caso de interação entre os fatores, os dados foram representados em gráficos de barras tridimensionais, de modo a permitir a visualização dos seis grupos experimentais estudados, bem como a influência de cada fator sobre a variável avaliada. Quando não houve interação entre os fatores, foram analisados os dados marginais, a fim de saber se animais EFC diferiram dos animais NEFC e se os suplementados com polpa de açaí diferiram daqueles sem suplementação. Neste caso, os dados e as diferenças foram representados em gráficos de barras. Com base nessas considerações, apresentamos os resultados da seguinte maneira:

- 1) Alterações causadas pela EFC, que correspondem: a) às comparações entre os grupos NEFCA0 e EFCA0 ou NEFCA2 e EFCA2 ou NEFCA5 e EFCA5 na ocorrência de interação; b) às comparações entre todos os animais NEFC e todos os animais EFC na ausência de interação entre os fatores e c) às comparações realizadas entre os grupos NEFCA0 e EFCA0 por meio dos testes de Mann-Whitney ou t, quando não foi possível realizar a transformação matemática da variável
- 2) Efeitos da suplementação de polpa de açaí nos animais EFC, que correspondem: a) às comparações entre os grupos EFCA0, EFCA2 e EFCA5 na ocorrência de interação e b) às comparações entre os grupos EFCA0, EFCA2 e EFCA5 por meio dos testes de Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via, quando não foi possível realizar a transformação matemática da variável
- 3) Efeitos da suplementação de polpa de açaí tanto na EFC como no coração sem agressão, que correspondem: a) às comparações entre todos os animais sem suplementação de polpa de açaí e todos os animais suplementados com ambas as doses na ausência de interação entre os fatores
- 4) Efeitos da suplementação de polpa de açaí no coração sem agressão, que correspondem: a) às comparações entre os grupos NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5 na ocorrência de interação; b) às comparações entre os grupos NEFCA0, NEFCA2 e

NEFCA5 por meio dos testes de Kruskal-Wallis ou ANOVA de uma via, quando não foi possível realizar a transformação matemática da variável

O nível de significância adotado foi de 5%. Para análise dos dados e construção dos gráficos, foram utilizados os pacotes estatísticos SigmaStat versão 3.5 e SigmaPlot versão 12, respectivamente (Systat Software Inc, San Jose, EUA).

*Resultados*

## **5. Resultados**

### ***Mortalidade, peso dos animais e consumo de ração***

Quanto à mortalidade, apenas um animal pertencente ao grupo NEFCA2 morreu. O óbito ocorreu após a realização do estudo ecocardiográfico. Os animais não apresentaram diferença significativa em relação ao peso corporal inicial, peso corporal final e consumo médio diário de ração na comparação entre os grupos. Estes dados estão apresentados na Tabela 1.

### ***Pressão arterial sistólica***

Não foi observada diferença significativa da pressão arterial sistólica na comparação entre os grupos (Tabela 1).

### ***Cotínina***

Em relação à dosagem de cotínina sérica dos animais, os ratos EFC apresentaram concentrações de cotínina presente no soro, diferente dos NEFC que não apresentaram esta substância. Ao compararmos os resultados, os animais EFC apresentaram maior valor do que os animais NEFC. Não foi observada diferença na concentração de cotínina entre os três grupos EFC. Além disso, não foi observada alteração da cotínina pela suplementação de polpa de açaí ou influência da polpa de açaí nos animais EFC. Os dados estão apresentados na Tabela 1 e nas Figuras 4 e 5.

Tabela 1. Peso corporal, consumo de ração, PAS e cotinina sérica.

| Variáveis                      | Grupo NEFCA0<br>(n=10) | Grupo NEFCA2<br>(n=9) | Grupo NEFCA5<br>(n=11) | Grupo EFCA0<br>(n=9) | Grupo EFCA2<br>(n=10) | Grupo EFCA5<br>(n=9) | p (EFC)                        | p (A)                   | p (EFC x A)        |
|--------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|--------------------|
| Peso inicial (g)               | 241±9                  | 240±11                | 241±9                  | 237±9                | 240±9                 | 245±8                | 0,949                          | 0,908                   | 0,915              |
| Peso final (g)                 | 390±7                  | 402±7                 | 393±4                  | 383±5                | 384±8                 | 393±6                | 0,111                          | 0,530                   | 0,358              |
| Consumo de ração (g)           | 22,2±0,4               | 23,1±0,1              | 22,6±0,3               | 22,4±0,3             | 21,7±0,5              | 22,5±0,3             | 0,101                          | 0,759                   | 0,069              |
| PAS (mmHg) <sup>#</sup>        | 134±25                 | 108±6                 | 152±14                 | 118±7                | 122±3                 | 121±3                | 0,775 <sup>\$</sup>            | 0,170 <sup>@&amp;</sup> | 0,839 <sup>§</sup> |
| Cotinina (ng/mL) <sup>o#</sup> | 0,00±0,00              | 0,00±0,00             | 0,00±0,00              | 5,04±0,09            | 5,46±0,12             | 5,15±0,16            | <b>0,010<sup>\$&amp;</sup></b> | 1,000 <sup>@</sup>      | 0,103 <sup>§</sup> |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; PAS: pressão arterial sistólica. #: os valores não atenderam às exigências do teste ANOVA de duas vias. \$: foi realizado teste Mann-Whitney para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. @: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. &: ajuste do valor de  $\alpha$  por Bonferroni por 5 comparações. §: foi realizado teste ANOVA de uma via para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. °: n - NEFCA0=8, NEFCA2=5, NEFCA5=4, EFCA0=5, EFCA2=5 e EFCA5=5. Valor de p em negrito representa diferença significativa.

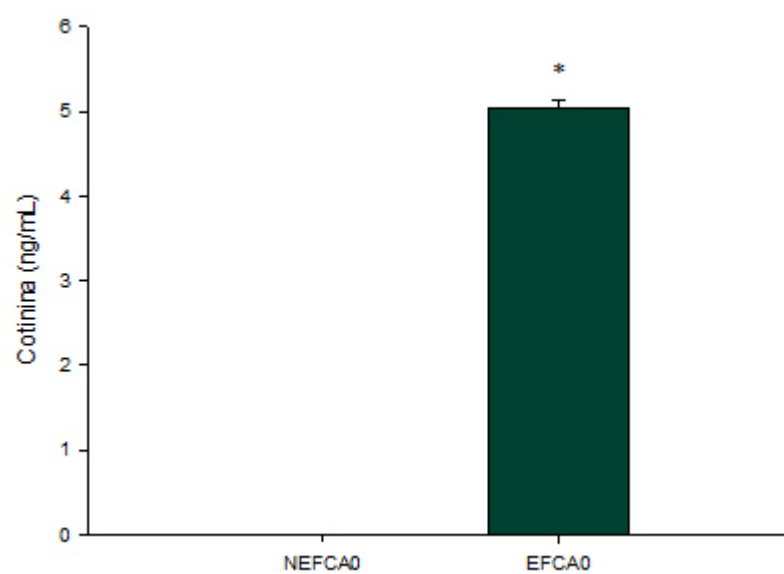


Figura 4. Dosagem de cotinina a partir do soro. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro e A0: ração sem suplementação de polpa de açaí. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p = 0,010$ .

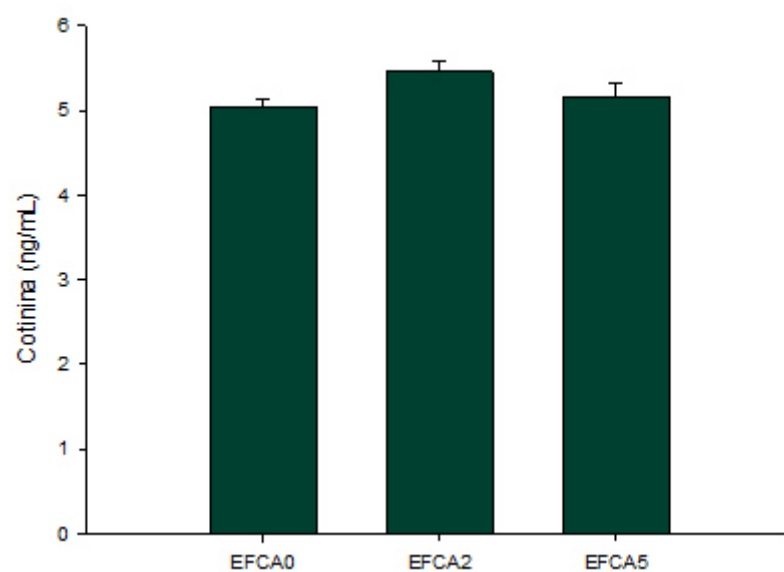


Figura 5. Dosagem de cotinina a partir do soro. EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão.  $p = 0,103$ .

### ***Estudo ecocardiográfico***

Os resultados ecocardiográficos estão apresentados nas Tabelas 2, 3 e 4. A EFC promoveu as seguintes alterações morfológicas: maiores diâmetros diastólico e sistólico do VE corrigidos pelo peso corporal final (Figuras 6 e 7), maior massa do VE e maior índice de massa do VE (Figuras 8 e 9). Não foram observadas alterações relacionadas com a suplementação de polpa de açaí ou com a influência da suplementação de polpa de açaí nos animais EFC. Com relação às variáveis de função sistólica e diastólica, não foram observadas diferenças entre os grupos.

Tabela 2. Variáveis morfológicas avaliadas pelo ecocardiograma.

