

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

THAIS FERNANDES LUCIANO

**AUMENTO DA AUTOFAGIA MEDIADO POR
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO MIOCÁRDIO DE
CAMUNDONGOS SWISS EXPOSTOS À FUMAÇA DE
CIGARRO**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Claudio
Teodoro de Souza.

**CRICIÚMA
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

L937A Luciano, Thais Fernandes.

Aumento da autofagia mediado por espécies reativas de oxigênio no miocárdio de camundongos *swiss* expostos à fumaça de cigarro / Thais Fernandes Luciano ; orientador : Claudio Teodoro de Souza. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

71 p. : il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2014.

1. Fumaça de cigarro – Efeitos colaterais. 2. Autofagia.
3. Miocárdio - Doenças. 4. Proteína quinase. I. Título.

CDD. 22^a ed. 616.865



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Thais Fernander Luciano** sob o título “**Aumento da autofagia mediada por espécies reativas de oxigênio no miocárdio de camundongos Swiss expostos à fumaça de cigarro**”, para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Dissertação, com conceito **A**.


Criciúma, SC, 29 de setembro de 2014


Prof. Dra. Josiane Budni

Membro Relator


Prof. Dr. Ricardo Andrez Machado de Ávila

Membro Interno


Prof. Dr. José Rodrigo Pauli

Membro Externo


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Orientador


Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica do Exercício do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

...à meus pais, pessoas que
acreditaram em mim
incondicionalmente, me
incentivaram, apoiaram e deram
forças em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre iluminou meus caminhos e me tornou capaz de conduzir e concluir este trabalho.

Ao meu orientador, Professor Dr. Claudio Teodoro de Souza, por ter me concedido a oportunidade de desenvolver essa pesquisa sobre a sua orientação. Obrigada por todo empenho e dedicação, contribuindo de maneira determinante para a qualidade deste trabalho. Agradeço ainda, seu apoio, incentivo e compreensão, tão importante na minha formação acadêmica e pessoal. Muito obrigada!

Aos meus amados pais, Elizabet e Janisvaldo, pelo amor infinito, paciência e incentivo ao estudo, vocês são meus exemplo.

Ao meu irmão, Cristiano (*in memoriam*), minha estrela guia, meu eterno amor.

Ao Pedro Daminelli, pela compreensão por todos os momentos que precisei me ausentar.

Aos amigos, em especial a Schérolin Marques e ao Marco Feira, que fizeram parte de todos os momentos, bons e ruins, sempre me ajudando incondicionalmente. A todos os alunos do laboratório de fisiologia e bioquímica do exercício (LAFIBE), todos os alunos de iniciação científica, pela intensa colaboração, em especial para Hemelin Farias, Lara Paganini, Vitor Comin, Júlia de Souza, Matheus Mesquita, Fernando Aperté, Fernanda Tavares, Marcela Farias, Giulia Pedroso, Marcelo Vitto, Patricia Cesconetto, Simone Leal, Marciele Gelesky e Alessandra Machado. A todos os alunos de mestrado, em especial a Daniela Roxo. A todos os alunos de doutorado que eu tive a honra de conviver, em especial ao Elvis Wisniewski, Bruno Pieri, Janesca Guedes, Nara Corrêa, Ariete Minetto, Talita Tuon e Viviane Acunha.

A todos os outros professores do Lafibe, por toda orientação, em especial, aos professores Alexandre Muller, Paulo Silveira e Ricardo Pinho. Sem essas pessoas o desenvolvimento do projeto não seria possível.

A todos, meus sinceros agradecimentos!

“Nossa recompensa se encontra no esforço e não no resultado. Um esforço total é uma vitória completa.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

O hábito de fumar induz diversas alterações ao sistema cardíaco e isso pode estar relacionado, pelo menos em parte, à excessiva formação de espécies reativas de oxigênio. Evidência recente demonstra que o acúmulo de espécies reativas está envolvido em vários processos importantes, um deles é a autofagia. Uma das moléculas envolvidas na regulação da autofagia é a AMPK. A AMPK estimula a ULK e consequentemente outras proteínas relacionadas a autofagia. No entanto, o conhecimento sobre esse processo carece de maiores investigações. Diante disso, o presente estudo avaliou o envolvimento das espécies reativas de oxigênio no processo autofágico no músculo cardíaco de camundongos expostos à fumaça de cigarro. Foram utilizados camundongos *Swiss* expostos à 4 cigarros comerciais com filtro por sessão, 3 sessões/dia, todos os dias da semana por 7, 15, 30 e 45 dias (n=10) e o grupo controle. Os animais sofreram eutanásia, o tecido cardíaco foi removido e realizado análises moleculares e bioquímicas. Nos grupos expostos à fumaça de cigarro por 30 e 45 dias, observou-se maiores alterações no processo autofágico no tecido cardíaco; o tempo de 30 dias de exposição foi utilizado para os experimentos posteriores (suplementação com N-acetilcisteína e cessação da fumaça de cigarro por 30 dias). Após protocolo de exposição, suplementação e cessação da fumaça de cigarro por 30 dias os animais sofreram eutanásia, o tecido cardíaco foi removido e realizado análises bioquímicas e moleculares. Os resultados demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro por diferentes dias aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio, fosforilação de AMPK e ULK^{ser317}, níveis proteicos de sestrina 2, Atg5 e LC3 II e diminuiu a fosforilação de mTOR. Após o uso de antioxidante e a cessação da fumaça de cigarro por 30 dias, a produção de espécies reativas de oxigênio foi significamente menor nos grupos suplementados e cessados por 30 dias em relação aos animais expostos por 30 dias. Em adição, a fosforilação de AMPK e ULK^{ser317} e os níveis proteicos de sestrina 2, Atg5 e LC3 II foram menores nesses grupos. Além disso, a fosforilação de mTOR foi aumentada nos grupos suplementados com n-acetilcisteína e no grupo com cessação da fumaça. Os resultados demonstraram que a exposição da fumaça de cigarro aumenta a autofagia mediada pelas espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de camundongos *Swiss*.

Palavras chaves: fumaça de cigarro; tecido cardíaco; espécies reativas de oxigênio; autofagia; antioxidante.

ABSTRACT

Smoking induces several changes to the cardiovascular system and this may be related, at least in part, to the excessive formation of reactive oxygen species. Recent evidence demonstrates that the accumulation of reactive oxygen species is involved in several important processes, one is autophagy. One of the molecules involved in the regulation of AMPK is autophagy. AMPK stimulates ULK and consequently other autophagy-related proteins. However, knowledge of this process needs further investigations. Thus, the present study evaluated the involvement of reactive oxygen species in the process of autophagy in heart muscle of mice exposed to cigarette smoke. Were used Swiss mice exposed to four commercial filter cigarettes (10 mg tar, 0.8 mg nicotine, carbon monoxide 10mg) per session, 3 sessions / day, every day of the week for 7, 15, 30 and 45 days (n=10) and control group (no exposure). The animals were euthanized, the heart tissue was removed and performed molecular and biochemical analyzes. Groups exposed to cigarette smoke for 30 and 45 days, we observed major changes in the autophagic process in cardiac tissue; time of 30 days of exposure was used for subsequent experiments (N-acetylcysteine supplementation and cessation of cigarette smoke for 30 days). After exposure protocol, supplementation and cessation of cigarette smoke for 30 days the animals were euthanized, the heart tissue was removed and carried biochemical and molecular analyzes. The results demonstrated that exposure to cigarette smoke for different days has increased production of reactive oxygen species, phosphorylation of AMPK and ULK^{ser317}, protein levels sestrina 2, Atg5 and LC3 II and decreased phosphorylation of mTOR. After the use of antioxidant and cessation of cigarette smoke for 30 days, the production of reactive oxygen species was significantly lower in the supplemented groups and terminated by 30 days compared to animals exposed for 30 days. In addition, phosphorylation of AMPK and ULK^{ser317} and protein levels sestrina 2 Atg5 LC3 and II were lower in these groups. Additionally, mTOR phosphorylation was increased in the groups supplemented with N-acetyl group and the cessation of smoking. The results showed that exposure of cigarette smoke increases autophagy mediated by reactive oxygen species in cardiac tissue of Swiss mice.

Keywords: cigarette smoke; cardiac tissue; reactive oxygen species; autophagy; antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Sinalização da autofagia.....	32
Figura 2- Câmara de inalação.....	36
Figura 3- Exposição, suplementação com NAC e cessação à fumaça de cigarro por 30 dias.....	38
Figura 4- Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a fosforilação e níveis proteicos das moléculas autofágicas no miocárdio de camundongos <i>Swiss</i>	41
Figura 5- Efeitos da exposição à fumaça de cigarro concomitante ao uso de antioxidante sobre a fosforilação e níveis proteicos das moléculas autofágicas no miocárdio de camundongos <i>Swiss</i>	43
Figura 6- Efeitos da cessação da fumaça de cigarro por 30 dias em miocárdio de camundongos <i>Swiss</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3-MA- 3-Metiladenina, do inglês *3-Methyladenine*.
- 4E-BP1- Fator Eucariótico de Início de Tradução 4E, do inglês *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E-binding Protein 1*.
- AMP- Adenosina Monofosfato, do inglês *Adenosine Monophosphate*.
- AMPK- Proteína Quinase Ativada por AMP, do inglês *AMP-activated Protein Kinase*.
- AKT- Proteína Quinase B, do inglês *Protein Kinase B*.
- ATG- Proteína Relacionada à Autofagia, do inglês *Autophagy-related Protein*.
- ATP- Adenosina Trifosfato, do inglês *Adenosine Triphosphate*.
- AVE- Acidente Vascular Encefálico.
- BCL-2- Célula B de Linfoma 2, do inglês *B-cell Lymphoma 2*.
- DCFH-DA- 2',7'-Diclorofluoresceína-diacetato, do inglês 2',7'-*Dichlorodihydrofluorescein diacetate*.
- EPM- Erro Padrão da Média.
- ERK- Proteína Quinase Regulada por Sinal Extracelular, do inglês *Extracellular Signal-Regulated Kinases*.
- ERO/ROS- Espécies Reativas de Oxigênio.
- FoxO1/3- Fatores de Transcrição *Forkhead Box* Sub-group O, do inglês *Forkhead Box Protein O 1/3*.
- GAP – Proteína Ativadora de GTPase, do inglês *GTPase-activating protein*.
- GSH- Glutaciona Reduzida.
- H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio, do inglês *Hydrogen Peroxide*.
- JNK- c-Jun Quinase N-Terminal, do inglês *c-Jun N-terminal Kinases*.
- LC3- Formas I/II Proteína de Cadeia Leve Associada ao Microtúbulo, do inglês *Microtubule-associated Protein Light Chain 3*.
- LKB1- Quinase Hepática B1, do inglês *Liver Kinase B1*
- MLST8- Subunidade Semelhante à Proteína Gb/GbL, do inglês *Target of Rapamycin Complex Subunit LST8*.
- mTOR- Proteína Alvo da Rapamicina em Mamíferos, do inglês *Mammalian Target of Rapamycin*.
- NAC- N-acetilcisteína.
- NO- Óxido Nítrico, do inglês *Nitric Oxide*.
- NADPHox- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase, do inglês *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-Oxidase*.
- p70S6k- Proteína Quinase Ribossomal S6 de 70 kDa, do inglês *Ribosomal Protein Kinase S6 of 70 kDa*.

PE- Fosfatidiletanolamina.

PI3K (1 à III)- Fosfatidilinositol 3-Quinase (classe I à III), do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*.

PRAS40- Substrato 1 da Akt de 40 kDa Rico em Prolina, do inglês *Proline-Rich Akt Substrate of 40-kDa*.

RHEB- Homóloga de Ras Enriquecida no Cérebro, do inglês *Ras homolog enriched in brain*.

