

## Efeito do Betacaroteno sobre o Estresse Oxidativo e a Expressão de Conexina 43 Cardíaca

*Effect of Beta-Carotene on Oxidative Stress and Expression of Cardiac Connexin 43*

Rosângela Novo, Paula S. Azevedo, Marcos F. Minicucci, Leonardo A. M. Zornoff, Sergio A. R. Paiva

Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Estudos de intervenção mostraram aumento da mortalidade em pacientes que receberam betacaroteno. Contudo, não são conhecidos os mecanismos envolvidos nesse fenômeno.

**Objetivo:** Avaliar a influência do betacaroteno sobre o estresse oxidativo e a expressão de conexina 43 em coração de ratos.

**Métodos:** Ratos Wistar, pesando aproximadamente 100 g, foram alocados em dois grupos: Grupo Controle (n = 30), que recebeu a dieta usada de rotina em nosso laboratório, e Grupo Betacaroteno (n = 28), que recebeu betacaroteno (na forma de cristal, adicionado e misturado à dieta) na dose de 500 mg de betacaroteno/kg de dieta. Os animais receberam tratamento até que atingissem entre 200 e 250 g, quando eram sacrificados. Foram coletados sangue, fígado e coração para realização de *Western blotting* e imunohistoquímica para conexina 43; foram realizados estudos morfométricos, dosagens de betacaroteno por cromatografia líquida de alta eficiência bem como de glutathiona reduzida, glutathiona oxidada e hidroperóxidos de lipídeos por análises bioquímicas.

**Resultados:** O betacaroteno foi detectado apenas no fígado dos animais do Grupo Betacaroteno ( $288 \pm 94,7 \mu\text{g/kg}$ ). Os níveis de glutathiona reduzida/glutathiona oxidada foram maiores no fígado e no coração dos animais do Grupo Betacaroteno (fígado - Grupo Controle:  $42,60 \pm 1,62$ ; fígado - Grupo Betacaroteno:  $57,40 \pm 5,90$ ;  $p = 0,04$ ; coração: - Grupo Controle:  $117,40 \pm 1,01$ ; coração - Grupo Betacaroteno:  $121,81 \pm 1,32 \text{ nmol/mg proteína}$ ;  $p = 0,03$ ). O conteúdo de conexina 43 total foi maior no Grupo Betacaroteno.

**Conclusão:** O betacaroteno apresentou efeito benéfico, caracterizado pelo aumento da comunicação intercelular e melhora do sistema de defesa antioxidante. Nesse modelo, os mecanismos não explicam a maior mortalidade observada com a suplementação de betacaroteno em estudos clínicos. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(3):233-239)

**Palavras-chave:** Beta Caroteno / efeitos adversos; Estresse Oxidativo; Ratos; Conexina 43; Remodelação Ventricular.

### Abstract

**Background:** Intervention studies have shown an increased mortality in patients who received beta-carotene. However, the mechanisms involved in this phenomenon are still unknown.

**Objective:** Evaluate the influence of beta-carotene on oxidative stress and the expression of connexin 43 in rat hearts.

**Methods:** Wistar rats, weighing approximately 100 g, were allocated in two groups: Control Group (n=30), that received the diet routinely used in our laboratory, and Beta-Carotene Group (n = 28), which received beta-carotene (in crystal form, added and mixed to the diet) at a dose of 500 mg of beta-carotene/kg of diet. The animals received the treatment until they reached 200-250g, when they were sacrificed. Samples of blood, liver and heart were collected to perform Western blotting and immunohistochemistry for connexin 43; morphometric studies, dosages of beta-carotene by high-performance liquid chromatography as well as reduced glutathione, oxidized glutathione and lipids hydroperoxides were performed by biochemical analysis.

**Results:** Beta-carotene was detected only in the liver of Beta-Carotene Group animals ( $288 \pm 94.7 \mu\text{g/kg}$ ). Levels of reduced/oxidized glutathione were higher in the liver and heart of Beta-Carotene Group animals (liver - Control Group:  $42.60 \pm 1.62$ ; liver - Beta-Carotene Group:  $57.40 \pm 5.90$ ;  $p = 0.04$ ; heart: - Control Group:  $117.40 \pm 1.01$ ; heart - Beta-Carotene Group:  $121.81 \pm 1.32 \text{ nmol/mg protein}$ ;  $p = 0.03$ ). The content of total connexin 43 was larger in Beta-Carotene Group.

**Conclusion:** Beta-carotene demonstrated a positive effect, characterized by the increase of intercellular communication and improvement of anti-oxidizing defense system. In this model, mechanism does not explain the increased mortality rate observed with the beta-carotene supplementation in clinical studies. (Arq Bras Cardiol. 2013;101(3):233-239)

**Keywords:** Beta Carotene / adverse effects; Oxidative Stress; Rats; Connexin 43; Ventricular Remodeling.

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

Correspondência: Leonardo A. M. Zornoff •

Departamento de Clínica Médica, Rubião Jr. CEP 18618-970, Botucatu, SP - Brasil

E-mail: lzornoff@fmb.unesp.br, lzornoff@cardiol.br

Artigo recebido em 23/4/13; revisado em 24/4/13; aceito em 27/5/13.

DOI: 10.5935/abc.20130160

## Introdução

Junções comunicantes, ou *gap junctions*, são regiões de contato intercelular especializadas que conectam o citoplasma de células adjacentes, permitindo acoplamento elétrico e metabólico<sup>1</sup>. Cada junção comunicante é constituída de proteínas chamadas Conexinas (Cx). Mais de 20 genes codificantes de Cx foram identificados. No coração, as três principais isoformas correspondem às Cx40, Cx43 e Cx45, sendo a Cx43 mais abundante entre miócitos atriais e ventriculares, e em partes distais do sistema de condução<sup>2-4</sup>.

A redução da comunicação intercelular via junções comunicantes associa-se à ocorrência de arritmias cardíacas<sup>5,6</sup> e está presente em diversas situações em que o coração é submetido a algum tipo de agressão. Nesse sentido, já foi verificada alteração nas junções comunicantes em situações de remodelação ventricular, como hipertensão<sup>3</sup>, insuficiência cardíaca congestiva<sup>7</sup> e infarto agudo do miocárdio<sup>8</sup>.

O betacaroteno é um carotenoide com atividade de pró-vitamina A, presente na dieta de seres humanos, em frutas e vegetais coloridos<sup>9,10</sup>. Apresenta variedade de funções, incluindo ação antioxidante<sup>11</sup> e aumento da comunicação intercelular pelas junções comunicantes em diversos tipos de tecidos do organismo<sup>9,12,13</sup>. No entanto, não se conhecem estudos que avaliaram os efeitos do betacaroteno em relação à Cx43 no coração.

Estudos de intervenção, delineados para testar a hipótese de que o betacaroteno protegeria os humanos contra o desenvolvimento de câncer ou de doenças cardiovasculares, mostraram aumento de mortes por doenças cardiovasculares nos grupos suplementados com o carotenoide<sup>9,14-16</sup>. Adicionalmente, estudos realizados na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) mostraram que a suplementação da dieta de ratos com betacaroteno induziu remodelação ventricular, caracterizada por aumento do diâmetro sistólico do Ventrículo Esquerdo (VE) e diminuição das frações de ejeção e encurtamento ventriculares<sup>17</sup>. Além disso, em estudo que analisou os efeitos do betacaroteno antes do infarto em ratos normais e fumantes, observou-se que o ele aboliu o efeito paradoxal protetor do fumo induzido pelo cigarro<sup>18</sup>.

Assim, diante dos efeitos prejudiciais produzidos pelo betacaroteno no coração, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do betacaroteno sobre o estresse oxidativo e a expressão de Cx43 em coração de ratos.

## Métodos

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

Foram utilizados ratos Wistar, machos, pesando aproximadamente 100 g. Os animais foram alocados, ao acaso, em dois grupos experimentais: Grupo Controle (C), formado por 30 animais, que receberam a dieta usada de rotina na Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX); e Grupo Betacaroteno (BC), composto por 28 animais que receberam betacaroteno (na forma de cristal, adicionado

e misturado à dieta) na dose de 500 mg de betacaroteno/kg de dieta. Os animais receberam tratamento até que os atingissem entre 200 e 250 g (entre 4 e 5 semanas).

Após o fim do período de tratamento, os animais foram sacrificados com uma dose excessiva de anestésico (100 mg/kg de pentobarbital sódico) e, em seguida, foram coletados sangue, fígado e coração para realização do protocolo experimental.

## Estudo morfométrico

Após eutanásia dos animais, os corações foram removidos e dissecados; os átrios e ventrículos foram separados e pesados. Os pesos do VE e do Ventrículo Direito (VD) foram ajustados pelo peso corporal final do rato e utilizados como índice de hipertrofia ventricular.

Amostras de tecido cardíaco foram fixadas em solução de formol a 10%, segundo método já descrito<sup>19</sup>. Após fixação, o tecido foi incluso em parafina, obtendo-se, a seguir, cortes de 4  $\mu$ m. Os cortes histológicos foram corados em lâminas com solução Hematoxilina-Eosina (HE) para aferição das áreas da secção transversa dos miócitos, empregando-se microscópio Leica DM LS acoplado à câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensurados 50 a 70 células por ventrículo analisado<sup>20</sup>. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente e apresentavam forma arredondada e núcleo visível no centro da célula; eles se localizavam na camada subendocárdica da parede muscular do VE. Esse cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Para avaliação do interstício do miocárdio do VE, foram feitas lâminas com cortes histológicos coronais de 5  $\mu$ m, corados pela técnica de *Picrosirius red* e específicos para visualização de colágeno. A leitura foi realizada utilizando-se microscópio Leica DM LS acoplado à câmera de vídeo, que envia imagens digitais ao computador dotado de programa de análise de imagens Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram analisados 30 a 40 campos por ventrículo<sup>20</sup>, utilizando-se objetiva de 40X. Os campos escolhidos estavam afastados da região perivascular.

## Western blotting para Cx43

Os experimentos de *Western blotting* foram realizados segundo Rolim e cols.<sup>21</sup>, com algumas modificações<sup>22</sup>. Amostras de VE foram homogeneizadas em aparelho Polytron (Ika Ultra-Turrax® T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM; pH 7,0; sucrose 0,3 M; DTT 0,5 mM; EDTA 1 mM; pH 8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM e inibidor de fosfatase) e centrifugadas (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12.000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C. A concentração de proteínas foi analisada pelo método de Bradford, utilizando curvas de BSA Protein Assay Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão, com leituras a 595 nm de absorbância.

A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico de empilhamento (Tris-HCL 240 mM; pH 6,8; poliacrilamida 30%; APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240 mM; pH 8,8; poliacrilamida 30%; APS e Temed), na concentração

de 10% a 120V (PowerPac HC 3.0, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 2 horas e 10 minutos. A transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) foi realizada em sistema Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% e SDS 0,1%). Após transferência, as membranas foram incubadas em solução bloqueadora a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS pH 7,4 (Tris HCl 20 mM; NaCl 137 mM e detergente Tween 20 0,1%) por 2 horas, em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH 2,8; NaCl 5M e Tween 20) e incubada com os anticorpos primários diluídos na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após incubação com anticorpo primário Mouse Monoclonal to GJA1 (Abcam) – para Cx43 total, na concentração de 1:250, e Mouse Monoclonal Anti-Connexin-43 (Zymed) – para Cx43 não fosforilada, na concentração de 3 µg/mL, a membrana foi lavada em solução basal e incubada com o anticorpo secundário (1:10.000) IgG anti-mouse HRP (Sigma), em solução bloqueadora, por 2 horas em temperatura ambiente sob agitação constante.

A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA).

O anticorpo de normalização utilizado correspondeu ao GAPDH, Mouse IgG1 (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA) (1:10.000).

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

### Imunoistoquímica para Cx43

Os experimentos de imunoistoquímica foram realizados segundo Saffitz e cols.<sup>23</sup>, com algumas modificações. Fragmentos do miocárdio ventricular esquerdo, fixados sucessivamente em formaldeído a 10% por 24 horas, água corrente por 24 horas e álcool 70° por 24 horas, foram emblocados em parafina e, em seguida, feitos cortes histológicos de 3 µm. Em seguida, os cortes permaneceram em estufa a 60°C, durante 24 horas. A desparafinização foi feita em banhos sucessivos de xilol, álcool 100°, álcool 95° e álcool 70°, seguida de hidratação em água destilada. Os cortes histológicos foram colocados em solução de ácido cítrico a 0,01M, pH 6,0 e submetidos a ambiente de micro-ondas por 10 minutos, para recuperação antigênica. Após resfriamento de 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,2 e incubadas por 30 minutos em solução de albumina sérica bovina (BSA) a 3% (solução de BSA em PBS), para bloqueio de reações inespecíficas. Em seguida, foram incubadas *overnight* a 4°C em câmara úmida com anticorpo primário (Rabbit Polyclonal Anti-Connexin 43; Abcam), na diluição de 1:100.

Após esse período, as lâminas foram lavadas em PBS, e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Texas Red anti-rabbit IgG; Vector), na diluição de 1:50, por 1 hora, em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas em PBS e cobertas com meio de montagem, composto de

glicerina tamponada e lamínula. Para cada bateria de reações de imunoistoquímica realizada (dez lâminas), o controle negativo correspondeu a uma lâmina de VE em que se omitiu o anticorpo primário.

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

### Dosagens de betacaroteno

As concentrações de betacaroteno, no soro, foram quantificados segundo Yeum e cols.<sup>24</sup> e, no fígado e no coração, foram dosadas segundo Paiva e cols.<sup>25</sup>. A metodologia utilizada foi a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com cromatógrafo Alliance 2695 (Waters) acoplado a detector PDA 2996 (Waters). A coluna analítica utilizada correspondeu a C<sub>30</sub> (Waters – YMC carotenoid: 4,6 x 150 mm; 3,0 µm). O betacaroteno foi quantificado pela determinação da área do pico da amostra/área pico do padrão interno. Os valores obtidos foram corrigidos quanto a perdas durante a extração e manipulação das amostras pela recuperação do padrão interno.

### Estudo do estresse oxidativo

O estudo do estresse oxidativo foi realizado segundo Azevedo e cols.<sup>26</sup>. Amostras de aproximadamente 200 mg de tecido (VE ou fígado) foram homogeneizadas com 5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,0, sob gelo, em homogeneizador. Os homogeneizados foram centrifugados (10.000 rpm) por 15 minutos, em centrífuga refrigerada a -4°C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para determinação da concentração de Glutationa Reduzida (GSH), Glutationa Oxidada (GSSG) e hidroperóxidos de lipídeos. As leituras espectrofotométricas foram obtidas em leitor ELISA (Biotek Instruments, INC) e em espectrofotômetro Pharmacia Biotech (England).

### Determinação dos hidroperóxidos de lipídeos

Os hidroperóxidos de lipídeos foram determinados pela oxidação do Fe<sup>+2</sup> (sulfato ferroso amoniacal). O Fe<sup>+3</sup> formado reage com alaranjado de xilenol, formando um composto colorido. As leituras foram realizadas com comprimento de onda de 560 nm.

### Determinação da GSH e GSSG

A concentração de GSH (grupos SH não proteicos) foi determinada em tampão tris-HCl, pH 8,9, e 5,5'-dithiobis (ácido 2-nitro-benzoico), (DTNB) após prévia precipitação com ácido tricloroacético (TCA) 50%. Como padrão, foi utilizada GSH 1 mM<sup>27</sup>. A concentração de GSSG foi determinada pela diferença entre GSH total e GSH reduzida, sendo a proporção estequiométrica (2GSH:GSSG)<sup>28</sup>.

### Análise estatística

Os resultados de cada variável, para cada grupo experimental, foram submetidos à verificação da normalidade

e de igualdade de variância. Como em todas as comparações essas condições foram atendidas, foi realizado teste *t* de Student para análise das variáveis estudadas.

## Resultados

No soro e no coração, não foi detectada presença de betacaroteno. No fígado, apenas os animais do Grupo BC apresentaram concentrações detectáveis desse carotenoide ( $288 \pm 94,7 \mu\text{g/kg}$ ).

Todos os animais apresentaram peso corpóreo entre 200 e 250 g, não havendo diferença estatisticamente significativa entre os Grupos C e BC (Tabela 1). Os níveis de colágeno foram menores nos ratos suplementados com BC (Tabela 1).

Não se detectou diferença significativa entre os Grupos C e BC quanto à localização e à intensidade de marcação (quantidade) para Cx43 (Figura 1 e Tabela 1). No entanto, o conteúdo de Cx43 total (fosforilada + não fosforilada) foi maior no Grupo BC quando comparado ao Grupo C (Figura 2).

As concentrações de GSH/GSSG foram maiores no fígado e no coração dos animais do Grupo BC em relação ao Grupo C. Quanto às demais variáveis, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 2).

## Discussão

O presente estudo foi realizado para analisar os efeitos do betacaroteno sobre a comunicação intercelular e o estresse oxidativo em coração de ratos. Este estudo observou que esse carotenoide aumenta a expressão de Cx43 bem como a defesa antioxidante do coração.

Quanto aos efeitos antioxidantes do betacaroteno, vitaminas antioxidantes têm sido estudadas devido à sua capacidade de prevenir doenças crônicas, entretanto, o uso desses compostos em doenças cardiovasculares permanece controverso. Discrepâncias nos resultados obtidos podem ser relacionadas a características individuais ou às doses de antioxidantes utilizadas<sup>29,30</sup>.

A ação antioxidante do betacaroteno é bem caracterizada na literatura. Em diversos estudos, com animais e humanos, ele oferece proteção contra danos oxidativos<sup>10</sup>. Também após injúrias cardíacas, o uso de antioxidantes tem efeito benéfico<sup>31,32</sup>. Como o estresse oxidativo está envolvido na etiologia e na progressão de várias doenças crônicas no coração, antioxidantes como o betacaroteno são considerados importantes estratégias na prevenção dessas doenças<sup>30,33</sup>. No presente estudo, o betacaroteno apresentou ação antioxidante, caracterizada pelo aumento da relação GSH/GSSG em coração e fígado de ratos, protegendo, assim, o sistema antioxidante total.

Outro efeito do betacaroteno, neste estudo, correspondeu à atenuação dos níveis de colágeno no tecido cardíaco. Em situações de agressão ao coração, é conhecida a participação de radicais livres no processo de remodelação ventricular<sup>33-35</sup>, bem como a prevenção ou a atenuação desse processo, quando são utilizados antioxidantes<sup>32,36</sup>.

Dentre as alterações morfológicas observadas durante o processo de remodelação, encontra-se a fibrose intersticial<sup>37</sup>. Estudos mostram que o estresse oxidativo induz à síntese de

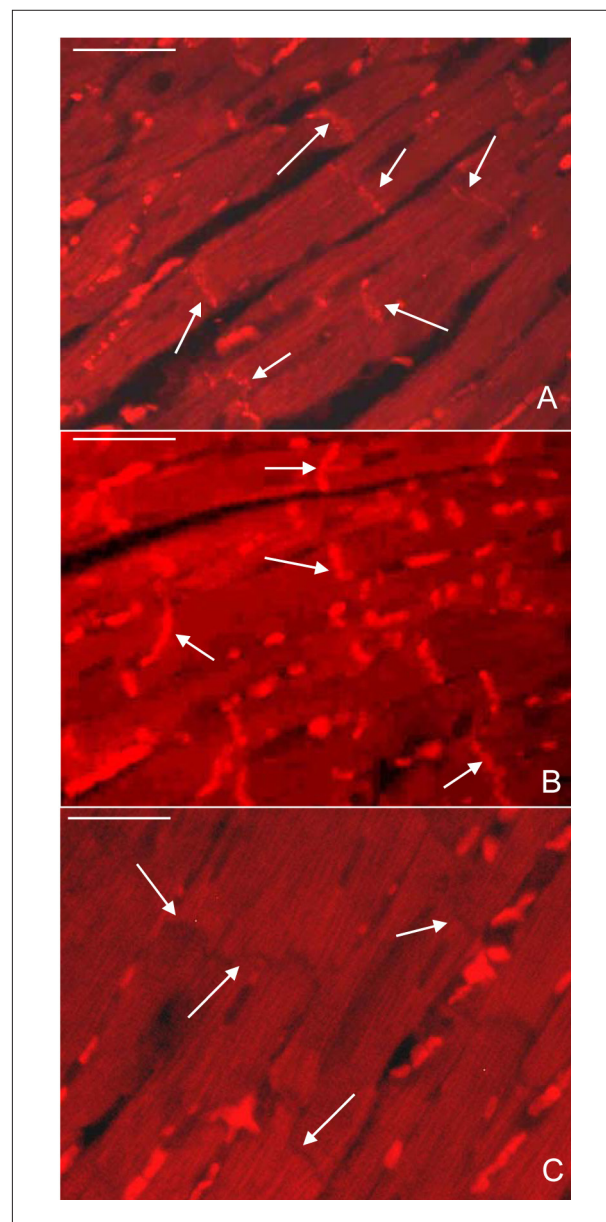


Figura 1 - Imunoistoquímica para conexina 43 em miocárdio ventricular esquerdo. (A) Controle; (B) suplementado com betacaroteno; (C): controle negativo.

colágeno, produzindo, conseqüentemente, fibrose no tecido cardíaco<sup>34,36</sup>. Dentre os mecanismos, tem sido observado que os radicais livres induzem a expressão de  $\text{TGF}_{\beta 1}$ , fator de crescimento que atua aumentando a síntese de colágeno, além de suprimir sua degradação no tecido cardíaco<sup>36</sup>.

Este estudo está em consonância com tal conceito, já que a diminuição do estresse oxidativo foi associada à diminuição na quantidade de colágeno. Assim, pode-se sugerir que a atenuação dos níveis de colágeno, no presente estudo, tenha ocorrido devido à melhora do sistema antioxidante relacionado à suplementação da dieta com betacaroteno<sup>10,12</sup>.

Tabela 1 - Dados morfométricos nos Grupos Controle e Betacaroteno

	Controle n = 23	Betacaroteno n = 25	Valor de p
Peso corporal	237 ± 3,8	237 ± 4,0	0,95
Área miócito (µm <sup>2</sup> )*	190,10 ± 10,3	185,10 ± 8,0	0,76
Colágeno (%)*	4,34 ± 0,55	2,65 ± 0,25	0,02
VE/PC (g)	2,21 ± 0,03	2,16 ± 0,03	0,37
Localização Cx43 <sup>#</sup>	3,63 ± 0,12	3,68 ± 0,11	0,80
Quantidade Cx43 <sup>#</sup>	2,32 ± 0,19	2,55 ± 0,27	0,51

Os dados são expressos em média ± erro padrão. \* 5 animais em cada grupo experimental; # 10 animais em cada grupo experimental. VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; Cx: conexina. Teste t de Student.

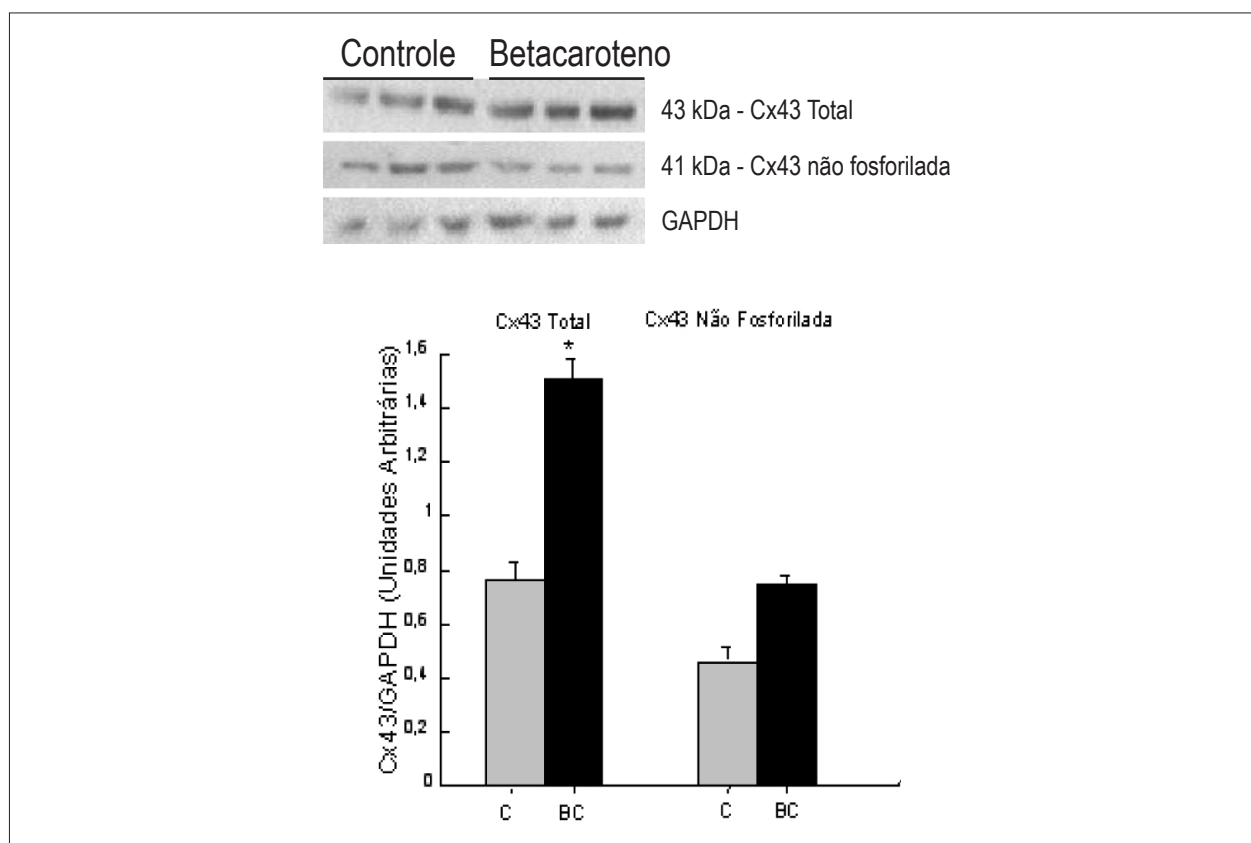


Figura 2 - Western blotting para conexina 43 em miocárdio ventricular esquerdo. \* Valor de p = 0,02. C: controle; BC: betacaroteno; Cx: conexina. Teste t de Student.

Quanto ao aumento da expressão de Cx43 no tecido cardíaco, induzido pelo betacaroteno neste estudo, este foi um achado de grande importância, uma vez que a estimulação da comunicação intercelular por carotenoides é bem documentada na literatura em outros tecidos, sendo considerada um dos mecanismos da ação preventiva contra o câncer<sup>9,10,13</sup>. Além disso, tem sido mostrado que o betacaroteno aumenta a expressão de Cx43 em diversos tecidos, como fibroblastos humanos e de camundongo<sup>38,39</sup>, linhagens celulares de adenocarcinoma de pulmão

humano<sup>13</sup> e células hepáticas de rato<sup>40</sup>. Em relação ao efeito do betacaroteno na carcinogênese, os carotenoides, pelo aumento na expressão de Cx43, restauram a comunicação intercelular, efeito que se correlaciona à inibição do crescimento de células quimicamente transformadas<sup>9</sup>.

No presente estudo, o efeito de aumentar expressão de Cx43 induzido pelo betacaroteno ocorreu em corações não agredidos. Esse achado está em concordância com os demais resultados publicados na literatura, na qual é observado o aumento da expressão de Cx43 por ação desse

**Tabela 2 - Biomarcadores de estresse oxidativo nos Grupos Controle e Betacaroteno**

		Controle n = 5	Betacaroteno n = 5	Valor de p
Soro (µmol/mL)	GSH	21,80 ± 0,14	22,36 ± 0,40	0,69
	GSSG	1,78 ± 0,02	1,78 ± 0,02	1,00
	GSH/GSSG	12,21 ± 0,2	12,13 ± 0,1	0,73
	HP	4,76 ± 0,11	4,92 ± 0,36	0,44
Fígado (nmol/mg proteína)	GSH	4,34 ± 0,22	4,83 ± 0,27	0,18
	GSSG	0,52 ± 0,05	0,54 ± 0,05	0,78
	GSH/GSSG	42,60 ± 1,62	57,40 ± 5,90	0,04
	HP	3,22 ± 0,12	3,06 ± 0,12	0,26
Coração (nmol/mg proteína)	GSH	45,37 ± 2,44	49,41 ± 1,22	0,17
	GSSG	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,41
	GSH/GSSG	117,40 ± 1,01	121,81 ± 1,32	0,03
	HP	3,34 ± 0,31	2,52 ± 0,21	0,06

Os dados são expressos em média ± erro padrão. Teste t de Student.

GSH: glutatona reduzida; GSSG: glutatona oxidada; GSH/GSSG: relação entre glutatona reduzida e glutatona oxidada; HP: hidroperóxidos de lipídeos.

carotenoide em vários tipos de tecidos do organismo<sup>9,38</sup>. Assim, neste modelo experimental, a suplementação da dieta com o betacaroteno não se comporta como agressão, já que, em corações agredidos, observa-se redução da expressão de Cx43<sup>3,7,8</sup>. Adicionalmente, essa alteração não explica o aumento de eventos adversos observados em estudos de intervenção com o betacaroteno.

Os mecanismos pelos quais o betacaroteno aumenta a expressão de Cx43 ainda não são completamente conhecidos. No entanto, é possível inferir que essa ação dos carotenoides não se deve exclusivamente à atividade de pró-vitamina A e nem à atividade antioxidante desses compostos. Essa afirmação se baseia no fato de que carotenoides sem atividade de pró-vitamina também exercem esse efeito e outros antioxidantes, como alfa-tocoferol, não o exercem<sup>10</sup>.

Em conclusão, o betacaroteno, no modelo experimental utilizado no presente estudo, apresenta efeito benéfico, caracterizado pelo aumento da comunicação intercelular e do sistema de defesa antioxidante.

## Referências

1. Minamino T. Gap junctions mediate the spread of ischemia-reperfusion injury. *Circ J*. 2009;73(9):1591-2.
2. Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;48(1):76-82.
3. Fialová M, Dlugosová K, Okruhlicová L, Kristek F, Manoach M, Tribulová N. Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodeling. *Physiol Res*. 2008;57(1):7-11.
4. Shintani-Ishida K, Unuma K, Yoshida K. Ischemia enhances translocation of connexin43 and gap junction intercellular communication, thereby propagating contraction band necrosis after reperfusion. *Circ J*. 2009;73(9):1661-8.
5. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med*. 2007;13(4):486-91.
6. Tribulová N, Knezl V, Okruhlicová L, Slezák J. Myocardial gap junctions: targets for novel approaches in the prevention of life-threatening cardiac arrhythmias. *Physiol Res*. 2008;57 Suppl 2:S1-S13.
7. Severs NJ, Coppin SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2004;62(2):368-77.
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.

## Contribuição dos autores

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

9. Bertram JS. Dietary carotenoids, connexins and cancer: what is the connection? *Biochem Soc Trans.* 2004;32(Pt 6):985-9.
10. Elliott R. Mechanisms of genomic and non-genomic actions of carotenoids. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1740(2):147-54.
11. Palozza P, Serini S, Trombino S, Lauriola L, Ranelletti FO, Calviello G. Dual role of beta-carotene in combination with cigarette smoke aqueous extract on the formation of mutagenic lipid peroxidation products in lung membranes: dependence on pO<sub>2</sub>. *Carcinogenesis.* 2006;27(12):2383-91.
12. Paiva SA, Russell RM. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 1999;18(5):426-33.
13. Yeh SL, Hu ML. Oxidized beta-carotene inhibits gap junction intercellular communication in the human lung adenocarcinoma cell line A549. *Food Chem Toxicol.* 2003;41(12):1677-84.
14. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996;334(18):1145-9.
15. Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ. Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet.* 2003;361(9374):2017-23.
16. Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, et al. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med.* 2007;167(15):1610-8.
17. 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.
18. 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.
19. de Paiva SA, Zornoff LA, Okoshi MP, Okoshi K, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(6):H2242-6.
20. Minicucci MF, Azevedo PS, Oliveira SA Jr, Martinez PF, Chiuso-Minicucci F, Polegato BF, et al. Tissue vitamin A insufficiency results in adverse ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem.* 2010;6(4-5):523-30.
21. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, 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.
22. 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? *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(3):274-80.
23. 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.
24. Yeum KJ, Booth SL, Sadowski JA, Liu C, Tang G, Krinsky NI, et al. Human plasma carotenoid response to the ingestion of controlled diets high in fruits and vegetables. *Am J Clin Nutr.* 1996;64(4):594-602.
25. Paiva SA, Yeum KJ, Lee KS, Park IS, Lee-Kim YC, Russell RM. Endogenous carotenoid concentrations in cancerous and non-cancerous tissues of gastric cancer patients in Korea. *Asia Pacific J Clin Nutr.* 1999;8(2):160-6.
26. Azevedo PS, Minicucci MF, Chiuso-Minicucci F, Justulin LA Jr, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by tissue vitamin A deficiency in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(3):395-402.
27. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968;25(1):192-205.
28. Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem.* 2001;276(31):29596-602.
29. Jialal I, Devaraj S. Antioxidants and atherosclerosis: don't throw out the baby with the bath water. *Circulation.* 2003;107(7):926-8.
30. Honarbakhsh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *Br J Nutr.* 2009;101(8):1113-31.
31. Qin F, Shite J, Liang CS. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(2):H822-32.
32. Sia YT, Lapointe N, Parker TG, Tsoporis JN, Deschepper CF, Calderone A, et al. Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat. *Circulation.* 2002;105(21):2549-55.
33. 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):209-12, 224-8, 212-5.
34. Murdoch CE, Zhang M, Cave AC, Shah AM. NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovasc Res.* 2006;71(2):208-15.
35. Minicucci MF, Azevedo PS, Ardisson LP, Okoshi K, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Relevance of the ventricular remodeling pattern in the model of myocardial infarction in rats. *Arq Bras Cardiol.* 2010;95(5):635-9.
36. Zhao W, Zhao T, Chen Y, Ahokas RA, Sun Y. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. *Mol Cell Biochem.* 2008;317(1-2):43-50.
37. Zornoff LA, Paiva SA, Minicucci MF, Spadaro J. Experimental myocardium infarction in rats: analysis of the model. *Arq Bras Cardiol.* 2009;93(4):434-40, 426-32.
38. Vine AL, Bertram JS. Upregulation of connexin 43 by retinoids but not by non-provitamin A carotenoids requires RARs. *Nutr Cancer.* 2005;52(1):105-13.
39. Hieber AD, King TJ, Morioka S, Fukushima LH, Franke AA, Bertram JS. Comparative effects of all-trans beta-carotene vs. 9-cis beta-carotene on carcinogen-induced neoplastic transformation and connexin 43 expression in murine 10T1/2 cells and on the differentiation of human keratinocytes. *Nutr Cancer.* 2000;37(2):234-44.
40. Naves MM, Silveira ER, Dagli ML, Moreno FS. Effects of beta-carotene and vitamin A on oval cell proliferation and connexin 43 expression during hepatic differentiation in the rat(1). *J Nutr Biochem.* 2001;12(12):685-92.