| Variáveis                               | Grupo NEFCA0<br>(n=10) | Grupo NEFCA2<br>(n=9)  | Grupo NEFCA5<br>(n=11) | Grupo EFCA0<br>(n=9) | Grupo EFCA2<br>(n=10)  | Grupo EFCA5<br>(n=9) | p (EFC)             | p (A)                   | p (EFC x A)              |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|----------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------|
| AE (mm)                                 | 5,31±0,13              | 5,45±0,23              | 5,41±0,13              | 5,47±0,12            | 5,47±0,12              | 5,27±0,12            | 0,902               | 0,700                   | 0,586                    |
| AE/AO                                   | 1,45±0,04              | 1,44±0,05              | 1,46±0,04              | 1,43±0,04            | 1,49±0,05              | 1,42±0,04            | 0,995               | 0,759                   | 0,592                    |
| AE/PC (mm/kg)                           | 13,7±0,5               | 13,5±0,5               | 13,8±0,4               | 14,3±0,4             | 14,3±0,4               | 13,5±0,4             | 0,326               | 0,660                   | 0,381                    |
| Área AE (cm <sup>2</sup> ) <sup>#</sup> | 0,21±0,01              | 0,23±0,02              | 0,21±0,01              | 0,23±0,02            | 0,21±0,01              | 0,22±0,01            | 0,248 <sup>\$</sup> | 0,288 <sup>@</sup>      | 0,477 <sup>∅</sup>       |
| Área AD (cm <sup>2</sup> ) <sup>#</sup> | 0,15±0,02              | 0,20±0,00              | 0,16±0,02              | 0,18±0,02            | 0,16±0,02              | 0,17±0,02            | 0,380 <sup>\$</sup> | 0,220 <sup>@&amp;</sup> | 0,841 <sup>∅</sup>       |
| DDVE (mm)                               | 6,64±0,19              | 6,62±0,16              | 7,05±0,15              | 6,86±0,21            | 6,98±0,20              | 6,70±0,25            | 0,647               | 0,810                   | 0,164                    |
| DDVE/PC (mm/kg)                         | 17,0±0,4               | 16,5±0,4 <sup>b</sup>  | 18,0±0,4               | 17,9±0,4             | 18,2±0,6 <sup>b</sup>  | 17,1±0,6             | 0,160               | 0,946                   | <b>0,025</b>             |
| DSVE (mm) <sup>♣</sup>                  | 3,01±0,17              | 3,06±0,07              | 3,31±0,09              | 3,30±0,14            | 3,32±0,14              | 3,08±0,16            | 0,363               | 0,927                   | 0,099                    |
| DSVE/PC (mm/kg)                         | 7,71±0,39              | 7,63±0,21 <sup>b</sup> | 8,45±0,26              | 8,60±0,33            | 8,66±0,36 <sup>b</sup> | 7,86±0,43            | 0,109               | 0,999                   | <b>0,032</b>             |
| EDPP (mm) <sup>#</sup>                  | 1,69±0,04              | 1,65±0,05              | 1,63±0,04              | 1,79±0,07            | 1,67±0,07              | 1,75±0,07            | 0,322 <sup>\$</sup> | 0,560 <sup>@</sup>      | 0,433 <sup>\$</sup>      |
| Esp. Rel. VE                            | 0,51±0,02              | 0,50±0,02              | 0,46±0,02              | 0,53±0,03            | 0,48±0,03              | 0,53±0,04            | 0,300               | 0,560                   | 0,288                    |
| EDSIV (mm) <sup>#</sup>                 | 1,74±0,05              | 1,70±0,06              | 1,67±0,06              | 1,75±0,05            | 1,82±0,05              | 1,94±0,04            | 0,858 <sup>\$</sup> | 0,570 <sup>@</sup>      | 0,125 <sup>\$&amp;</sup> |
| MVE (mg)                                | 773±43                 | 741±27                 | 804±39                 | 856±55               | 853±37                 | 868±40               | <b>0,013</b>        | 0,630                   | 0,839                    |
| IMVE (mg/g)                             | 1,98±0,11              | 1,84±0,05              | 2,04±0,08              | 2,22±0,12            | 2,23±0,09              | 2,21±0,10            | <b>0,001</b>        | 0,581                   | 0,511                    |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; PC: peso corporal final; AD: átrio direito; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (VE); DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; Esp. rel. VE: espessura relativa da parede do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; MVE: massa do VE; IMVE: índice de massa do VE. #: os valores não atenderam às exigências do teste ANOVA de duas vias. \$: foi realizado teste Mann-Whitney para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. @: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. ∅: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. &: ajuste do valor de  $\alpha$  por Bonferroni por 5 comparações. ♣: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias. §: foi realizado teste ANOVA de uma via para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos: b – EFCA2 ≠ NEFCA2. Valor de p em negrito representa diferença significativa.

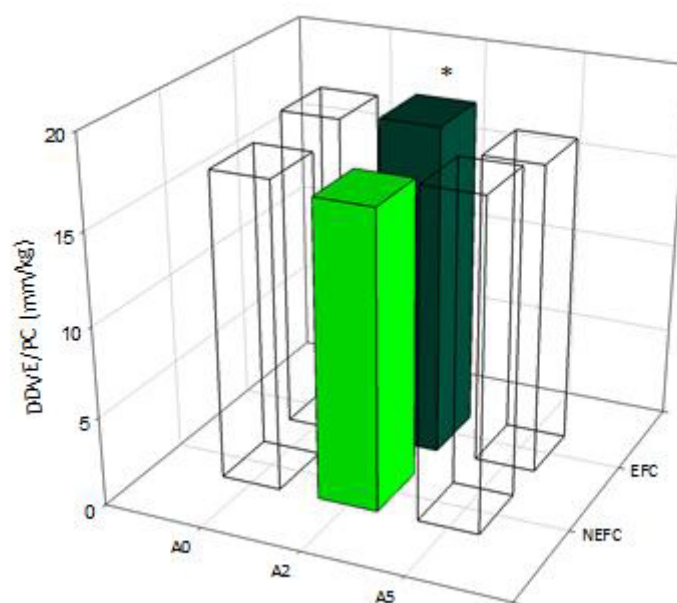


Figura 6. Diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo/peso corporal final. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \*p = 0,025.

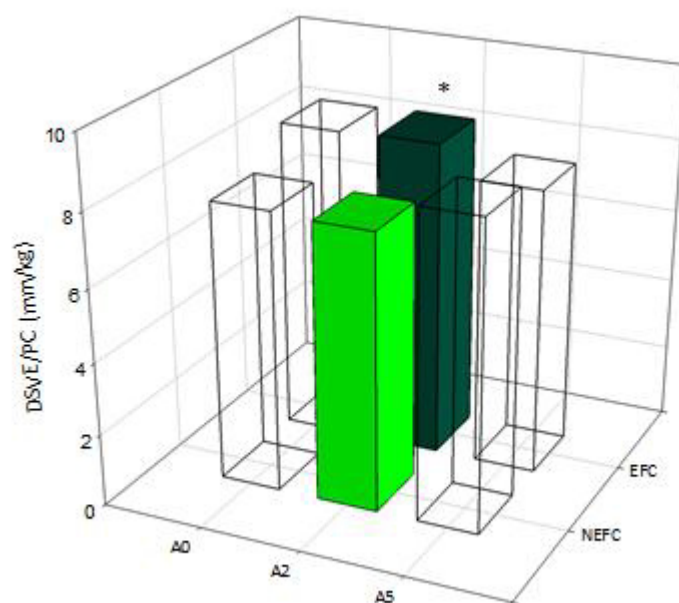


Figura 7. Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo/peso corporal final. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \*p = 0,032.

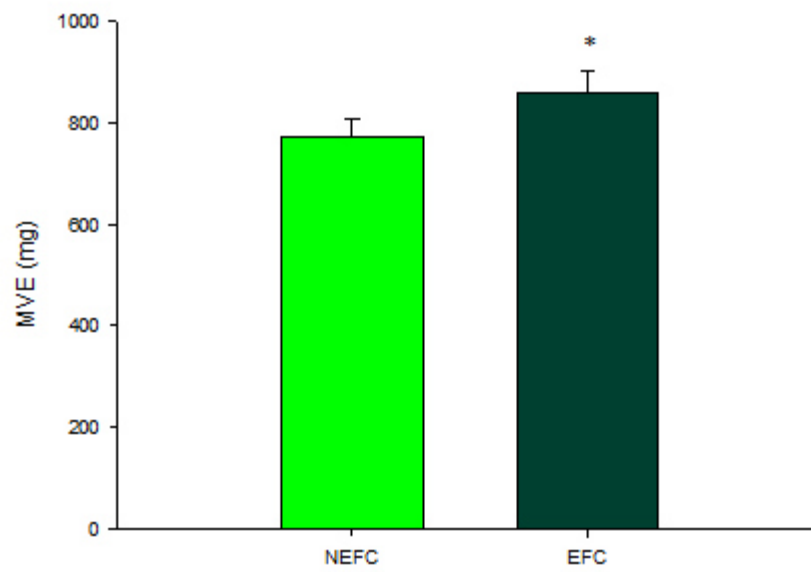


Figura 8. Massa do ventrículo esquerdo. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*p = 0,013.

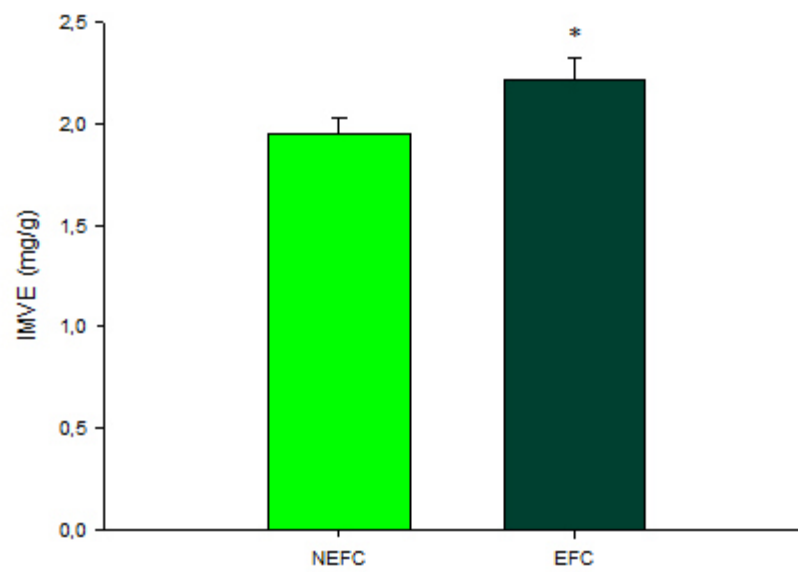


Figura 9. Índice de massa do ventrículo esquerdo. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*p = 0,001.

Tabela 3. Dados de função sistólica pelo ecocardiograma.

| Variáveis                  | Grupo NEFCA0<br>(n=10) | Grupo NEFCA2<br>(n=9) | Grupo NEFCA5<br>(n=11) | Grupo EFCA0<br>(n=9) | Grupo EFCA2<br>(n=10) | Grupo EFCA5<br>(n=9) | p (EFC)            | p (A)              | p (EFC x A)        |
|----------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| FC (bpm) <sup>♠</sup>      | 304±19                 | 281±10                | 315±16                 | 290±20               | 297±10                | 302±17               | 0,846              | 0,467              | 0,513              |
| SM (cm/s) <sup>♠</sup>     | 5,22±0,20              | 5,37±0,23             | 5,24±0,22              | 5,03±0,23            | 5,15±0,12             | 5,36±0,30            | 0,585              | 0,715              | 0,718              |
| FE (%)                     | 90,3±1,2               | 89,9±0,7              | 89,4±0,7               | 88,6±1,0             | 89,1±0,8              | 90,2±0,8             | 0,431              | 0,908              | 0,373              |
| % ENC                      | 54,8±2,0               | 53,7±1,0              | 52,9±1,0               | 51,9±1,4             | 52,5±1,1              | 54,1±1,1             | 0,376              | 0,943              | 0,306              |
| IC (mL/min/g) <sup>#</sup> | 0,21±0,03              | 0,21±0,03             | 0,27±0,03              | 0,22±0,03            | 0,21±0,03             | 0,20±0,03            | 0,882 <sup>△</sup> | 0,162 <sup>●</sup> | 0,916 <sup>◇</sup> |
| ST (cm/s)                  | 5,45±0,28              | 5,27±0,29             | 5,16±0,26              | 5,01±0,27            | 5,44±0,22             | 5,50±0,25            | 0,912              | 0,883              | 0,304              |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; FC: frequência cardíaca; SM: onda sistólica do anel mitral septal; FE: fração de ejeção; % ENC: porcentagem de encurtamento; IC: índice cardíaco; ST: onda sistólica do anel tricúspide lateral. ♠: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias. #: os valores não atenderam às exigências do teste ANOVA de duas vias. △: foi realizado teste t para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. ●: foi realizado teste ANOVA de uma via para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. ◇: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5.