SPSS- Pacote Estatístico para as Ciências Sociais, do inglês *Statistical Package for Social Sciences*.

TSC1/2- Proteínas de Esclerose Tuberosa 1 e 2, do inglês *Tuberous Sclerosis Proteins 1 and 2*.

TTFA- Tenoiltrifluoroacetona, do inglês *Thenoyltrifluoroacetone*.

ULK1- Quinase 1 Semelhante a Unk-51, do inglês *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 OBJETIVOS.....	34
2.1 OBJETIVO GERAL.....	34
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	35
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS.....	35
3.2.1 Camundongos expostos à fumaça de cigarro em diferentes tempos.....	35
3.2.2 Exposição à fumaça de cigarro por 30 dias em camundongos suplementados ou não com N-acetilcisteína e cessação da fumaça de cigarro.....	37
3.3 ESPÉCIES REATIVAS POR DIACETATO DE DICLOROFLUORESCÉINA.....	38
3.4 WESTERN BLOTTING.....	38
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO SOBRE A FOSFORILAÇÃO E NÍVEIS PROTEICOS DAS MOLÉCULAS AUTOFÁGICAS NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS SWISS.....	40
4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO CONCOMITANTE AO USO DE ANTIOXIDANTE SOBRE A FOSFORILAÇÃO E NÍVEIS PROTEICOS DAS MOLÉCULAS AUTOFÁGICAS NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS SWISS.....	42
4.3 EFEITOS DA CESSAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO POR 30 DIAS EM MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS SWISS.....	44
5 DISCUSSÃO.....	46
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
ANEXO 1- Carta de Aprovação da CEUA.....	71

1 INTRODUÇÃO

O tabagismo é a principal causa de morbimortalidade em todo o mundo (Cokkinides et al., 2009). Dados epidemiológicos estimam que 20% da população mundial, cerca de 1,4 bilhões de pessoas, fazem uso do tabaco (Eriksen et al., 2012). Como consequência desse hábito, mais de 6 milhões de pessoas morrem anualmente. Estima-se que por volta do ano de 2030, esses números aumentem para 8 milhões de mortes anuais (World Health Organization, 2013). O hábito de fumar é um fator de risco para diversas doenças, dentre elas a aterosclerose (Goldschmidt-Clermont et al., 2012; Starke et al., 2013), hipertensão (Talukder et al., 2011), infarto agudo do miocárdio (Teo et al., 2006) e acidente vascular encefálico (AVE) (Shah e Cole, 2010; Peters et al., 2013). Acredita-se que 54% de todas as mortes causadas por doenças cardiovasculares no mundo, sejam atribuídas ao uso de tabaco (Ezzati et al., 2005). Apesar dos efeitos prejudiciais da exposição à fumaça de cigarro sobre o tecido cardíaco serem bem estabelecidos, as alterações moleculares e os mecanismos subjacentes envolvidos, não estão totalmente esclarecidos.

A fumaça do cigarro contém mais de 4000 espécies químicas já identificadas (Liu et al., 2011). Muitos destes compostos podem agir como agentes oxidantes, pró-inflamatórios e carcinogênicos (Pryor e Stone, 1993; Colombo et al., 2010). Nesse sentido, a exposição crônica à fumaça de cigarro é capaz de predispor a várias alterações fisiológicas tais como alteração da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) (Zhang et al., 2006), aumento da disfunção endotelial (Rahman e Laher, 2007) e elevados níveis pressóricos (Nakamura et al., 2008). Além disso, o tabagismo induz diversos efeitos nocivos ao sistema cardíaco como, alargamento do ventrículo (Zornoff et al., 2006; Rafacho et al., 2011), hipertrofia dos miócitos (Castardeli et al., 2008) e disfunção sistólica (Paiva et al., 2003). Os mecanismos para estas alterações parecem estar relacionado, em parte, à excessiva formação de espécies reativas de oxigênio (ERO ou, do inglês ROS) (Pryor e Stone, 1993; Niu et al., 2011; Talukder et al., 2011).

As ERO são moléculas ou fragmentos moleculares altamente instáveis e reativos, com meia vida curta, possuindo um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital mais externo que tendem a extrair elétrons de outras moléculas para alcançar um estado mais estável (Halliwell e Gutteridge, 2007). Diversas moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio são denominadas de ERO, dentre elas: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila (OH^{\bullet}), as espécies oxidantes não radiculares como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio

singlet (Mandal et al., 2010). A exposição à fumaça de cigarro induz a produção de ERO por vários mecanismos, tais como: disfunção da cadeia de transporte de elétrons (Alonso et al., 2004; Toorn et al., 2009; Raza et al., 2013), indução da atividade da enzima xantina oxidase (XO) (Deliconstantinos e Villiotou, 2000), diminuição das enzimas antioxidantes (Avti et al., 2006; Raza et al., 2013) e a via nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPHox) (Jaimes et al., 2004; Orosz et al., 2007; Rafacho et al., 2011).

As mitocôndrias tem grande relevância na produção de ERO (Balaban et al., 2005; Hamanaka e Chandel, 2010; Waypa e Schumacker, 2010). Na mitocôndria, o O_2 sofre redução tetravalente, a partir da oxidação do citocromo c pela ação da enzima citocromo oxidase, com conseqüente formação de água. Dessa forma, a ação da citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua geração excessiva na mitocôndria. No entanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, e reduzidos de forma univalente, dando origem aos radicais livres (Halliwell e Gutteridge, 1989; Schneider e Oliveira, 2004). Compostos químicos presentes na fumaça de cigarro são capazes de interferir no transporte de elétrons (Miró et al., 1999) e resultar em produção ainda maior de ERO, formando o $O_2^{\bullet-}$ (Echtay, 2007; Valko et al., 2007; Angelopoulou et al., 2009).

Embora os processos de oxidação sejam importantes para a sobrevivência das células, a produção excessiva de ERO, pode levar ao estresse oxidativo (Bernhard e Wang, 2007; Csiszar et al., 2009; Varela-Carver et al., 2010). Em grande extensão, o estresse oxidativo, induz danos às macromoléculas devido a capacidade de reagir facilmente com biomoléculas que se localizam em torno de seu sítio de formação, podendo levar à prejuízos celulares como: peroxidação lipídica, carbonilação de proteínas e fragmentação de ácidos nucleicos (Valko et al., 2007; Roberts e Sindhu, 2009; Talukder, 2011). Harman (1956), sugeriu que os radicais livres provocam danos cumulativos e irreversíveis a macromoléculas, perda da função e morte celular ao longo do tempo impactando diretamente na saúde e na expectativa de vida (Beckman e Ames, 1998). Porém, nos últimos anos, observou-se que as ERO não estão envolvidas apenas em dano e morte celular, mas também em vários processos regulatórios (Bedard e Krause, 2007). Alguns autores observaram que em concentrações fisiológicas, as ERO são capazes de regular sinais para a diferenciação e proliferação celular, crescimento e apoptose (Allen e Tresini, 2000; Droge, 2002; Ji, 2007). Estudos recentes demonstram que o acúmulo de ERO está envolvido em

outro processo fisiologicamente importante, conhecido por autofagia, que é caracterizada pelo processo celular catabólico para a degradação ou reciclagem de componentes celulares (Wang et al., 2011; Kaminsky e Zhivotovsky, 2014). Uma das moléculas envolvidas na regulação da autofagia sendo modulada por ERO (Hu et al., 2008; Jin et al., 2009; Barbosa et al., 2013) é a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato- AMP (AMPK).

A AMPK, descrita por Beg et al. (1973), é uma proteína heterotrimétrica eucariótica altamente conservada. É constituída por uma subunidade catalítica (α), com duas isoformas ($\alpha 1$) (Stapleton et al., 1996) e ($\alpha 2$) (Woods et al., 1994), e duas subunidades regulatórias (β e γ), com as seguintes isoformas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$) (Iseli et al., 2005). Como demonstrado por Hawley et al. (1996), a AMPK pode ser ativada através da fosforilação do resíduo de treonina 172, localizado no sítio de ativação do domínio catalítico da subunidade $\alpha 1$ e $\alpha 2$ (Hawley et al., 1996) e também por diversas enzimas, dentre elas, a quinase hepática B1 (LKB1) (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003; Shaw et al., 2004). A AMPK funciona como um sensor metabólico central extremamente sensível à alteração da razão adenosina monofosfato (AMP)/ adenosina trifosfato (ATP). Esta enzima é ativada alostericamente por AMP, em situações tanto fisiológicas quanto patológicas, tais como o exercício físico, contração muscular, hipóxia, depleção de nutrientes e estresse oxidativo (Beg et al., 1973; Hardie, 2003; Kemp et al., 2003; Kahn et al., 2005). Qualquer estresse metabólico que inibe a produção de ATP tende a aumentar a razão AMP/ATP, e assim ativar a AMPK (Sato et al., 1993). A AMPK é a proteína chave que regula o substrato energético para diversos tecidos, inclusive para o tecido cardíaco. Além de promover a atividade de enzimas catabólicas, essa quinase também está envolvida na manutenção da viabilidade celular através da indução da autofagia (Mihaylova e Shaw, 2011; Wang et al., 2011).

AMPK pode ativar a autofagia através de pelo menos cinco diferentes mecanismos. O primeiro é a estimulação da c-jun quinase N-terminal (JNK1). JNK1 inibe a proteína célula B de linfoma 2 (Bcl-2) e a fosforilação inibitória subsequente de Bcl-2 sobre a proteína Beclin 1 (Wei et al., 2008; He et al., 2013). A dissociação de Beclin 1 e Bcl-2 permite que Beclin 1 forme um complexo com VPS-34, complexo esse, essencial para a indução da autofagia (Maiuri et al., 2007a). ERO aumentam a atividade de JNK, que por sua vez ativa fatores de transcrição como o *forkhead box sub-group O* (FoxO), levando ao aumento da transcrição do gene da sestrina 2. As proteínas sestrinas acumulam-se nas células expostas ao estresse exacerbado e levam a

ativação da AMPK. Sestrinas podem ativar a AMPK através da indução de estresse metabólico, diminuindo os níveis de ATP celular (Budanov e Karin, 2008), levando diretamente para a supra-regulação da autofagia (Lee et al., 2010).

O segundo mecanismo é o controle exercido pela AMPK sobre o FoxO1/3. FoxO1 e FoxO3 são fatores de transcrição, sensíveis ao estado redox (Brunet et al., 2004) que estimulam a expressão de genes relacionados à autofagia. AMPK ativa FoxO1 e FoxO3 no músculo esquelético e em cardiomiócitos, aumentando a expressão do gene para a proteína de cadeia leve associada ao microtúbulo (LC3) e para a proteína relacionada à autofagia 12 (ATG12), necessárias para a promoção da autofagia (Greer et al., 2007; Mammucari et al., 2007; Sengupta et al., 2009).

O terceiro mecanismo pelo qual AMPK pode induzir a autofagia é por fosforilar a quinase 1 semelhante a Unk-51 (ULK1) em dois sítios estimulatórios Serina 317 e Serina 777. A fosforilação de ULK1 por AMPK é importante para a regulação e formação do autofagossomo e consequentemente para a autofagia (Egan et al., 2011; Kim et al., 2011; Shang et al., 2011). Outro mecanismo promovido pela AMPK é a fosforilação direta de Beclin 1, ativando o complexo fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) classe III (complexo responsável por recrutar diversas proteínas envolvidas na formação do autofagossoma), aumentando a autofagia (Kim et al., 2013).

Por fim, o último mecanismo pelo qual AMPK estimula a autofagia é através da inibição da proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). AMPK fosforila em dois sítios de ativação a proteína de esclerose tuberosa 2 (TSC2) em treonina 1227 e serina 1345, o que culmina em inativação da mTOR (Inoki et al., 2003; Gwinn et al., 2008) regulando positivamente a autofagia (figura 1). Portanto, a AMPK é uma molécula crucial que integra sinais de baixo estado energético, modulando a mTOR e consequentemente a autofagia.

