

A Resposta Oxidativa em Corações de Camundongos é Modulada por Background Genético

The Oxidative Response of Mouse Hearts is Modulated by Genetic Background

Marco Aurélio Santos-Silva¹, Akinori Cardozo Nagato¹, Eduardo Tavares Lima Trajano^{1,2}, Jackson Nogueira Alves², Ana Carla Balthar Bandeira³, Luís Cristóvão Porto², Frank Silva Bezerra³

Universidade Severino Sombra¹, Vassouras; Universidade do Estado do Rio de Janeiro², Rio de Janeiro, RJ; Universidade Federal de Ouro Preto³, Ouro Preto, MG - Brasil

Resumo

Fundamento: o tabagismo apresenta importante papel sobre as doenças cardiovasculares, entretanto permanecem pouco compreendidos os motivos pelos quais alguns seres humanos as desenvolvem e outros não.

Objetivo: nosso objetivo foi analisar o perfil redox do coração de diferentes linhagens de camundongos após exposição à fumaça de cigarro.

Métodos: camundongos machos suíços (n = 10), C3H (n = 10), BALB/c (n = 10) e C57BL/6 (n = 10) foram expostos à fumaça de cigarro (12 cigarros/dia), enquanto os respectivos controles (n = 10) ao ar ambiente por 60 dias. Após sacrifício, o coração foi retirado para análises bioquímicas.

Resultados: embora o conteúdo de malondialdeído não tenha aumentado em nenhum grupo, a atividade da catalase diminuiu no grupo suíço (p < 0,05), BALB/c (p < 0,05) quando comparados aos respectivos grupos-controle, enquanto a mieloperoxidase diminuiu no grupo C3H (p < 0,05) e C57BL/6 (p < 0,001) quando comparados aos respectivos grupos controle. O conteúdo de glutatona reduzida diminuiu nos grupos suíço, C3H, C57BL/6 (p < 0,05) e no grupo BALB/c (p < 0,001) quando comparados com os respectivos controles. Observamos aumento do conteúdo da glutatona oxidada no grupo Suíço (p < 0,05) e diminuição nos grupos C3H (p < 0,05) e BALB/c (p < 0,001) quando comparados aos respectivos grupos-controle. A razão glutatona reduzida/glutatona oxidada apresentou redução nos grupos suíço e C57BL/6 (p < 0,05) quando comparados aos grupos controle.

Conclusão: o *background* genético nos camundongos pode influenciar na resposta antioxidante após a exposição à fumaça de cigarro e parece ser um fator determinante para o desequilíbrio redox no suíço e C57BL/6. Compreender as respostas antioxidantes e do *background* genético C3H e BALB/c podem fornecer importantes informações quanto à resistência cardíaca a fumaça de cigarro. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(2):157-163)

Palavras-chave: Estresse Oxidativo, Tabaco, Fumaça, Melhoramento Genético, Camundongos.

Abstract

Background: Smoking plays an important role in cardiovascular diseases. However, the reasons why some individuals develop those diseases and others do not remain to be explained.

Objective: This study aimed at assessing the redox profile of the heart of different mouse strains after exposure to cigarette smoke.

Methods: Male mice of the Swiss (n = 10), C3H (n = 10), BALB/c (n = 10) and C57BL/6 (n = 10) strains were exposed to cigarette smoke (12 cigarettes/day), while their respective controls (n = 10) were exposed to ambient air for 60 days. After being euthanized, their heart was removed for biochemical analyses.

Results: Although the malondialdehyde content did not increase in any of the groups, catalase activity decreased in the Swiss (p < 0.05) and BALB/c (p < 0.05) strain mice as compared with their respective control groups, while myeloperoxidase decreased in the C3H (p < 0.05) and C57BL/6 (p < 0.001) strain mice as compared with their respective control groups. The reduced glutathione content decreased in the Swiss, C3H, C57BL/6 (p < 0.05) and BALB/c (p < 0.001) strain mice as compared with their respective control groups. Regarding reduced glutathione content, an increase was observed in the Swiss strain mice (p < 0.05), while a decrease was observed in the C3H (p < 0.05) and BALB/c (p < 0.001) strain mice as compared with their respective control groups. The reduced glutathione/reduced glutathione ratio showed a reduction in the Swiss and C57BL/6 (p < 0.05) strain mice as compared with their respective control groups.

Conclusion: The genetic background of mice can influence the antioxidant response after exposure to cigarette smoke and seems to be a determinant factor for redox imbalance in Swiss and C57BL/6 strain mice. Understanding antioxidant responses and genetic background of C3H and BALB/c strain mice might provide important information regarding cardiac resistance to cigarette smoke. (Arq Bras Cardiol. 2013;100(2):157-163)

Keywords: Oxidative Stress; Tobacco; Smoke; Genetic Enhancement; Mice.