Tabela 4. Dados de função diastólica pelo ecocardiograma.

| Variáveis               | Grupo NEFCA0<br>(n=10) | Grupo NEFCA2<br>(n=9) | Grupo NEFCA5<br>(n=11) | Grupo EFCA0<br>(n=9) | Grupo EFCA2<br>(n=10) | Grupo EFCA5<br>(n=9) | p (EFC)             | p (A)              | p (EFC x A)        |
|-------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| E (cm/s) <sup>#</sup>   | 78,3±2,7               | 76,8±2,4              | 80,2±3,4               | 79,2±3,5             | 73,7±2,1              | 76,9±3,3             | 0,967 <sup>\$</sup> | 0,930 <sup>@</sup> | 0,268 <sup>◇</sup> |
| A (cm/s) <sup>♣</sup>   | 46,8±3,6               | 46,3±2,6              | 52,8±3,5               | 47,5±2,4             | 46,6±1,9              | 50,2±4,2             | 0,898               | 0,271              | 0,812              |
| E/A <sup>♣</sup>        | 1,75±0,12              | 1,69±0,10             | 1,56±0,08              | 1,70±0,10            | 1,59±0,04             | 1,58±0,09            | 0,623               | 0,263              | 0,824              |
| EM (cm/s)               | 5,18±0,53              | 5,56±0,67             | 5,61±0,49              | 4,97±0,51            | 4,30±0,43             | 4,99±0,48            | 0,109               | 0,773              | 0,611              |
| AM (cm/s)               | 4,73±0,45              | 4,74±0,41             | 5,08±0,51              | 4,20±0,34            | 5,47±0,36             | 5,49±0,58            | 0,590               | 0,175              | 0,367              |
| E/EM                    | 16,3±1,4               | 15,2±1,7              | 15,3±1,4               | 17,1±1,7             | 18,8±1,9              | 16,3±1,3             | 0,163               | 0,716              | 0,618              |
| TDE (ms)                | 49,2±3,7               | 51,7±3,3              | 49,4±2,4               | 53,2±4,1             | 46,8±3,7              | 53,6±4,6             | 0,707               | 0,798              | 0,368              |
| TRIV (ms) <sup>#</sup>  | 30,5±1,7               | 29,7±2,2              | 29,2±1,2               | 28,1±1,7             | 31,2±1,9              | 31,4±1,6             | 0,346 <sup>\$</sup> | 0,821 <sup>@</sup> | 0,324 <sup>◇</sup> |
| TRIV/R-R <sup>0,5</sup> | 68,0±3,9               | 63,5±3,8              | 66,4±2,7               | 61,7±4,7             | 69,2±3,9              | 70,4±4,0             | 0,733               | 0,651              | 0,253              |
| ET (cm/s) <sup>♣</sup>  | 5,33±0,46              | 4,14±0,31             | 5,24±0,55              | 4,50±0,30            | 4,00±0,30             | 4,51±0,59            | 0,122               | 0,100              | 0,764              |
| AT (cm/s)               | 4,67±0,66              | 4,31±0,50             | 3,81±0,39              | 4,38±0,63            | 5,04±0,50             | 5,32±0,37            | 0,133               | 0,956              | 0,229              |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; E: onda E do fluxo transmitral; A: onda A do fluxo transmitral; EM: onda diastólica inicial do anel mitral septal; AM: onda diastólica tardia do anel mitral septal; TDE: tempo de desaceleração da onda E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIV/R-R<sup>0,5</sup>: TRIV normalizado para a frequência cardíaca; ET: onda diastólica inicial do anel tricúspide lateral; AT: onda diastólica tardia do anel tricúspide lateral. #: os valores não atenderam às exigências do teste ANOVA de duas vias. \$: foi realizado teste Mann-Whitney para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. @: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. ◇: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. ♣: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias.

### ***Estudo morfométrico***

Os dados morfométricos analisados estão apresentados na Tabela 5. Os animais com EFC apresentaram maior peso úmido do VE e peso úmido do VE normalizado pelo peso corporal final quando comparados com os animais NEFC (Figuras 10 e 11). Não foi observada nenhuma outra alteração pela EFC. Não foi observada ainda nenhuma alteração pela suplementação de polpa de açaí ou influência da polpa de açaí nos animais EFC entre as variáveis estudadas.

Tabela 5. Variáveis morfométricas.

| Variáveis    | Grupo NEFCA0<br>(n=10) | Grupo NEFCA2<br>(n=9) | Grupo NEFCA5<br>(n=11) | Grupo EFCA0<br>(n=9) | Grupo EFCA2<br>(n=10) | Grupo EFCA5<br>(n=9) | p (EFC)          | p (A) | p (EFC x A) |
|--------------|------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|------------------|-------|-------------|
| VE (mg)      | 711±13                 | 717±20                | 721±29                 | 796±22               | 729±23                | 782±24               | <b>0,006</b>     | 0,327 | 0,271       |
| VE/PC (mg/g) | 1,83±0,04              | 1,78±0,03             | 1,84±0,07              | 2,08±0,06            | 1,90±0,04             | 1,99±0,07            | <b>&lt;0,001</b> | 0,117 | 0,461       |
| VD (mg)      | 207±7                  | 198±14                | 199±8                  | 212±9                | 213±20                | 206±8                | 0,351            | 0,835 | 0,894       |
| VD/PC (mg/g) | 0,53±0,02              | 0,49±0,03             | 0,51±0,02              | 0,55±0,02            | 0,55±0,05             | 0,53±0,02            | 0,146            | 0,616 | 0,699       |
| AE (mg)      | 22,2±3,0               | 20,4±2,4              | 21,7±2,9               | 20,8±1,3             | 21,0±2,4              | 23,4±3,8             | 0,902            | 0,798 | 0,851       |
| AE/PC (mg/g) | 0,06±0,01              | 0,05±0,01             | 0,06±0,01              | 0,05±0,00            | 0,05±0,01             | 0,06±0,01            | 0,789            | 0,804 | 0,857       |
| AD (mg)      | 17,7±2,7               | 18,2±1,8              | 22,3±2,3               | 23,9±2,3             | 20,7±2,8              | 21,9±3,6             | 0,205            | 0,611 | 0,461       |
| AD/PC (mg/g) | 0,05±0,01              | 0,05±0,00             | 0,06±0,01              | 0,06±0,01            | 0,05±0,01             | 0,06±0,01            | 0,154            | 0,628 | 0,423       |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal final; VD: ventrículo direito; AE: átrio esquerdo; AD: átrio direito. Valor de p em negrito representa diferença significativa.

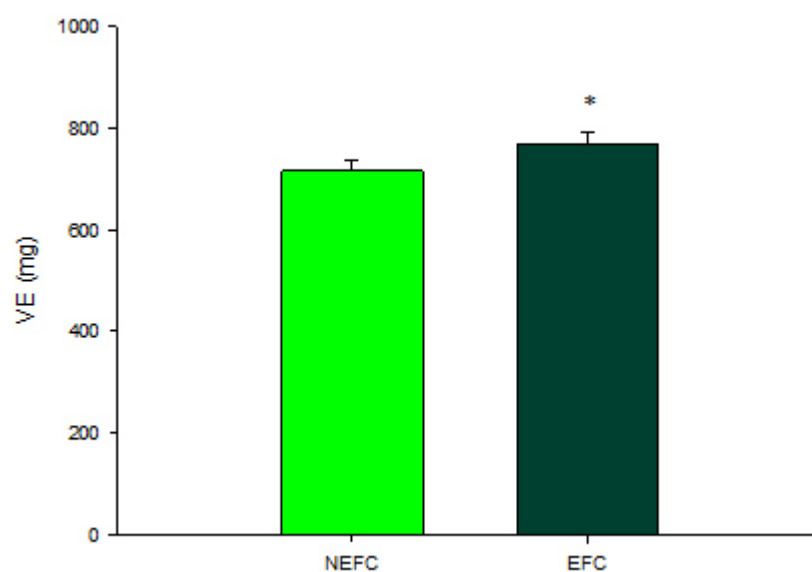


Figura 10. Peso úmido do ventrículo esquerdo. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*p = 0,006.

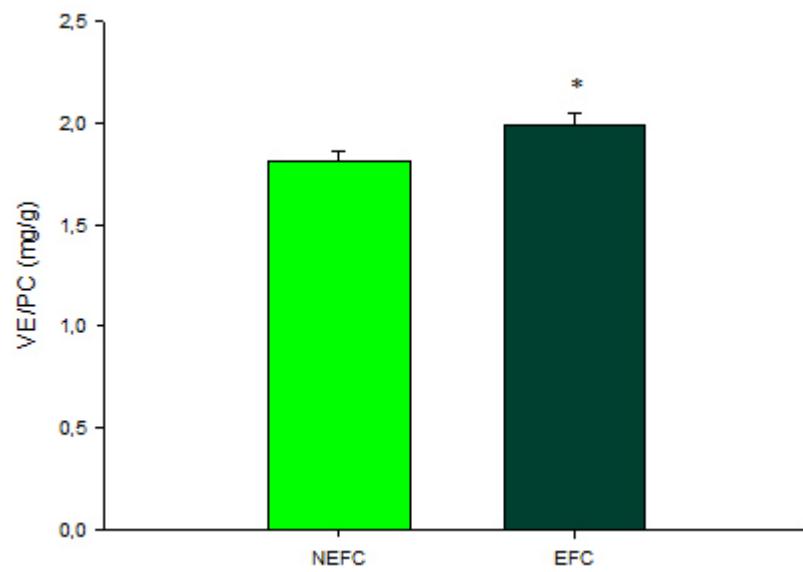


Figura 11. Peso úmido do ventrículo esquerdo/peso corporal final. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

### ***Metabolismo energético***

Os dados referentes ao metabolismo energético estão apresentados na Tabela 6 e nas Figuras 12 a 19. A EFC promoveu as seguintes alterações: menor valor de atividade da  $\beta$ -OH-acil CoA-DH, da citrato sintase, do complexo I, do complexo II e da ATP sintase, além de maior valor de atividade da lactato desidrogenase. Em relação à suplementação de polpa de açaí, os animais (EFC e NEFC) que receberam 2% apresentaram menor valor de atividade do complexo II quando comparados com os animais que não receberam suplementação. A influência da polpa de açaí nos animais NEFC foi observada pelo maior valor de atividade da citrato sintase no grupo NEFCA5 do que nos grupos NEFCA2 e NEFCA0. Não foram observadas alterações relacionadas à influência da polpa de açaí nos animais EFC entre as variáveis analisadas.