A mTOR é uma proteína evolucionária conservada, com massa molecular de aproximadamente 280 kDa, pertencente a família das serina/treonina quinases associadas as fosfatidilinositol quinases (Wullschleger et al., 2006). É responsável pela remodelação do miocárdio, regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência celular, transcrição e síntese proteica (Dunlop e Tee, 2009). Encontra-se *downstream* à proteína quinase B (AKT) na via de sinalização de fatores de crescimento e possui dois grandes complexos proteicos distintos, mTORC1 e mTORC2. Em mamíferos, três proteínas compõem o complexo mTORC1 conhecidas como Raptor, subunidade semelhante a

proteína Gb/GbL (MLST8) e o substrato 1 da Akt de 40 kDa rico em prolina (PRAS40). Já o complexo mTORC2 consiste em Rictor, mLST8 e PROTOR, esse complexo é responsável por controlar o citoesqueleto e a difusão celular (Sarbasov et al., 2005; Yang e Guan, 2007). A ativação do complexo mTORC1 aumenta a síntese de proteína e o crescimento celular através da fosforilação da proteína quinase ribossomal S6 de 70 kDa (p70S6K) e do fator eucariótico de início de tradução 4E (4E-BP1) (Dunlop e Tee, 2009).

O controle negativo da mTORC1 é exercido principalmente pelo complexo esclerose tuberosa (TSC1/TSC2), através do domínio da proteína ativadora de GTPase (GAP) (Saucedo et al., 2003; Wullschleger et al., 2006). TSC2 estimula a hidrólise de GTP e assim torna inativa a proteína homóloga de Ras enriquecida no cérebro (RHEB), um potente regulador positivo de mTOR dependente de GTP (Manning e Cantley, 2003; Li et al., 2004). Uma vez ligada ao GDP, Rheb deixa de ativar mTOR. mTOR é inibida diretamente através da fosforilação de Raptor em Serina 722 e Serina 792 (Gwinn et al., 2008) ou indiretamente através da ativação por fosforilação de TSC2 (Inoki et al., 2006). De modo contrário, a Akt (Potter et al., 2002; Inoki et al., 2003) e a proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK) inibem TSC1/2 (em 7 locais de fosforilação, sendo os resíduos de Serina 939 e Treonina 1462 os principais locais de fosforilação *in vivo*) (Manning e Cantley, 2003), mantendo altos níveis de Rheb ligado a GTP, aumentando a atividade de mTOR (Dan et al., 2002; Saucedo et al., 2003) (figura 1).

A mTORC1 está diretamente relacionada a autofagia, por regular a proteína Atg1/ULK (Castets; Rüegg, 2013; Nazio et al., 2013). Em condições normais, mTORC1 hiperfosforila e inativa a proteína Atg13 resultando em afinidade reduzida de Atg13 com ULK1, o que torna o complexo ULK1-Atg13-FIP200 inativo, modulando negativamente a autofagia (Jung et al., 2009; Kamada et al., 2010). Além disso, estudos têm mostrado que mTORC1 fosforila e sequestra ULK1 do complexo Atg13 e FIP200 consequentemente inativando o início da autofagia (Ganley et al., 2009; Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009). Autofagia (auto-próprio + fagia-comer/alimentar-se) é o principal mecanismo catabólico utilizado por células eucarióticas, desempenha um importante papel no crescimento, desenvolvimento e homeostase celular, mantendo o equilíbrio entre a síntese, degradação e subsequente reciclagem e reutilização de materiais citoplasmáticos (como proteínas, lipídeos e organelas) (Mizushima et al., 2008; Kroemer et al., 2010; Rabinowitz e White, 2010). A autofagia é descrita por ser induzida através de

privação de nutrientes e oxigênio, porém, outros sinais pró-autofágicos estão bem caracterizados, tais como: presença de organelas/proteínas danificadas e de longa vida, presença de toxinas extracelulares e compostos citotóxicos. Dessa maneira, a autofagia está envolvida em diversos processos fisiológicos ou patológicos como desenvolvimento e manutenção da homeostase do organismo, diferenciação celular, neurodegeneração, infecção e câncer (Levine e Yuan, 2005; Mizushima et al., 2008). Várias etapas são necessárias para que ocorra a degradação dos materiais citoplasmáticos mediado pela autofagia, estas incluem: indução da autofagia, iniciação da nucleação da vesícula, expansão da membrana autofágica, maturação das vesículas autofágicas e fusão das vesículas autofágicas com os lisossomos (Levine e Klionsky, 2004; Fan e Zong, 2013).

Após uma mudança no estado energético ou outras condições de estresse, a autofagia é estimulada (Singh et al., 2011). Para a execução da autofagia, há envolvimento de um conjunto de produtos de genes evolutivamente conservados e suas proteínas correspondentes denominadas de Atg, as quais são reguladas principalmente pela mTOR (Mizushima et al., 2008). Desta forma, para que ocorra a indução da autofagia é necessária a inibição de mTOR e associação da Atg13 com ULK1 (Singh et al., 2011; Castets; Rüegg, 2013). Após a indução da autofagia, o próximo passo envolve a nucleação da membrana do fagóforo através do complexo PI3K classe III/Vps-34. O complexo é formado por beclin1/Atg6, Atg14L, p150/Vps-15 e PI3K/Vps-34 que após estimulação, há a formação de fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) que recruta um número de proteínas envolvidas na formação do fagóforo (Kihara et al., 2001; Itakura et al., 2008). O fagóforo é a estrutura que dará origem a uma vesícula de membrana dupla que envolve proteínas e organelas citoplasmáticas, chamada autofagossoma (Cuervo, 2010). O alongamento da membrana do fagóforo para formar o autofagossoma maduro depende da ação de dois sistemas de conjugação regulados pela Atg7: Atg12 + Atg5 e LC3 + fosfatidiletanolamina (PE) (Ohsumi, 2001; Levine; Klionsky, 2004).

Através das enzimas Atg7 e Atg10, o resíduo de glicina C-terminal da Atg12 é covalentemente ligado ao resíduo lisina da Atg5, formando o complexo conjugado Atg12-Atg5 (Mizushima et al., 1998). Após, o complexo Atg12-Atg5 liga-se à Atg16L1, e este complexo resultante é incorporado à membrana externa da vesícula autofágica, desempenhando um papel importante no alongamento da membrana do autofagossoma (Mizushima et al., 2003). Em seguida, LC3 é submetido a clivagem proteolítica induzida por Atg4, expondo seu resíduo C-

terminal de glicina (Gli116), formando a proteína LC3-I. Subsequentemente, o domínio glicina ligará ao domínio cisteína da Atg7 através de uma ligação tioéster, em seguida, LC3-I é transferido a Atg3 a qual realiza o acoplamento de LC3-I com PE, formando a LC3-II. LC3-II é um componente lipídico de membranas plasmáticas, que através do auxílio da Atg5 é incorporado à membrana externa do fagóforo isolando-a para possibilitar sua elongação (Ohsumi, 2001; Wu et al., 2006; Pan et al., 2011). Por fim, ocorre a etapa de fusão, onde as proteínas receptoras lisossomais (LAMP1/2) e Rab7 medeiam a fusão do autofagossomo maduro agregado aos componentes a serem degradados com os lisossomos citosólicos, formando o autofagolisossomo (Jäger et al., 2004). No interior do autofagolisossomo, a fusão de hidrolases (lipases, proteases, glicosidases e nucleotidases) e a acidificação do lúmen do autofagossomo pela bomba de prótons fornecidos pelo lisossoma resultam na degradação dos componentes sequestrados pelos autofagossomas (figura 1). Em seguida, os aminoácidos ou e outros componentes do material degradado são reciclados e transportados para o citosol para serem reutilizados pela célula (Behrends et al., 2010; Kubli e Gustafsson, 2013). Desta forma, a autofagia fornece um mecanismo não só para a rotatividade de constituintes celulares, mas também para a reposição de precursores metabólicos durante condições pobre em nutrientes.

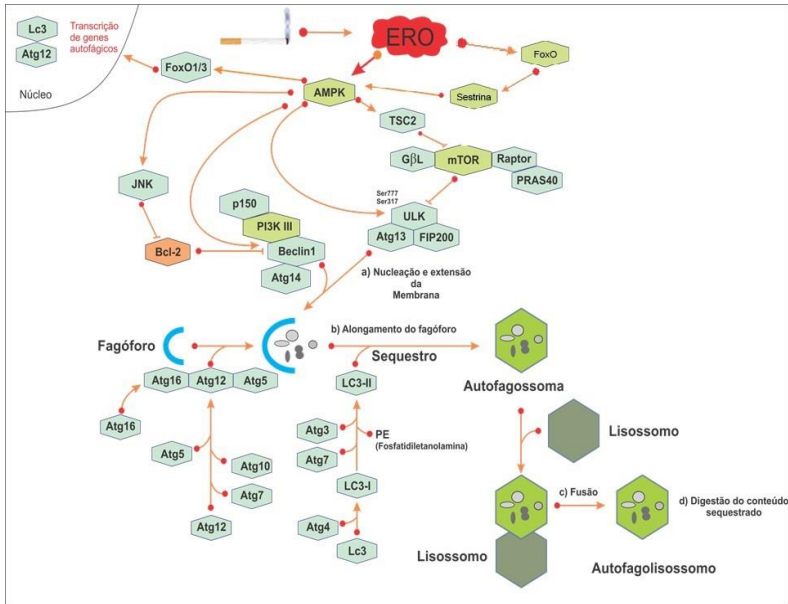


Figura 1. Sinalização da autofagia. Envolvimento da AMPK na sinalização autofágica. O complexo TSC1/2 regula mTOR nos diversos sinais recebidos de distintas vias de sinalização, tais como PI3K/Akt e AMPK. Em situações como o aumento de espécies reativas de oxigênio a AMPK é estimulada. Uma vez ativada, AMPK pode aumentar a autofagia através de pelo menos cinco diferentes mecanismos: 1) estimulação da JNK1; 2) ativação do fator de transcrição FoxO1/3; 3) fosforilação de ULK1; 4) fosforilação direta de Beclin 1 e 5) inibição de mTOR. Inversamente, fatores de crescimento, favorecem a via PI3K/Akt/mTOR que por sua vez, regula negativamente a autofagia. Autofagia divide-se em quatro etapas gerais: (a) nucleação e extensão de uma membrana delimitante em uma estrutura de forma crescente que engloba os materiais citoplasmáticos sequestrados, (b) alongamento do autogossomo em compartimento limitado por membrana dupla, denominado de autogossomo (c) fusão do autogossomo com lisossomos e por fim, (d) digestão da membrana interna do autogossomo e de seu conteúdo. Adaptado de Kubli e Gustafsson (2013) e Cell Signaling Technology (2013).

A autofagia é essencial nos períodos de privação de nutrientes. O tratamento com inibidores farmacológicos da autofagia (3-metiladenina, bafilomicina A1 e hidroxicloroquina) ou inativação dos genes Atg (Atg5, Atg10 e Atg12) aumentam a morte celular em células com privação de nutrientes (Boya et al., 2005). A desregulação da autofagia

pode contribuir para a patogênese de diversas doenças, incluindo doenças neurodegenerativas (Larsen e Sulzer, 2002; Hara et al., 2006), câncer (Qu et al., 2003; Yue et al., 2003) e doenças infecciosas (Gutierrez et al., 2004).

