

# O Tabagismo Está Associado com a Remodelação de Junções Comunicantes no Coração de Ratos: Explicação do Paradoxo dos Fumantes?

*Smoking is Associated with Remodeling of Gap Junction in the Rat Heart: Smoker's Paradox Explanation?*

Rosângela Novo<sup>1</sup>, Cristiana M. Freire<sup>1</sup>, Sergio Felisbino<sup>2</sup>, Marcos F. Minicucci<sup>1</sup>, Paula S. Azevedo<sup>1</sup>, Leonardo A. M. Zornoff<sup>1</sup>, Sergio A. R. Paiva<sup>1</sup>

Faculdade de Medicina de Botucatu<sup>1</sup>; Instituto de Biociências de Botucatu<sup>2</sup>, Botucatu, SP – Brasil

## Resumo

**Fundamento:** Em estudo anterior, utilizando o modelo de ratos, a exposição à fumaça do cigarro durante 5 semanas aumentou a sobrevida após IAM, apesar da idade similar e tamanho do infarto entre fumantes e não fumantes, e da ausência de reperfusão.

**Objetivo:** Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre a intensidade, distribuição ou fosforilação da conexina 43 no coração de ratos.

**Métodos:** Ratos Wistar, pesando 100 g, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: 1) Controle (n = 25); 2) Expostos à fumaça do cigarro (ETS), n = 23. Depois de 5 semanas, foram conduzidas análise morfométrica do ventrículo esquerdo, imuno-histoquímica e Western blot para conexina 43 (Cx43).

**Resultados:** A fração do volume de colágeno, as áreas transversais e o peso ventricular não foram estatisticamente diferentes entre os grupos controle e ETS. O grupo ETS apresentou uma coloração de menor intensidade da Cx43 em discos intercalados (Controle:  $2,32 \pm 0,19$ ; ETS:  $1,73 \pm 0,18$ ;  $p = 0,04$ ). A distribuição da Cx43 em discos intercalados não diferiu entre os grupos (Controle:  $3,73 \pm 0,12$ ; ETS:  $3,20 \pm 0,17$ ;  $p = 0,18$ ). Os ratos do grupo ETS mostraram um nível maior de forma desfosforilada da Cx43 (Controle:  $0,45 \pm 0,11$ ; ETS:  $0,90 \pm 0,11$ ;  $p = 0,03$ ). Por outro lado, o Cx43 total não diferiu entre os grupos de controle e ETS (Controle:  $0,75 \pm 0,19$ ; ETS:  $0,93 \pm 0,27$ ;  $p = 0,58$ ).

**Conclusão:** A exposição à fumaça do cigarro resultou na remodelação das junções comunicantes cardíacas, caracterizada por alterações na quantidade e fosforilação da Cx43 em corações de ratos. Essa constatação pode explicar o paradoxo dos fumantes observado em alguns estudos (Arq Bras Cardiol. 2013;100(3):274-280).

**Palavras-Chave:** Tabagismo/fisiopatologia, Lesão por inalação de fumaça/mortalidade, Arritmias Cardíacas, Ratos.

## Abstract

**Background:** In a previous study utilizing the rat model, exposure to tobacco smoke for 5 weeks increased survival after AMI, despite similar age and infarct size between the smokers and nonsmokers, and absence of reperfusion.

**Objective:** Thus, this study aimed to analyze the effects of exposure to tobacco smoke on intensity, distribution or phosphorylation of connexin 43 in the rat heart.

**Methods:** Wistar rats weighing 100 g were randomly allocated into 2 groups: 1) Control (n = 25); 2) Exposed to tobacco smoke (ETS), n = 23. After 5 weeks, left ventricular morphometric analysis, immunohistochemistry and western blotting for connexin 43 (Cx43) were performed.

**Results:** Collagen volume fraction, cross-sectional areas, and ventricular weight were not statistically different between control and ETS. ETS showed lower stain intensity of Cx43 at intercalated disks (Control:  $2.32 \pm 0.19$ ; ETS:  $1.73 \pm 0.18$ ;  $p = 0.04$ ). The distribution of CX43 at intercalated disks did not differ between the groups (Control:  $3.73 \pm 0.12$ ; ETS:  $3.20 \pm 0.17$ ;  $p = 0.18$ ). ETS rats showed higher levels of dephosphorylated form of Cx43 (Control:  $0.45 \pm 0.11$ ; ETS:  $0.90 \pm 0.11$ ;  $p = 0.03$ ). On the other hand, total Cx43 did not differ between control and ETS groups (Control:  $0.75 \pm 0.19$ ; ETS:  $0.93 \pm 0.27$ ;  $p = 0.58$ ).