Tabela 6. Metabolismo energético.

| Variáveis                            | Grupo NEFCA0<br>(n=8)  | Grupo NEFCA2<br>(n=8) | Grupo NEFCA5<br>(n=8) | Grupo EFCA0<br>(n=8)  | Grupo EFCA2<br>(n=8)  | Grupo EFCA5<br>(n=8)  | p (EFC)                       | p (A)                    | p (EFC x A)        |
|--------------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------|
| $\beta$ -OH-acil CoA-DH <sup>1</sup> | 33,5±1,6               | 29,6±1,8              | 35,6±1,1              | 22,7±3,2              | 21,5±1,9              | 21,0±1,2              | <b>&lt;0,001</b>              | 0,287                    | 0,255              |
| Citrato sintase <sup>1♣</sup>        | 86,7±3,4 <sup>aA</sup> | 105±10 <sup>bB</sup>  | 134±8 <sup>cAB</sup>  | 60,7±7,0 <sup>a</sup> | 76,9±5,8 <sup>b</sup> | 66,2±9,5 <sup>c</sup> | <0,001                        | 0,008                    | <b>0,020</b>       |
| Complexo I <sup>2#</sup>             | 5,13±0,14              | 5,15±0,10             | 5,32±0,16             | 3,68±0,45             | 3,13±0,24             | 3,57±0,13             | <b>0,040<sup>△&amp;</sup></b> | 0,563 <sup>●</sup>       | 0,412 <sup>§</sup> |
| Complexo II <sup>2</sup>             | 5,11±0,15              | 4,84±0,19             | 4,90±0,23             | 3,74±0,49             | 2,39±0,09             | 2,97±0,11             | <b>&lt;0,001</b>              | <b>0,009<sup>‡</sup></b> | 0,106              |
| ATP sintase <sup>2</sup>             | 38,4±1,6               | 34,4±1,5              | 29,5±1,4              | 25,4±3,5              | 29,2±2,4              | 25,3±1,2              | <b>&lt;0,001</b>              | 0,059                    | 0,081              |
| Fosfofrutoquinase <sup>3</sup>       | 141±6                  | 148±9                 | 139±9                 | 126±6                 | 145±10                | 137±4                 | 0,280                         | 0,239                    | 0,602              |
| LDH <sup>2</sup>                     | 73,4±5,7               | 81,0±7,2              | 69,0±4,2              | 122±15                | 105±9                 | 102±9                 | <b>&lt;0,001</b>              | 0,382                    | 0,381              |
| PDH <sup>3#</sup>                    | 316±14                 | 306±11                | 318±17                | 254±27                | 314±9                 | 302±9                 | 0,130 <sup>\$</sup>           | 0,264 <sup>@</sup>       | 0,208 <sup>◇</sup> |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração;  $\beta$ -OH-acil CoA-DH:  $\beta$  hidroxiacil coenzima A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase; PDH: piruvato desidrogenase; 1: nmol/mg proteína; 2: nmol/mg tecido; 3: nmol/g tecido. ♣: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias. #: os valores não atenderam às exigências do teste ANOVA de duas vias. △: foi realizado teste t para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. &: ajuste do valor de  $\alpha$  por Bonferroni por 5 comparações. ●: foi realizado teste ANOVA de uma via para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. §: foi realizado teste ANOVA de uma via para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. \$: foi realizado teste Mann-Whitney para comparação entre NEFCA0 e EFCA0. @: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre NEFCA0, NEFCA2 e NEFCA5. ◇: foi realizado teste Kruskal-Wallis para comparação entre EFCA0, EFCA2 e EFCA5. ‡: comparação de dados marginais relacionados ao açaí: A2<A0. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos: a - EFCA0 ≠ NEFCA0, b - EFCA2 ≠ NEFCA2, c - EFCA5 ≠ NEFCA5, A - NEFCA0 ≠ NEFCA5 e B - NEFCA2 ≠ NEFCA5. Valor de p em negrito representa diferença significativa.

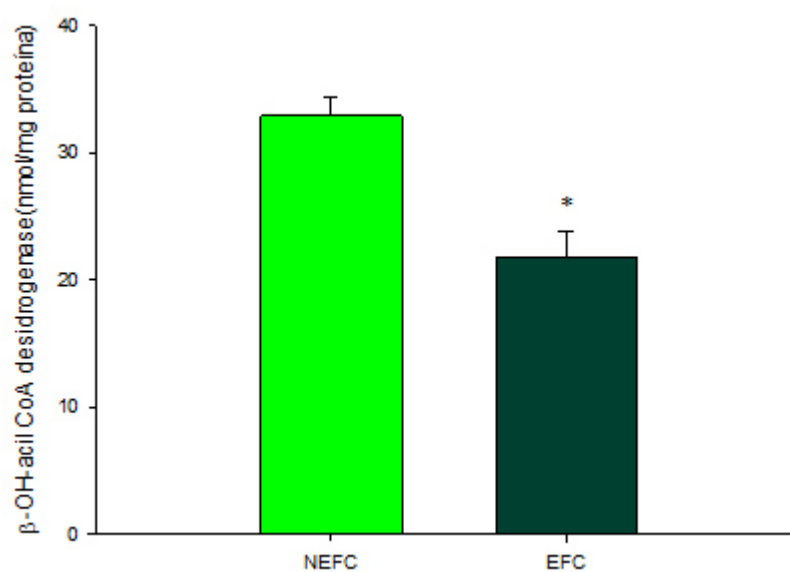


Figura 12.  $\beta$  hidroxiaçil coenzima A desidrogenase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

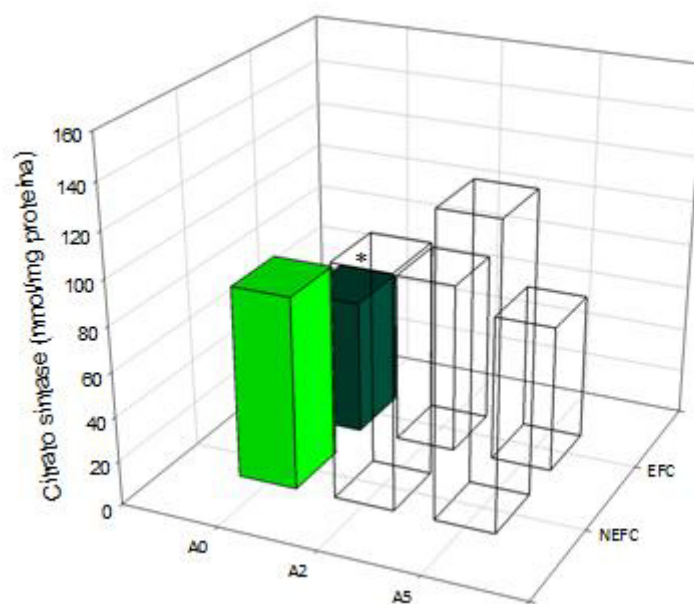


Figura 13. Citrato sintase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \*p = 0,020.

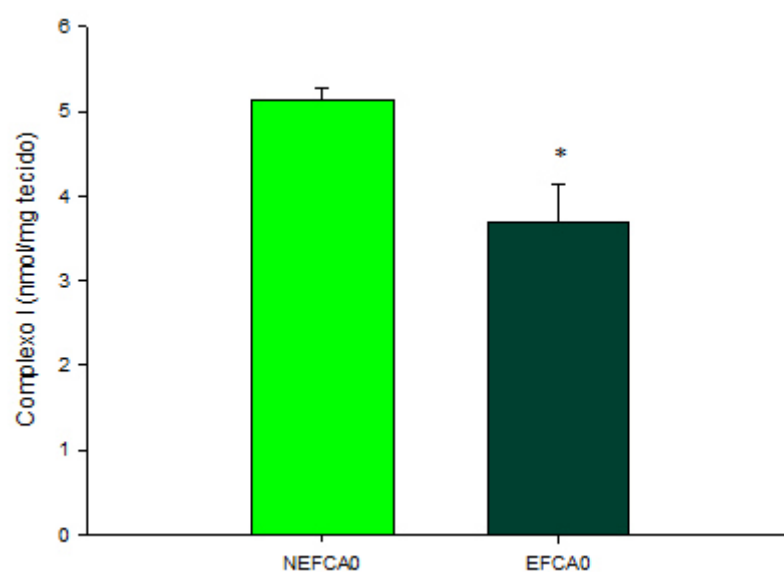


Figura 14. Complexo I. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro e A0: ração sem suplementação de polpa de açaí. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p = 0,040$ .

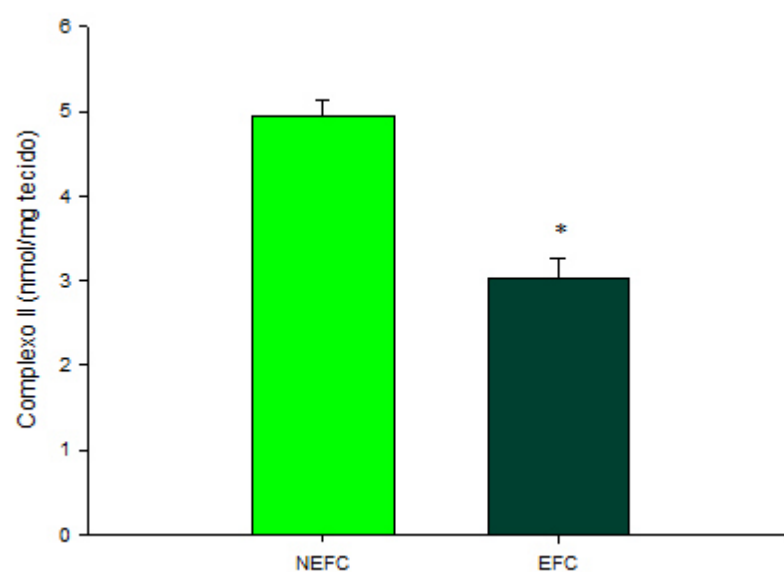


Figura 15. Complexo II. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

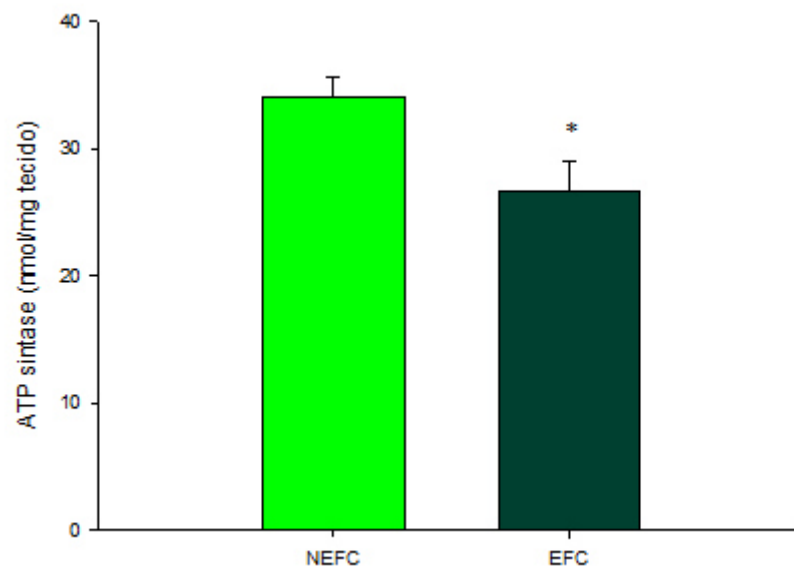


Figura 16. ATP sintase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

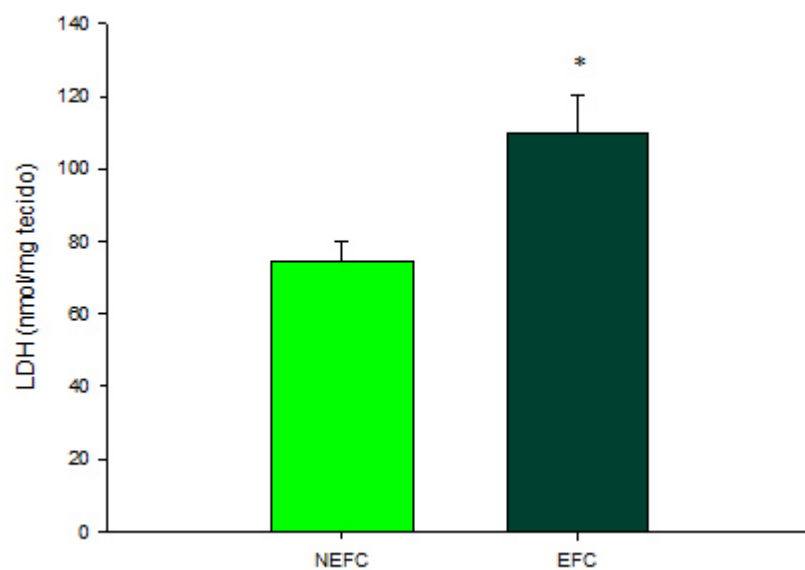


Figura 17. Lactato desidrogenase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