O mecanismo molecular da exposição à fumaça de cigarro induzindo estresse oxidativo, resultando em regulação excessiva da autofagia no tecido cardíaco, é uma questão essencial na biologia das células e ainda não foi completamente compreendido. Neste sentido, pesquisas com objetivo de investigar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a autofagia mediada por ERO são de extrema importância para prevenir os efeitos deletérios do tabagismo. Algumas substâncias definidas como antioxidantes, mesmo que em baixas concentrações, são capazes de retardar ou inibir o aumento de ERO e podem exercer efeitos protetores aos danos cardíacos induzidos pelo tabagismo. Assim, o presente estudo buscou avaliar se a diminuição das ERO poderia resultar em uma estratégia não farmacológica para reverter o possível aumento da autofagia induzida pelo tabagismo no tecido cardíaco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento das espécies reativas de oxigênio no processo de autofagia no músculo cardíaco de camundongos expostos à fumaça de cigarro, tratados ou não com N-acetilcisteína (NAC).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da AMPK, sestrina 2, ULK^{ser317}, Atg5, LC3 II, inibição de mTOR e aumento/diminuição da autofagia em miocárdio de camundongos *Swiss*;
- b) Avaliar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro concomitante a suplementação com N-acetilcisteína sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da AMPK, sestrina 2, ULK^{ser317}, Atg5, LC3 II, inibição de mTOR e aumento/diminuição da autofagia em miocárdio de camundongos *Swiss*;
- c) Avaliar os efeitos da cessação da exposição à fumaça de cigarro sobre a produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da AMPK, sestrina 2, ULK^{ser317}, Atg5, LC3 II, inibição de mTOR e aumento/diminuição da autofagia em miocárdio de camundongos *Swiss*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense-UNESC sob o protocolo número 001/2013-2 (anexo 1) e respeitou estritamente os princípios éticos na experimentação animal. Após os experimentos, os restos mortais dos animais foram acondicionados em saco branco leitoso e encaminhados para freezer (conservação) na própria universidade. Após isso, coletados e transportados por uma empresa terceirizada. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos estão de acordo com a RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados 90 camundongos *Swiss* machos com 2 meses de idade, provenientes do centro de bioterismo da Universidade do Extremo Sul Catarinense, pesando entre 30-40g. Os animais foram mantidos em ciclos de 12 horas claro e 12 horas escuro, ambiente com 70% de umidade com temperatura em $20 \pm 22^{\circ}\text{C}$, alojados em gaiolas de poliuretano com cobertura metálica (10 animais por caixa), alimentados com dieta padrão para roedores e água *ad libitum*.

3.2.1 Camundongos expostos à fumaça de cigarro em diferentes tempos

Foram utilizados 50 camundongos, divididos aleatoriamente em cinco grupos (n=10), expostos à fumaça de cigarro em diferentes tempos: **a)** controle (sem exposição); **b)** 7 dias de exposição; **c)** 15 dias de exposição; **d)** 30 dias de exposição; **e)** 45 dias de exposição.

Os animais foram expostos a fumaça de 4 cigarros comerciais com filtro contendo alcatrão 10mg; nicotina 0,8mg; monóxido de carbono 10mg (Marlboro, Philip Morris) por sessão, 3 sessões/dia (8:30 da manhã, 13:30 da tarde e 17:30 da noite) todos os dias da semana por 7, 15, 30 e 45 dias (tabela 1). Os animais foram mantidos em exposição à fumaça de cada cigarro durante 6 minutos em uma câmara de inalação em acrílico (40cm x 30cm x 25cm), cuja capacidade total foi de 30 litros (figura 2).

Cada cigarro foi acoplado a uma seringa de plástico de 60 ml com a qual se injetou a fumaça no interior da câmara de inalação. O procedimento de insuflar e desinsuflar a seringa foi finalizado com a queima do cigarro até o seu terço final, que durou em média 3 minutos. Decorridos os 6 minutos, a abertura superior da caixa foi retirada e, ligando o exaustor da capela, a fumaça foi evacuada durante 1 minuto onde os animais entraram em contato com o ar ambiente. O procedimento se repetiu com os demais cigarros. A concentração média de monóxido de carbono no interior da caixa variou entre 350-400 p.p.m durante o período de exposição. Os animais ventilando em ar ambiente nas mesmas condições foram considerados controle (Valença et al., 2004; Menegalli et al., 2009). Cada cigarro gera aproximadamente 1 L de fumaça que foi diluído em 30 L (capacidade da câmara). A concentração de fumaça no interior da câmara foi de 3% durante a exposição.



Figura 2 – Câmara de Inalação (40 cm de comprimento, 30 cm de largura e 25 cm de altura).

Tabela 1: Protocolo de exposição à fumaça de cigarro.

	Manhã (8:30h)	Tarde (13:30h)	Noite (17:30h)	Tempo/cigarro	Tempo/exaustão
Domingo	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min.	1 min.
Segunda	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Terça	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quarta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Quinta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sexta	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.
Sábado	4 cig.	4 cig.	4 cig.	6 min	1 min.

Os animais sofreram eutanásia e as amostras do tecido cardíaco foram coletadas para posteriores análises moleculares e bioquímicas. Nos grupos expostos à fumaça de cigarro por 30 e 45 dias, observou-se maiores alterações no processo autofágico no tecido cardíaco; o tempo de 30 dias de exposição foi utilizado para os experimentos posteriores (suplementação com N-acetilcisteína e cessação da fumaça de cigarro por 30 dias).

3.2.2 Exposição à fumaça de cigarro por 30 dias em camundongos suplementados ou não com N-acetilcisteína e cessação da fumaça de cigarro

Após a escolha do melhor tempo, 40 camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos (n=10), expostos à fumaça de cigarro com suplementação ou não de N-acetilcisteína e cessados por 30 dias para avaliar possível reversão: **f**) controle (sem exposição); **g**) 30 dias de exposição; **h**) 30 dias de exposição + NAC; **i**) 30 dias de exposição + 30 dias de cessação (figura 3).

A suplementação com o antioxidante foi realizada diariamente através de gavagem oral. A dimensão da cânula foi suficiente para alcançar o estômago. A NAC (Zanbon Brasil, São Paulo, São Paulo) foi administrada na concentração de 60 mg/kg por dia, em dose única (Farombi et al., 2008).

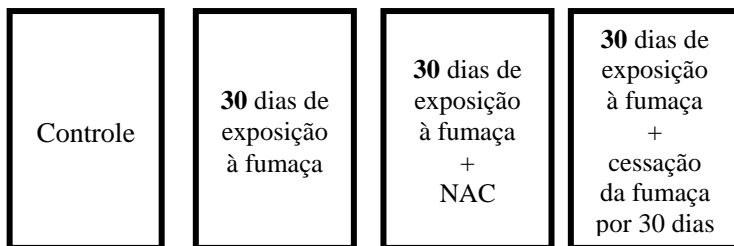


Figura 3. Exposição, suplementação com NAC e cessação à fumaça de cigarro por 30 dias.

Após o período de exposição, suplementação com NAC e cessação por 30 dias, os animais sofreram eutanásia, as amostras do tecido cardíaco foram coletadas e análises moleculares e bioquímicas foram realizadas.

3.3 ESPÉCIES REATIVAS POR DIACETATO DE DICLOROFLORESCEÍNA (DCFH)

A oxidação do DCFH pelas células causa a fluorescência da diclorofluoresceína que pode facilmente ser lida em fluorímetro. Neste ensaio, 100 μ L de água e 75 μ L de DCFH-DA foram adicionados a 25 μ L de homogeneizado de amostra, homogeneizados em vórtex e levados ao banho-maria 37°C ao abrigo da luz por um período de 30 minutos. Separadamente, foi preparada a curva de calibração onde utilizou-se como padrão o DCF 0,1 μ M diluído em tampão fosfato/EDTA em pH 7,4 em diferentes concentrações. Tanto as amostras, quanto a curva de calibração, foram processadas em duplicata e ao abrigo da luz. Ao final dos trinta minutos foram realizadas as leituras no fluorímetro (525 nm excitação e 488 nm de emissão). Os resultados foram expressos em nmol de DCF por mg de proteínas.

3.4 WESTERN BLOTTING

Doze horas após a última sessão de exposição à fumaça de cigarro os animais sofreram eutanásia por guilhotina, o ápice do miocárdio foi extraído e imediatamente homogeneizado em tampão específico contendo 1% de Triton X 100, 100mM de Tris (pH 7,4), 100mM de pirofosfato de sódio, 100mM de fluoreto de sódio, 10mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 10mM de vanadato de sódio, 2mM de PMSF e 0,1 mg/mL de aprotinina a 4°C com Polytron MR

2100 (Kinematica, Suíça). O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm por 30 minutos a 4°C. No sobrenadante determinou-se a concentração de proteínas totais (por teste colorimétrico), utilizando-se para isso o método de Bradford (Bradford, 1976). As proteínas foram ressuspensas e conservadas em tampão Laemmli, contendo 100 mmol/L de DTT (Laemmli, 1970) e posteriormente realizada a determinação do *immunoblotting* com anticorpos específicos. Para isso, alíquotas contendo 250µg de proteína por amostra foram aplicadas sobre gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em cuba Mini-PROTEAN® Tetra electrophoresis system (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América), com solução tampão para eletroforese. As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos da América). As membranas de nitrocelulose contendo as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora por 2 horas, à temperatura ambiente, para diminuir as ligações proteicas inespecíficas. A seguir, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos: anti-Sestrina 2, anti-pAMPK, anti-pmTOR^{ser2448}, anti-pULK1^{ser317}, anti-Atg5 adquiridos da Cell Signalling Biotechnology (Beverly, Estados Unidos da América) e anti-LC3 II adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA) sob agitação constante e *overnight* à 4°C. As membranas originais foram reblotadas com β-actina como proteína controle. A seguir, as membranas foram incubadas em solução com anticorpo secundário conjugado com peroxidase, durante 2 horas à temperatura ambiente. Após, as membranas foram incubadas por dois minutos com substrato enzimático e expostas ao filme de RX em cassete de revelação autoradiográfica. A intensidade das bandas foi determinada através da leitura das autoradiografias reveladas por densitometria ótica, utilizando um *scanner* (HP G2710) e o programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Estados Unidos da América).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM), e analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) one-way, seguida do teste post hoc Tukey. Adotou-se nível de significância $p < 0.05$. A análise estatística foi realizada através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para *Microsoft Windows*.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO SOBRE A FOSFORILAÇÃO E NÍVEIS PROTEICOS DAS MOLÉCULAS AUTOFÁGICAS NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS SWISS

A fim de avaliar as alterações sobre a exposição à fumaça de cigarro no estado redox, camundongos *Swiss* foram expostos à fumaça de cigarro por 7, 15, 30 e 45 dias. A oxidação de DCFH-DA foi analisada como parâmetro oxidativo (fig. 4a). A oxidação do DCFH-DA foi alterada nos grupos 7, 15, 30 e 45 dias de exposição quando comparado ao grupo controle. No entanto, nos grupos expostos por 30 e 45 dias os níveis de DCF foram significativamente maiores do que os animais expostos por 7 e 15 dias. Não foram observadas diferenças entre os grupo 30 e 45 dias de exposição.

Uma vez observado o aumento das ERO nos grupos expostos a fumaça, avaliou-se as moléculas relacionadas a autofagia: ULK^{ser317}, Atg5 e LC3 II. A fosforilação de ULK^{ser317} e LC3 II foram aumentadas nos grupos expostos por 7, 15, 30 e 45 dias. Em adição, os grupos expostos por 30 e 45 dias apresentaram uma maior fosforilação da ULK^{ser317} e níveis proteicos da LC3 II em relação aos grupos 7 e 15 dias. (fig. 4b e 4d, respectivamente). Os níveis proteicos de Atg5 não apresentaram diferenças significativas nos animais expostos por 7 dias em relação aos animais não expostos, enquanto que nos grupos expostos por 15, 30 e 45 dias tiveram seus níveis aumentados quando comparados aos animais não expostos. Interessantemente, este aumento foi ainda maior nos grupos expostos por 30 e 45 dias (fig. 4c). Não houve diferença significativa entre os grupos 30 e 45 dias de exposição.