**Conclusion:** Exposure to tobacco smoke resulted in cardiac gap junction remodeling, characterized by alterations in the quantity and phosphorylation of the Cx43, in rats hearts. This finding could explain the smoker's paradox observed in some studies (Arq Bras Cardiol. 2013;100(3):274-280).

**Keywords:** Smoking/physiopathology; Smoke Inhalation Injury/mortality; Arrhythmias, Cardiac; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

**Correspondência:** Leonardo Zornoff •

Departamento de Clínica Médica, Rubião Jr, S/N, CEP 18618-970, Botucatu, SP – Brasil

E-mail: [lzornoff@fmb.unesp.br](mailto:lzornoff@fmb.unesp.br), [lzornoff@cardiol.br](mailto:lzornoff@cardiol.br)

Artigo recebido em 18/04/12, revisado em 08/10/12; aceito em 18/10/12.

DOI: 10.5935/abc.20130065

### Introdução

Apesar dos dados convincentes sobre os efeitos nocivos do tabagismo, vários estudos relataram baixa mortalidade após infarto agudo do miocárdio (IAM) para fumantes em comparação com não fumantes. Esse fenômeno é conhecido como paradoxo dos fumantes<sup>1-4</sup>.

Muitas explicações foram propostas para os desfechos mais favoráveis em fumantes após IAM, incluindo: 1) os fumantes serem mais jovens e apresentarem menos comorbidades; 2) possuírem uma maior mortalidade pré-hospitalar; 3) os fumantes possuírem uma maior carga de trombo, o que induz uma maior eficácia da trombólise intravenosa; 4) o efeito semelhante ao pré-condicionante isquêmico ser induzido pela fumaça do cigarro. O pré-condicionamento isquêmico é um fenômeno por meio do qual um breve período de isquemia torna o miocárdio resistente ao infarto a partir de um insulto isquêmico subsequente. O pré-condicionamento isquêmico limita o tamanho do infarto, reduz a incidência de arritmias fatais, e protege contra miocárdio lesado<sup>5,6</sup>.

Em um estudo anterior, utilizando o modelo de ratos, a exposição à fumaça do cigarro durante 5 semanas aumentou a sobrevivência após IAM, a despeito das idades semelhantes e tamanho do infarto entre fumantes e não fumantes, e da ausência de reperfusão. É importante notar que a redução da mortalidade foi observada nas primeiras 24 horas após oclusão coronariana<sup>7</sup>. Neste modelo, 87% das mortes prematuras foram uma consequência das arritmias ventriculares<sup>8</sup>. Portanto, presumimos que o efeito paradoxal dos fumantes pode ser resultado de ação semelhante ao pré-condicionamento. No entanto, ainda são desconhecidos os mecanismos potenciais desta proteção induzidos pela exposição à fumaça do cigarro.

A proteção do pré-condicionamento isquêmico depende dos canais funcionais da comunicação intercelular da junção de hiato<sup>9</sup>. As junções comunicantes no miocárdio correspondem a contatos intercelulares especializados que permitem a propagação do impulso elétrico entre cardiomiócitos. A conexina 43 (Cx43) é a proteína principal da junções comunicantes em ventrículos do coração<sup>10</sup> e desempenha um papel importante no pré-condicionamento isquêmico. Este fato é evidenciado pela constatação de que o pré-condicionamento isquêmico não pode induzir uma proteção em camundongos heterozigotos deficientes de Cx43<sup>11</sup>. No entanto, permanecem desconhecidos os efeitos do tabagismo em Cx-43 cardíaca<sup>12</sup>. Por isso, para solucionar este problema, testamos a hipótese de que a exposição à fumaça do cigarro possa interferir na intensidade, distribuição ou fosforilação da Cx43 no coração de ratos.

### Materiais e Métodos

#### Grupos e Tratamento

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com as diretrizes do NIH para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição (protocolo número 399).

Ratos machos Wistar, pesando 100 g, foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: 1) Grupo de controle (n = 25), ratos de controle sem exposição à fumaça do cigarro; 2) Grupo de expostos à fumaça do cigarro (ETS), n = 23. A exposição à fumaça do cigarro durou 5 semanas.