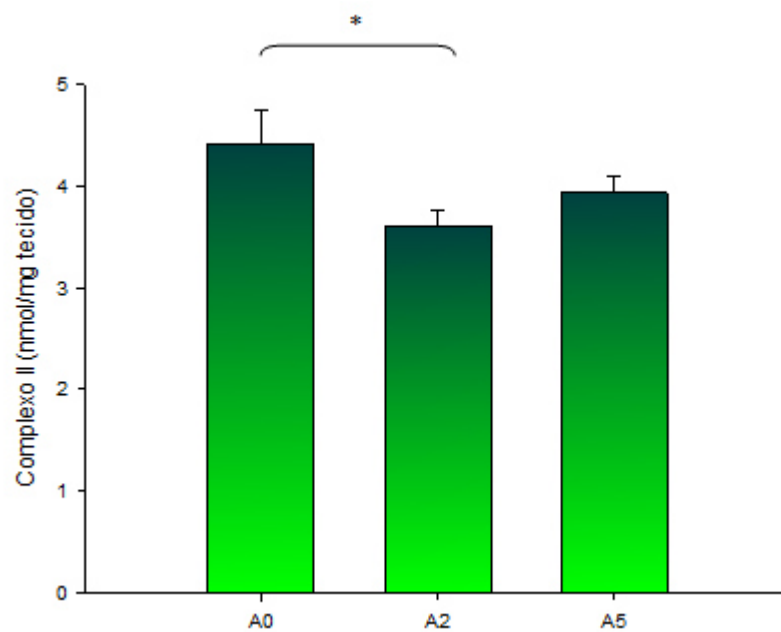


Figura 18. Complexo II. A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p = 0,009$ .

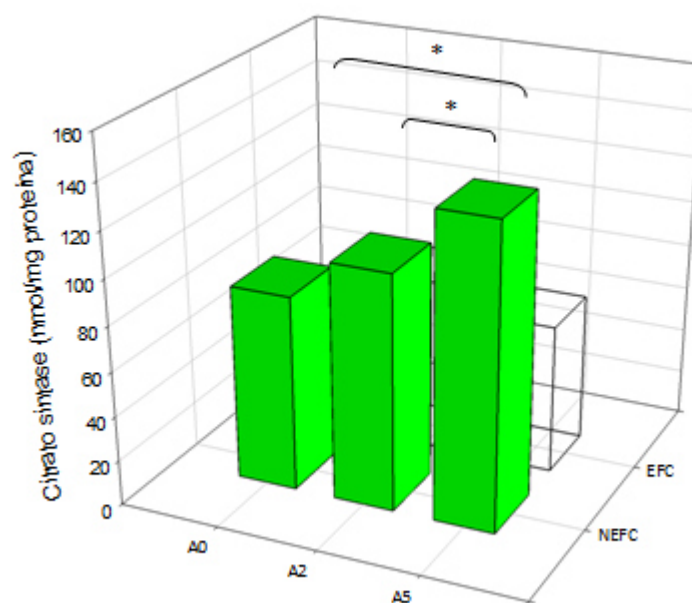


Figura 19. Citrato sintase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \* $p = 0,020$ .

### ***Estresse oxidativo***

Os dados referentes ao estresse oxidativo estão apresentados na Tabela 7 e nas Figuras 20 a 25. A EFC promoveu as seguintes alterações: maior concentração de hidroperóxido de lipídio e menor valor de atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase. Entretanto, a EFC não alterou os valores de Nrf2. Em relação à suplementação de polpa de açaí, os animais (EFC e NEFC) que receberam a dose de 5% apresentaram menor concentração de hidroperóxido de lipídio quando comparados com os animais que receberam as outras duas doses. Não foi observada nenhuma outra alteração pela suplementação de polpa de açaí. A influência da polpa de açaí nos animais EFC foi observada pelo maior valor de atividade da catalase no grupo EFCA5 do que nos grupos EFCA2 e EFCA0. Não foram observadas outras alterações relacionadas à influência da polpa de açaí nos animais EFC.

Tabela 7. Estresse oxidativo.

| Variáveis                    | Grupo NEFCA0<br>(n=8) | Grupo NEFCA2<br>(n=8) | Grupo NEFCA5<br>(n=8) | Grupo EFCA0<br>(n=8)   | Grupo EFCA2<br>(n=8)  | Grupo EFCA5<br>(n=8)   | p (EFC)          | p (A)         | p (EFC x A)  |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|------------------|---------------|--------------|
| HL (nmol/g tecido)*          | 280±20                | 302±22                | 266±24                | 584±95                 | 636±61                | 348±29                 | <b>&lt;0,001</b> | <b>0,007‡</b> | 0,058        |
| CAT (μmol/g tecido)          | 69,5±4,2 <sup>a</sup> | 61,7±4,8              | 64,2±2,1              | 52,4±2,8 <sup>aD</sup> | 55,7±4,0 <sup>E</sup> | 69,3±3,9 <sup>DE</sup> | 0,054            | 0,095         | <b>0,017</b> |
| SOD (nmol/mg proteína)       | 7,89±0,33             | 7,75±0,34             | 8,17±0,34             | 6,57±0,38              | 6,67±0,19             | 6,77±0,49              | <b>&lt;0,001</b> | 0,720         | 0,895        |
| GSH-Px (nmol/mg tecido)      | 44,0±1,8              | 45,1±1,4              | 41,9±2,6              | 24,3±4,3               | 15,2±1,1              | 21,6±1,4               | <b>&lt;0,001</b> | 0,243         | 0,066        |
| Nrf2 (unidades arbitrárias)* | 1,82±0,51             | 3,38±2,14             | 3,20±1,63             | 3,41±1,46              | 2,27±0,86             | 2,11±0,57              | 0,330            | 0,880         | 0,855        |

Os dados são expressos em média ± erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; HL: hidróperóxido de lipídio; CAT: catalase; SOD: superóxido dismutase; GSH-Px: glutatona peroxidase; Nrf2: fator nuclear derivado de eritróide 2. ♣: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias. ‡: comparação de dados marginais relacionados ao açaí: A5<A2=A0. Interação entre os fatores: as diferenças estão representadas por letras, em que letras iguais designam as diferenças entre os grupos: a - EFCA0 ≠ NEFCA0, D - EFCA0 ≠ EFCA5 e E - EFCA2 ≠ EFCA5. Valor de p em negrito representa diferença significativa.

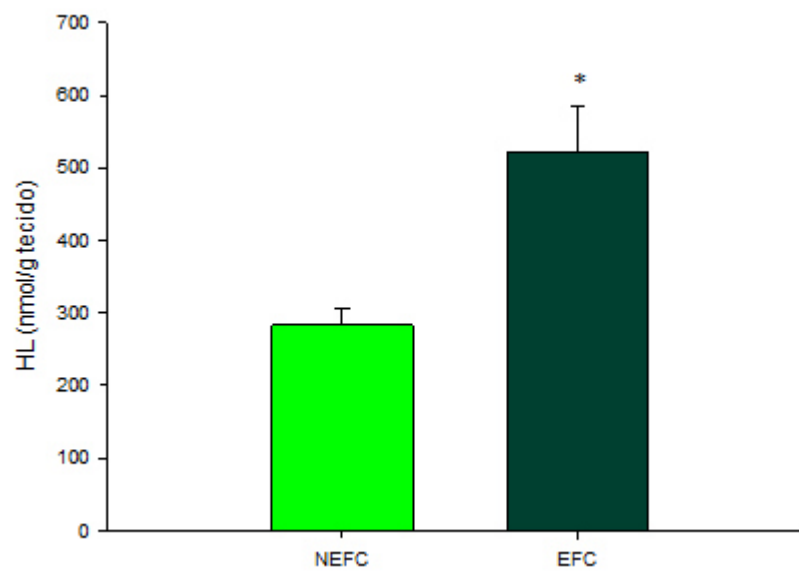


Figura 20. Hidroperóxido de lipídio. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

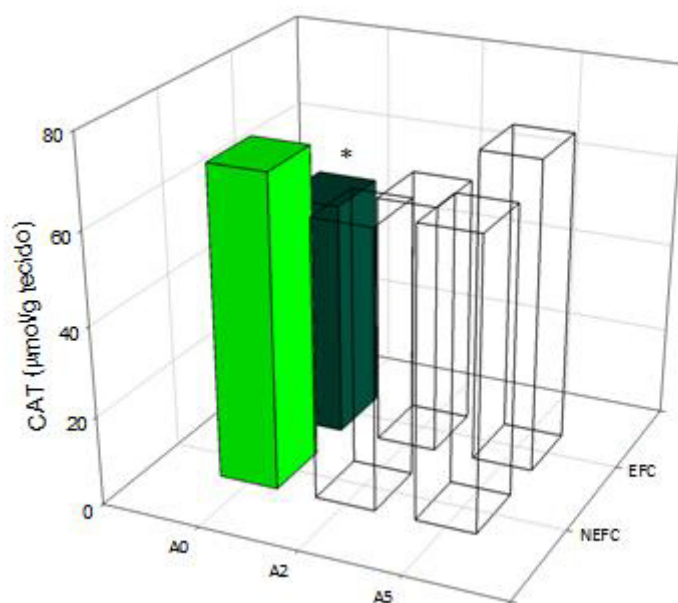


Figura 21. Catalase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \*p = 0,017.