Sabendo que a AMPK ativa a autofagia e que, a AMPK é modulada via sestrina 2, o conteúdo dessas moléculas foi analisado. No miocárdio dos animais expostos a fumaça de cigarro observou-se aumento significativo na fosforilação da AMPK bem como nos níveis proteicos de sestrina 2 quando comparados ao grupo controle (fig. 4e e 4f, respectivamente). Os grupos expostos por 30 e 45 dias apresentaram um maior aumento na fosforilação de AMPK em relação aos animais expostos por 7 e 15 dias (fig. 4e). No entanto, tanto a fosforilação da AMPK quanto os níveis proteicos de sestrina não diferiram entre os grupos 30 e 45 dias de exposição.

A seguir, avaliou-se a fosforilação da mTOR. Foi observado uma redução significativa na fosforilação da mTOR em todos os grupos expostos à fumaça de cigarro quando comparado ao grupo controle. No

entanto, as reduções foram mais significativas nos grupos 30 e 45 dias de exposição (fig. 4g).

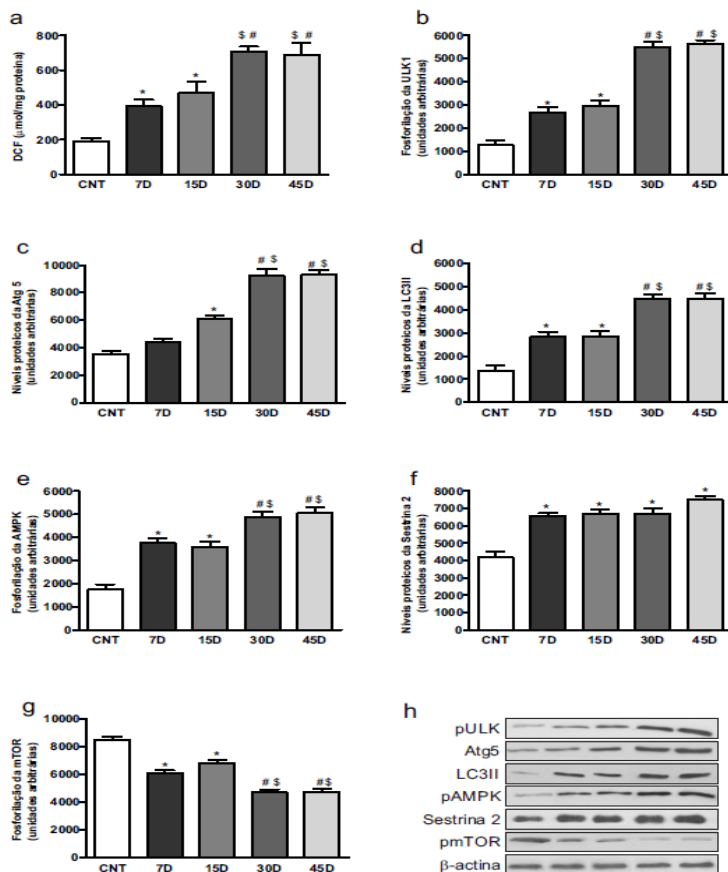


FIG. 4. Efeitos da exposição à fumaça de cigarro sobre a fosforilação e níveis proteicos das moléculas autofágicas no miocárdio de camundongos Swiss. Oxidação do DCFH (a), fosforilação de ULK^{ser317} (b), níveis proteicos de Atg5 (c), níveis proteicos de LC3II (d), fosforilação da AMPK (e), níveis proteicos de sestrina 2 (f), fosforilação da mTOR (g) e bandas representativas das moléculas (h). A membrana foi estripada e re-blotada com β -actina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de dez camundongos por grupo, * $p < 0,05$ versus grupo controle (CNT), # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 7 dias e \$ $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 15 dias.

4.2 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO CONCOMITANTE AO USO DE ANTIOXIDANTE SOBRE A FOSFORILAÇÃO E NÍVEIS PROTEICOS DAS MOLÉCULAS AUTOFÁGICAS NO MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS SWISS

A fim de avaliar se as alterações do estado redox e das moléculas autofágicas no miocárdio de camundongos expostos à fumaça de cigarro podem ser revertidos com o uso de antioxidante, analisou-se a oxidação do DCF, fosforilação de AMPK, ULK^{ser317}, mTOR e os níveis proteicos de sestrina 2, LC3 II, atg5. O tempo 30 dias de exposição não diferiu do tempo 45 dias. Assim o tempo 30 dias foi utilizado nesta etapa. O grupo suplementado com NAC apresentou reduzidos os níveis de DCF quando comparados ao grupo exposto por 30 dias (fig. 5a). Fortemente sugerindo o envolvimento da participação de ERO no processo de autofagia. Em adição, essa redução foi observada também na fosforilação de ULK^{ser317} e AMPK, e os níveis proteicos de Atg5, LC3 II e sestrina 2 (fig. 5b-f), enquanto que a fosforilação de mTOR foi aumentada (fig. 5g).

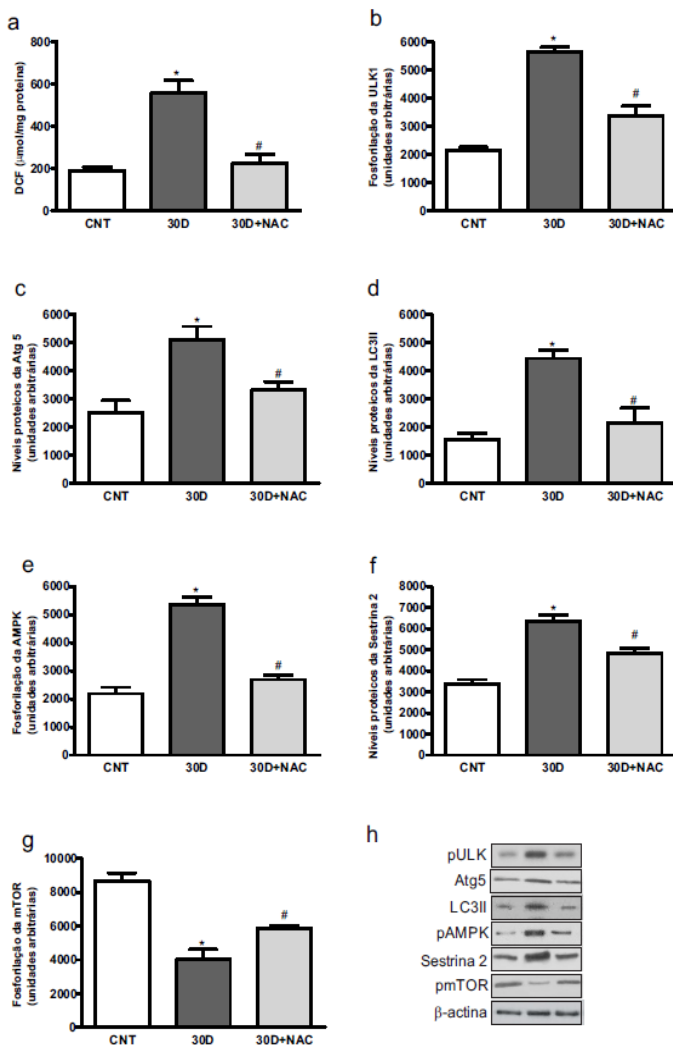


FIG. 5. Efeitos da exposição à fumaça de cigarro concomitante ao uso de antioxidante sobre a fosforilação e níveis proteicos das moléculas autofágicas no miocárdio de camundongos Swiss. Oxidação do DCFH (a), fosforilação de ULK^{ser317} (b), níveis proteicos de Atg5 (c), níveis proteicos de LC3II (d), fosforilação da AMPK (e), níveis proteicos de sestrina 2 (f), fosforilação da mTOR (g) e bandas representativas das moléculas (h). A membrana foi estripada e re-blotada com β-actina. As barras são apresentadas como média ± EPM de dez camundongos por grupo, *p<0,05 versus grupo controle (CNT), # p<0,05 versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 30 dias.

4.3 EFEITOS DA CESSAÇÃO DA FUMAÇA DE CIGARRO POR 30 DIAS EM MIOCÁRDIO DE CAMUNDONGOS *SWISS*

A fim de avaliar se as alterações da exposição à fumaça de cigarro são revertidas com o cessar dessa exposição, os animais foram expostos a fumaça de cigarro por 30 dias e após esse período, os animais foram cessados por mais 30 dias. O tempo 30 dias de exposição não diferiu do tempo 45 dias. Assim o tempo 30 dias foi utilizado nesta etapa. O grupo cessado por 30 dias da exposição à fumaça de cigarro apresentou reduzidos os níveis de DCF quando comparados ao grupo exposto por 30 dias (fig.6a), sugerindo o envolvimento da participação de ERO no processo de autofagia. Em adição, o cessar da fumaça foi suficiente para reduzir a fosforilação de ULK^{ser317} e AMPK (fig. 6b e 6e, respectivamente), bem como os níveis proteicos de Atg5, LC3 II e sestrina 2 (fig. 6c, 6d e 6f, respectivamente) e aumentar a fosforilação de mTOR (fig. 6g).

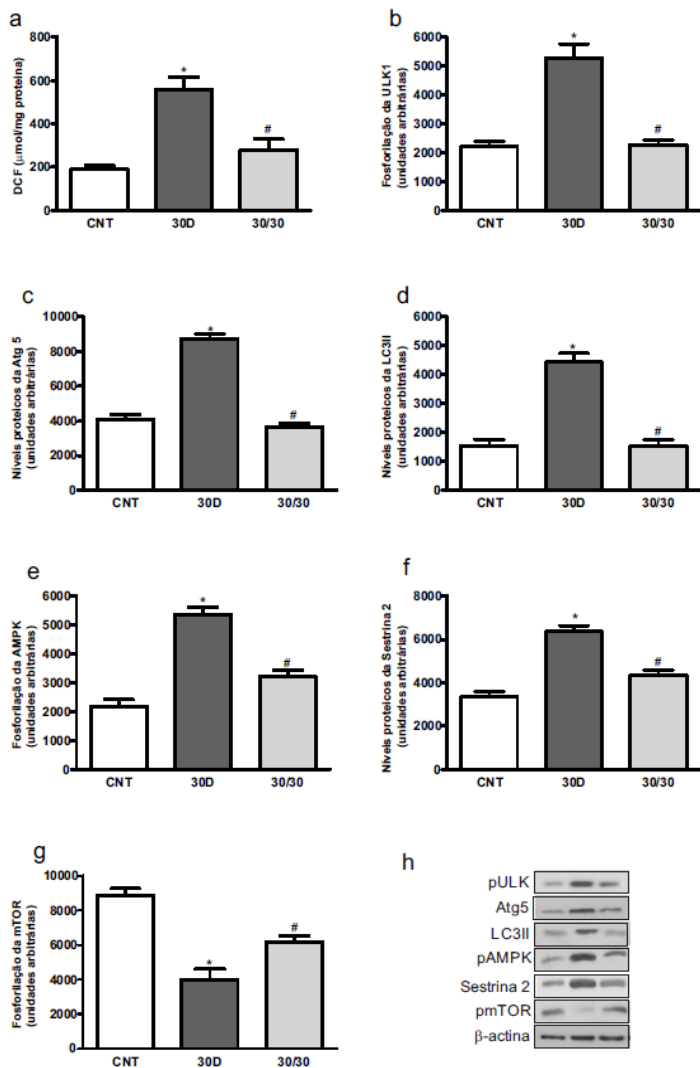


FIG. 6. Efeitos da cessação da fumaça de cigarro por 30 dias em miocárdio de camundongos Swiss. Oxidação do DCFH (a), fosforilação de ULK^{ser317} (b), níveis proteicos de Atg5 (c), níveis proteicos de LC3II (d), fosforilação da AMPK (e), níveis proteicos de sestrina 2 (f), fosforilação da mTOR (g) e bandas representativas das moléculas (h). A membrana foi estripada e re-blotada com β -actina. As barras são apresentadas como média \pm EPM de dez ratos por grupo, * $p < 0,05$ versus grupo controle (CNT), # $p < 0,05$ versus grupo exposto a fumaça de cigarro por 30 dias.