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

Correspondência: Frank Silva Bezerra •

Laboratório de Bioquímica Metabólica - Departamento de Ciências Biológicas (DECBI) - Campus Universitário, s/n - Morro do Cruzeiro - CEP 35400-000 - Ouro Preto, MG, Brasil

E-mail: frank@iceb.ufop.br, franksbezerra@hotmail.com

Artigo recebido em 29/02/12, revisado em 14/08/12, aceito em 04/09/12.

DOI: 10.5935/abc.20130029

Introdução

A fumaça de cigarro, uma mistura composta por mais de 4.700 substâncias¹, predispõe a doenças pulmonares² e cardiovasculares³, como a doença arterial periférica e infarto do miocárdio⁴. O hábito de fumar aumenta o risco para essas doenças⁵. A fumaça de cigarro é uma das fontes exógenas de radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente). Esses oxidantes desempenham um importante papel na regulação da homeostasia celular, entretanto participam na patogênese de diversas doenças cardiovasculares⁶. As ERO advindas da exposição à fumaça de cigarro (EFC) possuem a capacidade de iniciar uma cadeia de reações químicas que levam a alterações irreversíveis resultando em disfunção celular e citotoxicidade⁷. Para impedir a evolução dos danos celulares existe um organizado sistema antioxidante e detoxificador formado por antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) e não enzimáticos (glutaciona reduzida e oxidada)⁸. Entretanto, sob condições de excesso de agentes oxidantes e/ou deficiência do sistema protetor, haverá diminuição da atividade da catalase (CAT) e desequilíbrio entre o consumo de glutatona reduzida (GSH) e a produção de glutatona oxidada (GSSG), o que caracteriza o estresse oxidativo⁹. Em situações em que o sistema de oxirredução está íntegro, haverá recuperação da GSH. A análise indireta do estresse oxidativo feita por meio da atividade de enzimas antioxidantes como CAT, concentração de tripeptídeos como a GSH e GSSG e de peroxidases como mieloperoxidase (MPO) podem fornecer informações importantes sobre o desequilíbrio redox e para terapias futuras.

Estudos sugerem que a EFC nas diferentes linhagens camundongo pode comprometer o processo de cicatrização de feridas da pele^{10,11}. Órgãos de diferentes linhagens de camundongos apresentam respostas ao estresse oxidativo induzido por fumaça de cigarro. Um estudo demonstrou que camundongos C57BL/6 e BALB/c são as melhores escolhas como modelo experimental para investigar as respostas oxidativas da fumaça de cigarro no fígado e pulmão, e as linhagens C3H e C57BL/6 no cérebro¹². Entretanto, as respostas oxidativas no coração nas diferentes linhagens de camundongos após a EFC permanecem pouco esclarecidas. Desse modo, esse conhecimento pode favorecer a compreensão dos motivos pelos quais alguns seres humanos desenvolvem doenças cardiovasculares e outros não ao serem tabagistas. Nosso objetivo foi investigar o perfil redox do coração de camundongos Suíços, C3H, BALB/c e C57BL/6 em resposta a EFC.

Métodos

Animais

Foram utilizados camundongos suíços, C3H, BALB/c e C57BL/6 machos (20 animais/linhagem), oito semanas, acondicionados em grupos de dez animais/caixa, com temperatura e umidade controladas ($21 \pm 2^\circ\text{C}$, $50 \pm 10\%$, respectivamente), submetidos aos ciclos invertidos claro/escuro de 12 h (luzes artificiais, 19 h-7 h) e exaustão 15 min/h no Departamento de Histologia e Embriologia (DHE). Os

animais foram separados em um grupo que foi submetido exposição à fumaça de cigarro (grupo EFC – 10 animais/linhagem) e outro grupo-controle exposto ao ar ambiente (grupo CTR – 10 animais/linhagem) por 60 dias.

Os protocolos de manuseio e experimentação seguiram o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo US National Institutes of Health (publicação nº 85-23, revisado em 1985). Esse projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para trabalhos com animais de experimentação – IBRAC – UERJ.

Exposição à Fumaça de Cigarro (EFC)

Durante 60 dias por meio da utilização de uma câmara de inalação de fumaça de cigarro, cada grupo EFC foi exposto a 12 cigarros comerciais por dia, três vezes ao dia. Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de 60 ml que depois de insuflada a fumaça foi expelida na câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar terminam com a queima do cigarro até o seu terço final que dura em média três minutos. Cada cigarro gera, aproximadamente, um litro de fumaça que foi diluído em 30 litros presentes na câmara, gerando uma concentração de 3% para inalação durante um total de seis minutos por cigarro. Após esse período, a câmara foi aberta para total exaustão da fumaça, proporcionando aos animais contato com o ar ambiente por um minuto, e, então, o procedimento foi repetido com os cigarros restantes. Durante todo o período de experimento, os animais receberam a ração padrão balanceada e água *ad libitum*.

Após os 60 dias de EFC ou ao ar ambiente, os animais foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e, em seguida, foi realizada uma incisão sagital no tórax do animal para retirada do coração.