Os ratos do grupo ETS foram expostos à fumaça de cigarro numa câmara (dimensões 95 x 80 x 65 cm), conectados a um dispositivo de fumaça tendo como base um modelo adaptado de Paiva e cols.<sup>7,13-17</sup>. A fumaça foi retirada de cigarros comerciais com filtro (composição por unidade: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono) com uma bomba de vácuo, tendo sido expelida dentro da câmara de fumo. Durante a 1ª semana, o número de cigarros foi gradualmente aumentado de 5 para 10 por um período de 30 minutos, por duas vezes, no período da tarde. Durante as próximas 3 a 4 semanas, aproximadamente, até que os ratos atingissem o peso alvo, 10 cigarros foram utilizados em cada ensaio de fumo, que foi repetido 4 vezes/dia, duas vezes durante a manhã e duas vezes no período da tarde. Em um estudo anterior, com um tempo de exposição ao tabaco semelhante, os níveis de carboxihemoglobina nos ratos expostos à fumaça eram maiores do que no grupo de controle (ratos de controle:  $0,9 \pm 0,7\%$  e ratos do grupo ETS:  $5,3 \pm 2,8\%$ ,  $p = 0,008$ )<sup>14</sup>. Dessa forma, o último estudo confirmou a eficácia da exposição dos animais à fumaça de cigarro. Todos os animais eram alimentados com uma dieta na mesma quantidade, que se baseou na ingestão de alimentos do grupo ETS. Depois desse período de exposição à fumaça do cigarro, os ratos foram sacrificados com uma dose excessiva de anestesia (pentobarbital de sódio 100 mg/kg de peso corporal). Os ratos do grupo ETS não foram expostos à fumaça do cigarro durante as 12 horas anteriores à eutanásia.

#### Análise Morfométrica

Quando da conclusão do período de tratamento, os ventrículos direito e esquerdo (incluindo o septo interventricular) foram dissecados, separados e pesados. As seções coronais, com cerca de 3 mm de espessura, feitas a 5 mm da ponta dos ventrículos, foram fixadas em uma solução de formaldeído tamponado a 10% por 48 horas, seguido de imersão em uma solução de álcool a 70% por 48 horas. Após a fixação, os tecidos foram embebidos em parafina. As seções histológicas de quatro e seis micra de espessura foram coradas, respectivamente, com Hematoxilina-eosina (HE) e Picrosirius vermelho colágeno-específico. As áreas transversais de miócitos (MA) foram medidas nas seções coradas com HE por um microscópio LEICA DM LS conectado a uma câmera de vídeo e um computador IBM compatível, equipado com o programa de análise de imagem Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, EUA). Cinquenta a setenta células por lâmina foram analisadas. As células selecionadas apresentavam forma circular e estavam localizadas na camada subendocárdica das paredes ventriculares. Esta precaução objetivou otimizar a uniformidade do formato dos miócitos entre os grupos. A área transversal média obtida para cada grupo foi utilizada como um indicador de hipertrofia celular. As lâminas coradas com Picrosirius vermelho foram utilizadas para quantificar a

fração de volume do colágeno intersticial por meio de videodensitometria. As imagens do tecido cardíaco foram feitas e analisadas utilizando o sistema descrito acima. Os elementos do tecido cardíaco foram identificados de acordo com o nível de cor. Portanto, as fibras colágenas foram visualizadas em vermelho e os miócitos em amarelo. A fração do volume de colágeno (CVF) foi calculada automaticamente e correspondia à soma das áreas de colágeno dividida pela soma dos tecidos de colágeno e área dos miócitos. Uma média de trinta campos foram analisados utilizando uma lente com uma ampliação de 40X. O colágeno perivascular foi excluído da análise<sup>14,16</sup>.

#### Imuno-histoquímica para conexina 43

Os experimentos de imuno-histoquímica foram realizados de acordo com Saffitz e cols.<sup>18</sup> com algumas modificações<sup>19</sup>. Todos os corações, cortados transversalmente, foram fixados, sucessivamente, em uma solução de formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, água corrente por 24 horas e álcool a 70% por 24 horas. Após a fixação, os tecidos foram embebidos em parafina e cortados em seções de 3  $\mu$ m. Antes da imunomarcação, caracterização tecidual e orientação, houve registro com coloração por hematoxilina-eosina.

As seções (3  $\mu$ m) foram dispostas em lâminas de vidro revestidas com poli-D-lisina e, sucessivamente, desparafinadas três vezes, durante 5 minutos cada, em banhos de xilol, álcool 100%, álcool 95% e álcool 70%, seguido por rehidratação em água destilada por 10 minutos. Os locais antigênicos foram recuperados por meio do tratamento dos cortes em tampão de ácido cítrico de 0,01 M em um tampão fosfato-salino (PBS) com pH 6,0, por 10 minutos, em ambiente de micro-ondas. Após este período, os cortes foram mantidos congelados durante 20 minutos, seguido por lavagem em PBS com pH de 7,2. As seções foram bloqueadas com solução de albumina de soro bovino (BSA) de 3% em PBS por 30 minutos em temperatura ambiente. Depois desse procedimento, as seções foram incubadas durante a noite com anticorpo policlonal de coelho, anti-conexina 43 (Abcam Inc. Cambridge), diluído a 1:100 em BSA a 2%, em PBS a 4 °C. Na manhã seguinte, as seções foram lavadas em PBS durante 15 minutos, por três vezes e incubadas em um anticorpo secundário (IgG anti-coelho vermelho Texas, Vector) na diluição de 1:50 em BSA a 2%, em PBS à temperatura ambiente, durante 1 hora.