5 DISCUSSÃO

Apesar das advertências e o aumento dos esforços governamentais para reduzir a prevalência do tabagismo, o cigarro permanece como um dos mais prevalentes fatores de risco modificáveis para as doenças cardiovasculares. Acredita-se que o elo entre o tabagismo e as doenças cardiovasculares seja a elevada produção de ERO (Nedeljkovic et al., 2003; Csordas et al., 2011). O cigarro não só possui ERO como ainda pode potencializar a produção endógena (Armani et al., 2009; Liu et al., 2011).

Estudos têm demonstrado que as ERO produzidas pelo cigarro, tais como H_2O_2 podem induzir uma variedade de efeitos celulares, incluindo danos às membranas e às proteínas mitocondriais, reduzindo o potencial redox dessas organelas e aumentando ainda mais a produção de ERO (Ballinger et al., 2000; Brunk e Terman, 2002). Expondo camundongos BALB/c à 9 cigarros diários, Raza et al. (2013) demonstraram, através do DCF, aumento na produção de ERO nos animais expostos à fumaça de cigarro em relação aos camundongos não expostos. Chen et al. (2007) demonstrou que o acúmulo de ERO está envolvido em vários processos fisiologicamente importantes como a autofagia.

Autofagia é uma via lisossomal envolvida na degradação ou reciclagem de proteínas e organelas no interior das células (Baehrecke, 2005; Codogno e Meijer, 2005; Levine e Yuan, 2005). Essick et al. (2013), mostraram que concentrações altas de H_2O_2 induz a formação de autofagossomas em cardiomiócitos. Uma possível explicação para o aumento de ERO, como já mencionado, é a inibição da cadeia de transporte de elétrons, que pode desencadear a produção de ERO, através da transferência inversa de elétrons, além dos próprios oxidantes endógenos presentes na fumaça de cigarro (Li et al., 2003; Muller et al., 2004; Quinlan et al., 2012). Chen et al. (2007) utilizando rotenona (50 μM), um inibidor do complexo I mitocondrial e tenoiltrifluoracetona (TTFA) (0,5 mM), um inibidor do complexo II, por 72 horas, mostraram que a inibição dos complexos I e II da cadeia respiratória induz a autofagia mediada pelo aumento das ERO. O presente estudo observou aumento da produção de ERO nos camundongos expostos à fumaça de cigarro por 7, 15, 30 e 45 dias, através da oxidação do DCFH, consistente com dados encontrados por Scherz-Shouval et al. (2007). Por outro lado, o uso de NAC e a cessação da fumaça de cigarro por 30 dias, foi eficaz em reverter, parcialmente, os níveis de ERO. A NAC é um composto tiol derivado do aminoácido L-cisteína. Por possuir um

grupamento sulfidrilica é amplamente usado como antioxidante em uma gama de eventos (Ziment, 1988). Estudos sugerem que a NAC aumenta as concentrações intracelulares de cisteína e, portanto, de glutatona reduzida (GSH), e isto reduz as espécies oxidantes como radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (Issels et al., 1988; Aruoma et al., 1989). Yuan et al. (2009), incubaram cardiomiócitos de ratos neonatos com H_2O_2 (100 μM) e observaram aumento da autofagia, o que foi revertido parcialmente com a incubação com NAC (2 μM).

A autofagia geralmente ocorre quando as mitocôndrias não conseguem manter os níveis de ATP como no jejum (Levine e Yuan, 2005), ou quando as mitocôndrias estão danificadas (Elmore et al, 2001; Gozuacik e Kimchi, 2004). Uma das moléculas chave envolvida na regulação da autofagia induzida por ERO e baixos níveis de ATP é a AMPK (Wu et al., 2014). O aumento dos níveis de AMPK ativa a proteína TSC2, que resulta em inibição da mTOR e indução da autofagia (Inoki et al., 2003; Matsui et al., 2007). Incubando células de miócitos ventriculares com H_2O_2 (1mM), Essick et al. (2013), mostraram significante aumento da fosforilação da AMPK e uma marcante redução da fosforilação da mTOR. Wang (2011), demonstrou que a ativação da AMPK por ERO derivados da mitocôndria é necessária para a indução da autofagia em células endoteliais, e que a fosforilação foi inibida pela administração dos antioxidantes 4-hidroxi-Tempol e NAC. No presente estudo, a fosforilação da AMPK foi aumentada nos animais expostos à fumaça de cigarro. Como esperado, os animais expostos à fumaça de cigarro apresentavam redução significativa da fosforilação de mTOR. Este evento, possivelmente está relacionado ao aumento da autofagia mediado pelas espécies reativas. Corroborando os achados de Essick et al. (2013), o presente estudo observou diminuição na fosforilação de AMPK e aumento na fosforilação de mTOR após a suplementação com NAC e cessação da exposição à fumaça de cigarro por 30 dias.

A AMPK pode ser modulada indiretamente por ERO via sestrina 2. Zhang et al. (2013) demonstraram que a sestrina 2 desempenha um papel fundamental na ativação da autofagia. As proteínas sestrinas acumulam-se nas células mediante ao aumento de estresse e levam a ativação da AMPK e inibição direta da mTOR, ocasionando a supra-regulação da autofagia (Lee et al., 2010). No presente estudo, nos grupos expostos a fumaça de cigarro, a proteína sestrina 2 apresentou-se elevada, em relação ao grupo controle. Como esperado, o uso de antioxidante diminui os níveis de sestrina 2 no miocárdio de camundongos *Swiss* expostos ao cigarro.

A AMPK pode induzir a autofagia por diversos mecanismos, um deles, é a fosforilação da ULK em dois sítios estimulatórios (Serina 317 e Serina 777) (Kim et al., 2011). Para que ocorra a indução da autofagia é necessária a associação da Atg13 e FIP200 com pULK1^{Ser317 Ser777} (Singh et al., 2011; Castets e Rüegg, 2013). Diante disso, foi avaliado a fosforilação de ULK em serina 317. No presente trabalho, observou-se aumento da fosforilação ULK^{Ser317} nos camundongos expostos a fumaça de cigarro por 7, 15, 30 e 45 dias e reversão desse aumento após o cessar da exposição por 30 dias e do uso de antioxidante. Kim et al. (2014) demonstraram que o aumento de ERO leva a ativação de várias moléculas autofágicas, inclusive a ULK. Após a ativação da ULK, para a formação do autofagossoma, é necessário o recrutamento das proteínas relacionadas a autofagia (ATG), dentre estas, a Atg5 é essencial para dar início ao alongamento do fagóforo (Mizushima et al., 2003). A ubiquitinação de Atg5 e Atg12 catalisada pelas enzimas Atg7 e Atg10 é necessária para a formação do vacúolo autofágico (Mizushima et al., 2001; Nemoto et al., 2003). Matsui et al. (2007), mostraram que a deleção homozigótica de Atg5 resultou em bloqueio da conversão de LC3 I para LC3 II no coração. Em ratos adultos, a deficiência cardíaca específica de Atg5 leva a diminuição da autofagia (Nakai et al., 2007). Além disso, Changou et al. (2014) demonstraram que o excesso de ERO ocasionou um aumento na Atg5 e outras moléculas autofágicas, o que foi revertido parcialmente com a suplementação de NAC. Resultados similares foram encontrados no presente estudo, em que o aumento de ERO nos grupos expostos à fumaça de cigarro levou a um aumento no conteúdo de Atg5 e, em contrapartida, a cessação da exposição por 30 dias ou a suplementação diária de NAC (60 mg/kg) reduziu esses níveis.

Uma reação da via autofágica regulada por ERO, é a clivagem de LC3 pela Atg4. A Atg4 é uma protease de cisteína que cliva LC3 para LC3 I, expondo um resíduo glicina permitindo a ligação covalente de LC3 I para PE, através da Atg3 e Atg7. Atg4 também é responsável pela clivagem de LC3-PE, impedindo a sua adesão à membrana do fagóforo, formando o autofagossoma. O H₂O₂ gerado durante situações de estresse regula a formação de autofagossoma pela inativação da Atg4, mantendo a conjugação entre LC3-PE (Scherz-Shouval et al., 2007). Essick et al. (2013) mostraram que após a incubação de miócitos ventriculares com H₂O₂ (1mM) os níveis de LC3 I e LC3 II estavam aumentados, o que confirma os resultados encontrados neste trabalho, que após a exposição à fumaça de cigarro, os animais expostos à diferentes tempos aumentaram as ERO, demonstrado através do aumento do DCF seguido pelo aumento da proteína LC3 II. Em adição, após o

uso do antioxidante (L-cisteína), Chen et al. (2007) observaram redução nos níveis de LC3-II. Ainda Scherz-Shouval et al. (2007) demonstraram que o tratamento com NAC (10 mM) ocasionou uma redução no conteúdo de LC3, corroborando o presente estudo, onde a suplementação com NAC diminuiu a proteína LC3 II em camundongos expostos à fumaça de cigarro. Desta forma, supõe-se que o estresse oxidativo decorrente da exposição à fumaça de cigarro é responsável, pelo menos em parte, pela ativação da autofagia. O presente estudo mostrou que a fumaça de cigarro estimula a formação de ERO. Essa hipótese é corroborada por observações de que a autofagia induzida pela fumaça de cigarro, pode ser inibida pela administração de compostos antioxidantes, tais como o NAC. Estas condições oxidantes são essenciais para a autofagia, o que foi confirmado através do tratamento com NAC, que reduziu a autofagia como demonstrado pelos menores níveis de ULK, Atg5 e LC3 II (Scherz-Shouval et al., 2007).

A fim de manter a função cardíaca adequada, o coração necessita se adaptar ao estresse cardiovascular elevado devido ao acúmulo de ERO (Murdoch et al., 2006; Hariharan et al., 2011). Quando o aumento de ERO supera as defesas antioxidantes pode ocasionar o estado de estresse oxidativo (Sawyer et al., 2002), o que compromete a função cardíaca (Sam et al., 2005). Corroborando esta idéia, Essick et al. (2013) mostraram que a incubação com H_2O_2 diminui a viabilidade de cardiomiócitos. No coração, a autofagia constitui de um mecanismo homeostático para a manutenção da estrutura e função cardíaca (Codogno e Meijer, 2005; Reef et al, 2006; Martinet et al., 2007). Inibidores da autofagia, como o 3-metiladenina (3 MA), promovem a morte dos miócitos cardíacos sob inanição de glicose ou hipóxia, sugerindo que a autofagia pode ser protetora nesses períodos, através da reposição das reservas energéticas e remoção dos componentes citoplasmáticos disfuncionais (Matsui et al., 2007). No entanto, a indução excessiva da autofagia pode destruir o citosol e organelas (como as mitocôndrias e o retículo endoplasmático), liberando fatores que conduzem à morte celular e a disfunção cardíaca (Maiuri et al., 2007b; Nishida et al., 2008). Zhou et al. (2013) demonstraram que a autofagia induzida pela fumaça de cigarro desempenha um papel patogênico diminuindo a função sistólica ventricular esquerda.