Processamento tecidual

O coração foi adicionado ao tubo de hemólise com 1 ml de tampão (KPE), e homogeneizado por meio de um homogeneizador de tecidos (Nova Técnica, SP, Brasil), onde o movimento de trituração foi repetido 10 vezes possibilitando a centrifugação diferencial. Em seguida as amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 7.500 rpm por 10 minutos (FANEM®, SP, Brasil), o sobrenadante foi colhido e armazenado a 4°C para análise bioquímica e o *pellet* descartado.

Determinação do conteúdo de Mieloperoxidase (MPO)

O conteúdo da mieloperoxidase (MPO), enzima liberada por neutrófilos, que participa da via antioxidante, por degradar elementos danosos como o peróxido de hidrogênio, foi extraído através da adição de HTBA (hexadecyltrimethylammonium bromide) e TMB (3,3',5,5' tetramethylbenzidine). O tecido foi homogeneizado com 1 ml de HTAB (5 a 50 mg de tecido) ou para as amostras provenientes de fluídos corporais adicionar em tubo com amostra (100 μl) + HTAB (900 μl). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 11.000 RPM (14.000 g), refrigerado a 4°C , o sobrenadante foi coletado e as absorvâncias foram determinadas a 650 nm usando um leitor de placa ELISA (modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA).

Análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Como índice de dano oxidativo, foi utilizada a formação de TBARS durante uma reação de aquecimento ácido como descrito por Draper¹³. As amostras de homogeneizados de pulmão foram misturados com 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10% e 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67% e foram aquecidas em banho-maria por 1 hora. Níveis de TBARS foram determinados por absorvância a 532 nm e expressas como equivalentes de malondialdeído (MDA nM/mg de proteína).

Ensaio da catalase (CAT), glutatona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG)

A atividade da CAT (U/mg de proteína) foi mensurada em resposta à quantidade de H₂O₂ e lida em um comprimento de onda de 240 nm (14). Alíquotas de homogeneizado foram tratadas com ácido sulfossalicílico na proporção de 1:1, a fim de retirar os debris celulares. O sobrenadante foi utilizado nos ensaios de GSH e GSSG. A dosagem de GSH é um método cíclico, pois a GSH reage com o ácido ditionitrobenzólico (DTNB) formando um conjugado (GSH-TNB) e um ânion (TNB). Em seguida, o conjugado reage com o GSH remanescente, formando GSSG e TNB, o qual foi mensurado por espectrofotometria (412 nm). Toda GSSG presente na amostra é convertida à GSH, pela ação da glutatona redutase (GSH-Rd), e o consumo de NADPH. A taxa de produção de TNB é então mensurada, por um método cinético, e é proporcional à concentração inicial de GSH na amostra. A GSSG foi mensurada em amostras tratadas com vinilpiridina, a fim de impedir a

conversão cíclica da GSH em GSSG. O método de dosagem de GSSG, também é cinético e se baseia no consumo de NADPH pela glutatona redutase na reação de redução da GSSG à GSH. A GSH reage então com o DTNB gerando o TNB, que foi então mensurado espectrofotometricamente (412 nm)¹⁴.

Análise Estatística

A normalidade de todos os dados foi testada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados foram expressos em média \pm erro-padrão da média. As análises dos dados foram realizadas pelo teste de variância One-way Anova seguido pelo pós-teste de Bonferroni, em que foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0.05$. O software GraphPad InStat foi usado para análise da performance estatística (GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software Inc.; San Diego, CA, USA).

Resultados

EFC não altera o conteúdo de Malondialdeído (MDA) no coração

Com o objetivo de caracterizar o estresse oxidativo em nosso modelo de EFC, analisamos o dano oxidativo mensurado por meio do TBARS (MDA). Em relação ao conteúdo de MDA nas diferentes linhagens de camundongos EFC, nossos resultados mostraram que não houve aumento do MDA equivalente no grupo EFC das linhagens quando comparados aos grupos CTR (Figura 1).