As seções foram lavadas em PBS durante 15 minutos, por três vezes, e montadas em meio de glicerol. Dez seções foram processadas simultaneamente em cada execução de imunomarcação enquanto controles negativos, nas quais o anticorpo primário foi omitido, com execução rotineira em paralelo<sup>20</sup>, visando a monitorar qualquer ocorrência de coloração inespecífica. A imunomarcação da Cx43 foi examinada por microscopia de epifluorescência (Carl-Zeiss, Inc. North America), equipada com um cubo de filtro de WG (excitação = 550 nm e emissão = 650 nm), conectado a uma câmara de vídeo e um computador compatível (AxioPlan 4,1; Carl-Zeiss Inc.). Todas as imagens foram registradas no mesmo dia da marcação, e os tecidos foram codificados e examinados cegamente pela mesma pessoa.

Em cada coração, conforme descrito por Kostin e cols.<sup>21</sup>, 10 campos óticos tiveram registradas e analisadas a distribuição da Cx43 nos miócitos (ou seja, presença da Cx43 dentro e fora do disco intercalado) e a intensidade da coloração da Cx43 em discos intercalados.

#### Western blot para conexina 43

Os experimentos de Western blot foram realizados de acordo com Rolim e cols.<sup>22</sup>. As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise gelado (tampão fosfato de potássio de 50 mM, pH de 7,0, 0,3 mM de sacarose, 0,5 mM de DTT, 1 mM de EDTA, pH de 8,0, 0,3 mM de PMSF, 10 mM de NaF e coquetel inibidores de protease).

O sobrenadante foi recolhido por centrifugação a 12000 rpm durante 20 minutos e armazenado a -80 °C. A determinação das proteínas foi realizada por curvas padrão de proteína BSA (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e por meio do método de Bradford. As amostras de proteína foram diluídas em tampão de Laemmli (Tris-HCl 240 mM; 0,8% de SDS; glicerol a 40%; 0,02% de azul de bromofenol e 200 mM de beta-mercaptoetanol). Em seguida, 50  $\mu$ g de cada amostra foi separada em géis de empilhamento de poli(acrilamida a 10% (Tris-HCl 240 mM, pH 6,8; poli(acrilamida a 30%; APS e TEMED) e géis separadores (Tris-HCl 240 mM, pH 8,8, 30% de poli(acrilamida; APS e TEMED). A eletroforese foi executada em 120 V por 90 minutos.

A transferência para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foi realizada no sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM, metanol a 20% e 0,1% de SDS) por 90 minutos a 120 mA. Os blots foram bloqueados com 5% de leite desnatado, durante 2 horas à temperatura ambiente com agitação e lavagem três vezes com PBS Tween (Tris 1 mM, pH 2,8, 5 mM de NaCl e Tween 20). Em seguida, os blots foram imunomarcados durante a noite com um anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-Cx43 (Ab11369 - Abcam), correspondendo a 130 – 143 aminoácidos de Cx43 diluídos a 1 : 250 em PBS Tween (Tris 1mM, pH 2,8; NaCl 5 mM e Tween 20) ou camundongo monoclonal anti-Cx43 (13-8300 – Zymed) diluído a 3  $\mu$ g/mL, específico para serina 368, e resíduo não fosforilado de Cx43.

Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas três vezes em PBS Tween (Tris 1 mM, pH 2,8; 5 mM de NaCl e Tween 20). Isso foi acompanhado por incubação de 2 horas à temperatura ambiente com anticorpo anticamundongo conjugado HRP (Sigma) diluído a 1:10000. Depois de enxaguar três vezes em PBS Tween (Tris 1 mM, pH 2,8; NaCl 5 mM e Tween 20), as membranas foram incubadas por 1 minuto em solução de ECL (Amershan) (Solução I: luminol 2,5 mM; ácido p-cumárico 400  $\mu$ M; tris 100  $\mu$ M, pH 8,5; solução II: 5,4 mM de peróxido de hidrogênio a 30%; 100  $\mu$ M de tris, pH 8,5). Depois desse período, as membranas foram expostas a filme de raios-X (Eastman Kodak Co, EUA) por 10 minutos em uma sala escura e, depois, sucessivamente imersos em soluções reveladora, água e fixador por 1 minuto cada. A reação entre o reagente de ECL e o anticorpo conjugado anticamundongo com HRP nas membranas emite uma luz que aparece como faixas escuras sobre o filme de raios-X após revelação.

Após este procedimento, as densidades das faixas escuras obtidas foram analisadas por quantificação densitométrica da intensidade do sinal com o software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), com as medições de fundo de intensidade de sinal a ser subtraídas individualmente de cada Lane<sup>19</sup>.

### Análise estatística

Os dados foram expressos em média  $\pm$  DP. A análise estatística foi realizada pelo teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando SigmaStat para Windows v2.03 (SPSS Inc., Chicago, IL).

## Resultados

As variáveis morfométricas não diferiram estatisticamente entre os grupos de controle e ETS (Tabela 1).

A exposição à fumaça induziu uma coloração de menor intensidade de Cx43 no disco intercalado quando comparada aos ratos do grupo controle (Controle:  $2,32 \pm 0,19$ ; ETS:  $1,73 \pm 0,18$ ;  $p = 0,04$ ). A distribuição da CX43 em discos intercalados não diferiu entre os ratos do grupo de controle e ETS (Controle:  $3,73 \pm 0,12$ ; ETS:  $3,20 \pm 0,17$ ;  $p = 0,18$ ); (Figura 1).

Os ratos do grupo ETS mostraram valores maiores de forma desfosforilada da Cx43 que os ratos do grupo controle (Controle:  $0,45 \pm 0,11$ ; ETS:  $0,90 \pm 0,11$ ;  $p = 0,03$ ). Por outro lado, o Cx43 total não diferiu entre os grupos controle e ETS (Controle:  $0,75 \pm 0,19$ ; ETS:  $0,93 \pm 0,27$ ;  $p = 0,58$ ); (Figura 2).

## Discussão

O presente estudo teve como objetivo analisar os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre a intensidade, distribuição ou fosforilação da conexina Cx43 no coração de ratos. Nossos dados indicam que a exposição à fumaça do cigarro induziu a remodelação das junções de hiato cardíacas.

Uma questão importante a ser considerada é que, além dos efeitos já conhecidos sobre o endotélio vascular e os pulmões, os estudos anteriores mostraram que a exposição

à fumaça de cigarro por pelo menos dois meses induz a remodelação cardíaca, caracterizada por alterações morfológicas e funcionais. Na verdade, a fumaça produzia aumentos nos diâmetros da sístole diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo, induzindo também hipertrofia ventricular esquerda. Essas alterações morfológicas foram associadas com a redução da função sistólica ventricular esquerda<sup>7,13,14,16,19,23-27</sup>. Entretanto, ainda são desconhecidos os efeitos da exposição à fumaça do cigarro nas junções comunicantes cardíacas.

A principal conclusão do presente estudo foi que a exposição à fumaça do cigarro induz a remodelação das junções comunicantes cardíacas. Com efeito, o processo de remodelação foi caracterizado por uma menor quantidade de Cx43 em discos intercalados e por um aumento na forma não fosforilada da Cx43 no miocárdio.

Outra questão importante é que a remodelação cardíaca começa tipicamente com alterações genéticas, moleculares, celulares, bioquímicas e, em seguida, estruturais<sup>28-31</sup>. Neste contexto, nossos achados de alteração na Cx43 sem diferenças nas variáveis morfológicas dos ventrículos direito e esquerdo podem ser interpretados como observação de estágio precoce da remodelação cardíaca. Portanto, presumimos que a remodelação da Cx43 precede as alterações morfológicas e funcionais induzidas pela exposição à fumaça do cigarro.

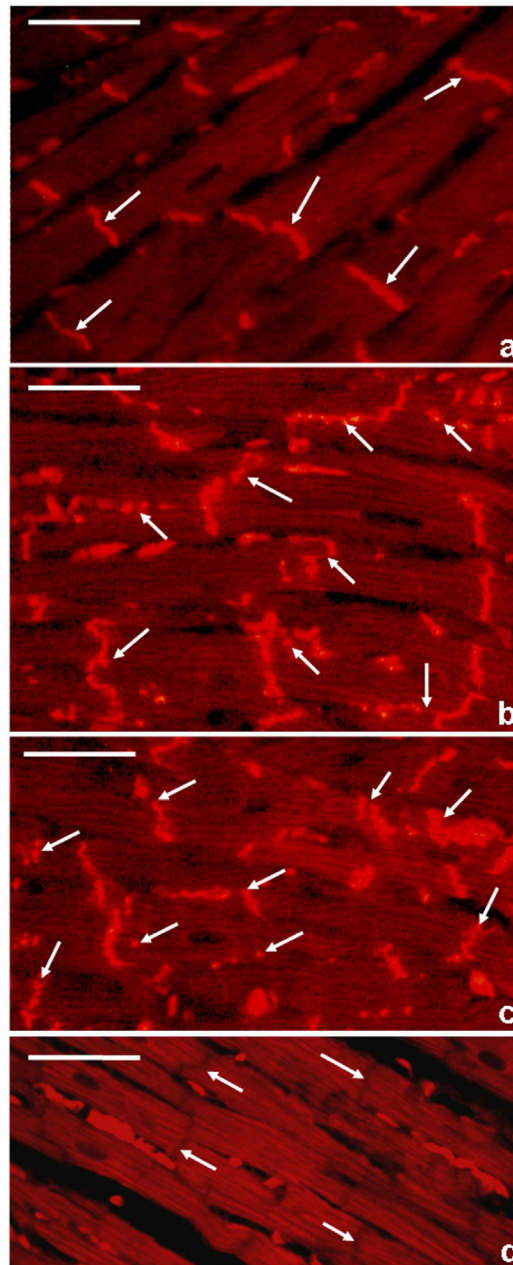
As junções comunicantes são aglomerados de canais transmembrana que ligam os compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas. As proteínas do componente de canais de junções comunicantes são denominadas conexinas. Existem diversos tipos de conexinas, mas a isoforma predominante no coração, principalmente no ventrículo, é Cx43<sup>10</sup>. O principal papel das junções comunicantes no miocárdio é coordenar a excitação elétrica e facilitar a troca intercelular de pequenas proteínas, como as proteínas transdutoras de sinal. É importante notar que as funções normais de junções comunicantes estão relacionadas com a expressão e distribuição normais da Cx43, dado que esta conexina está localizada principalmente no disco intercalado de cardiomiócitos. Além do mais, o grau de fosforilação da Cx43 é essencial para a função da junções comunicantes<sup>10</sup>.

Tabela 1 - Dados morfométricos

|                             | Controle<br>(n = 25) | ETS<br>(n = 23)   | p    |
|-----------------------------|----------------------|-------------------|------|
| PC (g)                      | 237 $\pm$ 20,5       | 230 $\pm$ 19,6    | 0,30 |
| VE (g)                      | 0,52 $\pm$ 0,05      | 0,52 $\pm$ 0,05   | 0,97 |
| VD (g)                      | 0,15 $\pm$ 0,015     | 0,15 $\pm$ 0,014  | 0,45 |
| VE/PC (g)                   | 2,21 $\pm$ 0,15      | 2,27 $\pm$ 0,14   | 0,15 |
| VD/PC (g)                   | 0,64 $\pm$ 0,05      | 0,67 $\pm$ 0,10   | 0,11 |
| Átrio (g)                   | 0,05 $\pm$ 0,015     | 0,045 $\pm$ 0,014 | 0,16 |
| Área do miócito ( $\mu^2$ ) | 190 $\pm$ 51,6       | 184 $\pm$ 30,8    | 0,68 |
| Colágeno (%)                | 4,34 $\pm$ 2,75      | 4,41 $\pm$ 0,96   | 0,90 |

Os valores são média  $\pm$  DP. n: número de ratos; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; VE/PC: ventrículo esquerdo normalizado por PC; VD/PC ventrículo direito normalizado por PC. Teste t de Student.

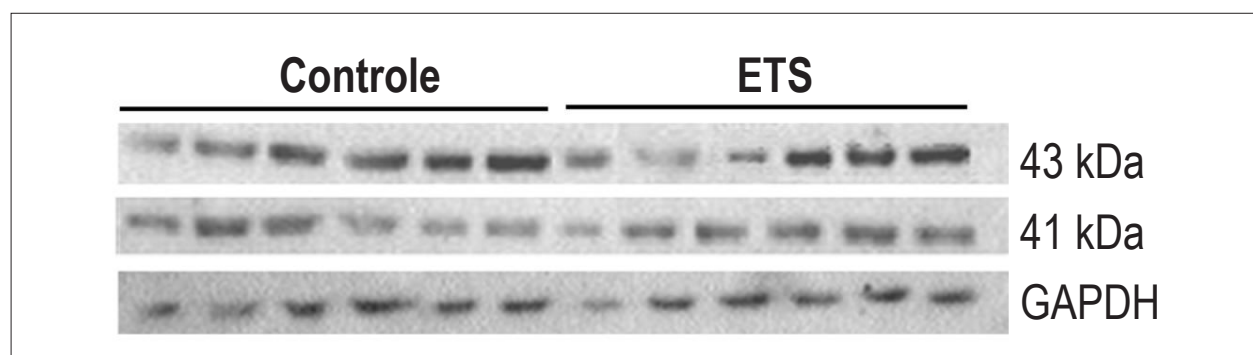




**Figura 1** - Micrografias de imunofluorescência de Cx43 de seções do miocárdio de ratos: controle (A), expostos à fumaça do cigarro (B e C) e controle negativo (D). As setas em A: Discos intercalados com sinal imunorreativo para Cx43; em B e C: sinal imunorreativo para Cx43 em discos intercalados e membrana plasmática; em D: discos intercalados livres da coloração de Cx43. Bar = 20  $\mu$ m.

As alterações na quantidade, localização e fosforilação da Cx43 foram observadas quando o coração era submetido a eventos isquêmicos ou hipóxicos<sup>21,32,33</sup> e quando esses eventos são precedidos por pré-condicionamento isquêmico<sup>34,35</sup>. A referida isquemia leva à redução da junções comunicantes cardíaca, caracterizada por uma menor expressão da Cx43<sup>32,36</sup>. Dessa forma, as alterações observadas na intensidade da Cx43 provocadas pelo tabagismo no presente estudo são semelhantes àquelas induzidas por isquemia.

No presente estudo, a diminuição da intensidade da coloração da Cx43 em discos intercalados induzida pela exposição à fumaça do cigarro se assemelha aos efeitos do pré-condicionamento isquêmico, que inicia um processo de ocorrência de Cx43 na membrana plasmática livre, no lado externo dos discos intercalados. Em decorrência deste efeito, o pré-condicionamento isquêmico pode melhorar a possibilidade de sobrevivência celular após isquemia prolongada<sup>35</sup>.



**Figura 2** - Análise por Western blot. A: Blot com anti-total-Cx43, B: forma não fosforilada de Cx43 detectada pelo anticorpo monoclonal de camundongo anti-*np*-Cx43. C: Bandas de GAPDH.

No que diz respeito ao aumento da forma não fosforilada da Cx43 induzida pela exposição à fumaça do cigarro, diversos estudos demonstram que a desfosforilação da Cx43 causa desacoplamento elétrico nos miócitos cardíacos<sup>34</sup> e a inibição da desfosforilação da Cx43 leva a efeitos protetores na função cardíaca durante lesão hipóxica<sup>37</sup>. Nesse contexto, estudos revelam que os agentes de desacoplamento de junções comunicantes administrados antes da isquemia preservam o acoplamento elétrico dos miócitos cardíacos durante um insulto isquêmico subsequente, de maneira similar ao pré-condicionamento isquêmico<sup>38</sup>. Esses autores sugerem que o desacoplamento parcial e reversível das junções comunicantes antes da isquemia resultam em um efeito antiarrítmico durante um insulto isquêmico prolongado, de maneira similar ao pré-condicionamento isquêmico.

Nesse contexto, o presente estudo constatou que a exposição à fumaça do cigarro desencadeou um processo de remodelação nas junções comunicantes cardíacas, um efeito semelhante ao pré-condicionamento isquêmico. Portanto, nossos dados sugerem fortemente que a exposição à fumaça do cigarro pode induzir um efeito semelhante ao pré-condicionamento isquêmico no coração de ratos. Com efeito, esse fenômeno pode explicar o paradoxo dos fumantes observado em alguns estudos<sup>1-4</sup>.

Os mecanismos envolvidos nos efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre as junções comunicantes cardíacas são desconhecidos. Entre os possíveis mecanismos, a remodelação ventricular induzida pela exposição está associada com uma ativação aumentada de proteínas quinases ativadas por mitógenos<sup>23</sup>. Além disso, há evidências de que as vias PKC p38 e p42/44 MAPK regulam a expressão da Cx43<sup>39</sup>.

Nosso estudo deve ser analisado considerando uma potencial limitação. Não incluímos um grupo de pré-condicionamento. No entanto, as alterações na Cx43 induzidas pelo pré-condicionamento são bem consolidadas. Portanto, acreditamos fortemente que os nossos dados contribuem com informações importantes acerca do assunto aqui tratado.

## Conclusão

O presente estudo demonstrou que a exposição à fumaça do cigarro resultou na remodelação de junções comunicantes cardíacas, caracterizada por alterações na quantidade e fosforilação da Cx43 em corações de ratos. Essa constatação pode explicar o paradoxo dos fumantes observado em alguns estudos.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Novo R, Paiva SAR; Obtenção de dados: Novo R, Freire CM, Felisbino S, Minicucci MF, Azevedo PS; Análise e interpretação dos dados: Novo R, Freire CM, Felisbino S, Minicucci MF, Azevedo PS, Zornoff LAM, Paiva SAR; Análise estatística: Novo R, Minicucci MF, Paiva SAR; Redação do manuscrito: Novo R, Zornoff LAM, Paiva SAR; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Freire CM, Felisbino S, Minicucci MF, Azevedo PS, Zornoff LAM, Paiva SAR.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo não teve fontes de financiamento externas.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Rosângela Novo pela Faculdade de Medicina de Botucatu.

## Referências

- Barbash GI, Reiner J, White HD, Wilcox RG, Armstrong PW, Sadowski Z, et al. Evaluation of paradoxical beneficial effects of smoking in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: mechanism of the "smoker's paradox" from the GUSTO-I trial, with angiographic insights. *Global Utilization of Streptokinase and Tissue-Plasminogen Activator for Occluded Coronary Arteries. J Am Coll Cardiol.* 1995;26(5):1222-9.
- Kievit PC, Brouwer MA, Veen G, Aengevaeren WR, Verheugt FW. The smoker's paradox after successful fibrinolysis: reduced risk of reocclusion but no improved long-term cardiac outcome. *J Thromb Thrombolysis.* 2009;27(4):385-93.
- Barua RS, Sy F, Srikanth S, Huang G, Javed U, Buhari C, et al. Acute cigarette smoke exposure reduces clot lysis—association between altered fibrin architecture and the response to t-PA. *Thromb Res.* 2010;126(5):426-30.
- Aune E, Roislien J, Mathisen M, Thelle DS, Otterstad JE. The "smoker's paradox" in patients with acute coronary syndrome: a systematic review. *BMC Med.* 2011;9:97.
- Evrengul H, Selez D, Tanriverdi H, Kaftan A. The antiarrhythmic effect and clinical consequences of ischemic preconditioning. *Coron Artery Dis.* 2006;17(3):283-8.
- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1113-51.
- 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. *J Nutr.* 2005;135(9):2109-13.
- Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat: continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation.* 1995;92(2):253-61.
- Schulz R, Heusch G. Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004;62(2):335-44.
- Severs NJ, Bruce AF, Dupont E, Rothery S. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 2008;80(1):9-19.
- Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, Li X, Schulz R, Heusch G. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(4):H1740-2.
- 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]. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94(2):224-8.
- Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Tobacco smoke-induced left ventricular remodelling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *Eur J Heart Fail.* 2007;9(11):1081-5.
- 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. *Arq Bras Cardiol.* 2005;84(4):320-4.
- 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 Cardiol.* 2011;66(1):3-7.
- Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol.* 2003;81(3):221-8.
- Rafacho BP, Santos P, Assalim HB, Ardissone LP, Roscani MG, Polegato BF, et al. Role of vitamin D in the cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Int J Cardiol.* 2012;155(3):472-3.
- Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(5):H1662-70.
- Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Chiuseo-Minicucci F, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Influence of lisinopril on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Med Sci Monit.* 2010;16(8):BR255-9.
- Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, et al. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2000;86(8):871-8.
- Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klovekorn WP, et al. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem.* 2003;242(1-2):135-44.
- Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger JE, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007;29(3):246-52.
- 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. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(11):1057-64.
- Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Campanha AO, et al. [Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction]. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(4):276-82.
- 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. *Toxicol Sci.* 2006;90(1):259-66.
- Rafacho BP, Azevedo PS, Polegato BF, Fernandes AA, Bertoline MA, Fernandes DC, et al. Tobacco smoke induces ventricular remodeling associated with an increase in NADPH oxidase activity. *Cell Physiol Biochem.* 2011;27(3-4):305-12.
- Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, et al. Chronic cigarette smoking causes hypertension, increased oxidative stress, impaired NO bioavailability, endothelial dysfunction, and cardiac remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(1):H388-96.
- 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. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction: experimental observations and clinical implications. *Circulation.* 1990;81(4):1161-72.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999;79(1):215-62.
- Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol.* 2009;92(2):157-64.
- Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res.* 2000;87(8):656-62.
- Matsushita S, Kurihara H, Watanabe M, Okada T, Sakai T, Amano A. Alterations of phosphorylation state of connexin 43 during hypoxia and reoxygenation are associated with cardiac function. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(3):343-53.
- Jain SK, Schuessler RB, Saffitz JE. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning. *Circ Res.* 2003;92(10):1138-44.
- Vetterlein F, Muhlfeld C, Cetegen C, Volkmann R, Schrader C, Hellige G. Redistribution of connexin43 in regional acute ischemic myocardium: influence of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(2):H813-9.
- Hatanaka K, Kawata H, Toyofuku T, Yoshida K. Down-regulation of connexin43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo. *Jpn Heart J.* 2004;45(6):1007-19.
- Matsushita S, Kurihara H, Watanabe M, Okada T, Sakai T, Amano A. Inhibition of connexin43 dephosphorylation is involved in protective effects of diltiazem on cardiac function during hypoxic injury. *Histol Histopathol.* 2011;26(3):315-22.
- Papp R, Goncz M, Kovacs M, Seprenyi G, Vegh A. Gap junctional uncoupling plays a trigger role in the antiarrhythmic effect of ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2007;74(3):396-405.
- Salameh A, Krautblatter S, Baessler S, Karl S, Rojas Gomez D, Dhein S, et al. Signal transduction and transcriptional control of cardiac connexin43 up-regulation after alpha 1-adrenoceptor stimulation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(1):315-22.