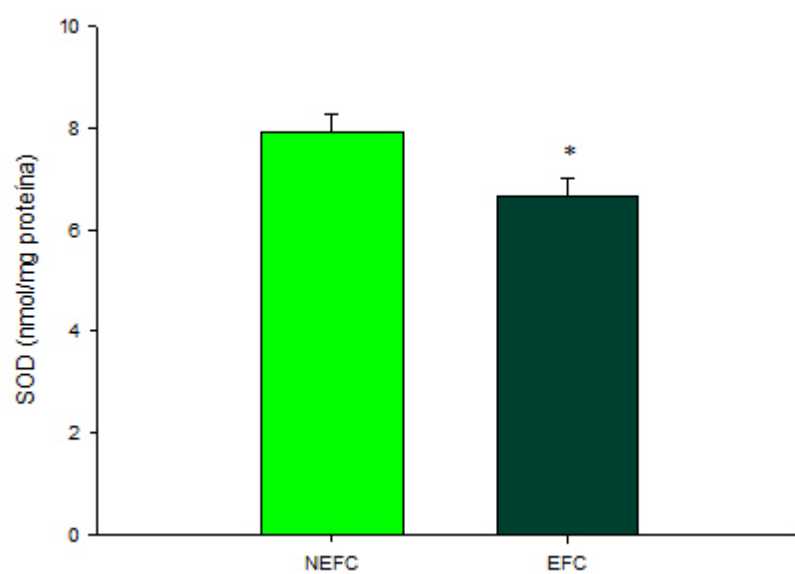


Figura 22. Superóxido dismutase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

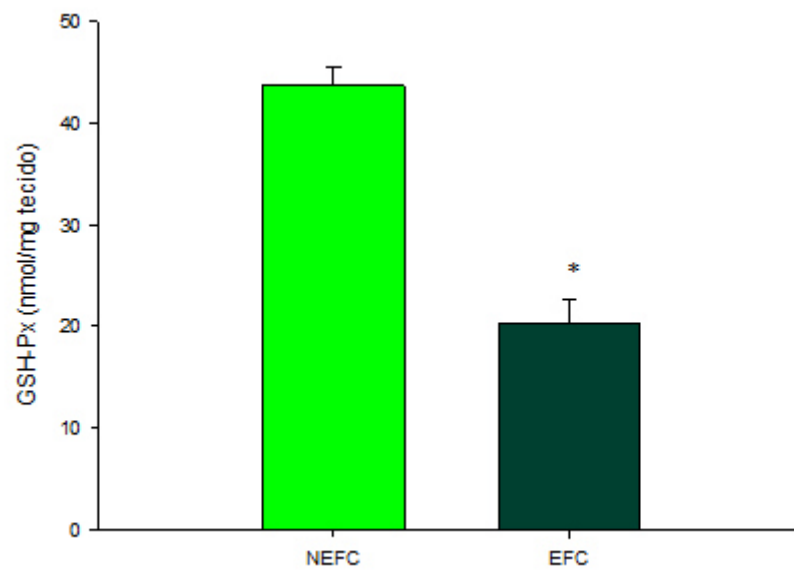


Figura 23. Glutathione peroxidase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro e EFC: animais expostos à fumaça do cigarro. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* $p < 0,001$ .

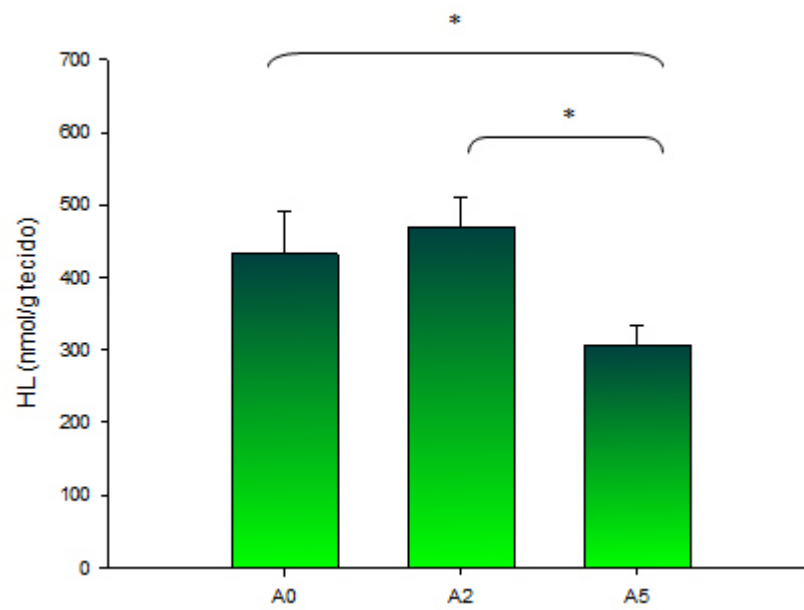


Figura 24. Hidroperóxido de lipídio. A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*p = 0,007.

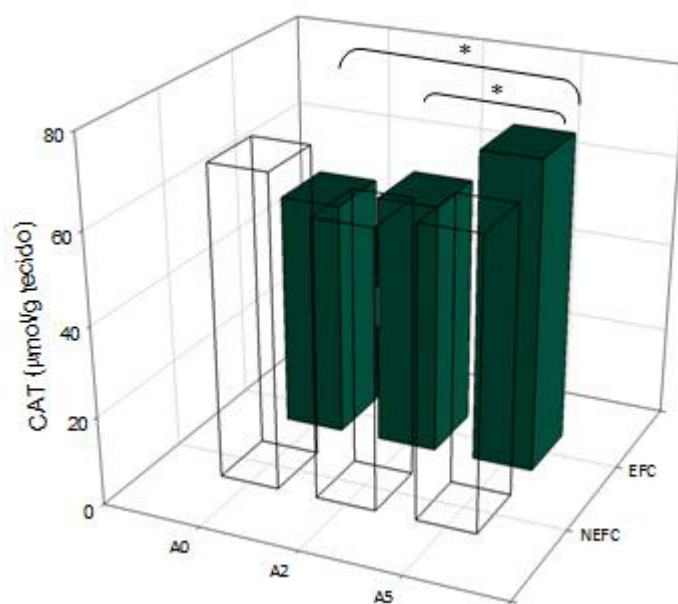


Figura 25. Catalase. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro, EFC: animais expostos à fumaça do cigarro, A0: ração sem suplementação de polpa de açaí, A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração e A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração. Dados expressos em média. \*p = 0,017.

### ***NF-κB e caspase-3***

Com relação à expressão da NF-κB nas formas fosforilada e total, da relação entre NF-κB fosforilada/NF-κB total e da caspase-3, não foram observadas diferenças entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8. NF- $\kappa$ B e caspase-3 (unidades arbitrárias).

| Variáveis                            | Grupo NEFCA0<br>(n=8) | Grupo NEFCA2<br>(n=6) | Grupo NEFCA5<br>(n=5) | Grupo EFCA0<br>(n=7) | Grupo EFCA2<br>(n=7) | Grupo EFCA5<br>(n=6) | p (EFC) | p (A) | p (EFC x A) |
|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------|-------|-------------|
| pNF- $\kappa$ B <sup>♠</sup>         | 0,84±0,06             | 1,00±0,18             | 0,78±0,22             | 1,26±0,36            | 1,06±0,22            | 0,83±0,17            | 0,618   | 0,341 | 0,848       |
| NF- $\kappa$ B total <sup>♠</sup>    | 0,90±0,05             | 1,03±0,11             | 0,73±0,09             | 1,43±0,40            | 0,89±0,13            | 0,85±0,16            | 0,715   | 0,190 | 0,419       |
| pNF- $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B total | 0,94±0,05             | 1,01±0,15             | 1,08±0,25             | 0,91±0,09            | 1,16±0,09            | 1,00±0,15            | 0,902   | 0,405 | 0,641       |
| Caspase-3 <sup>°♠</sup>              | 1,39±0,46             | 1,29±0,59             | 0,85±0,27             | 0,86±0,21            | 2,11±1,12            | 1,04±0,41            | 0,919   | 0,630 | 0,541       |

Os dados são expressos em média  $\pm$  erro padrão. NEFC: animais não expostos à fumaça do cigarro; EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; A: polpa de açaí; A0: ração sem suplementação de polpa de açaí; A2: suplementação de 20g de polpa de açaí/kg de ração; A5: suplementação de 50g de polpa de açaí/kg de ração; pNF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B forma fosforilada. ♠: variável normalizada por meio de transformação matemática para realização do teste ANOVA de duas vias. °: n - NEFCA0=7, NEFCA2=7, NEFCA5=8, EFCA0=8, EFCA2=8 e EFCA5=7.

***Díscussão***

## 6. Discussão

A remodelação cardíaca pela EFC resulta, na maioria das vezes, em queda progressiva da função ventricular, elevando a mortalidade por doenças cardíacas (11, 14). Por essa razão, algumas estratégias têm sido estudadas a fim de atenuar as alterações cardíacas induzidas pelo fumo, como por exemplo, nutrientes e alimentos com ações antioxidantes (22, 25, 28).

O açaí, fruta típica do norte brasileiro, é amplamente utilizado na produção industrial e artesanal de alimentos. Ele é bastante relacionado com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (53, 55, 57). Essas ações se devem principalmente aos compostos bioativos presentes em sua composição (59).

No modelo de fumo, o nosso estudo foi pioneiro em relacionar a influência da suplementação de polpa de açaí e o estado antioxidante no coração. Assim, o objetivo do trabalho foi analisar a influência da suplementação de polpa de açaí sobre a remodelação cardíaca em ratos EFC. Nossos dados mostraram que a EFC induziu, como esperado, alterações cardíacas. Além disso, a suplementação de polpa de açaí nos animais EFC parece atenuar de forma dose-dependente o estresse oxidativo no coração.

### *Alterações no coração relacionadas à EFC*

Diante do modelo utilizado para a agressão cardíaca, é importante avaliar nos animais EFC a presença de cotinina, metabólito da nicotina, para confirmar o sucesso do protocolo. A dosagem de cotinina sérica dos ratos mostrou sua presença em todos os animais avaliados pelo teste enquanto que os NEFC não apresentaram essa substância (77). Além disso, a dosagem de cotinina sérica permitiu verificar que os animais foram submetidos à EFC de modo semelhante.

O estudo ecocardiográfico mostrou que os animais EFC apresentaram sinais de remodelação, como: maior valor do DDVE/PC, do DSVE/PC, da massa do VE e do índice de massa do VE quando comparados com os animais NEFC. Os achados de hipertrofia pelo

ecocardiograma (maior valor da massa do VE e do índice de massa do VE) se assemelham com a morfometria do coração, em que foi possível observar maior peso úmido do VE e peso úmido do VE/PC nos animais EFC do que nos NEFC. Os dados encontrados pelo ecocardiograma e pela morfometria já eram esperados e corroboram com a literatura (14, 15, 18, 25) como, por exemplo, na revisão de Minicucci e colaboradores, em que os autores associam EFC com aumento das câmaras esquerdas cardíacas e hipertrofia cardíaca (78). Isso mostra que o nosso estudo foi adequado e obteve êxito em induzir remodelação cardíaca nos animais.

No coração, a demanda de energia é constante e a regulação do metabolismo energético é essencial. A respiração mitocondrial não é importante somente para a síntese de energia, mas está envolvida também na formação de espécies reativas. A respiração mitocondrial depende da oxidação de substrato, além da massa e da função mitocondrial (79). Em corações normais, a utilização preferencial para síntese de ATP é a de ácidos graxos. A  $\beta$ -OH-acil CoA-DH é uma das responsáveis pela oxidação de ácidos graxos em acetil-CoA, que no ciclo do citrato irá formar ácido cítrico pela citrato sintase, e gerar NADH e FADH<sub>2</sub> para a cadeia transportadora de elétrons. Um dos efeitos da fumaça de cigarro no metabolismo energético cardíaco é a diminuição da síntese de ATP (79). Em situações de agressão como essa, pode haver desvio da utilização de ácidos graxos por glicose, juntamente com outras alterações da homeostase energética (31-33). Neste sentido, defeitos no maquinário da cadeia respiratória e nos complexos da fosforilação oxidativa têm sido relacionados à progressão da insuficiência cardíaca (80). 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 (81, 82). Nos estágios iniciais da remodelação cardíaca, essa mudança protege o coração porque os ácidos graxos usam mais oxigênio quando oxidados. Quando eles não são oxidados, se tornam potenciais causas de lipotoxicidade e formação de espécies reativas (79). Os animais EFC do nosso estudo apresentaram menores valores de  $\beta$ -OH-acil CoA desidrogenase, de citrato sintase, de complexo I, de complexo II, de ATP sintase e maior valor de LDH quando comparados com os NEFC. Estes achados mostram a troca na utilização de substrato no coração, que é uma característica da remodelação cardíaca (38).

Além das alterações mencionadas acima, o metabolismo energético apresenta relação com o estresse oxidativo. Em condições normais no metabolismo energético, mais de 98% dos elétrons estão ligados ao metabolismo de ATP e somente 2% geram radicais que

serão neutralizados pelo sistema antioxidante. Entretanto, o fluxo de elétrons pode ser desviado, transformado e gerar grande quantidade de superóxido, levando a piora do metabolismo energético e ao estresse oxidativo (83). Em condições fisiológicas, os efeitos tóxicos das espécies reativas podem ser prevenidos, em parte, pelo sistema enzimático que inclui as enzimas antioxidantes (84). No presente estudo, a concentração de hidroperóxido de lipídio foi avaliada como marcador de dano oxidativo e a atividade das enzimas antioxidantes como marcador de defesa antioxidante. Os animais EFC apresentaram maior valor de hidroperóxido de lipídio e menores valores de atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase quando comparados com os ratos NEFC. Assim, o estresse oxidativo pode ser mecanismo importante no processo de remodelação cardíaca (24, 79, 85) por três motivos: o primeiro seria pelas alterações no metabolismo energético; o segundo seria a lipoperoxidação como marcador de mudança na membrana celular com alterações em decorrência desta condição; e o terceiro motivo, que o estresse oxidativo poderia participar de vias de sinalização celular como as de hipertrofia e de apoptose (86).

### ***Influência da polpa de açaí no coração do animal EFC***

O Brasil, assim como vários outros países do mundo, vem desenvolvendo políticas para o controle do tabagismo. Uma delas é a lei antifumo que, além de diminuir o número de fumantes ativos, diminuiu também o número de fumantes passivos. Está havendo ainda regulamentação das campanhas publicitárias de cigarro e maior taxa nos impostos e preços dos produtos (87). No entanto, apesar de todas essas medidas e dos conhecidos benefícios da cessação do tabagismo, o hábito de fumar ainda é realidade para um grande número de indivíduos que, por muitas vezes, sofrem para deixar o vício do cigarro, o que influencia negativamente na saúde (88). Por isso, é importante investigar estratégias que possam atenuar os efeitos deletérios do cigarro, como alternativa aos seus desfechos de morbi-mortalidade. A ação da suplementação de polpa de açaí pode ser observada por meio de suas propriedades no metabolismo energético e antioxidantes.

Na avaliação do metabolismo energético, foi observado menor valor de complexo II nos corações dos animais suplementados com 2% do que nos dos animais que não receberam suplementação de polpa de açaí. Entretanto, tal dado não se traduz em declínio da

atividade da cadeia transportadora de elétrons e piora do metabolismo energético, visto que não ocorreu diminuição da ATP sintase e nem alteração da peroxidação lipídica nos animais que receberam suplementação de 2%. O mecanismo pelo qual podemos explicar a manutenção da produção de ATP é que a fonte de elétrons para a cadeia transportadora no complexo II é o FADH<sub>2</sub>. O FADH<sub>2</sub> adiciona elétrons em nível energético menor do que o NADH. Dessa forma, com a mesma doação de par de elétrons que o NADH para a cadeia respiratória, o FADH<sub>2</sub> fornece apenas 2/3 de energia para síntese de ATP (89). Além disso, outros complexos (complexos I e III e Co-enzima Q também suprem a demanda de elétrons (90).

Como mencionado acima, a fumaça do cigarro contém espécies reativas e promove estresse oxidativo no coração, o que pode levar à remodelação. O indicador escolhido para mostrar o dano celular oxidativo foi a análise da concentração de hidroperóxido de lipídio. Este marcador é eficaz em mostrar peroxidação lipídica (91). Em trabalhos anteriores do grupo, foi mostrado que a concentração de hidroperóxido de lipídio diminuiu em ratos EFC quando estes receberam suplementação de vitamina D ou de beta-caroteno (25, 28). Assim, mostramos no presente estudo a ação protetora do açaí no estresse oxidativo de ratos EFC. Outro achado interessante foi o encontro de maior atividade de catalase no grupo EFC suplementado com a maior dose de açaí. Este aumento da atividade da catalase pode significar o maior equilíbrio do sistema oxidante/antioxidante com menor necessidade da enzima antioxidante (83). A EFC fez com que houvesse consumo das enzimas antioxidantes como mecanismo de defesa. A suplementação de açaí, ao atenuar o estresse oxidativo, normalizou os valores da atividade da catalase.

Não foram encontrados dados na literatura que associem a suplementação de açaí e o estado antioxidante no coração. No entanto, há estudos em outros órgãos e sistemas, como o trabalho com modelo de câncer de bexiga em camundongos que, após avaliação do dano ao DNA pela técnica do cometa, considerou o açaí na dose de 5% um potencial alimento funcional na prevenção da doença, provavelmente por sua ação antioxidante (62).

### ***Influência da polpa de açaí no coração do animal não EFC***

Este tipo de delineamento experimental permite ainda a avaliação da ação do suplemento de polpa de açaí no coração sem agressão. Pouca informação existe na literatura sobre a ação do açaí no coração de pessoas “saudáveis” e animais “normais”. A

suplementação de açaí por dois meses em ratos “normais” não mostrou nenhuma alteração cardíaca funcional ou morfológica. Nossos dados podem ser comparados com os de Gale e colaboradores, os quais observaram que jovens voluntários saudáveis, ao receber suplementação aguda de açaí, não apresentaram alterações hemodinâmicas importantes (92).

Uma alteração significativa ligada ao metabolismo energético, foi o aumento da enzima citrato sintase. Este achado pode estar mostrando melhora no ciclo do ácido cítrico (38).

Além disso, foi possível observar a ação da polpa de açaí em alterações relacionadas ao complexo II e ao hidróperóxido de lipídio, assim como nos animais EFC.

### ***Equivalência da suplementação de polpa de açaí: de ratos para seres humanos***

O resultado do nosso trabalho é importante porque mostra o efeito benéfico do açaí no coração de ratos EFC. Este achado pode ter implicações clínicas em humanos. Assim, é necessário o conhecimento da equivalência para seres humanos da quantidade de açaí fornecida ao rato. O cálculo de equivalência da dose para seres humanos, foi realizado a partir da equação proposta por Reagan-Shaw e colaboradores em seu estudo (93). Diariamente, um rato consome em média 25g de ração, portanto a suplementação nas doses 2 e 5% equivale, respectivamente, a 0,5 e 1,25g por dia de polpa de açaí. De acordo com a fórmula utilizada, 0,5g de polpa de açaí para o rato equivale a 15,6g para o ser humano, enquanto que 1,25g equivale a 39g. A fim de facilitar o entendimento e tornar os valores mais próximos da população, podemos expor os dados em medidas caseiras, ou seja, a quantidade de 15g seria o mesmo que 1 colher de sopa diária e 39g seria aproximadamente 2,5 colheres de sopa.

Não se trata de fazer recomendações para seres humanos, porque para fazê-las seriam necessários estudos de intervenção (clinical trials). Entretanto, o nosso estudo permite levantar a hipótese de que o açaí é benéfico para atenuar as agressões cardíacas induzidas pela fumaça do cigarro e propor que futuras pesquisas sejam realizadas em seres humanos. Com o cálculo de equivalência, podemos observar que a quantidade de polpa de açaí suplementada não é grande, tornando viável a inclusão desse alimento no dia-a-dia, após a verificação de seus efeitos benéficos.

### ***Limitações do estudo***

A ausência de alterações funcionais e morfológicas pela suplementação de polpa de açaí pode ser devido ao curto período de tempo do projeto. A duração do experimento foi definida com base no trabalho de Castardeli e colaboradores (13), em que não foram observadas diferenças nas alterações cardíacas nos ratos EFC durante 2 ou 6 meses. Assim, estudo de maior duração pode ser necessário para mostrar a influência do açaí nas alterações funcionais e morfológicas induzidas pelo fumaça do cigarro.

Outro fato interessante observado neste estudo é que a maior resposta à suplementação de polpa de açaí foi na dose 5%. Este achado faz com que tenhamos a impressão visual de que seu efeito é dose-dependente. Necessitamos de mais estudos para verificar qual é a melhor dose de açaí para obter ação benéfica no coração EFC.

*Conclusão*

## **7. Conclusão**

Em conclusão, a EFC induz remodelação cardíaca nos animais e a suplementação de polpa de açaí parece atenuar os efeitos do cigarro no estresse oxidativo cardíaco de forma dose-dependente.

## *Referências*

## 8. Referências

1. Xu X, Bishop EE, Kennedy SM, Simpson SA, Pechacek TF. Annual healthcare spending attributable to cigarette smoking: an update. *American journal of preventive medicine*. 2015;48(3):326-33.
2. Bilano V, Gilmour S, Moffiet T, d'Espaignet ET, Stevens GA, Commar A, et al. Global trends and projections for tobacco use, 1990-2025: an analysis of smoking indicators from the WHO Comprehensive Information Systems for Tobacco Control. *Lancet*. 2015;385(9972):966-76.
3. Ng M, Freeman MK, Fleming TD, Robinson M, Dwyer-Lindgren L, Thomson B, et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980-2012. *Jama*. 2014;311(2):183-92.
4. Smith CJ, Fischer TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001;158(2):257-67.
5. Counts ME, Hsu FS, Laffoon SW, Dwyer RW, Cox RH. Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*. 2004;39(2):111-34.
6. Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *Bmj*. 1994;309(6959):901-11.
7. Klein LW. Cigarette smoking, atherosclerosis and the coronary hemodynamic response: a unifying hypothesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 1984;4(5):972-4.
8. Bullen C. Impact of tobacco smoking and smoking cessation on cardiovascular risk and disease. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2008;6(6):883-95.
9. Ridker PM, Genest J, Libby P. Risk factors for atherosclerotic disease. In: *Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine* (6th ed.), edited by Braunwald E, Zipes DP and Libby P. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001, p. 1010-39.
10. Armaganijan D, Batlouni M. Impactos dos fatores de risco tradicionais. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 10: 686-93.
11. Azevedo PS, Minicucci MF, Matsubara BB, Matsubara LS, Duarte DR, Paiva SA, et al. [Remodeling pattern and ventricular function in rats exposed to cigarette smoke]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2010;94(2):209-12, 24-8, 12-5.
12. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Tobacco smoke-induced left ventricular remodeling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *European journal of heart failure*. 2007;9(11):1081-5.
13. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2008;14(3):BR62-6.
14. Castardeli E, Paiva SA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, et al. [Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2005;84(4):320-4.
15. de Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2003;81(3):221-8.
16. Denipote F, Ardisson LP, Azevedo PS, Minicucci MF, Lima-Leopoldo AP, Chiuso-Minicucci F, et al. Influence of taurine on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;27(3-4):291-8.
17. 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. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2010;16(8):BR255-9.

18. 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. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;92(6):443-7, 62-6, 79-83.
19. Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SA, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodelling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *European journal of heart failure*. 2008;10(11):1057-64.
20. Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiovascular remodeling induced by passive smoking. *Inflammation & allergy drug targets*. 2009;8(5):334-9.
21. Novo R, Freire CM, Felisbino S, Minicucci MF, Azevedo PS, Zornoff LA, et al. Smoking is associated with remodeling of gap junction in the rat heart: smoker's paradox explanation? *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013;100(3):274-80.
22. Oliveira LC, Azevedo PS, Minicucci ME, Rafacho BP, Duarte DR, Matsubara LS, et al. Retinoic acid prevents ventricular remodelling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Acta cardiologica*. 2011;66(1):3-7.
23. Paiva SA, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF, et al. beta-carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *The Journal of nutrition*. 2005;135(9):2109-13.
24. 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. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2011;27(3-4):305-12.
25. Rafacho BP, 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. *International journal of cardiology*. 2012;155(3):472-3.
26. Zornoff LA, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Effects of beta-carotene and smoking on heart remodeling after myocardial infarction. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2007;89(3):135-41, 51-7.
27. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Camapanha AO, et al. [Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2006;86(4):276-82.
28. Zornoff LA, 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. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2006;90(1):259-66.
29. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35(3):569-82.
30. Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2009;92(2):150-64.
31. Lopaschuk GD, Rebeyka IM, Allard MF. Metabolic modulation: a means to mend a broken heart. *Circulation*. 2002;105(2):140-2.
32. Saks V, Favier R, Guzun R, Schlattner U, Wallimann T. Molecular system bioenergetics: regulation of substrate supply in response to heart energy demands. *The Journal of physiology*. 2006;577(Pt 3):769-77.
33. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiological reviews*. 2005;85(3):1093-129.
34. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *The American journal of medicine*. 2001;110 Suppl 7A:37S-46S.
35. Mei Z, Wang X, Liu W, Gong J, Gao X, Zhang T, et al. Mitochondrial adaptations during myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic constriction. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2014;23(5):283-8.

36. 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. *Clinics*. 2009;64(7):691-7.
37. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental physiology*. 1997;82(2):291-5.
38. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiology in review*. 2013;21(3):135-40.
39. Cogni AL, Farah E, Minicucci MF, Azevedo PS, Okoshi K, Matsubara BB, et al. Metalloproteinases-2 and -9 predict left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2013;100(4):315-21.
40. Magesh S, Chen Y, Hu L. Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents. *Med Res Rev*. 2012;32:687-726.
41. 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.
42. Dinh W, Futh R, Nickl W, Krahn T, Ellinghaus P, Scheffold T, et al. Elevated plasma levels of TNF- $\alpha$  and interleukin-6 in patients with diastolic dysfunction and glucose metabolism disorders. *Cardiovascular diabetology*. 2009;8:58.
43. Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *Journal of cardiac failure*. 2002;8(6 Suppl):S379-86.
44. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;27(5):1201-6.
45. Zhong CY, Zhou YM, Pinkerton KE. NF- $\kappa$ B inhibition is involved in tobacco smoke-induced apoptosis in the lungs of rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 2008;230(2):150-8.
46. Siveski-Iliskovic N, Hill M, Chow DA, Singal PK. Probucol protects against adriamycin cardiomyopathy without interfering with its antitumor effect. *Circulation*. 1995;91(1):10-5.
47. Zhu YZ, Huang SH, Tan BK, Sun J, Whiteman M, Zhu YC. Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective. *Natural product reports*. 2004;21(4):478-89.
48. de Souza MO, Souza ESL, de Brito Magalhaes CL, de Figueiredo BB, Costa DC, Silva ME, et al. The hypocholesterolemic activity of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) is mediated by the enhanced expression of the ATP-binding cassette, subfamily G transporters 5 and 8 and low-density lipoprotein receptor genes in the rat. *Nutrition research*. 2012;32(12):976-84.
49. Guerra JF, Magalhaes CL, Costa DC, Silva ME, Pedrosa ML. Dietary acai modulates ROS production by neutrophils and gene expression of liver antioxidant enzymes in rats. *Journal of clinical biochemistry and nutrition*. 2011;49(3):188-94.
50. Jensen GS, Wu X, Patterson KM, Barnes J, Carter SG, Scherwitz L, et al. In vitro and in vivo antioxidant and anti-inflammatory capacities of an antioxidant-rich fruit and berry juice blend. Results of a pilot and randomized, double-blinded, placebo-controlled, crossover study. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(18):8326-33.
51. Lichenthaler R, Rodrigues RB, Maia JG, Papagiannopoulos M, Fabricius H, Marx F. Total oxidant scavenging capacities of *Euterpe oleracea* Mart. (Acai) fruits. *International journal of food sciences and nutrition*. 2005;56(1):53-64.
52. Mertens-Talcott SU, Rios J, Jilma-Stohlawetz P, Pacheco-Palencia LA, Meibohm B, Talcott ST, et al. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich acai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(17):7796-802.
53. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Huang D, Owens J, et al. Antioxidant capacity and other bioactivities of the freeze-dried Amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* Mart. (acai). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(22):8604-10.
54. Xie C, Kang J, Burris R, Ferguson ME, Schauss AG, Nagarajan S, et al. Acai juice attenuates atherosclerosis in ApoE deficient mice through antioxidant and anti-inflammatory activities. *Atherosclerosis*. 2011;216(2):327-33.

55. Xie C, Kang J, Li Z, Schauss AG, Badger TM, Nagarajan S, et al. The acai flavonoid velutin is a potent anti-inflammatory agent: blockade of LPS-mediated TNF- $\alpha$  and IL-6 production through inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MAPK pathway. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2012;23(9):1184-91.
56. Del Pozo-Insfran D, Percival SS, Talcott ST. Acai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(4):1222-9.
57. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *J Food Compos Anal*. 2009;22(5):394-6.
58. Santos GM, Maia GA, Sousa PH, Costa JM, Figueiredo RW, Prado GM. [Correlation between antioxidant activity and bioactive compounds of acai (*Euterpe oleracea* Mart) comercial pulps]. *Archivos latinoamericanos de nutricion*. 2008;58(2):187-92.
59. Schauss AG, Wu X, Prior RL, Ou B, Patel D, Huang D, et al. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleracea* mart. (acai). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2006;54(22):8598-603.
60. de Souza MO, Silva M, Silva ME, Oliveira Rde P, Pedrosa ML. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. *Nutrition*. 2010;26(7-8):804-10.
61. Moura RS, Ferreira TS, Lopes AA, Pires KM, Nesi RT, Resende AC, et al. Effects of *Euterpe oleracea* Mart. (ACAI) extract in acute lung inflammation induced by cigarette smoke in the mouse. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*. 2012;19(3-4):262-9.
62. Fragoso MF, Prado MG, Barbosa L, Rocha NS, Barbisan LF. Inhibition of mouse urinary bladder carcinogenesis by acai fruit (*Euterpe oleraceae* Martius) intake. *Plant foods for human nutrition*. 2012;67(3):235-41.
63. Simani AS, Inoue S, Hogg JC. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1974;31(1):75-81.
64. 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. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999;91(1):60-6.
65. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1971;78(6):957-62.
66. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography : official publication of the American Society of Echocardiography*. 2005;18(12):1440-63.
67. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91(10):2642-54.
68. Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;328(2):309-16.
69. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1969;10(2):198-206.
70. Singer TP. Determination of the activity of succinate, NADH, choline, and alpha-glycerophosphate dehydrogenases. *Methods of biochemical analysis*. 1974;22:123-75.

71. 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. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1985;153(1):23-36.
72. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, Feuers RJ. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1996;333(1):145-51.
73. Pereira B, Costa-Rosa LF, Bechara EJ, 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 adrenodemedullated rats. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 1998;31(6):827-33.
74. Crouch RK, Gandy SE, Kimsey G, Galbraith RA, Galbraith GM, Buse MG. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. *Diabetes*. 1981;30(3):235-41.
75. Nakamura W, Hosoda S, Hayashi K. Purification and Properties of Rat-Liver Glutathione Peroxidase. *Biochim Biophys Acta*. 1974;358(2):251-61.
76. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72:248-54.
77. Gu F, Derkach A, Freedman ND, Landi MT, Albanes D, Weinstein SJ, et al. Cigarette smoking behaviour and blood metabolomics. *International journal of epidemiology*. 2015.
78. Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling induced by smoking: concepts, relevance, and potential mechanisms. *Inflammation & allergy drug targets*. 2012;11(6):442-7.
79. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VC, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *PloS one*. 2014;9(12):e113739.
80. Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JC, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxidants & redox signaling*. 2013;18(16):2029-74.
81. Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology*. 1974;36:413-59.
82. Wolfe CL, Sievers RE, Visseren FL, Donnelly TJ. Loss of myocardial protection after preconditioning correlates with the time course of glycogen recovery within the preconditioned segment. *Circulation*. 1993;87(3):881-92.
83. Azevedo PS, Santos PP, Fernandes AA, Minicucci MF, Zornoff LAM, Paiva SAR. Congestive Heart Failure. In: Dichi I, Bregano JW, Simão ANC, Cecchini R, editors. *Role of oxidative stress in chronic disease*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press; 2013. p. 282-313.
84. van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, et al. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free radical biology & medicine*. 2008;44(7):1305-13.
85. Madamanchi NR, Runge MS. Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free radical biology & medicine*. 2013;61:473-501.
86. Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2002;34(4):379-88.
87. Gigliotti A, Figueiredo VC, Madruga CS, Marques ACPR, Pinsky I, Caetano R, et al. How smokers may react to cigarette taxes and price increases in Brazil: data from a national survey. *Bmc Public Health*. 2014;14.
88. Spangler EL, Goodney PP. Smoking cessation strategies in vascular surgery. *Seminars in vascular surgery*. 2015;28(2):80-5.
89. Timkova V, Tatarkova Z, Lehotsky J, Racay P, Dobrota D, Kaplan P. Effects of mild hyperhomocysteinemia on electron transport chain complexes, oxidative stress, and protein expression in rat cardiac mitochondria. *Molecular and cellular biochemistry*. 2015.

90. Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837 (2014) 427-443.
91. Sugiyama A, Sun J. Immunochemical detection of lipid hydroperoxide- and aldehyde-modified proteins in diseases. *Sub-cellular biochemistry*. 2014;77:115-25.
92. Gale AM, Kaur R, Baker WL. Hemodynamic and electrocardiographic effects of acai berry in healthy volunteers: a randomized controlled trial. *International journal of cardiology*. 2014;174(2):421-3.
93. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2008;22(3):659-61.