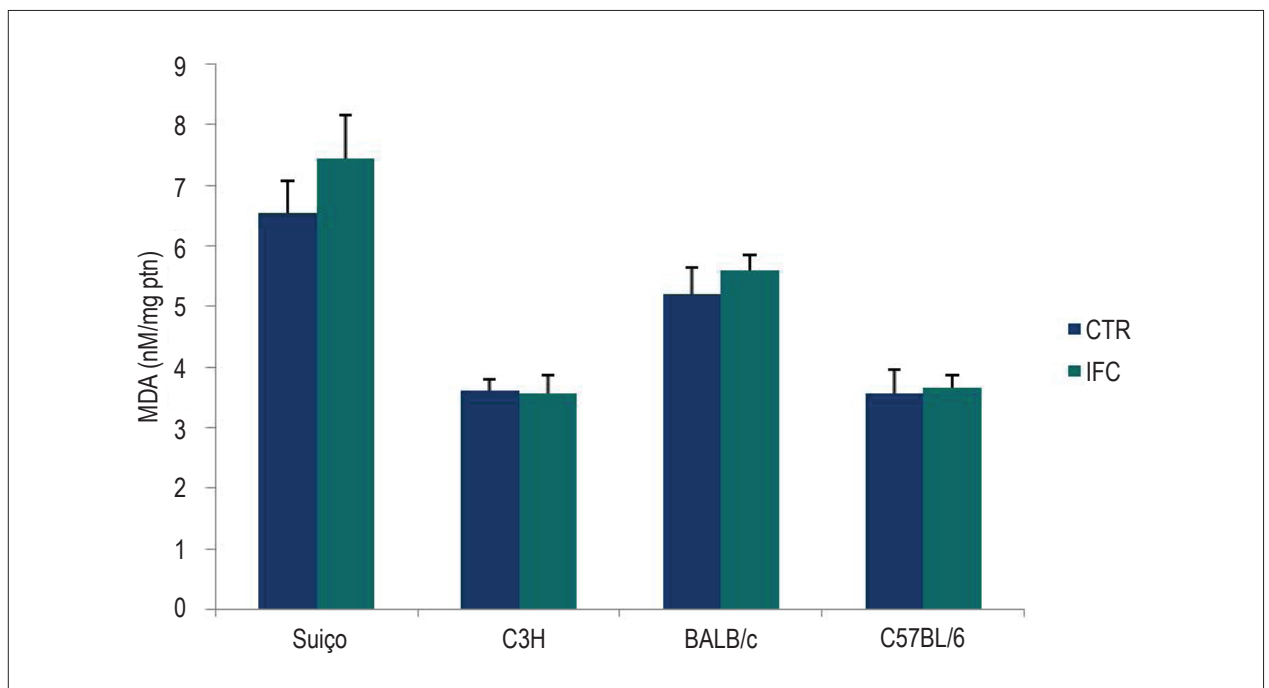


Figura 1 – Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a concentração de malondialdeído (MDA) no coração das diferentes linhagens de camundongos. Equivalente de MDA (nM/mg proteína) mensurado por meio do método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – thiobarbituric acid reactive substances). Resultados do grupo exposição à fumaça de cigarro (EFC) comparado com o grupo-controle (CTR) por linhagem. Os valores são expressos em média \pm SEM e analisados pelo teste de variância One-way Anova seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

EFC diminui a atividade da catalase (CAT) e Mieloperoxidase (MPO) no coração

Em relação à atividade dos antioxidantes nas diferentes linhagens de camundongos EFC, foi observado que atividade da CAT diminuiu nos grupos suíço ($p < 0,05$), BALB/c ($p < 0,05$) quando comparados aos respectivos grupos CTR, enquanto a MPO diminuiu no grupo C3H ($p < 0,05$) e C57BL/6 ($p < 0,001$) quando comparados aos respectivos grupos CTR (Figura 2A e 2B).

EFC induz redução da razão GSH/GSSG no coração de camundongos suíços e C57BL/6

O conteúdo de GSH diminuiu nos grupos suíço, C3H, C57BL/6 ($p < 0,05$) e no grupo BALB/c ($p < 0,001$) após EFC quando comparado com os respectivos CTR (Figura 3A). Após a EFC, foi observado aumento do conteúdo da GSSG no grupo suíço ($p < 0,05$) e diminuição nos grupos C3H ($p < 0,05$) e BALB/c ($p < 0,001$), quando comparado aos respectivos grupos CTR (figura 3B). A razão GSH/GSSG apresentou redução nos grupos suíço e C57BL/6 EFC ($p < 0,05$) quando comparada aos grupos CTR (Figura 3C).

Discussão

O remodelamento cardíaco é decorrente das alterações geométricas e volumétricas do coração em resposta à agressão miocárdica¹⁵. O estresse oxidativo advém do desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, e o dano oxidativo é causado por esse desequilíbrio que modifica as macromoléculas celulares, levando a morte celular por apoptose ou necrose¹⁶. Um estudo experimental mostrou que a exposição crônica ao monóxido de carbono aumentou a expressão gênica de endotelina-1 e induziu hipertrofia cardíaca¹⁷. A hipertrofia ventricular foi reconhecida como agente importante no processo de remodelamento, pois estudos anteriores confirmam que a

EFC foi seguida pelo aumento no tamanho do ventrículo esquerdo em ratos¹⁸. Trinta dias de EFC são suficientes para comprometer a função ventricular¹⁹. Entretanto, a EFC por quatro meses provoca a dilatação ventricular associada à redução da função sistólica²⁰.

A sobrecarga pressórica ocasiona estresse oxidativo e a inflamação no sistema cardiovascular³. O dano oxidativo no sistema cardiovascular é analisado por meio da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e pelo dano ao DNA²¹. Por mais de trinta anos, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), como o malondialdeído (MDA), são utilizadas como importante marcador de peroxidação lipídica²². Apesar de camundongos C57BL/6 e BALB/c terem sido descritos como animais propensos a dano oxidativo nos pulmões, após um longo prazo da EFC¹², os parâmetros oxidativos seguintes a EFC observados no presente estudo mostraram uma tendência de resistência ao dano oxidativo cardíaco nessas linhagens. Cerca de 80% dos estudos encontram aumento significativo de MDA em fumantes comparado a não fumantes, entretanto tal resultado não é unanimidade²¹⁻²⁴. Investigações relacionando a dose-dependência da EFC com o conteúdo de MDA mostraram aumento significativo de acordo com a dose diária de cigarros. Em um estudo, 298 indivíduos saudáveis foram divididos em não fumantes, fumantes (< 30 cigarros/dia) e fumantes (> 30 cigarros/dia), os resultados mostraram uma alta relação entre a EFC e o conteúdo de MDA no plasma ($p < 0,0001$)²⁵. Em outra investigação com 130 voluntários saudáveis divididos em fumantes leves (≤ 10 cigarros/dia), moderados (11-20 cigarros/dia) e fumantes pesados (> 20 cigarros/dia) mostrou que o conteúdo de MDA aumentou em todos os grupos fumantes comparados ao não fumante no plasma ($p < 0,05$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente)²⁶.

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 ²⁷, sendo localizada em peroxissomos de cardiomiócitos²⁸. Em camundongos transgênicos em que só há catalase isolada dos outros

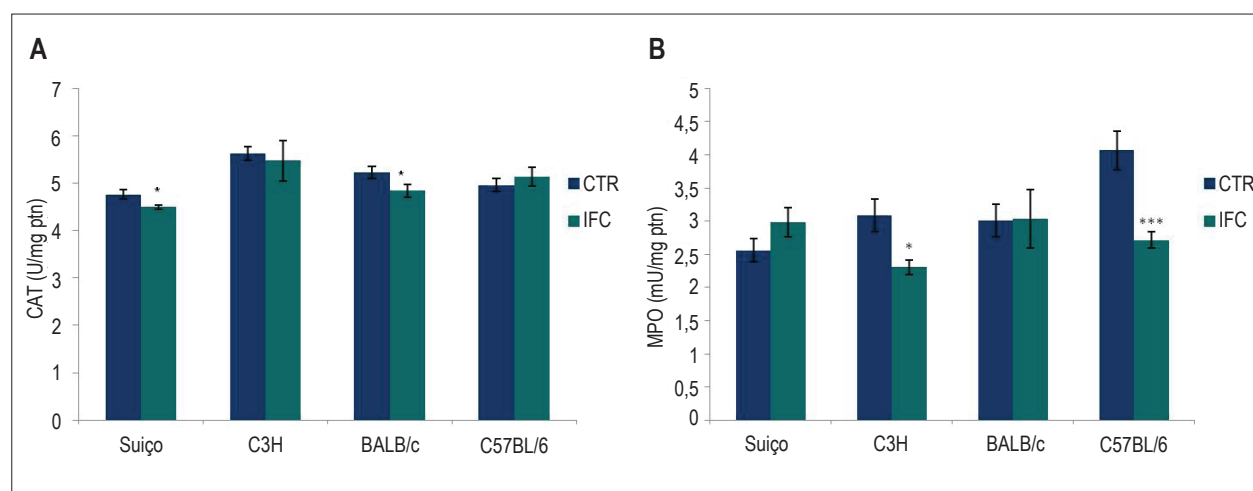


Figura 2 – Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre a atividade enzimática da catalase (CAT) e mieloperoxidase (MPO) no coração das diferentes linhagens de camundongos. (A) atividade da catalase (U/mg proteína) e (B) da mieloperoxidase (mU/mg proteína) nos grupos exposição à fumaça de cigarro (EFC) comparado com grupo-controle (CTR) por linhagem. Os valores são expressos em média \pm SEM e analisados pelo teste de variância One-way Anova seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

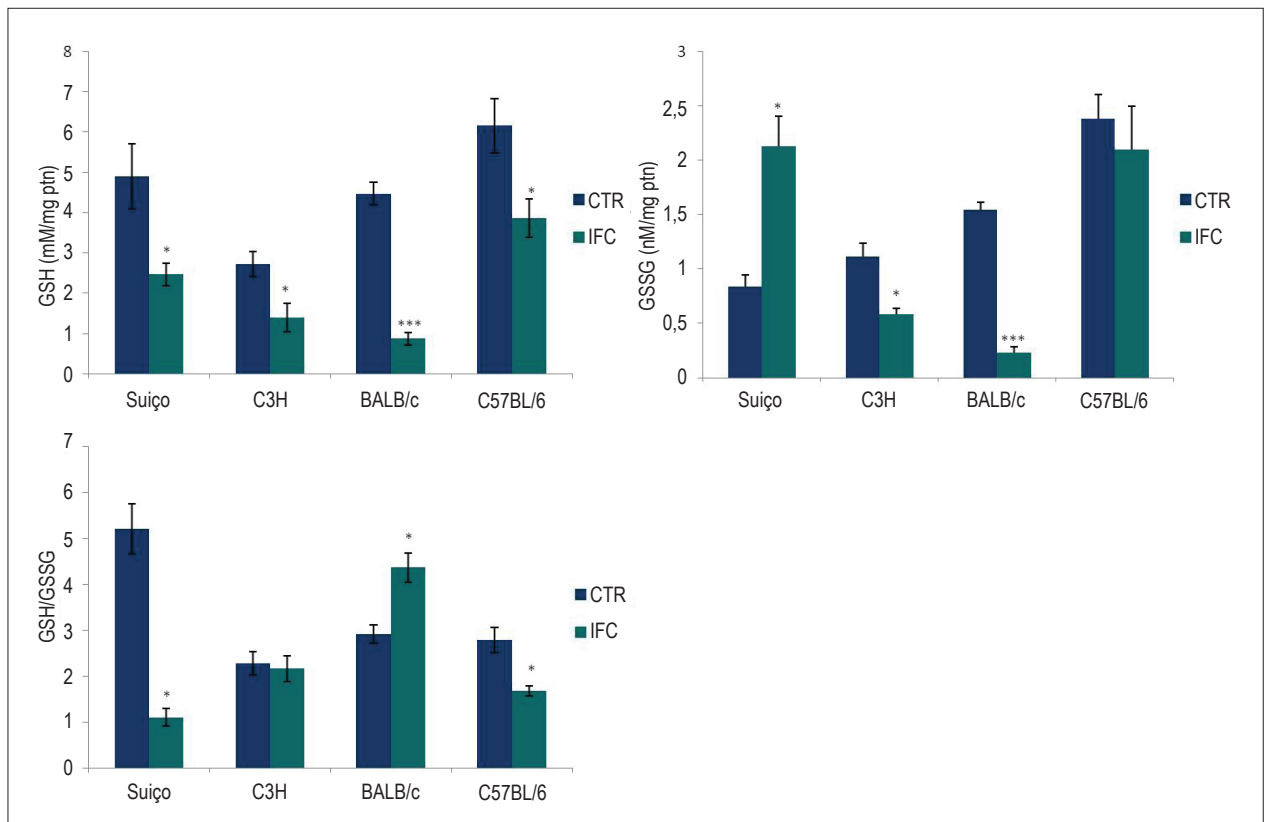


Figura 3 – Efeito da exposição à fumaça de cigarro sobre o conteúdo de glutatona (GSH) e glutatona oxidada (GSSG) no coração das diferentes linhagens de camundongos. (A) conteúdo de GSH (nM/mg proteína), (3B) conteúdo de glutatona oxidada (nM/mg proteína) e (3C) razão GSH/GSSG nos grupo exposição à fumaça de cigarro (EFC) comparado com grupo-controle (CTR) por linhagem. Os valores são expressos em média \pm SEM e analisados pelo teste de variância One-way Anova seguido pelo pós-teste de Bonferroni ($p < 0,05$). Os símbolos na figura significam * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

componentes antioxidantes, observou-se que a enzima é constitutiva e expressa em diferentes quantidades no coração e que ao administrar doxorrubicina, o aumento da atividade da catalase aumenta de 60 a 100 vezes protegendo o coração da toxicidade²⁹. A atividade da catalase aumentada provoca resistência à isquemia e reperfusão³⁰. Nossos resultados mostraram que a catalase diminuiu nos grupos EFC das linhagens suiço e BALB/c. Os camundongos BALB/c são resistentes a doenças cardiovasculares induzidas por dieta aterosclerótica, entretanto são sensíveis a doenças imunológicas e inflamatórias³¹.

A nicotina é capaz de ativar células polimorfonucleares (PMN) com aumento da produção de IL-8 por neutrófilos. Os PMN contribuem significativamente para a iniciação e progressão de inflamação vascular em fumantes, em que a mieloperoxidase (MPO) contribui para o desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares³². O conteúdo de MPO, uma enzima derivada de neutrófilos que catalisa a formação de numerosas ERO, é significativamente elevado em fumantes em comparação aos não fumantes³³. Os macrófagos utilizam NADPH oxidase para produzir O_2^- que, ao sofrer dismutação, forma H_2O_2 ; logo a MPO catalisa reações com H_2O_2 para gerar oxidantes citotóxicos mais potentes como ácido hipocloroso (HOCl) e radical tirosil, sendo a única enzima humana capaz de gerar HOCl³⁴. Nossos resultados

mostraram uma diminuição da MPO nos grupos EFC das linhagens C3H e C57BL/6. Os camundongos C57BL/6 são suscetíveis às lesões induzidas pela dieta. Quando alimentados com uma dieta aterogênica (1,25% de colesterol, 0,5% de ácido cólico e 15% de gordura) por 14 semanas desenvolvem lesões ateroscleróticas da aorta³⁵.

A MPO está relacionada com ativação da cascata de proteases. A inativação oxidativa de inibidores de proteases como α -1-antitripsina e inibidores teciduais de metaloproteinasas (TIMPs) associado à ativação das proelastases e MMPs, afetam o remodelamento cardíaco e a estabilidade de placas ateroscleróticas. Em estudo com ratos nulos para MPO (MPO^{-/-}) com infarto agudo do miocárdio (IAM), os animais apresentaram diminuição do infiltrado leucocitário, a dilatação ventricular e preservação a função sistólica³⁴. Os aldeídos derivados da oxidação de aminoácidos comuns, catalisada pela MPO, representam um mecanismo rápido e relevante para a geração de espécies citotóxicas em sítios inflamatórios³³. Um estudo observou um aumento de aldeídos em tecidos pós-infartados de ratos selvagens em relação aos MPO^{-/-}, apontando claramente para o papel da MPO na formação dessas espécies³⁶.

A GSH detoxifica agentes químicos e elimina produtos da peroxidação lipídica³⁷⁻³⁹. Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG. Na

inativação de um agente oxidante ocorre produção de GSSG e depleção de GSH. A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular⁴⁰. Em nossos resultados houve diminuição da GSH em todas as linhagens EFC. Nossos resultados sugerem que GSH-Rd recuperou a GSH nos grupos EFC das linhagens C3H e BALB/c comparados ao CTR, visto que há também diminuição da GSSG nesses grupos. Entretanto, observamos que a GSSG nos grupos EFC do suíço manteve-se aumentada. Em situações em que o sistema de oxirredução está íntegro, haverá recuperação da GSH. Nossos resultados mostraram que a razão GSH e GSSG diminuiu nos grupos EFC das linhagens suíço e C57BL/6, logo as duas linhagens desenvolveram estresse oxidativo.

Conclusões

Os resultados apresentados colocam o estresse oxidativo como ponto a ser considerado nas diferentes populações que apresentam doenças cardiovasculares e abre uma nova discussão sobre a relação entre o perfil genético e o desequilíbrio redox nos modelos experimentais de EFC.

Referências

1. Valenca SS, Bezerra FS, Romana-Souza B, Paiva RO, Costa AM, Porto LC. Supplementation with vitamins C and E improves mouse lung repair. *J Nutr Biochem*. 2008;19(9):604-11.
2. Valenca SS, Castro P, Pimenta WA, Lanzetti M, Silva SV, Barja-Fidalgo C, et al. Light cigarette smoke-induced emphysema and Nf-kappaB activation in mouse lung. *Int J Exp Pathol*. 2006;87(5):373-81.
3. Dimitrow PP, Undas A, Wolkow P, Tracz W, Dubiel JS. Enhanced oxidative stress in hypertrophic cardiomyopathy. *Pharmacol Rep*. 2009;61(3):491-5.
4. Levitzky YS, Guo CY, Rong J, Larson MC, Walter RE, Keaney JF Jr, et al. Relation of smoking status to a panel of inflammatory markers: the Framingham offspring. *Atherosclerosis*. 2008;201(1):217-24.
5. Hool LC. Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2006;33(1-2):146-51.
6. Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SA, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodeling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(11):1057-64.
7. Charniot JC, Bonnefont-Rousselot D, Albertini JP, Dever S, Vignat N, Nataf P, et al. Oxidative stress implication after prolonged storage donor heart with blood versus crystalloid cardioplegia and reperfusion versus static storage. *J Surg Res*. 2010;160(2):308-14.
8. Panda K, Chattopadhyay R, Chattopadhyay D, Chatterjee IB. Cigarette smoke-induced protein oxidation and proteolysis is exclusively caused by its tar phase: prevention by vitamin C. *Toxicol Lett*. 2001;123(1):21-32.
9. Lanzetti M, Bezerra FS, Romana-Souza B, Brando-Lima AC, Koatz VL, Porto LC, et al. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. *Nutrition*. 2008;24(4):375-81.
10. Cardoso JF, Mendes FA, Amadeu TP, Romana-Souza B, Valenca SS, Porto LC, et al. Ccn2/Ctgf overexpression induced by cigarette smoke during cutaneous wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol*. 2009;37(2):175-82.
11. Cardoso JF, Souza BR, Amadeu TP, Valenca SS, Porto LC, Costa AM. Effects of cigarette smoke in mice wound healing is strain dependent. *Toxicol Pathol*. 2007;35(7):890-6.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Santos-Silva MA, Nagato AC, Bezerra FS; Obtenção de dados: Santos-Silva MA, Nagato AC, Trajano ETL, Alves JN; Análise e interpretação dos dados: Santos-Silva MA, Nagato AC, Trajano ETL, Alves JN, Bandeira ACB, Bezerra FS; Análise estatística: Bandeira ACB, Porto LC, Bezerra FS; Obtenção de financiamento: Porto LC; Redação do manuscrito: Trajano ETL, Alves JN, Bandeira ACB, Porto LC, Bezerra FS; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Porto LC, Bezerra FS.

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

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

12. Rueff-Barroso CR, Trajano ET, Alves JN, Paiva RO, Lanzetti M, Pires KM, et al. Organ-related cigarette smoke-induced oxidative stress is strain-dependent. *Med Sci Monit*. 2010;16(7):BR218-26.
13. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993;15(4):353-63.
14. Aebi H. [Erythrocyte catalase]. *Expos Annu Biochim Med*. 1969;29:139-66.
15. 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 (Sao Paulo)*. 2009;64(7):691-7.
16. Trachtenberg BH, Hare JM. Biomarkers of oxidative stress in heart failure. *Heart Fail Clin*. 2009;5(4):561-77.
17. 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.
18. 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. *Eur J Heart Fail*. 2007;9(11):1081-5.
19. Paiva SA, Matsubara LS, Matsubara BB, Minicucci MF, Azevedo PS, Campanha AO, et al. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr*. 2005;135(10):2326-8.
20. 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. *Med Sci Monit*. 2008;14(3):BR62-6.
21. Ozgen N, Guo J, Gertsberg Z, Danilo P, Rosen MR, Steinberg SF. Reactive oxygen species decrease cAMP response element binding protein expression in cardiomyocytes via a protein kinase D1-dependent mechanism that does not require Ser133 phosphorylation. *Mol Pharmacol*. 2009;76(4):896-902.
22. Polidori MC, Savino K, Alunni G, Freddio M, Senin U, Sies H, et al. Plasma lipophilic antioxidants and malondialdehyde in congestive heart failure patients: relationship to disease severity. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(2):148-52.

23. Berr C, Coudray C, Bonithon-Kopp C, Roussel AM, Mainard F, Alperovitch A. Demographic and cardiovascular risk factors in relation to antioxidant status: the EVA Study. *Int J Vitam Nutr Res.* 1998;68(1):26-35.
24. Marangon K, Herbeth B, Lecomte E, Paul-Dauphin A, Grolier P, Chancerelle Y, et al. Diet, antioxidant status, and smoking habits in French men. *Am J Clin Nutr.* 1998;67(2):231-9.
25. Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B, et al. Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol.* 2002;156(3):274-85.
26. Solak ZA, Kabaroglu C, Cok G, Parildar Z, Bayindir U, Ozmen D, et al. Effect of different levels of cigarette smoking on lipid peroxidation, glutathione enzymes and paraoxonase 1 activity in healthy people. *Clin Exp Med.* 2005;5(3):99-105.
27. Zhou Z, Kang YJ. Cellular and subcellular localization of catalase in the heart of transgenic mice. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(5):585-94.
28. Yokota S, Asayama K. Proliferation of myocardial peroxisomes in experimental rat diabetes: a biochemical and immunocytochemical study. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1992;63(1):43-9.
29. Kang YJ, Chen Y, Epstein PN. Suppression of doxorubicin cardiotoxicity by overexpression of catalase in the heart of transgenic mice. *J Biol Chem.* 1996;271(21):12610-6.
30. Li G, Chen Y, Saari JT, Kang YJ. Catalase-overexpressing transgenic mouse heart is resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1997;273(3 Pt 2):H1090-5.
31. Paigen B, Ishida BY, Verstuyft J, Winters RB, Albee D. Atherosclerosis susceptibility differences among progenitors of recombinant inbred strains of mice. *Arteriosclerosis.* 1990;10(2):316-23.
32. Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, et al. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol.* 2003;74(5):942-51.
33. Roman RM, Wendland AE, Polanczyk CA. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. *Arq Bras Cardiol.* 2008;91(1):e11-9.
34. Askari AT, Brennan ML, Zhou X, Drinko J, Morehead A, Thomas JD, et al. Myeloperoxidase and plasminogen activator inhibitor 1 play a central role in ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Exp Med.* 2003;197(5):615-24.
35. Ishida BY, Blanche PJ, Nichols AV, Yashar M, Paigen B. Effects of atherogenic diet consumption on lipoproteins in mouse strains C57BL/6 and C3H. *J Lipid Res.* 1991;32(4):559-68.
36. Vasilyev N, Williams T, Brennan ML, Unzek S, Zhou X, Heinecke JW, et al. Myeloperoxidase-generated oxidants modulate left ventricular remodeling but not infarct size after myocardial infarction. *Circulation.* 2005;112(18):2812-20.
37. Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, Baras M, Abeliovich D, Hamburger T, et al. Glutathione-S-transferase M1, T1 and P1 polymorphisms, and breast cancer risk, in BRCA1/2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 2008;98(12):2006-10.
38. Niemoeller OM, Foller M, Lang C, Huber SM, Lang F. Retinoic acid induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(1-3):193-202.
39. Rainer M, Sonderegger H, Bakry R, Huck CW, Morandell S, Huber LA, et al. Analysis of protein phosphorylation by monolithic extraction columns based on poly(divinylbenzene) containing embedded titanium dioxide and zirconium dioxide nano-powders. *Proteomics.* 2008;8(21):4593-602.
40. Probst-Hensch NM, Imboden M, Felber Dietrich D, Barthelemy JC, Ackermann-Lieblich U, Berger W, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms, passive smoking, obesity, and heart rate variability in nonsmokers. *Environ Health Perspect.* 2008;116(11):1494-9.