Autofagia em níveis elevados além dos limites fisiológicos pode ser tóxica e desencadeia uma destruição celular conhecida como morte celular programada do tipo II, possivelmente através da ativação da apoptose (Yu et al., 2004; Kiffin et al., 2006; Scott et al., 2007) ou como um resultado da incapacidade das células sobreviverem a degradação

não-específica de grandes quantidades de conteúdo citoplasmático (Levine e Yuan, 2005; Gozuacik e Kimchi, 2007; Chen et al., 2008). Embora a morte celular, independente de caspase, não esteja bem estudada em comparação com a apoptose clássica (dependente caspase), parece que a produção de ERO é necessária para morte celular autofágica em diversas células (Kim e Lee, 2005; Xu et al., 2006; Yu et al., 2006). Na presença de um sequestrador de ERO (L-cisteína), Chen et al. (2007) mostraram que os níveis de ERO, a formação dos autofagolissomos e a morte celular autofágica reduziram, confirmando o mecanismo dependente da formação de ERO. Segundo Khanna et al. (2012), a suplementação com NAC pode melhorar os efeitos da exposição ao cigarro, prevenindo ou revertendo os efeitos adversos, tais como o infarto agudo do miocárdio no sistema cardiovascular. O mecanismo pelo qual a autofagia induz a morte celular permanece desconhecido, no entanto parece que as mitocôndrias desempenham um papel central (Gozuacik e Kimchi, 2004). O presente estudo não avaliou a morte celular do tipo II induzida pela autofagia, mas segundo o estudo realizado por Zhou et al. (2014), esta está aumentada em camundongos expostos à fumaça de cigarro.

Diante dos resultados apresentados, o estudo demonstrou que 7, 15, 30 e 45 dias de exposição à fumaça de cigarro foram suficientes para aumentar a autofagia no tecido cardíaco de camundongos *Swiss*. A indução da autofagia possivelmente foi mediada pela produção aumentada de ERO e ativação direta sobre a AMPK ou indireta através da sestrina 2. Desta forma, supõe-se que o estresse oxidativo decorrente da exposição à fumaça de cigarro é responsável, pelo menos em parte, pela ativação da autofagia.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram que a exposição à fumaça de cigarro aumenta os níveis das moléculas relacionadas a autofagia (ULK1^{ser317}, Atg5 e LC3 II) induzidas pelas espécies reativas de oxigênio, e que isto pode ser mediado pela ativação de sestrina 2, AMPK e inibição da mTOR. Portanto, a reversão do processo autofágico a partir da administração da NAC ou da cessação da fumaça de cigarro observadas no presente estudo, está possivelmente relacionado com a produção de ERO.

REFERÊNCIAS

- Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28(3):463-99.
- Alonso JR, Cardellach F, Casademont J, Miró O. Reversible inhibition of mitochondrial complex IV activity in PBMC following acute smoking. *Eur Respir J.* 2004; 23(2):214-8.
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. ROS in the aging male: model diseases with ROS-related pathophysiology. *Reprod Toxicol.* 2009; 28(2):167-71.
- Armani C, Landini L Jr, Leone A. Molecular and biochemical changes of the cardiovascular system due to smoking exposure. *Curr Pharm Des.* 2009; 15(10):1038-53.
- Aruoma OI, Halliwell B, Hoey BM, Butler J. The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 1989; 6(6):593-7.
- Avti PK, Kumar S, Pathak CM, Vaiphei K, Khanduja KL. Smokeless tobacco impairs the antioxidant defense in liver, lung, and kidney of rats. *Toxicol Sci.* 2006; 89(2):547-53.
- Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; 6(6):505-10.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell.* 2005; 120(4):483-95.
- Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 2000; 86(9):960-6.
- Barbosa VA, Luciano TF, Marques SO, Vitto MF, Souza DR, Silva LA, Santos JP, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Lira FS, Pinho RA, De Souza CT. Acute exercise induce endothelial nitric oxide synthase phosphorylation

via Akt and AMP-activated protein kinase in aorta of rats: Role of reactive oxygen species. *Int J Cardiol.* 2013; 167(6):2983-8.

Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev.* 1998;78(2):547-81.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245-313.

Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973; 54(4):1362-9.

Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature.* 2010; 466(7302):68-76.

Bernhard D, Wang XL. Smoking, oxidative stress and cardiovascular diseases--do anti-oxidative therapies fail? *Curr Med Chem.* 2007; 14(16):1703-12.

Boya P, González-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Métivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(3):1025-40.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.

Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, Tran H, Ross SE, Mostoslavsky R, Cohen HY, Hu LS, Cheng HL, Jedrychowski MP, Gygi SP, Sinclair DA, Alt FW, Greenberg ME. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004; 303(5666):2011-5.

Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. *Eur J Biochem.* 2002; 269(8):1996-2002.

Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 2008; 134(3):451-60.

Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit*. 2008; 14(3):BR62-66.

Castets P, Rüegg MA. mTORC1 determines autophagy through ULK1 regulation in skeletal muscle. *Autophagy*. 2013; 9(9):1435-7.

Changou CA, Chen YR, Xing L, Yen Y, Chuang FY, Cheng RH, Bold RJ, Ann DK, Kung HJ. Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. [Epub ahead of print].

Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I and II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species. *J Cell Sci*. 2007; 120(Pt 23):4155-66.

Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, Israels SJ, Gibson SB. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*. 2008; 15(1):171-82.

Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*. 2005; 12:1509-18.

Cokkinides V, Bandi P, McMahon C, Jemal A, Glynn T, Ward E. Tobacco control in the United States--recent progress and opportunities. *CA Cancer J Clin*. 2009; 59(6):352-65.

Colombo G, Aldini G, Orioli M, Giustarini D, Gornati R, Rossi R, Colombo R, Carini M, Milzani A, Dalle-Donne I. Water-Soluble alpha,beta-unsaturated aldehydes of cigarette smoke induce carbonylation of human serum albumin. *Antioxid Redox Signal*. 2010; 12(3):349-64.

Csiszar A, Podlutzky A, Wolin MS, Losonczy G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress and accelerated vascular aging: implications for cigarette smoking. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009; 14:3128-44.

Csordas A, Kreutmayer S, Ploner C, Braun PR, Karlas A, Backovic A, Wick G, Bernhard D. Cigarette smoke extract induces prolonged endoplasmic reticulum stress and autophagic cell death in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2011; 92(1):141-8.

Cuervo AM. The plasma membrane brings autophagosomes to life. *Nat Cell Biol*. 2010; 12(8):735-7.

Dan HC, Sun M, Yang L, Feldman RI, Sui XM, Ou CC, Nellist M, Yeung RS, Halley DJ, Nicosia SV, Pledger WJ, Cheng JQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*. 2002; 277(38):35364-70.

Deliconstantinos G, Villiotou V. Gas phase oxidants of cigarette smoke increase nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities of rabbit brain synaptosomes. *Neurochem Res*. 2000; 25(6):769-74.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1):47-95.

Dunlop EA, Tee AR. Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. *Cell Signal*. 2009; 21(6):827-35.

Echtay KS. Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role? *Free Radic Biol Med*. 2007; 43(10):1351-71.

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011; 331(6016):456-61.

Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J*. 2001; 15(12):2286-7.

Eriksen M, Mackay J, Ross H. The tobacco atlas. 4^a ed. Atlanta: American Cancer Society; 2012.

Essick EE, Wilson RM, Pimentel DR, Shimano M, Baid S, Ouchi N, Sam F. Adiponectin modulates oxidative stress-induced autophagy in cardiomyocytes. *PLoS One*. 2013; 8(7):e68697.

Ezzati M, Henley SJ, Thun MJ, Lopez AD. Role of smoking in global and regional cardiovascular mortality. *Circulation*. 2005; 112(4):489-97.

Fan YJ, Zong WX. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer*. 2013; 32(3):121-9.

Farombi EO, Ugwuezunmba MC, Ezenwadu TT, Oyeyemi MO, Ekor M. Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: effects of vitamin C and N-acetylcysteine. *Exp Toxicol Pathol*. 2008; 60(1):77-85.

Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13. FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem*. 2009; 284(18):12297-305.

Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Seo DM, Velazquez OC. Atherosclerosis, inflammation, genetics, and stem cells: 2012 update. *Curr Atheroscler Rep*. 2012; 14(3):201-10.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 2004; 23(16):2891-906.

Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol*. 2007; 78:217-45.

Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem*. 2007; 282(41):30107-19.

Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004; 119(6):753-66.

Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30(2):214-26.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. 2^a ed. New York: Oxford University Press; 1989.

Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4^a ed. New York: University Press; 2007.

Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. 2010; 35(9):505-13.

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006; 441(7095):885-9.

Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003; 144(12):5179-83.

Hariharan N, Zhai P, Sadoshima J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion. *Antioxid Redox Signal*. 2011; 14(11):2179-90.

Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956; 11(3):298-300.

Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, Alessi DR, Hardie DG. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*. 2003; 2(4):28.

Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. Characterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1996; 271(44):27879-87.

He C, Zhu H, Li H, Zou MH, Xie Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes*. 2013; 62(4):1270-81.

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 2009; 20(7):1981-91.

Hu Z, Chen J, Wei Q, Xia Y. Bidirectional actions of hydrogen peroxide on endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and function: co-commitment and interplay of Akt and AMPK. *J Biol Chem*. 2008; 283(37):25256-63.

Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL. TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell*. 2006; 126(5):955-68.

Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003; 115(5):577-90.

Iseli TJ, Walter M, van Denderen BJ, Katsis F, Witters LA, Kemp BE, Mitchell BJ, Stapleton D. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *J Biol Chem*. 2005; 280(14):13395-400.

Issels RD, Nagele A, Eckert KG, Wilmanns W. Promotion of cystine uptake and its utilization for glutathione biosynthesis induced by cysteamine and N-acetylcysteine. *Biochem Pharmacol*. 1988; 37(5):881-8.

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(12):5360-72.

Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, Eskelinen EL. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 20):4837-48.

Jaimes EA, DeMaster EG, Tian RX, Raji L. Stable compounds of cigarette smoke induce endothelial superoxide anion production via NADPH oxidase activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(6):1031-6.

Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol.* 2007; 42(7):582-93.

Jin BY, Sartoretto JL, Gladyshev VN, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase negatively regulates hydrogen peroxide-stimulated AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(41):17343-8.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 2009; 20(7):1992-2003.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005; 1(1):15-25.

Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, Kawamata T, Oshiro N, Yonezawa K, Ohsumi Y. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Mol Cell Biol.* 2010; 30(4):1049-58.

Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, Chen ZP, Murthy S, Walter M, Gupta A, Adams JJ, Katsis F, van Denderen B, Jennings IG, Iseli T, Michell BJ, Witters LA. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(Pt 1):162-8.

Khanna AK, Xu J, Mehra MR. Antioxidant N-acetyl cysteine reverses cigarette smoke-induced myocardial infarction by inhibiting inflammation and oxidative stress in a rat model. *Lab Invest.* 2012; 92(2):224-35.

Kaminsky VO, Zhivotovsky B. Free Radicals in Cross Talk Between Autophagy and Apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 21(1):86-102

Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2001; 152(3):519-30.

Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(1-2):152-62.

Kim A, Im M, Yim NH, Kim T, Ma JY. A novel herbal medicine, KIOM-C, induces autophagic and apoptotic cell death mediated by activation of JNK and reactive oxygen species in HT1080 human fibrosarcoma cells. *PLoS One.* 2014; 9(5):e98703.

Kim HS, Lee MS. Essential role of STAT1 in caspase-independent cell death of activated macrophages through the p38 mitogen-activated protein kinase/STAT1/reactive oxygen species pathway. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(15):6821-33.

Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q, Guan KL. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell.* 2013; 152(1-2):290-303.

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(2):132-41.

Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell.* 2010; 40(2):280-93.

Kubli DA, Gustafsson AB. Cardiomyocyte health: adapting to metabolic changes through autophagy. *Trends Endocrinol Metab.* 2013; S1043-2760(13)00205-1.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.

Larsen KE, Sulzer D. Autophagy in neurons: a review. *Histol Histopathol.* 2002; 17(3):897-908.

Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, Ocorr K, Ellisman MH, Bodmer R, Bier E, Karin M. Sestrin as a feedback

inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science*. 2010; 327(5970):1223-8.

Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004; 6(4):463-77.

Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005; 115(10):2679-88.

Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem*. 2003; 278(10):8516-25.

Li Y, Corradetti MN, Inoki K, Guan KL. TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem Sci*. 2004; 29(1):32-8.

Liu C, McAdam KG, Perfetti TA. Some recent topics in cigarette smoke science. *Mini-Rev Org Chem*. 2011; 8(4):349-359.

Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 2007a; 26(10):2527-39.

Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007b; 8(9):741-52.

Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab*. 2007; 6(6):458-71.

Mandal D, Fu P, Levine AD. REDOX regulation of IL-13 signaling in intestinal epithelial cells: usage of alternate pathways mediates distinct gene expression patterns. *Cell Signal*. 2010; 22(10):1485-94.

Manning BD, Cantley LC. Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci*. 2003; 28(11):573-6.

Martinet W, Knaapen MW, Kockx MM, De Meyer GR. Autophagy in cardiovascular disease. *Trends Mol Med.* 2007; 13(11):482-91.

Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007; 100(6):914-22.

Menegali BT, Nesi RT, Souza PS, Silva LA, Silveira PC, Valença SS, Pinho RA. The effects of physical exercise on the cigarette smoke-induced pulmonary oxidative response. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009; 22(6):567-73.

Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011; 13(9):1016-23.

Miró O, Alonso JR, Jarreta D, Casademont J, Urbano-Márquez A, Cardellach F. Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain function and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes. *Carcinogenesis.* 1999; 20(7):1331-6.

Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 2003; 116(Pt 9):1679-88.

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 2008; 451(7182):1069-75.

Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M, Ohsumi Y. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* 1998; 395(6700):395-8.

Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiisa T, Ohsumi Y, Yoshimori T. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 152(4):657-68.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279(47):49064-73.

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.

Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N, Otsu K. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat Med.* 2007; 13(5):619-24.

Nakamura K, Barzi F, Lam TH, Huxley R, Feigin VL, Ueshima H, Woo J, Gu D, Ohkubo T, Lawes CM, Suh I, Woodward M; Asia Pacific Cohort. Studies Collaboration Cigarette smoking, systolic blood pressure, and cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Stroke.* 2008; 39(6):1694-702.

Nazio F, Strappazon F, Antonioli M, Bielli P, Cianfanelli V, Bordi M, Gretzmeier C, Dengjel J, Piacentini M, Fimia GM, Cecconi F. mTOR inhibits autophagy by controlling ULK1 ubiquitylation, self-association and function through AMBRA1 and TRAF6. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(4):406-16.

Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res.* 2008; 103(4):343-51.

Niu J, Wang K, Kolattukudy PE. Cerium oxide nanoparticles inhibit oxidative stress and nuclear factor- κ B activation in H9c2 cardiomyocytes exposed to cigarette smoke extract. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 338(1):53-61.

Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J.* 2003; 79(930):195-199.

Nemoto T, Tanida I, Tanida-Miyake E, Minematsu-Ikeguchi N, Yokota M, Ohsumi M, Ueno T, Kominami E. The mouse Apg10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J Biol Chem.* 2003; 278(41):39517-26.

Ohsumi Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(3):211-6.

Orosz Z, Csiszar A, Labinsky N, Smith K, Kaminski PM, Ferdinandy P, Wolin MS, Rivera A, Ungvari Z. Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292(1):H130-9.

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.

Pan JA, Ullman E, Dou Z, Zong WX. Inhibition of protein degradation induces apoptosis through a microtubule-associated protein 1 light chain 3-mediated activation of caspase-8 at intracellular membranes. *Mol Cell Biol.* 2011; 31(15):3158-70.

Peters SA, Huxley RR, Woodward M. Smoking as a risk factor for stroke in women compared with men: a systematic review and meta-analysis of 81 cohorts, including 3,980,359 individuals and 42,401 strokes. *Stroke.* 2013; 44(10):2821-8.

Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(9):658-65.

Pryor WA, Stone K. Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxyxynitrate, and peroxyxynitrite. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 686:12-28.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003; 112(12):1809-20.

Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 2012; 287(32):27255-64.

Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism. *Science*. 2010; 330(6009):1344-8.

Rafacho BP, Azevedo PS, Polegato BF, Fernandes AA, Bertoline MA, Fernandes DC, Chiuso-Minicucci F, Roscani MG, Dos Santos PP, Matsubara LS, Matsubara BB, Laurindo FR, Paiva SA, Zornoff LA, Minicucci MF. Tobacco smoke induces ventricular remodeling associated with an increase in NADPH oxidase activity. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 27(3-4):305-12.

Rahman MM, Laher I. Structural and functional alteration of blood vessels caused by cigarette smoking: an overview of molecular mechanisms. *Curr Vasc Pharmacol*. 2007; 5(4):276-92.

Raza H, John A, Nemmar A. Short-term effects of nose-only cigarette smoke exposure on glutathione redox homeostasis, cytochrome P450 1A1/2 and respiratory enzyme activities in mice tissues. *Cell Physiol Biochem*. 2013; 31(4-5):683-92.

Reef S, Zalckvar E, Shifman O, Bialik S, Sabanay H, Oren M, Kimchi A. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death. *Mol Cell*. 2006; 22(4):463-75.

Roberts CK, Sindhu KK. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*. 2009; 84(21-22):705-12.

Sam F, Kerstetter DL, Pimental DR, Mulukutla S, Tabae A, Bristow MR, Colucci WS, Sawyer DB. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail*. 2005; 11(6):473-80.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005; 307(5712):1098-101.

Sato R, Goldstein JL, Brown MS. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(20):9261-5.

Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA. Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(6):566-71.

Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34(4):379-88.

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* 2007; 26(7):1749-60.

Schneider CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME.* 2004; 10(10):308-13.

Scott RC, Juhász G, Neufeld TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol.* 2007; 17(1):1-11.

Sengupta A, Molkentin JD, Yutzey KE. FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2009; 284(41):28319-31.

Shah RS, Cole JW. Smoking and stroke: the more you smoke the more you stroke. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2010; 8(7):917-32.

Shang L, Chen S, Du F, Li S, Zhao L, Wang X. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(12):4788-93.

Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(10):3329-35.

Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab.* 2011; 13(5):495-504.

Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res.* 2005; 579(1-2):200-13.

Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem.* 1996; 271(2):611-4.

Starke RM, Ali MS, Jabbour PM, Tjoumakaris SI, Gonzalez F, Hasan DM, Rosenwasser RH, Owens GK, Koch WJ, Dumont AS. Cigarette smoke modulates vascular smooth muscle phenotype: implications for carotid and cerebrovascular disease. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71954.

Talukder MA, Johnson WM, Varadharaj S, Lian J, Kearns PN, El-Mahdy MA, Liu X, Zweier JL. 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.

Teo KK, Ounpuu S, Hawken S, Pandey MR, Valentin V, Hunt D, Diaz R, Rashed W, Freeman R, Jiang L, Zhang X, Yusuf S. INTERHEART Study Investigators. Tobacco use and risk of myocardial infarction in 52 countries in the INTERHEART study: a case-control study. *Lancet.* 2006; 368(9536):647-58.

Toorn VDM, Rezayat D, Kauffman HF, Bakker SJ, Gans RO, Koëter GH, Choi AM, Van Oosterhout AJ, Slebos DJ. Lipid-soluble components in cigarette smoke induce mitochondrial production of reactive oxygen species in lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009; 297(1):L109-14.

Valença SS, da Hora K, Castro P, Moraes VG, Carvalho L, Porto LC. Emphysema and metalloelastase expression in mouse lung induced by cigarette smoke. *Toxicol Pathol.* 2004; 32(3):351-6.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1):44-84.

Varela-Carver A, Parker H, Kleinert C, Rimoldi O. Adverse effects of cigarette smoke and induction of oxidative stress in cardiomyocytes and vascular endothelium. *Curr Pharm Des.* 2010; 16(23):2551-8.

Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH. 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One.* 2011; 6(2):e17234..

Waypa GB, Schumacker PT. Hypoxia-induced changes in pulmonary and systemic vascular resistance: where is the O₂ sensor? *Respir Physiol Neurobiol.* 2010; 174(3):201-11.

Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell.* 2008; 30(6):678-88.

Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol.* 2003; 13(22):2004-8.

Woods A, Munday MR, Scott J, Yang X, Carlson M, Carling D. Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J Biol Chem.* 1994; 269(30):19509-15.

World Health Organization. Tobacco Free Initiative (TFI): World No Tobacco Day. Geneva: WHO Press, World Health Organization; 2013.

Wu J, Dang Y, Su W, Liu C, Ma H, Shan Y, Pei Y, Wan B, Guo J, Yu L. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339(1):437-42.

Wu SB, Wu YT, Wu TP, Wei YH. Role of AMPK-mediated adaptive responses in human cells with mitochondrial dysfunction to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1840(4):1331-44.

Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 2006; 124(3):471-84.

- Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem*. 2006; 281(28):19179-87.
- Yang Q, Guan KL. Expanding mTOR signaling. *Cell Res*. 2007; 17(8):666-81.
- Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 2004; 304(5676):1500-2.
- Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(13):4952-7.
- Yuan H, Perry CN, Huang C, Iwai-Kanai E, Carreira RS, Glembotski CC, Gottlieb RA. LPS-induced autophagy is mediated by oxidative signaling in cardiomyocytes and is associated with cytoprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296(2):H470-9.
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, uma autofagia gene essencial para o desenvolvimento embrionário precoce, é um supressor de tumor haploinsuficiente. *Proc Natl Acad Sci EUA A*. 2003; 100(25):15077-82.
- Zhang WZ, Venardos K, Chin-Dusting J, Kaye DM. Adverse effects of cigarette smoke on NO bioavailability: role of arginine metabolism and oxidative stress. *Hypertension*. 2006; 48(2):278-85.
- Zhang XY, Wu XQ, Deng R, Sun T, Feng GK, Zhu XF. Upregulation of sestrin 2 expression via JNK pathway activation contributes to autophagy induction in cancer cells. *Cell Signal*. 2013; 25(1):150-8.
- Zhou X, An G, Chen J. Hydrogen sulfide improves left ventricular function in smoking rats via regulation of apoptosis and autophagy. *Apoptosis*. 2014; 19(6):998-1005.
- Zhou X, Li C, Lu X. The pathogenic role of autophagy in smoking-induced left ventricular systolic dysfunction in rats. *Int J Cardiol*. 2013; 168(4):4302-3.

Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. *Biomed Pharmacother.* 1988; 42(8):513-9.

Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Camapanha AO, Paiva SA. Cigarette smoke exposure intensifies ventricular remodeling process following myocardial infarction. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86(4):276-82.

ANEXO 1 – Carta de Aprovação da CEUA



A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 001/2013-2

Professor Responsável: Cláudio Teodoro de Souza.

Equipe: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thais Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Título: "AVALLAÇÃO DAS ALTERAÇÕES METABÓLICAS E MOLECULARES DA EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE CIGARRO EM DIFERENTES TECIDOS DE CAMUNDONGOS MAGROS E OBESOS: PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E AMPK".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização de 420 Camundongo heterogênico Swiss 30 dias 20-25g. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesc.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 001/2013-2

Principal Investigator: Cláudio Teodoro de Souza.

Researchers: Ricardo Aurino de Pinho, Daniela Roxo de Souza, Schérolin de Oliveira Marques, Thais Fernandes Luciano, Alessandra Gonçalves Machado.

Project title: "EVALUATION OF METABOLIC AND MOLECULAR ALTERATIONS TO CIGARETTE SMOKE ESPOSURE IN DIFFERENT TISSUES OF LEAN AND OBESE MICE: ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES AND AMPK".

The project was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesc.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesc.net.

Criciúma, 06 de agosto de 2013.

Patricia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA