

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Medicina de Botucatu

*Influência da taurina na remodelação cardíaca
induzida pela exposição à fumaça do cigarro*

Fabiana Gouveia Denipote

Botucatu

2010

Fabiana Gouveia Denipote

*Influência da taurina na remodelação
cardíaca induzida pela exposição à fumaça do
cigarro*

Dissertação Apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica, área de concentração: Nutrição.

Orientador: *Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff*

Co-orientador: *Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp Paiva*

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Denipote, Fabiana Gouveia.

Influência da taurina na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro / Fabiana Gouveia Denipote. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Alberto Rupp Paiva

Assunto CAPES: 40101002.

1. Nutrição. 2. Cigarro. 3. Taurina. 4. Coração – Doenças.

Palavras chave: Exposição à fumaça do cigarro; Remodelação cardíaca; Taurina.

Dedicatória

*Aos meus pais que me ensinaram a lutar com honestidade e pelo apoio e
firmeza em seus olhares em cada momento da minha vida.*

*Às minhas irmãs e minha estrelinha Laura que transmitem uma imensa
alegria e energia que nunca me deixam enfraquecer.*

Agradecimientos

À Deus por me abençoar e dar forças para vencer todos os desafios.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leonardo A. M. Zornoff, por toda sua competência, dedicação, ensinamentos e pela oportunidade de engrandecimento. Obrigada pela confiança!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Sergio A. R. Paiva, pelo incentivo e suporte na realização deste projeto.

À todos os docentes do departamento de Clínica Médica, em especial à Dra. Beatriz B. Matsubara e Dr. Katashi Okoshi pelas contribuições no decorrer do projeto, na prova de qualificação e por serem grandes exemplos pessoais e profissionais.

Ao Dr. Marcos Ferreira Minicucci, Dra. Eline de Almeida Soriano e Dra. Paula S. Azevedo Gaiolla, por toda paciência e ensinamentos.

À todos os funcionários da Biblioteca, da seção de Pós-Graduação, Departamento e do Laboratório Experimental de Clínica Médica, por toda competência e suma importância no transcorrer deste projeto.

Aos amigos do Laboratório, Ana Paula, André Soares, André Leopoldo, Renata, Dijon, Paula, Sílvio, Maria Teresa, Marcelo, Ricardo, Albano, Cristiana, Daniela, Paula, Carlos, Heloísa e Priscila pela troca de conhecimentos e por todo o companheirismo.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini e ao químico Gilberto João Padovan da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, pelo espaço concedido e pela ótima recepção e auxílio na realização de análises.

À Lidiane Paula Ardisson, minha amiga irmã, pela maravilhosa convivência e por toda compreensão e carinho concedidos até hoje. Obrigada por me presentear com Miguel, meu sobrinho que está por vir.

À Fabiana, Marita, Lílian, Renata, Franciele, Rodrigo, Mariele e Bruna pela confiança e por me darem o prazer de tê-los como meus verdadeiros amigos.

À Ozias Augusto Lopes Gonçalves pela presença em minha vida e por todos os momentos encantadores.

À todos os Lopes Gonçalves pelo prazer de considerá-los como minha segunda família.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Façamos da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro!

(Fernando Sabino – “O encontro marcado”)

Resumo

O hábito de fumar figura entre os principais fatores de risco associados às doenças cardiovasculares. Recentemente, estudos mostram que a exposição à fumaça do cigarro resulta em alterações morfológicas e funcionais cardíacas, sugerindo que o fumo pode modular o processo de remodelação ventricular. Em contrapartida, evidências clínicas e experimentais indicam que a taurina parece desempenhar papel crítico no desenvolvimento, prevenção e atenuação da remodelação cardíaca. Objetivo: avaliar os efeitos da taurina em variáveis morfológicas, funcionais e bioquímicas cardíacas induzidas pela exposição à fumaça do cigarro. Métodos: ratos Wistar foram distribuídos em dois grupos: grupo Fumo (F, n=9), composto por animais apenas expostos à fumaça do cigarro e grupo Taurina (T, n=9), composto por animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina. Após dois meses de tratamento os animais foram submetidos ao estudo funcional, morfométrico e bioquímico. Para análise estatística foi utilizado o teste t de Student e Mann-Whitney. O nível de significância foi de 5%. Resultados: a pressão sistólica caudal foi menor no grupo T quando comparado com o grupo F (F = 155 ± 9 mmHg; T = 133 ± 16 mmHg; $p=0,041$). A parede posterior do ventrículo esquerdo foi maior no grupo T quando comparado com o grupo F (F = $1,30$ (1,20-1,42) mm; T = $1,50$ (1,40-1,50) mm; $p=0,029$). Na avaliação dos dados funcionais o grupo T apresentou menor onda E (F = $79,3 \pm 7,72$ cm/s; T = $66,1 \pm 11,8$ cm/s; $p=0,013$), menor onda A (F = $71,2 \pm 14,5$ cm/s; T = $49,7 \pm 12,3$ cm/s; $p=0,004$) e maior relação E/A (F = $1,13 \pm 0,13$; T = $1,37 \pm 0,26$; $p=0,028$). A frequência cardíaca foi menor no grupo T (F = 341 ± 37 bpm; T = 285 ± 49 bpm; $p=0,015$), enquanto o tempo de relaxamento isovolumétrico (F = $22,6 \pm 1,43$ ms; T = $33,2 \pm 4,28$ ms; $p<0,001$) e tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca (F = $53,9 \pm 4,33$; T = $72,5 \pm 12,0$; $p<0,001$) foram maiores no grupo T em comparação ao grupo F. A atividade da enzima do metabolismo

energético cardíaco, lactato desidrogenase (LDH), foi maior no grupo T ($F = 204 \pm 14$ nmol/mg proteína; $T = 232 \pm 12$ nmol/mg proteína; $p < 0,001$). Na avaliação das proteínas do trânsito de cálcio houve menor quantidade de PLB (fosfolambam) ($F = 1,00 \pm 0,13$; $T = 0,82 \pm 0,06$; $p = 0,026$) e de fosforilação da fosfolambam (PPLB Ser16) ($F = 1,00 \pm 0,14$; $T = 0,63 \pm 0,10$; $p = 0,003$) no grupo T, assim como houve desproporção na relação PPLB Ser16/PLB total entre os dois grupos ($F = 1,01 \pm 0,17$; $T = 0,77 \pm 0,11$; $p = 0,050$). Conclusão: a suplementação de taurina em ratos expostos à fumaça do cigarro não alterou a morfologia cardíaca, mas resultou em deterioração da função diastólica ventricular. Esse fenômeno poderia ser explicado por alteração do metabolismo energético cardíaco, com diminuição da produção de energia e de alterações nas proteínas reguladoras do trânsito de cálcio, mais precisamente por redução da fosforilação da fosfolambam.

Palavras-chave: exposição à fumaça do cigarro, remodelação cardíaca, taurina

Abstract

The habit of smoking is a relevant risk factor to cardiovascular diseases. Recently, clinical and experimental evidences indicated that the exposure to tobacco smoke results in both morphological and functional cardiac alterations, suggesting that smoking can modulate the process of ventricular remodeling. On the other hand, evidences suggest that taurine can attenuates cardiac remodeling in different models of cardiac injury. Objective: to analyze the effects of taurine in morphologic, functional, and biochemical variables induced by exposure to tobacco smoke. Wistar rats were allocated in two groups: 1) group exposed to tobacco smoke (F, n=9); 2) group exposed to tobacco smoke and treated with taurine (T, n=9). After two months the animals were submitted to the functional, morphometric, and biochemical studies. The statistical analysis used Student and Mann-Whitney tests. The significance level was 5%. Results: the caudal systolic pressure was smaller in the T group (F = 155 ± 9 mmHg; T = 133 ± 16 mmHg; p=0,041). The left ventricular posterior wall was higher in T group (F = 1,30 (1,20-1,42) mm; T = 1,50 (1,40-1,50) mm; p=0,029). The T group presented lower E (F = $79,3 \pm 7,72$ cm/s; T = $66,1 \pm 11,8$ cm/s; p=0,013) and A (F = $71,2 \pm 14,5$ cm/s; T = $49,7 \pm 12,3$ cm/s; p=0,004) waves but higher E/A ratio (F = $1,13 \pm 0,13$; T = $1,37 \pm 0,26$; p=0,028), isovolumetric relaxation time (F = $22,6 \pm 1,43$ ms; T = $33,2 \pm 4,28$ ms; p<0,001), and isovolumetric relaxation time normalised for heart rate (F = $53,9 \pm 4,33$; T = $72,5 \pm 12,0$; p<0,001). The heart rate was lower in the T group (F = 341 ± 37 beats/min; T = 285 ± 49 beats/min; p=0,015). The enzymatic activity of the lactate dehydrogenase was higher in T group T (F = 204 ± 14 nmol/mg protein; T = 232 ± 12 nmol/mg protein; p<0,001). Considering the calcium homeostasis proteins, the T group presented lower levels of fosfolambam (F = $1,00 \pm 0,13$; T = $0,82 \pm 0,06$; p=0,026), phosphorylated fosfolambam (PPLB Ser16) (F = $1,00 \pm 0,14$; T = $0,63 \pm 0,10$; p=0,003), and phosphorylated

fosfolambam/fosfolambam ratio ($F = 1,01 \pm 0,17$; $T = 0,77 \pm 0,11$; $p=0,050$). Conclusion: in exposed to tobacco smoke rats, the taurine supplementation did not change cardiac morphology, but resulted in impaired diastolic function. This phenomenon can be explained by decreased energy production and calcium transport abnormalities, characterized by decreased fosfolambam phosphorylation.

Key words: exposure to tobacco smoke, cardiac remodeling, taurine

Sumário

Introdução	16
Hipótese	23
Objetivo	25
Material e Métodos	27
Resultados	40
Discussão	61
Conclusão	77
Referências Bibliográficas	79

Introdução

A *nicotiana tabacum* é originária da América do Sul e por vários séculos foi cultivada pela população nativa que fumava as folhas durante vários rituais. O extrato das folhas da planta era utilizado para matar parasitas dentro e fora do corpo, como inseticida. O cultivo, o ato de mascar e de fumar tabaco eram costumes indígenas antigos em todo o subcontinente americano e australiano, identificados quando os exploradores europeus visitaram pela primeira vez estes lugares. Com isso, o ato de fumar se espalhou por toda a Europa durante o século XVI e daí expandiu-se rapidamente para todo o mundo ⁽¹⁾.

Os termos *tabacum* e tabaco vêm do nome de um tipo de junco vazado que era usado pelos nativos americanos para inalar o fumo. Nicotiana vem do nome de médico francês, Jean Nicot, que introduziu a planta com sucesso na França. Nicot estudou em detalhes os efeitos da nicotina e a recomendava como substância que “curava-tudo” ⁽¹⁾.

A produção de cigarros começou no fim do século XIX, mas eles tornaram-se populares no início do século XX. Atualmente, os cigarros são os responsáveis por mais de 90% do consumo do tabaco e seu uso tem atingido cifras altíssimas ⁽¹⁾.

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, 1 bilhão e 200 milhões de pessoas sejam fumantes. Pesquisas comprovam que aproximadamente 47% de toda a população masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. O total de mortes devido ao uso do tabaco atingiu 5,4 milhões de óbitos por ano. Caso as atuais tendências de expansão do seu consumo sejam mantidas, esses números aumentarão para 8 milhões por volta do ano 2030. De acordo com dados anteriores, no Brasil um terço da população adulta era fumante, sendo aproximadamente 11 milhões de mulheres e 16 milhões de homens. O maior número de fumantes estava concentrado na faixa etária dos 20 aos 49 anos e as estimativas mostravam que o tabagismo era responsável por 200 mil mortes por ano ⁽²⁾. Porém, os resultados dos inquéritos mais recentes mostram um

significativo declínio na prevalência de tabagismo na população brasileira. As últimas estatísticas mostram que 17,5% da população de 15 anos ou mais de idade são usuários de produtos derivados de tabaco (fumado ou não), o que corresponde a 25 milhões de pessoas, sendo 14,8 milhões homens (21,6%) e 9,8 milhões mulheres (13,1%). Ao analisar ex-fumantes diários de derivados do tabaco, observa-se que correspondem a 14,1% da população de 15 anos ou mais de idade. Dentre os homens, 17,2% deixaram o hábito diário e dentre as mulheres, 11,2%. Sob a ótica do abandono do hábito de fumar, três enfoques são apresentados: a tentativa de parar de fumar, o planejamento ou intenção de parar de fumar e a recomendação profissional de saúde para a cessação ⁽³⁾.

O uso do fumo figura entre os principais fatores de risco associados às doenças cardiovasculares. As doenças cardiovasculares relacionadas com o tabagismo matam mais de 600.000 pessoas por ano nos países desenvolvidos. Estudos mostram que fumar acelera os batimentos cardíacos, eleva a pressão sanguínea e aumenta o risco de hipertensão e obstrução das artérias, vindo, com o tempo, a causar insuficiência coronariana e acidentes vasculares encefálicos ⁽⁴⁾.

A fumaça do cigarro contém mais de quatro mil substâncias químicas. A maioria dos estudos pré-clínicos mostra que a nicotina é o principal agente responsável pelo desenvolvimento da dependência ao tabaco ⁽⁵⁾. A fumaça é composta de duas fases: a particulada (condensada) e a fase gasosa ⁽¹⁾. Entre os componentes da fase gasosa que produzem efeitos indesejáveis estão o monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, amônia, nitrosaminas voláteis, cianeto de hidrogênio, compostos voláteis contendo enxofre, hidrocarbonetos voláteis, álcoois, aldeídos e cetonas. A fase particulada contém a nicotina, água e alcatrão ⁽⁶⁾.

Das substâncias presentes na fumaça do cigarro, pelo menos quatro foram identificadas e relacionadas como causadoras de danos cardiovasculares: o monóxido de

carbono, a nicotina, o benzopireno e os radicais livres ^(7,8). Dentre estes, a nicotina e o monóxido de carbono são aceitos como os mais envolvidos na gênese das doenças coronarianas e de suas manifestações. Estudos comprovaram que o risco relativo de desenvolver infarto do miocárdio está relacionado ao número de cigarros fumados e varia de 2,1 a 4,0 (média 2,8), não sendo reduzido pelo uso de cigarros pobres em nicotina ^(8,9).

A nicotina é conhecida por seus efeitos sobre a função cardiovascular via estimulação simpática neural. Efeitos simpaticomiméticos são mediados por vários mecanismos, podendo ocorrer pela ativação de quimiorreceptores periféricos e efeitos diretos no tronco cerebral, resultando em aumento da frequência cardíaca e contração miocárdica, da vasoconstrição coronária e da pressão arterial e também causa secreção de adrenalina e noradrenalina pela medula adrenal ⁽¹⁰⁾. A liberação do hormônio antidiurético pela hipófise posterior contribui para os efeitos cardiovasculares, causando diminuição do fluxo urinário e aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres ⁽¹⁾.

Recentemente, diversos estudos têm mostrado que a exposição à fumaça do cigarro resulta em alterações morfológicas cardíacas, como crescimento e dilatação da cavidade ventricular esquerda e hipertrofia do ventrículo esquerdo e direito. Acompanhando essas alterações, o tabagismo resulta em queda de parâmetros de função sistólica e diastólica, tanto *in vivo*, como *in vitro*. Sendo assim, evidências sugerem que a exposição ao fumo pode modular o processo de remodelação ventricular ^(11,12,13,14,15).

O termo remodelação, remodelamento ou remodelagem pode ser definido como variações genéticas, moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão ^(16,17). Essas alterações decorrem de determinados estímulos, como: fatores mecânicos (sobrecarga hemodinâmica, pressórica ou volumétrica), bioquímicos (angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6,

fator de crescimento transformador $\beta 1$, fator de crescimento s milde-insulina 1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada), que podem tanto desencadear como regular a remodela o card cia ^(17,18,19).

A princípio, a remodela o ventricular tem como objetivo manter a fun o card cia estável em situa es de agressão. Cronicamente, entretanto, com a continuidade e/ou progressão do processo ocorre disfun o ventricular progressiva e morte ⁽²⁰⁾.

Diversos mecanismos fisiopatológicos estão envolvidos na progressão da disfun o ventricular em conseq ncia da remodela o. Dentre eles têm-se a hipertrofia celular, altera es da geometria ventricular, modifica es nas proteínas contráteis (cadeias pesadas da miosina), morte celular, fibrose, altera o das metaloproteases, participa o do sistema renina-angiotensina-aldosterona, altera es da via beta-adrenérgica e transporte de cálcio, anormalidades das proteínas de membrana, da matriz e do citoesqueleto, déficit energético e aumento do estresse oxidativo ⁽²¹⁾.

Uma das características mais marcantes da remodela o   que esse processo resulta, freqüentemente, em queda progressiva da fun o ventricular. Logo, inúmeras estratégias precisam ser utilizadas para atenua o do processo de remodela o e, assim, alterar a mortalidade conseqüente às doenças cardiovasculares. Para tanto, sabe-se que a manuten o da fun o card cia apropriada depende de adequado e contínuo fluxo de nutrientes. Destes fatores nutricionais, fazem parte a tiamina, riboflavina, piridoxina, L-carnitina, coenzima Q10, creatina e taurina ^(22,23). Dentre esses merece destaque a taurina, devido ao seu amplo papel de prote o cardiovascular.

Taurina ( cido 2-aminoetanosulf nico)   um aminoácido livre, abundante no meio intracelular, principalmente no músculo esquelético, no músculo card cio e cérebro, e que não   utilizado na síntese de proteínas ^(24,25).   o aminoácido livre mais abundante no músculo card cio, com participa o aproximada de 50% ⁽²³⁾.

A taurina é aminoácido condicionalmente essencial em humanos, pois seus níveis plasmáticos diminuem em determinadas situações de estresse metabólico como sepse, traumas e cirurgias ⁽²⁵⁾. Além disso, os recém-nascidos não são capazes de manter níveis normais de taurina plasmática e urinária ⁽²⁴⁾.

Em relação às ações gerais, a taurina é responsável por desenvolver inúmeras funções metabólicas como: conjugação de ácidos biliares, desintoxicação, estabilização de membrana, osmorregulação, modulação dos níveis de cálcio celular e neuromodulação do sistema nervoso central. Clinicamente, a taurina pode ser utilizada no tratamento de hipercolesterolemia, epilepsia e outras desordens como degeneração macular, Alzheimer, desordens hepáticas, fibrose cística, depressão, infertilidade masculina e alcoolismo ^(24,26).

Em relação aos potenciais efeitos da taurina sobre o coração, existem quatro mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos da taurina no processo de remodelação cardíaca: papel semelhante aos diuréticos, aumentando a excreção de água e sódio; modulador de diversos íons relevantes para o funcionamento normal da célula cardíaca; ação antioxidante, protegendo as membranas lipossômicas contra danos causados por radicais livres; antagonismo das ações da angiotensina II ⁽²⁷⁾.

Diversos estudos experimentais têm sugerido que a redução dos níveis de taurina resulta em importantes ações cardiovasculares, assim como sua suplementação diminui os efeitos deletérios em diferentes situações de agressão, como na isquemia cardíaca, sobrecarga de cálcio e regurgitação aórtica ⁽²⁸⁾.

Em seres humanos, semelhante ao que ocorre em animais, também existem evidências de que situações de deficiência de taurina se acompanham por efeitos deletérios na morfologia e na função cardíaca. Do mesmo modo, sua suplementação parece atenuar possíveis danos cardiovasculares ⁽²⁷⁾.

Portanto, a taurina parece desempenhar papel crítico no desenvolvimento, prevenção e atenuação da remodelação cardíaca em diferentes modelos de agressão. No entanto, os efeitos da taurina nas alterações morfológicas e funcionais cardíacas induzidas pela exposição à fumaça do cigarro não são conhecidas.

Hipótese

A suplementação de taurina atenua a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro.

Objetivo

Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da taurina em variáveis morfológicas, funcionais e bioquímicas cardíacas induzidas pela exposição à fumaça do cigarro, em ratos.

Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos da taurina em corações de ratos expostos à fumaça do cigarro por meio de:

- Avaliação morfológica e funcional in vivo;
- Estudo morfométrico;
- Avaliação da distribuição das isoformas das cadeias pesadas da miosina;
- Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias;
- Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco;
- Quantificação das proteínas do trânsito de cálcio.

Material e Métodos

Protocolo Experimental

O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo n° 641/2007), estando em conformidade com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para este estudo foram utilizados 18 ratos da raça Wistar, machos, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental da Clínica Médica do Campus de Botucatu. Ao atingirem o peso de 200g a 250g, os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos: Grupo Fumo (F), composto por 9 animais apenas expostos à fumaça do cigarro; Grupo Taurina (T), composto por 9 animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina.

Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, forradas com maravalha esterilizada de *Pinus*, com tampa de arame cromado, e em ambiente com temperatura (22 - 26°C) e luminosidade (ciclo claro e escuro – 12hs) controladas.

Os animais foram observados por dois meses.

Avaliação do peso corporal e da ingestão alimentar

O peso corporal de todos os animais foi aferido semanalmente em balança analítica de precisão. Foi realizado, diariamente, controle do consumo de ração, a fim de que todos os animais consumissem semelhante quantidade de dieta, impedindo variação significativa no peso corporal dos animais. A ração ofertada era da marca Purina®, dieta labina padrão do Laboratório Experimental da Clínica Médica.

Avaliação do consumo de água e taurina

O controle de água consumida foi realizado três vezes por semana, sendo sempre ofertada a mesma quantidade para todos os animais. Os ratos do grupo Fumo receberam água potável, enquanto o grupo Taurina recebeu água suplementada com o aminoácido taurina, dissolvida a 3%, definido em estudos prévios ^(29,30,31). A taurina utilizada foi a da marca Sigma®.

Exposição ao fumo

O método utilizado para expor os animais à fumaça do cigarro foi o descrito por Simani et al. ⁽³²⁾, adaptado por Wang et al. ⁽³³⁾ e padronizado em nosso laboratório por Paiva et al. ⁽³⁴⁾. Os 18 ratos, em caixas individuais, foram colocados na câmara transparente, com um volume de aproximadamente 95x80x65cm, conectada ao aparato de fumar. *Puffs* de fumaça foram tirados dos cigarros por vácuo e depois jogados na câmara por período de 30 minutos. Após esse período a fumaça era exaurida e o procedimento repetido. Durante a primeira semana, a fumaça foi liberada a uma taxa de 5 cigarros/30 min, com intervalos de descanso de 10 minutos, duas vezes por dia no período da tarde. A partir da segunda semana o número de cigarros foi aumentado para taxa de 10 cigarros/30min, com intervalos de descanso de 10 minutos, duas vezes no período da manhã e duas no período da tarde, até o final do estudo. Assim, após o período de adaptação, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia. O cigarro utilizado era de marca comercial com a seguinte composição: 1,1mg de nicotina, 14mg de alcatrão e 15mg de monóxido de carbono.

Pressão Arterial Caudal

Após 50 dias de exposição à fumaça do cigarro, 4 animais do grupo Fumo e 6 animais do grupo Taurina foram selecionados aleatoriamente para aferição da pressão arterial caudal.

Para a medida da pressão arterial utilizou-se o sistema CODA 2, Multi-Channel, Computerized, Non Invasive Blood Pressure System for Mice and Rats (Software version: 1.4.0.2/Firmware version: 170). Os animais foram aquecidos e por meio de sensores posicionados na região proximal da cauda, foi possível obter o fluxo sanguíneo arterial. Este aparelho fornece automaticamente valores de pressão arterial sistólica, pressão arterial diastólica e a pressão arterial média.

Avaliação Morfológica e Funcional pelo Ecocardiograma

Após dois meses de tratamento, todos os animais foram pesados e anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg) e cloridrato de xilazina (1mg/kg) por via intramuscular. A seguir, foi realizada tricotomia da região anterior do tórax. Após estes procedimentos, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, em aparato de madeira próprio para realização do ecocardiograma.

O ecocardiograma foi realizado com equipamento Philips (modelo HDI 5000), equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. A avaliação dos fluxos foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. A partir do corte paraesternal em eixo menor foi possível a obtenção da imagem monodimensional transversa do ventrículo esquerdo (VE), utilizando a imagem bidimensional como guia para posicionamento do feixe ultrassônico logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição para-esternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional, ajustada para a velocidade de 100 mm/s, foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co e as medidas das estruturas cardíacas foram medidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography ⁽³⁵⁾. As estruturas cardíacas foram medidas em três a cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo

esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE) foi medido no momento de máxima excursão sistólica da parede posterior da cavidade. A função sistólica do ventrículo esquerdo foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento sistólico $(DDVE-DSVE/DDVE) \times 100$ e a fração de ejeção $(DDVE^3-DSVE^3/DDVE^3)$. O fluxo diastólico transmitral foi obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. Os picos de velocidade nas fases de enchimento ventricular rápido (onda E) e durante a contração atrial (onda A) foram medidos diretamente no monitor do ecocardiógrafo, em cinco ciclos cardíacos consecutivos. O volume sistólico (VS), o débito cardíaco (DC) e índice cardíaco (IC) foram calculados segundo a fórmula: $VS = VTI \times \pi (VSVE/2)^2$; $DC = VS \times FC$ e $IC = DC/\text{peso corporal}$, onde VTI = integral tempo velocidade, VSVE = diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo e FC = frequência cardíaca ⁽³⁶⁾. A VSVE foi medida imediatamente abaixo das cúspides da valva aórtica na posição paraesternal, eixo maior. O tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) medido corresponde ao tempo entre o fechamento da válvula aórtica e a abertura da mitral. Posteriormente o TRIV foi ajustado pela frequência cardíaca por meio da fórmula: $TRIV_c = TRIV/RAIZ(RR/1000)$, sendo $RR = (60000/FC)$.

As seguintes variáveis ecocardiográficas foram estudadas:

- VSVE: diâmetro da via de saída do ventrículo esquerdo;
- AE: diâmetro do átrio esquerdo;
- AE/PC: relação entre o diâmetro do átrio esquerdo e o peso corporal;
- Ao: diâmetro da aorta;
- DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo;
- DDVE/PC: relação entre diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e o peso corporal;
- PPVE: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo;

- PPVE/DDVE: relação entre espessura de parede posterior do ventrículo esquerdo e o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo;
- DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo;
- DSVE/PC: relação entre diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo e o peso corporal;
- Onda E: velocidade da onda E do fluxo transmitral;
- Onda A: velocidade da onda A do fluxo transmitral;
- E/A: relação entre a onda E e a onda A;
- FC: frequência cardíaca;
- VAo: velocidade máxima na aorta;
- VTI: integral tempo velocidade;
- TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico;
- TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca;
- FE: fração de ejeção;
- % de Encurt.: porcentagem de encurtamento;
- DC: débito cardíaco;
- IC: índice cardíaco;
- VS: volume sistólico

Estudo Morfométrico

Após a realização do ecocardiograma, os animais foram submetidos à eutanásia com dose excessiva de pentobarbital sódico. Em seguida, foi coletado sangue e retirados coração, pulmão e fígado. Amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 rpm, e a 4°C para extração do soro e, em seguida, congelado a -80°C.

Após a dissecação dos corações, os ventrículos esquerdos (VE) de todos os animais foram rapidamente lavados em soro fisiológico para a remoção do sangue. Em seguida, os VE

foram seccionados transversalmente a 4 mm do ápice para a base, pelo fato desta região refletir a média da área dos resultados de cortes de todo ventrículo ⁽³⁷⁾. Um fragmento de 3 mm de espessura foi colocado em solução de formol tamponado a 10% por 24 h, posteriormente foram lavados em água corrente por mais 24 h e em seguida colocados em álcool 70%. Em seguida, foram fixados com parafina, em blocos, dos quais foram feitas as lâminas para a análise histológica, com cortes de 5 micrômetros de espessura. O restante dos VE foi seccionado em cinco fragmentos: um fragmento para análise do teor de água tecidual e os outros quatro fragmentos foram congelados a -80°C, para posterior análise da distribuição das cadeias pesadas da miosina, avaliação da produção de citocinas, das enzimas do metabolismo energético cardíaco e quantificação das proteínas do trânsito de cálcio.

O VE, ventrículo direito (VD), átrio esquerdo (AE), pulmão e fígado foram dissecados e pesados em balança analítica de precisão (modelo BG200-Gehaka).

Os pesos úmidos do VE, VD, AE, pulmão e fígado foram aferidos e posteriormente colocados em estufa a 80°C por 48hs. Depois deste período de permanência na estufa, os fragmentos já desidratados foram novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco. A relação entre peso seco e úmido foi utilizada para caracterizar a porcentagem de água nesses tecidos. O teor de água foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de água} = \frac{\text{Peso úmido} - \text{Peso seco}}{\text{Peso úmido}} \times 100$$

O peso úmido do ventrículo esquerdo e do ventrículo direito, normalizado para peso corpóreo final do rato, foi utilizado como índice de hipertrofia ventricular.

O teor de água do fígado e pulmão foi quantificado como indicativo da ocorrência de congestão.

Após ser inserido no bloco de parafina, o corte histológico do VE foi seccionado em cortes de 4 micrômetros e corados em lâmina com solução Hematoxilina - Eosina (HE) para

aferição da área seccional transversa dos miócitos (ASM), empregando-se microscópio LEICA DM LS acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus 3.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado pela objetiva 40X. Os miócitos selecionados estavam seccionados transversalmente, apresentavam forma redonda, núcleo visível no centro da célula e tipicamente localizados na camada sub-endocárdica da parede muscular do ventrículo esquerdo. Este cuidado visou uniformizar ao máximo o conjunto de miócitos dos diferentes grupos. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular.

Lâminas com cortes histológicos coronais de 6 micrômetros e corados pela técnica de Picro Sirius Red (sirius red F3BA em solução aquosa ácido pícrico), específicos para visualização de colágeno, foram feitas para avaliação do interstício do miocárdio do ventrículo esquerdo. Foram visualizados aproximadamente 30 a 40 campos por ventrículo utilizando objetiva de 40X^(38,39).

Eletroforese para cadeia pesada da miosina

O estudo das isoformas α e β da miosina de cadeia pesada foi realizado por meio da eletroforese de proteína em SDS-page⁽⁴⁰⁾.

Na fase de extração da proteína, adicionou-se 1,5 ml de tampão de extração (50 mM de tampão fosfato de potássio pH=7,0; 0,3 M sucrose; 0,5 mM de DTT; 1 mM de EDTA pH=8,0; PMSF 0,3 mM; NaF 10 mM; inibidor de protease 1:100) a 60mg de tecido cardíaco proveniente do septo interventricular. O material foi homogeneizado durante 10 segundos por 2 vezes. O material extraído foi centrifugado por 20 minutos a 4°C com 12000 rpm, e o sobrenadante coletado⁽⁴¹⁾. A quantidade de proteína do extrato foi determinada pelo método de Bradford e a concentração final ajustada para 1 mg/ml.

A eletroforese foi realizada em SDS-page, com gel de separação a 8%. Após a polimerização do gel, foi aplicado azul de bromofenol nos poços, seguido por 8 µg da amostra. Foi então adicionado o tampão de corrida (“lower buffer” = 50 mM Tris, 384 mM glicina, 0,2% de SDS e 4 litros de H₂O; “upper buffer” = “lower buffer” + 10 mM de 2 mercaptanol)⁽⁴⁰⁾.

A temperatura foi mantida ao redor de 20°C durante a corrida, que ocorreu em 36 horas a 70 V e com amperagem inicial de 4 mA⁽⁴⁰⁾. Após a corrida, o gel foi deixado em solução fixadora por 10 minutos (metanol 50%, ácido acético glacial 7%) e, em seguida, corado com solução de Comassie Blue R-250 (metanol 40%, ácido acético glacial 5%, Comassie Blue 0,1%), durante 30 minutos.

Posteriormente, o gel foi descorado sucessivamente em solução com metanol 40% e ácido acético 7%. Após a descoloração, foi realizada a captura da imagem do gel e a determinação da porcentagem de MHC α e β, em unidade de imagem denominada pixel.

Avaliação da produção de citocinas

Amostras de tecido cardíaco na quantidade de 60 mg foram homogeneizadas e solubilizados em 50 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4; 0,3 M de sacarose; 0,5 mM DTT; 1 mM EDTA, pH 8,0; 0,3 mM PMSF; 10 mM NaF, e 1:100 inibidor de protease. Níveis de citocinas em homogeneizado cardíaco foram avaliados por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). A sensibilidade do ELISA para o IFN-γ e TNF-α foram 19 e 31pg/ml, respectivamente.

Espectrofotometria para dosagens das enzimas do metabolismo energético cardíaco

O metabolismo energético cardíaco foi determinado através da atividade da enzima β-hidroxiacil coenzima A desidrogenase (β-OH, E.C. 1.1.1.35) que participa do metabolismo

dos ácidos graxos, lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) que participa do metabolismo da glicose e a citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) que participa na entrada da acetil coenzima A no ciclo do citrato. Para essas análises, 200 mg de ventrículos esquerdos foram homogeneizados sob gelo em 5 ml de solução de tampão fosfato (0,1M, pH=7,4), contendo 1 mM de etileno diamino ácido tetra-acético (EDTA) ^(42,43,44).

A atividade da β -OH foi determinada no coração em meio contendo acetilcoenzima A 0,05 mM e dinucleotídeo adenina nicotinamida, na forma reduzida (NADH) 0,1 mM. A atividade da LDH foi determinada pela oxidação do NADH a 340nm, tendo o piruvato como substrato. A atividade da CS foi determinada em meio contendo acetilcoenzima A 0,1 mM e oxaloacetato 0,5 mM. Nesse estudo também foi determinada a concentração de proteínas totais. As análises foram feitas por meio de espectrofotômetro e o padrão utilizado foi solução de albumina sérica bovina ⁽⁴²⁾.

Western Blot para quantificação das proteínas do trânsito de cálcio

Extração das proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a - 80°C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford ⁽⁴⁵⁾, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

Western Blot

A expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (Serca-2a), Fosfolambam (PLB) e Fosfolambam fosforilada (PPLB Ser16) foi analisada por *Western Blot*⁽⁴⁶⁾. As amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6 a 15%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 3 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCl 20mM pH 7,6 e NaCl 137mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH 7,4, NaCl 5M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo

secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., USA), nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

Anticorpos para proteínas reguladoras do trânsito de cálcio

- *Serca2 ATPase, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- *Phospholamban, mouse IgG2a* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 2 µg/ml.
- *Phospholamban phospho-Ser16, rabbit IgG* (Badrilla, Leeds-UK). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.

Anticorpo de normalização

- *β-actin, Rabbit IgG* (Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA).
Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000. A corrida eletroforética do anticorpo de normalização (β-actina) foi realizada no mesmo gel de corrida da proteína Serca-2a e fosfolambam.

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase (IgG anti-mouse, anti-rabbit ou anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA), anti os anticorpos primários, foram utilizados na titulação de 1:10000. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas

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

Análise Estatística

Para as variáveis com distribuição normal, os valores obtidos foram apresentados em média \pm desvio padrão e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste t de Student. Para as variáveis com distribuição não-normal, os resultados obtidos foram apresentados em mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

Os resultados foram analisados pelo pacote estatístico SigmaStat for Windows v 2.03 da SPSS (SigmaStat 3.5) e os gráficos foram elaborados a partir do programa SigmaPlot 9.0.

Resultados

Os animais não apresentaram diferença significativa entre os dois grupos em relação ao peso corporal final (F = 301 (293-303)g; T = 303 (296-308)g; p=0,352) e no consumo de água (F = 45,57 ± 8,10 ml; T = 50,46 ± 6,02 ml; p=0,165). Os dados estão apresentados na tabela 1.

Não houve diferença nos valores de pressão diastólica caudal (F = 96 ± 15 mmHg; T = 92 ± 15 mmHg; p=0,661) e de pressão arterial caudal média entre os grupos (F = 116 ± 12 mmHg; T = 106 ± 15 mmHg; p=0,306). Porém, a pressão sistólica caudal foi menor no grupo Taurina quando comparado como grupo Fumo (F = 155 ± 9 mmHg; T = 133 ± 16 mmHg; p=0,041). Os dados estão apresentados na tabela 2.

Estudo ecocardiográfico

Os dados relativos às análises ecocardiográficas estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Em relação às variáveis morfológicas (tabela 3), a parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) foi maior no grupo Taurina quando comparado com o grupo Fumo (F = 1,30 (1,20-1,42) mm; T = 1,50 (1,40-1,50) mm; p=0,029). Na análise das outras variáveis não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Na avaliação dos dados funcionais (tabela 4), não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em relação às variáveis indicativas da função sistólica. Quanto às variáveis da função diastólica, o grupo Taurina apresentou menor onda E (F = 79,3 ± 7,72 cm/s; T = 66,1 ± 11,8 cm/s; p=0,013), menor onda A (F = 71,2 ± 14,5cm/s; T = 49,7 ± 12,3 cm/s; p=0,004) e maior relação E/A (F = 1,13 ± 0,13; T = 1,37 ± 0,26; p=0,028), quando comparado com o grupo Fumo. A FC foi menor no grupo Taurina (F = 341 ± 37 bpm; T = 285 ± 49 bpm; p=0,015), enquanto o TRIV (F = 22,6 ± 1,43 ms; T = 33,2 ± 4,28 ms; p<0,001) e TRIVc (F = 53,9 ± 4,33; T = 72,5 ± 12,0; p<0,001) foram maiores no grupo Taurina em comparação ao grupo Fumo. Na análise das outras variáveis, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Estudo morfométrico

Os dados relativos ao estudo morfométrico estão apresentados na tabela 5. Não houve diferença entre os dois grupos quanto ao peso do ventrículo esquerdo e ventrículo direito, mesmo quando ajustados pelo peso corporal dos animais. O teor de água do átrio esquerdo, do ventrículo esquerdo, do ventrículo direito, do pulmão e fígado também foram semelhantes entre os dois grupos.

Distribuição das cadeias pesadas da miosina

Não houve diferença na porcentagem da isoforma β da cadeia pesada da miosina entre os dois grupos ($F = 55,3 \pm 9,53\%$; $T = 61,6 \pm 7,39\%$; $p=0,276$), assim como não foi encontrada diferença na relação β/α ($F = 1,32 \pm 0,50$; $T = 1,70 \pm 0,63$; $p=0,326$), como apresentados na tabela 6.

Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias

Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos em relação à concentração cardíaca de TNF- α ($F = 162$ (80-246) pg/mg; $T = 174$ (138-183) pg/mg; $p=1,00$) e IFN- γ ($F = 146$ (84-197) pg/mg; $T = 159$ (137-160) pg/mg; $p=1,00$), como apresentados na tabela 7.

Atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco

Quanto à atividade das enzimas do metabolismo energético, não houve diferença entre os grupos em relação à quantidade de proteína tecidual, atividade das enzimas citrato sintase (CS) e beta hidroxí acil coenzima A desidrogenase (β -OH). No entanto, a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi maior no grupo Taurina, quando comparado com o grupo Fumo ($F = 204 \pm 14$ nmol/mg proteína; $T = 232 \pm 12$ nmol/mg proteína; $p<0,001$). Os dados estão apresentados na tabela 8.

Proteínas do trânsito de cálcio

Na avaliação das proteínas do trânsito de cálcio (tabela 9), não houve diferença entre os dois grupos quanto à quantificação da Serca-2a (enzima dependente Ca^{2+} -ATPase). No entanto, houve menor quantidade de PLB (fosfolambam) ($F = 1,00 \pm 0,13$; $T = 0,82 \pm 0,06$; $p=0,026$) e de fosforilação da fosfolambam (PPLB Ser16) ($F = 1,00 \pm 0,14$; $T = 0,63 \pm 0,10$; $p=0,003$) no grupo Taurina quando comparado com o grupo Fumo, assim como houve desproporção na relação PPLB Ser16/PLB total entre os dois grupos ($F = 1,01 \pm 0,17$; $T = 0,77 \pm 0,11$; $p=0,050$).

Tabela 1 - Peso corporal e consumo de água

	Grupo F (n=9)	Grupo T (n=9)	p
PC (gramas)	301 (293-303)	303 (296-308)	0,352
Consumo água (ml)	45,57 ± 8,10	50,46 ± 6,02	0,165

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; PC: peso corpóreo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal).

Tabela 2 - Pressão arterial caudal

	Grupo F (n=4)	Grupo T (n=6)	p
PA sistólica (mmHg)	115 ± 9	133 ± 16	0,041
PA diastólica (mmHg)	96 ± 15	92 ± 15	0,661
PA média (mmHg)	116 ± 12	106 ± 15	0,306

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; PA sistólica: pressão arterial caudal durante a sístole; PA diastólica: pressão arterial caudal durante a diástole; PA média: pressão arterial caudal média. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal).

Tabela 3 - Dados morfológicos obtidos por ecocardiograma

	Grupo F (n=9)	Grupo T (n=9)	p
VSVE (mm)	2,3 ± 0,20	2,3 ± 0,10	0,885
AE (mm)	3,88 ± 0,39	3,89 ± 0,24	0,943
AE/PC (mm/kg)	13,2 ± 1,12	12,9 ± 0,84	0,570
Ao (mm)	3,56 ± 0,30	3,49 ± 0,27	0,628
Ao/PC (mm/kg)	12,1 ± 0,67	11,6 ± 1,28	0,347
DDVE (mm)	6,62 ± 0,48	6,53 ± 0,74	0,767
DDVE/PC (mm/kg)	22,5 ± 1,23	21,7 ± 2,71	0,429
PPVE (mm)	1,30 (1,20-1,42)	1,50 (1,40-1,50)	0,029
PPVE/DDVE	0,20 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,074
DSVE (mm)	2,98 ± 0,42	2,90 ± 0,58	0,748
DSVE/PC (mm/kg)	9,81 ± 1,00	9,90 ± 2,11	0,915

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; VSVE: via de saída do ventrículo esquerdo; AE: diâmetro do átrio esquerdo; PC: peso corpóreo; Ao: diâmetro da aorta; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; PPVE: espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal).

Tabela 4 - Dados funcionais obtidos por ecocardiograma

	Grupo F (n=9)	Grupo T (n=9)	p
Onda E (cm/s)	79,3 ± 7,72	66,1 ± 11,8	0,013
Onda A (cm/s)	71,2 ± 14,5	49,7 ± 12,3	0,004
E/A	1,13 ± 0,13	1,37 ± 0,26	0,028
FC (bpm)	341 ± 37	285 ± 49	0,015
Vao (cm/s)	76,0 ± 9,16	76,5 ± 13,5	0,920
VTI (cm)	4,39 ± 0,63	4,69 ± 1,00	0,459
TRIV (ms)	22,6 ± 1,43	33,2 ± 4,28	<0,001
TRIVc	53,9 ± 4,33	72,5 ± 12,0	<0,001
FE	0,91 ± 0,02	0,90 ± 0,03	0,405
% ENC	56,3 ± 4,00	54,6 ± 5,21	0,443
DC (l/min)	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,228
IC (l/min/kg)	0,84 ± 0,17	0,72 ± 0,17	0,144
VS (l/ml)	0,73 ± 0,14	0,76 ± 0,14	0,612

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; E/A: relação entre as ondas E e A avaliadas pelo fluxo transmitral; FC: frequência cardíaca; Vao: velocidade do sangue na aorta; VTI: integral tempo-velocidade; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TRIVc: tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca; FE: fração de ejeção; % ENC: porcentagem de encurtamento; DC: débito cardíaco; IC: índice cardíaco; VS: volume sistólico. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal).

Tabela 5 - Dados morfométricos

	Grupo F (n=9)	Grupo T (n=9)	p
VE (g)	0,59 ± 0,02	0,61 ± 0,04	0,178
VD (g)	0,17 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,837
VE/PC (g/kg)	2,02 ± 0,11	2,04 ± 0,14	0,787
VD/PC (g/kg)	0,59 ± 0,08	0,58 ± 0,06	0,843
Teor água AE (%)	0,80 ± 0,04	0,74 ± 0,09	0,087
Teor água VE (%)	0,76 (0,71-0,79)	0,68 (0,39-0,75)	0,268
Teor água VD (%)	0,76 (0,75-0,76)	0,76 (0,75-0,76)	0,480
Teor água pulmão (%)	0,79 ± 0,05	0,78 ± 0,02	0,639
Teor água fígado (%)	0,68 ± 0,01	0,67 ± 0,02	0,245
ASM (μm^2)	239 ± 15,4	232 ± 19,5	0,424
IC (%)	1,50 ± 0,66	1,88 ± 0,86	0,302

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; PC: peso corpóreo; AE: átrio esquerdo; ASM: área seccional do miócito; IC: índice de colágeno. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal).

Tabela 6 - Distribuição das isoformas das cadeias pesadas da miosina

	Grupo F (n=5)	Grupo T (n=5)	p
Isoforma β (%)	55,3 \pm 9,53	61,6 \pm 7,39	0,276
β/α	1,32 \pm 0,50	1,70 \pm 0,63	0,326

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; Isoforma β : porcentagem da isoforma β da cadeia pesada da miosina; β/α : relação entre a isoforma β e a isoforma α . Os dados são expressos em média \pm desvio padrão (para distribuição normal).

Tabela 7 - Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias

	Grupo F (n=5)	Grupo T (n=5)	p
TNF- α (pg/mg)	162 (80-246)	174 (138-183)	1,00
IFN- γ (pg/mg)	146 (84-197)	159 (137-160)	1,00

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; TNF- α : fator de necrose tumoral-alfa; IFN- γ : interferon-gama. Os dados são expressos em mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não normal).

Tabela 8 - Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco

	Grupo F (n=9)	Grupo T (n=9)	p
CS (nmol/mg proteína)	157 ± 16	147 ± 22	0,291
β-OH (nmol/mg proteína)	169 ± 42	153 ± 49	0,482
LDH (nmol/mg proteína)	204 ± 14	232 ± 12	<0,001

Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; CS: citrato sintase; β-OH: beta hidroxil acil coenzima A desidrogenase; LDH: lactato desidrogenase. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal).

Tabela 9 - Quantificação das proteínas do trânsito de cálcio

	Grupo F (n=5)	Grupo T (n=5)	p
Serca-2a	1,00 ± 0,13	1,02 ± 0,21	0,822
PLB	1,00 ± 0,13	0,82 ± 0,06	0,026
PPLB Ser16	1,00 ± 0,14	0,63 ± 0,10	0,003
PPLB Ser16/PLB	1,01 ± 0,17	0,77 ± 0,11	0,050

Os dados são apresentados em unidades arbitrárias. Grupo F: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo T: animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina; Serca-2a: enzima dependente Ca^{2+} -ATPase; PLB: fosfolambam; PPLB Ser 16: fosfolambam fosforilada. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição normal).

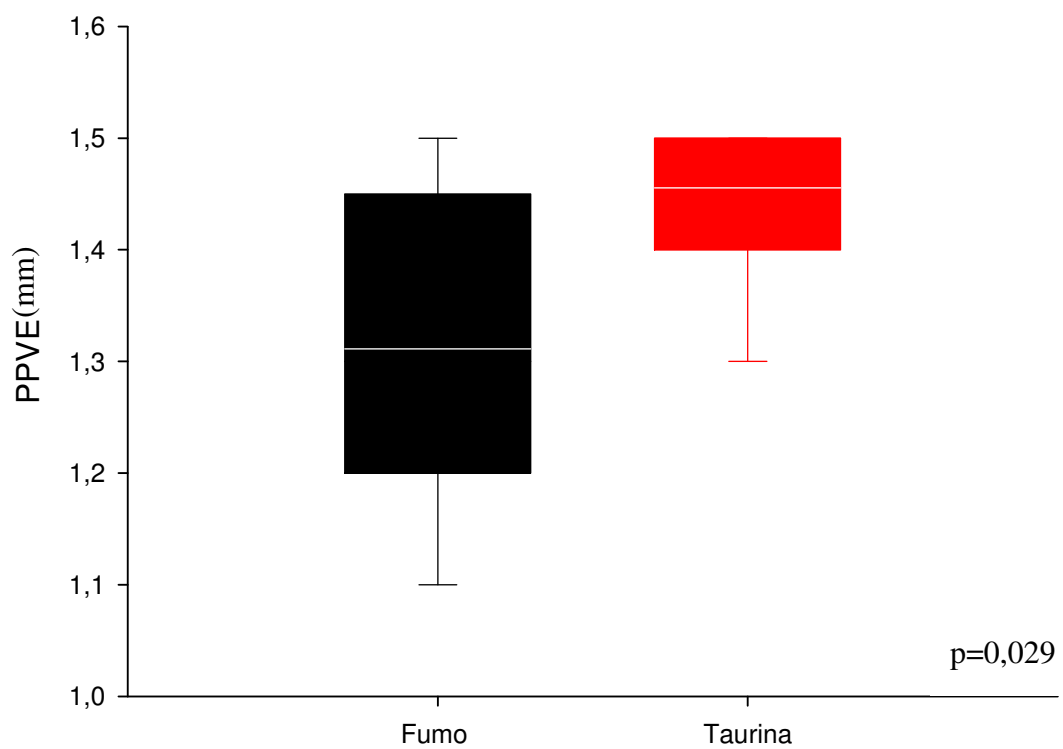


Figura 1 - Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, dos grupos fumo e taurina

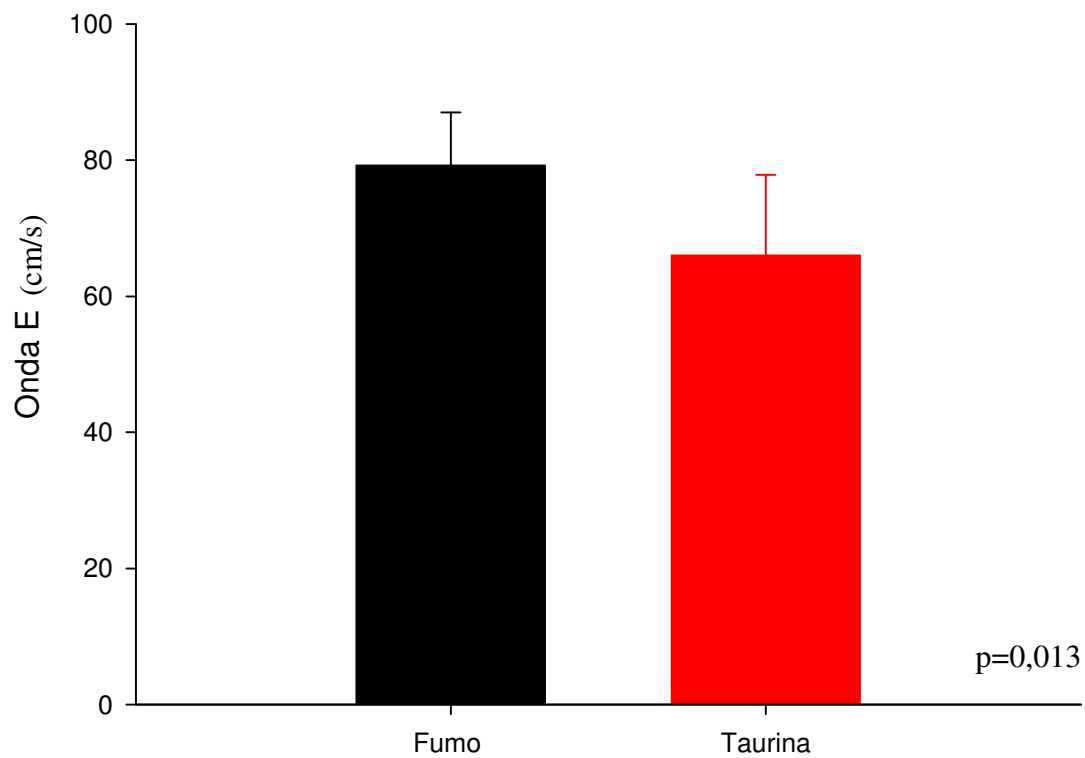


Figura 2 - Onda E do fluxo transmitral dos grupos fumo e taurina

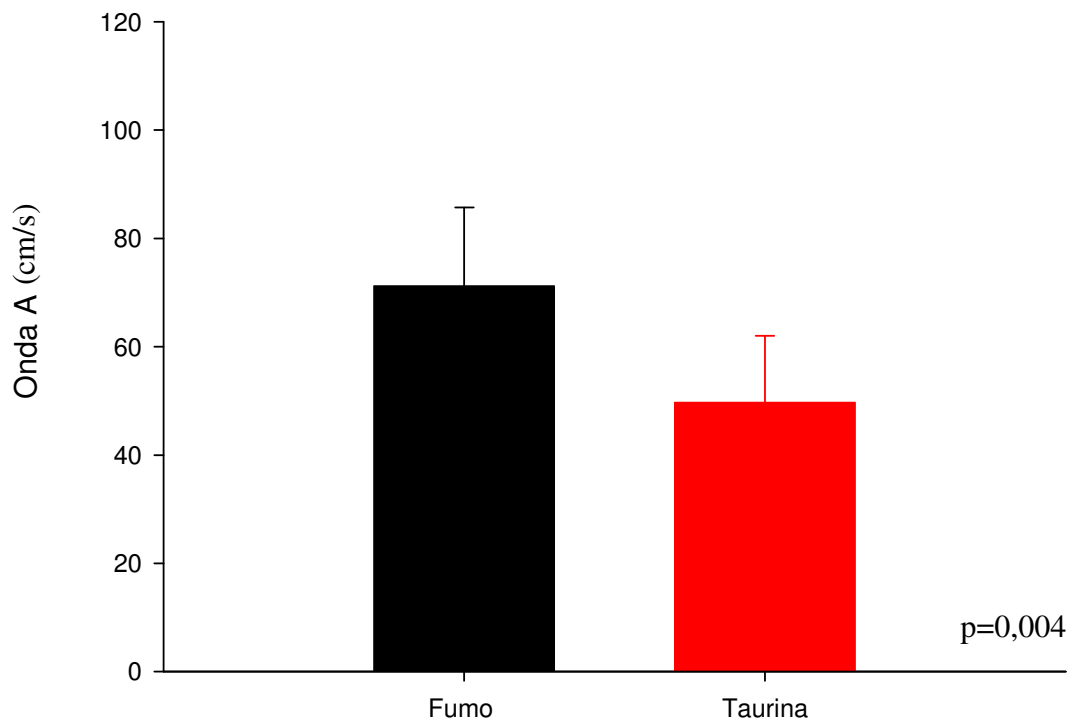


Figura 3 - Onda A do fluxo transmitral dos grupos fumo e taurina

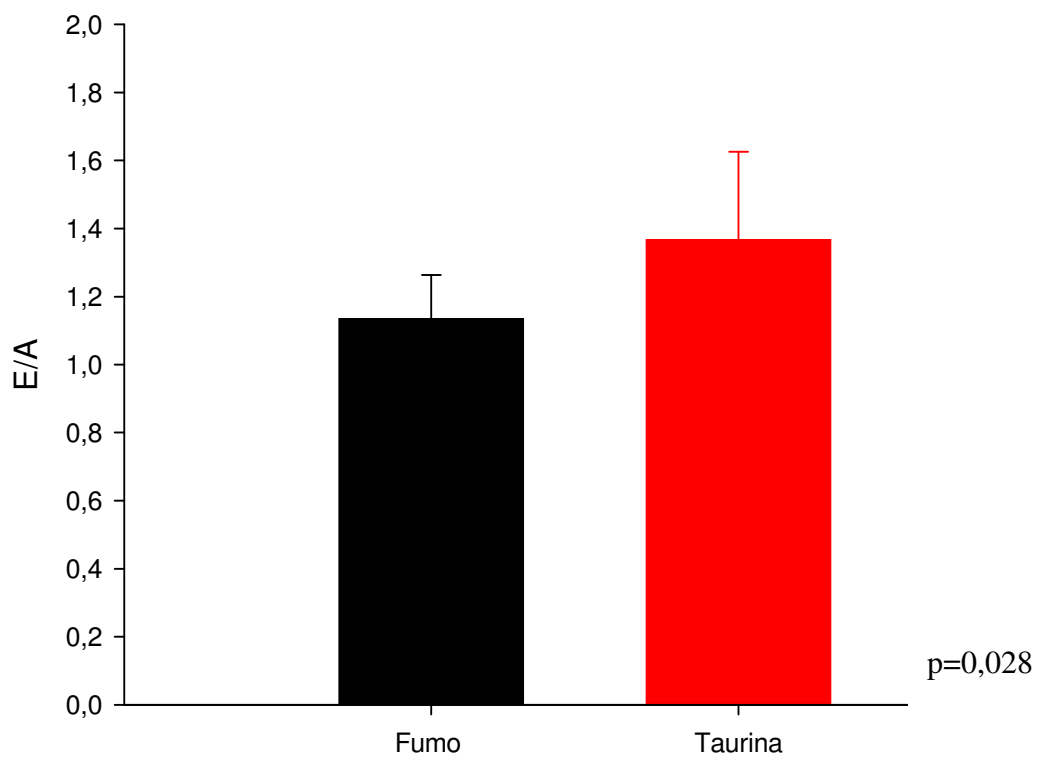


Figura 4 - Relação onda E/onda A do fluxo transmitral nos grupos fumo e taurina

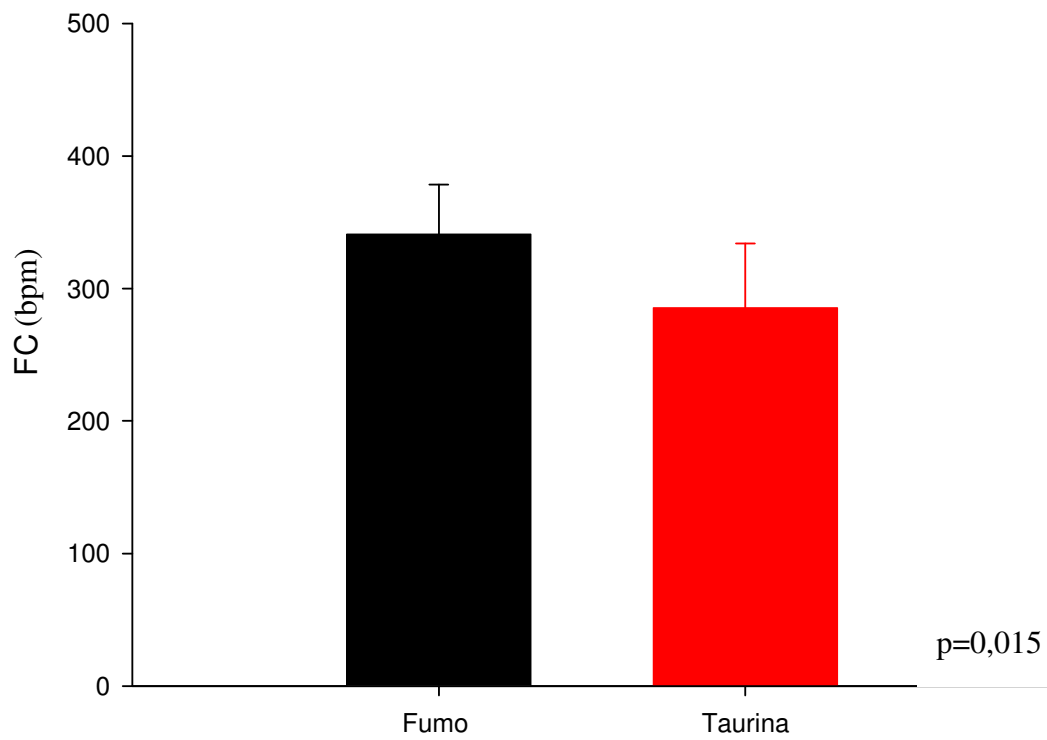


Figura 5 - Freqüência cardíaca nos grupos fumo e taurina

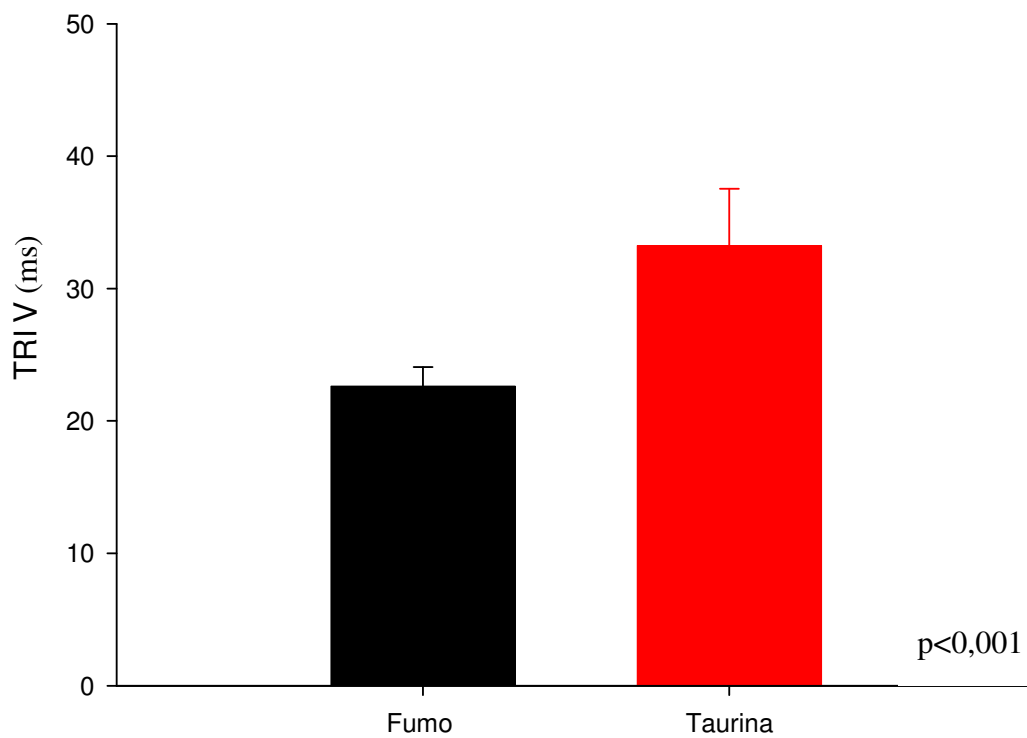


Figura 6 - Tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo nos grupos fumo e taurina

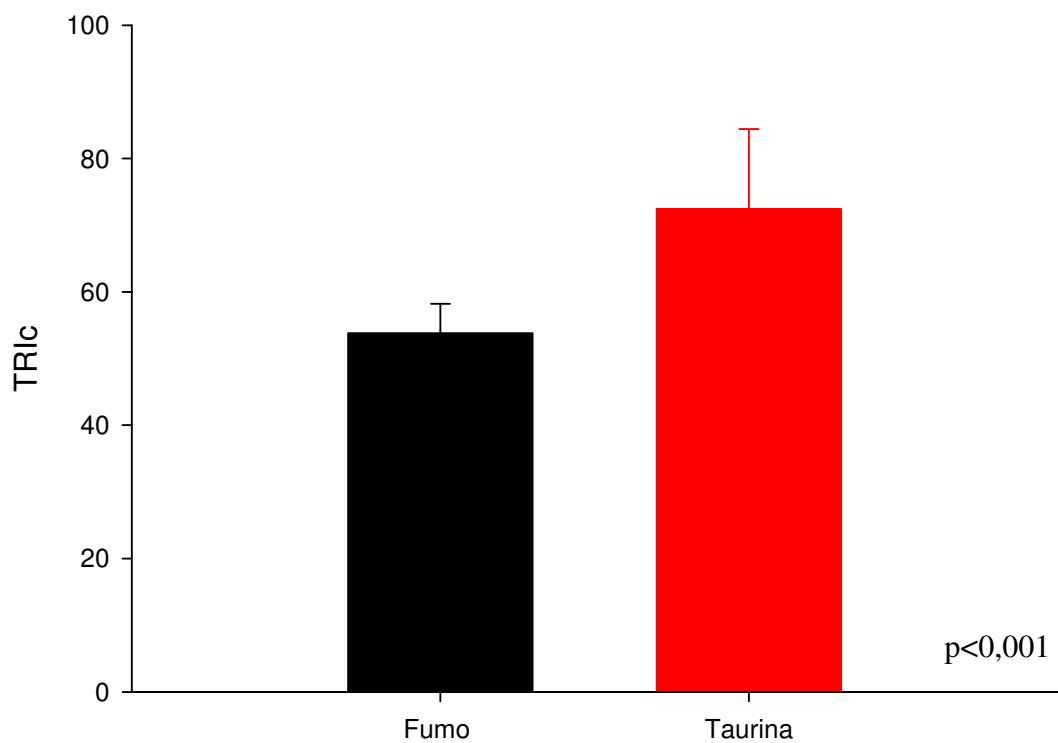


Figura 7 - Tempo de relaxamento isovolumétrico do ventrículo esquerdo ajustado pela frequência cardíaca dos grupos fumo e taurina

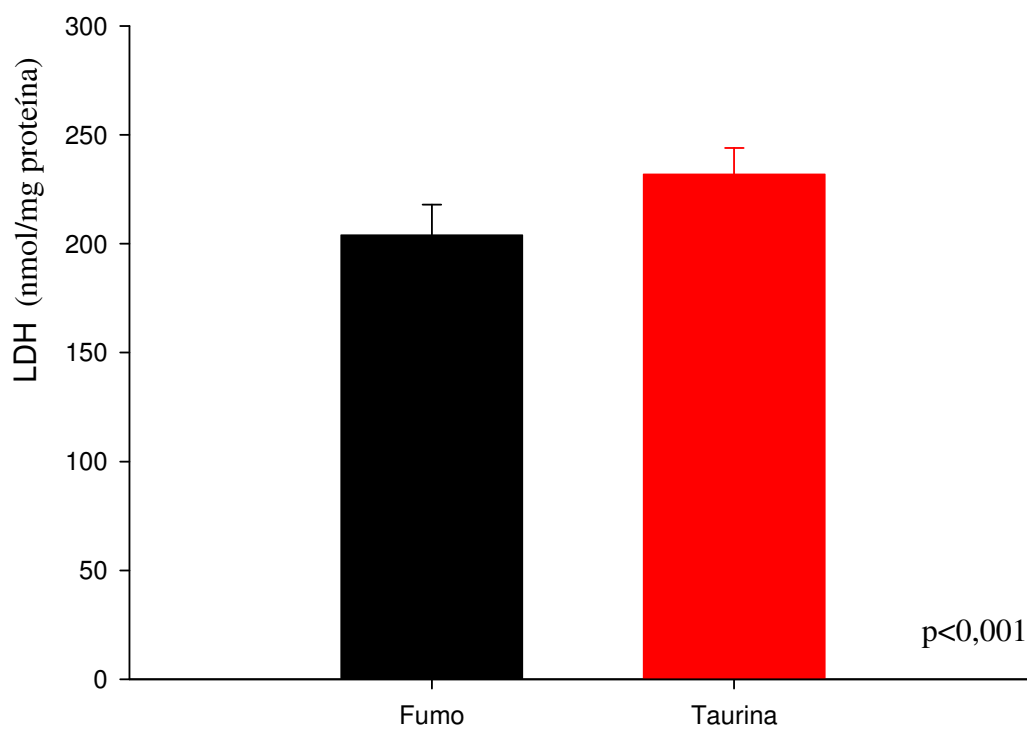


Figura 8 - Atividade da enzima do metabolismo energético cardíaco, lactato desidrogenase (LDH), dos grupos fumo e taurina

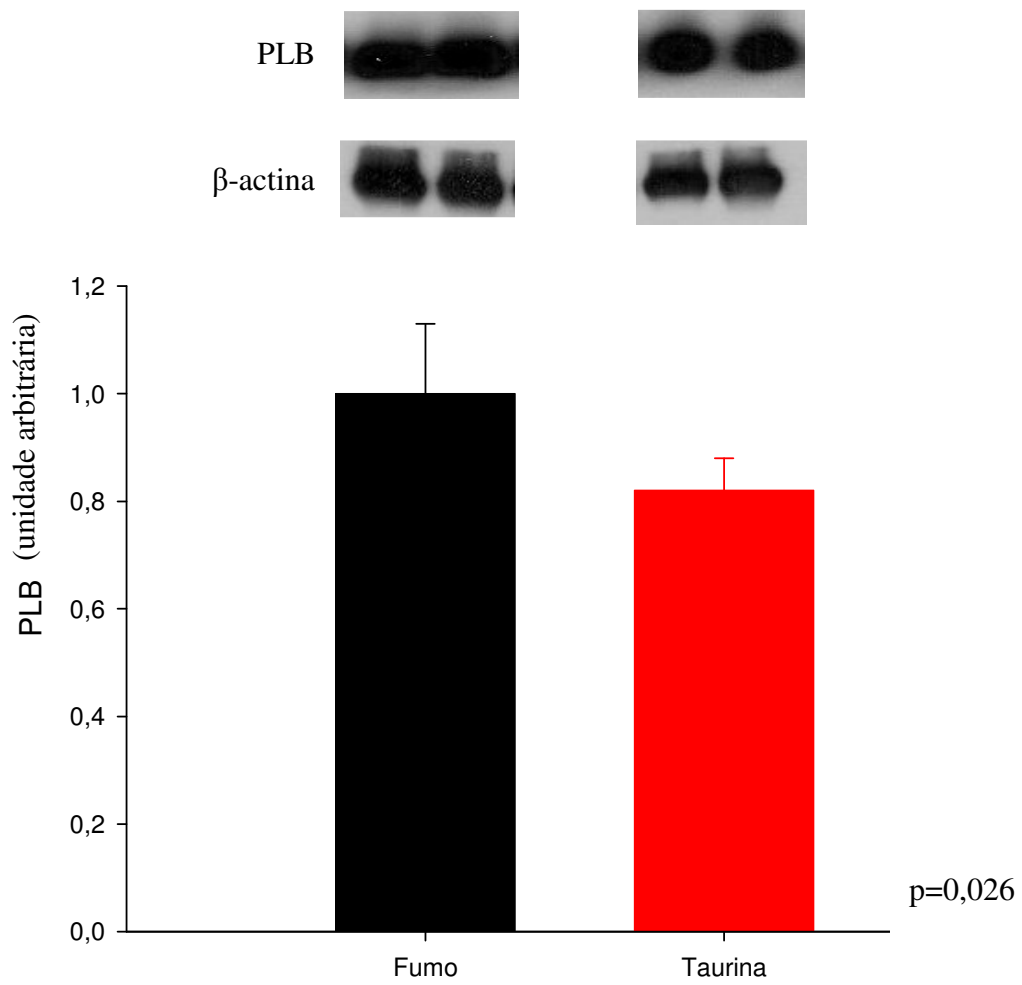


Figura 9 - Quantificação da proteína do trânsito de cálcio, fosfolambam (PLB), dos grupos fumo e taurina

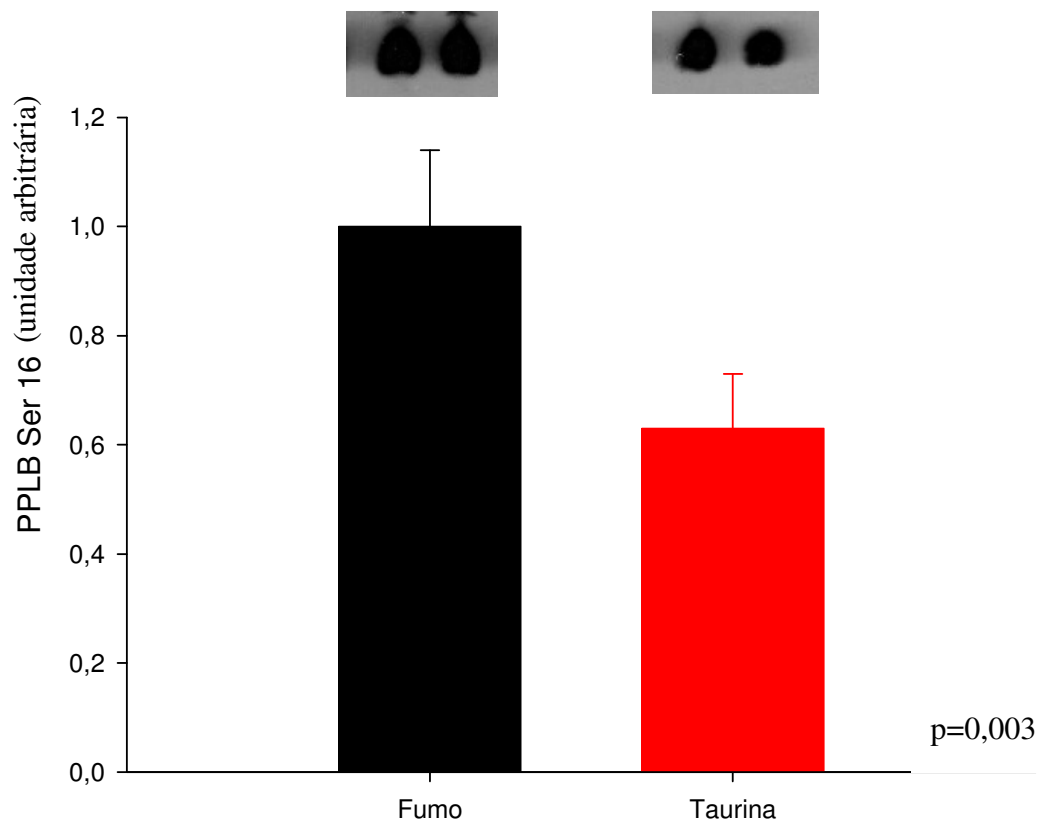


Figura 10 - Quantificação da proteína do trânsito de cálcio, fosfolambam fosforilada (PPLB Ser 16), dos grupos fumo e taurina

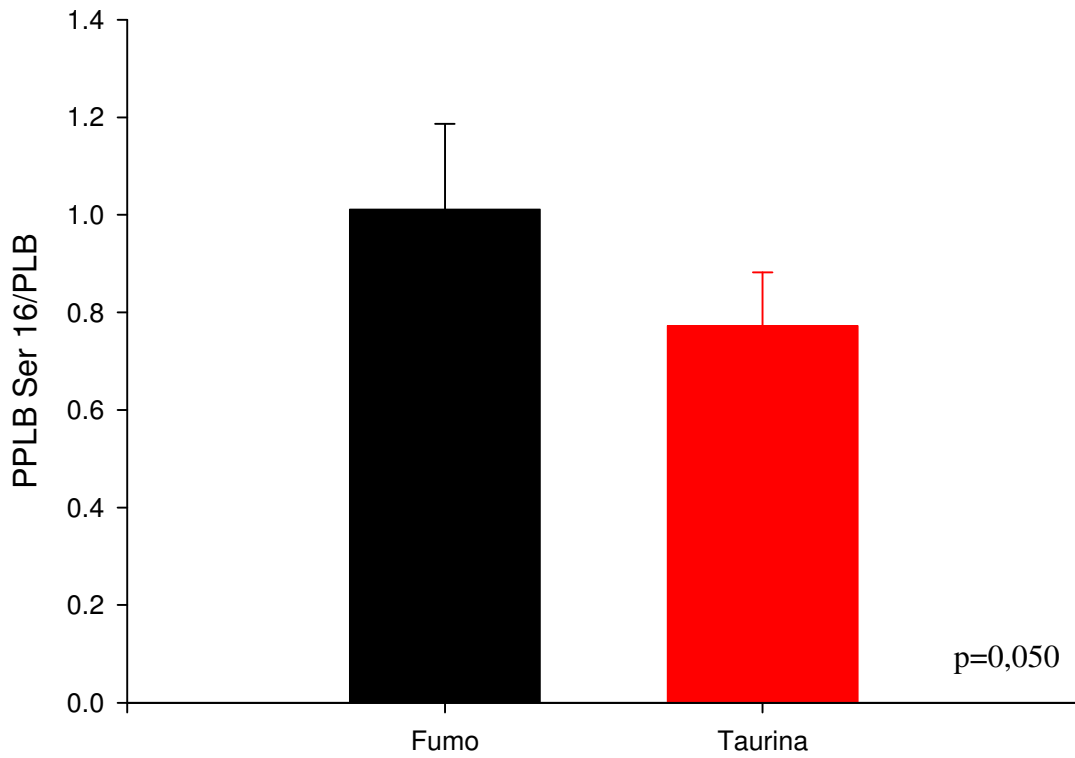


Figura 11 – Relação fosforilação da fosfolambam (PPLB Ser 16) / quantidade de fosfolambam total (PLB) nos grupos fumo e taurina

Discussão

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da taurina no processo de remodelação cardíaca em ratos expostos à fumaça do cigarro. Nossos dados indicam que a administração de taurina resultou em piora da função diastólica. Desse modo, contrariamente à nossa hipótese, podemos concluir que a taurina não atenua o dano cardíaco induzido pela exposição à fumaça do cigarro.

Recentemente, diversos estudos têm evidenciado que a exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em alterações cardíacas, caracterizadas por hipertrofia celular, aumento da cavidade do ventrículo esquerdo, acompanhados por diminuição dos índices de função sistólica e diastólica. No entanto, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda estão sendo esclarecidos.

Ao reagir à determinada agressão, o coração sofre alterações no tamanho, geometria, forma, composição e função, o que caracteriza o processo de remodelação cardíaca. Fator marcante da remodelação é que esse processo resulta, invariavelmente, em queda progressiva da função ventricular. Inicialmente, em consequência do crescimento celular, a remodelação pode contribuir para manter ou restaurar a função cardíaca. Cronicamente, entretanto, ocorrem alterações bioquímicas, genéticas e estruturais que vão resultar em disfunção ventricular progressiva⁽²⁰⁾.

Entre os diversos fatores que, potencialmente, podem desempenhar papel fisiopatológico na progressão da disfunção ventricular no coração remodelado destacam-se⁽²¹⁾.

- *Trânsito de cálcio*: o trânsito de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é um processo ativo, complexo, que envolve a participação de vários componentes. Por exemplo, sistemas de membrana e intracelulares de cálcio (canais tipo-L, rianodina, calsequestrina) regulam a quantidade de cálcio ofertado às proteínas contráteis durante o processo de contração. Da mesma forma, a ativação da calmodulina quinase e a fosforilação da fosfolambam estimulam

enzimas, entre elas a SR-Ca⁺⁺-ATPase ou SERCA-2, responsáveis pela maior captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, promovendo melhora do relaxamento. O fosfolambam, quando desfosforilado, inibe a atividade da SERCA-2 diminuindo sua afinidade pelo cálcio. Mediante a estimulação das vias adrenérgicas, a proteína quinase-A (PKA) fosforila o fosfolambam, no resíduo da serina 16, e a calmodulina quinase no resíduo da treonina 17. Quando fosforilado, o fosfolambam deixa de inibir a SERCA-2. Em situações de remodelação e disfunção ventricular, existem evidências de diversas alterações no trânsito de cálcio, como modificações dos canais-L, receptores de rianodina, diminuição da atividade da calsequestrina e calmodulina quinase, redução na fosforilação da fosfolambam e redução na atividade da SERCA-2 ⁽⁴⁷⁾.

- *Alterações das proteínas contráteis:* o processo de remodelação ventricular caracteriza-se por alterações na miosina, a principal proteína contrátil composta de um par de cadeias pesadas (α e β) e dois pares de cadeia leve. Dependendo da composição das cadeias, podemos identificar três isoenzimas (V1, V2, V3) no miocárdio de diferentes espécies. Essas isoenzimas possuem os mesmos pares de cadeias leves, variando apenas em relação à composição das cadeias pesadas ($\alpha\alpha$ nas V1, $\alpha\beta$ nas V2 e $\beta\beta$ nas V3). A capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativos localizados nas cadeias pesadas, e a fração α possui maior capacidade ATPásica. Portanto, a composição das isoenzimas determina a capacidade contrátil do miócito. Durante a remodelação, além de haver predomínio da forma fetal das cadeias leves da miosina, usualmente ocorre aumento da isoforma V3, acompanhado de diminuição da isoforma V1 ⁽⁴⁸⁾. Em concordância com esse conceito, estudo prévio de nosso laboratório mostrou que animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram maior porcentagem da isoforma β quando comparados com animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril, acompanhados por maior grau de remodelação e disfunção cardíaca ⁽⁴⁹⁾.

- *Fibrose*: os miócitos representam apenas 30% do número total de células miocárdicas. Circundando e interligando todas essas estruturas há uma complexa e organizada rede de colágeno. As fibras de colágeno encontradas no interstício são predominantemente dos tipos I e III (95% do colágeno total). As principais funções dessa rede são: regular a apoptose, resistir a deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força, durante o encurtamento da fibra cardíaca. O tecido colágeno, portanto, é um importante modulador tanto da função cardíaca diastólica quanto da função sistólica. Já está bem documentado que há acúmulo de colágeno (fibrose) em diversas situações patológicas, como no infarto agudo do miocárdio. Nessas condições, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular ⁽⁵⁰⁾.

- *Alterações das metaloproteases*: usualmente, as fibras colágenas são firmemente justapostas, com fortes ligações químicas e resistentes à degradação causada pela maioria das proteases. Algumas enzimas, entretanto, têm atividade colagenolítica, entre as quais se destacam as metaloproteases. Essas enzimas encontram-se em formas inativas (proenzima latente), podendo ser ativadas por uma série de estímulos: mecânicos, isquêmicos, angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucina 1, entre outros. A quebra da rede de colágeno interfibrilar pode ter inúmeras conseqüências, tanto na arquitetura quanto na função ventricular ⁽²¹⁾. Por exemplo, em ratos com infarto agudo do miocárdio, o aumento da atividade das metaloproteases foi acompanhado de dilatação ventricular progressiva ^(51,52). No entanto, aspecto a ser considerado refere-se ao fato de que as metaloproteases parecem não participar das alterações cardíacas induzidas pelo tabagismo ⁽⁴³⁾.

- *Déficit energético*: outro fator potencialmente responsável pela alteração da função cardíaca no coração remodelado é o déficit energético. Em condições normais, os ácidos graxos livres (AGL) são o principal substrato energético do coração, com participação variando de 60% a 90%. Por meio de processo de β -oxidação, metabólitos dos AGL participam da produção de

ATP nos transportadores de elétrons na mitocôndria. Após a produção, a energia produzida é estocada e transportada na forma de fosfocreatina. Já foram identificadas diversas alterações no metabolismo energético na remodelação, que se manifestam com diminuição da produção de energia: diminuição na utilização dos AGL e aumento da utilização de glicose como substrato energético, diminuição da β -oxidação e alterações funcionais mitocondriais. Essas alterações estão associadas à diminuição dos níveis de fosfocreatina que, como dito anteriormente, representa a forma na qual o ATP é estocado^(54,55). Como consequência, todas as proteínas miocárdicas com capacidade ATPásica, como as da cadeia pesada da miosina e as responsáveis pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, podem apresentar déficits em suas funções, com deterioração tanto da função cardíaca sistólica quanto diastólica⁽⁵⁶⁾.

- *Citocinas inflamatórias*: em diversos modelos de agressão cardíaca, a produção de citocinas inflamatórias pode modular o processo de remodelação. Nesse sentido, níveis aumentados de IFN- γ e, principalmente de TNF- α , estão associados com disfunção ventricular esquerda, caquexia cardíaca, ativação de programas genéticos fetais, hipertrofia, apoptose e fibrose⁽⁵⁷⁾.

- *Hipertrofia e alterações geométricas*: um dos principais mecanismos pelos quais o miócito se adapta a um determinado estímulo é o processo de hipertrofia. Usualmente, o padrão existente nas fases avançadas de disfunção ventricular é do tipo excêntrico. Atualmente, é aceito que mudanças geométricas poderiam mudar as condições de carga a que o coração é submetido e comprometer a função global do coração^(58,59).

Pelo exposto, existem diferentes mecanismos fisiopatológicos envolvidos na deterioração da função cardíaca secundária a diferentes agressões. Um aspecto importante é que a exposição à fumaça do cigarro pode levar à ativação de alguns desses fatores fisiopatológicos envolvidos no processo de remodelação ventricular.

O tabagismo constitui grande risco para a saúde, pois pode induzir alterações vasculares e cardíacas. Classicamente, as consequências vasculares do tabagismo são as mais

valorizadas. Assim, se aceita que o hábito de fumar seja importante fator de risco para doenças ateroscleróticas, tais como o acidente vascular encefálico e a doença vascular periférica ⁽⁶⁰⁾. No entanto, embora os efeitos vasculares da exposição à fumaça do cigarro estejam bem esclarecidos, os efeitos do tabagismo no coração ainda estão sendo explorados.

Diversos estudos experimentais mostraram que a exposição ao fumo levou à alteração de variáveis morfológicas e funcionais cardíacas, representadas por aumento do átrio esquerdo e da cavidade ventricular, hipertrofia miocárdica, bem como redução nos índices de ejeção do ventrículo esquerdo, como porcentagem de encurtamento, fração de variação da área e fração de ejeção ^(34,61).

Os mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de remodelação induzido pelo tabagismo não estão completamente esclarecidos. No entanto, potenciais moduladores dessas alterações vêm sendo estudados nos últimos anos e incluem ativação neuro-humoral, estresse oxidativo e ativação de quinases ativadas por mitógenos (MAPK) ⁽⁶¹⁾.

Em relação às alterações hemodinâmicas induzidas pela exposição à fumaça do cigarro, verificou-se que o tabagismo está associado com elevação da pressão arterial, acompanhado por ativação de fatores neuro-humorais, como endotelina-1 e vasopressina ⁽⁶²⁾. Adicionalmente, trabalho anterior de nosso laboratório identificou que o tabagismo resulta em hipertrofia cardíaca de padrão excêntrico, sugestivo de sobrecarga volumétrica no modelo do rato ⁽⁴⁹⁾. Finalmente, o uso de propranolol e lisinopril atenuou a remodelação induzida pelo fumo, sugerindo que os sistemas simpático e renina-angiotensina participam das alterações cardíacas induzidas pela exposição à fumaça do cigarro ^(15,49).

Outro fator fisiopatológico envolvido nas alterações induzidas pelo fumo é o estresse oxidativo. Já está bem estabelecido que o estresse oxidativo desempenha importante papel no processo de remodelação cardíaca após diferentes tipos de agressão. O estresse oxidativo resulta em alterações na matriz extracelular, nas proteínas contráteis, causa hipertrofia do

miócito, e pode levar à morte do miócito por necrose ou apoptose. Para avaliar o papel do estresse oxidativo na remodelação cardíaca induzida pelo cigarro, foi realizado estudo com ratos fumantes que foram suplementados com betacaroteno, um potente antioxidante. Os animais expostos à fumaça do cigarro apresentaram alterações ultraestruturais avaliados por microscopia eletrônica, tais como desorganização ou ausência de miofilamentos, invaginações da membrana plasmática, dilatação do retículo sarcoplasmático, além de mitocôndrias polimórficas e dilatadas, associadas à diminuição de suas cristas. Tais alterações foram atenuadas pela suplementação de betacaroteno ⁽⁶³⁾. Assim, os dados sugerem a participação do estresse oxidativo no processo de remodelação induzida pelo tabagismo.

Recentemente, Gu e colaboradores mostraram que a remodelação ventricular induzida pela exposição ao fumo esteve associada à ativação de ERK1/2, quinase p38 e JNK ⁽⁶¹⁾. Portanto, esses dados sugerem a participação das MAPK nas alterações cardíacas induzidas pelo tabagismo.

O conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no processo de remodelação é prioritário, pois o bloqueio dos moduladores propicia a possibilidade de prevenção ou atenuação das consequências morfológicas e funcionais cardíacas. Assim, inúmeras estratégias vêm sendo estudadas para prevenir ou atenuar o processo de remodelação ventricular secundária a diferentes modelos de agressão. Dentre essas estratégias, destaca-se a taurina.

A taurina é o aminoácido livre mais abundante no músculo cardíaco. Possui grupo amino no carbono beta (β) e apresenta o grupo sulfônico (SO_3H) em substituição ao grupo carboxila (COOH) ^(64,65). Considerando seu metabolismo, a taurina não é um aminoácido essencial para os humanos, pois é sintetizada a partir da metionina e cisteína. O fígado e o cérebro são os principais locais de sua síntese, destacando-se o fígado como maior órgão produtor e liberador de taurina no sangue, de onde é captada por outros tecidos ⁽²²⁾.

A principal via de biossíntese da taurina inclui a oxidação de cisteína para ácido cisteína sulfínico, com subsequente descarboxilação para hipotaurina e que, por fim, é oxidada à taurina. Cistationina sintase, cistationase e ácido cisteínossulfínico descarboxilase (CSAD) são as três principais enzimas envolvidas nesse metabolismo, e cada uma requer a vitamina B6 como cofator. Sendo assim, a deficiência de vitamina B6 devido à sua baixa ingestão, assim como a presença de drogas antagonistas ou qualquer alteração em seu metabolismo, levam à redução da síntese endógena de taurina. Além disso, a atividade da enzima CSAD também é influenciada por outros fatores como sexo e idade ⁽²⁶⁾.

Existem dois mecanismos de transporte que controlam o movimento da taurina através da membrana do intestino delgado: o transportador TauT e o sistema PAT1. O transportador TauT é Na⁺ e Cl⁻ dependente e é eficiente na captura de taurina em condições de baixas concentrações desse aminoácido na luz intestinal. Esta situação ocorre em dietas pobres em taurina e, também, no período entre refeições. Já o transportador PAT1, é H⁺ e pH dependente e apresenta eficiência na captura da taurina em presença de sua alta concentração intestinal. Em casos de baixa disponibilidade desse aminoácido, seu *pool* será controlado através de reabsorção renal ^(22,66).

O transporte de taurina para todos os tecidos é modulado pela ativação de duas enzimas sensíveis ao cálcio: proteína kinase C (a qual inibe o transporte) e calmodulina (a qual estimula o transporte) ⁽²²⁾. Sabe-se que o pH ótimo para a absorção da taurina é de 7,8 e temperatura é de 37°C. O acúmulo de taurina ocorre contra gradiente de concentração sódio e cloro-dependente. Por outro lado, a presença de β-aminoácidos, como a β-alanina pode competir com a taurina pelo seu receptor, resultando em deficiência de taurina ⁽⁶⁷⁾.

Considerando a excreção de taurina, esta acontece através da urina e bile, sendo que o total diário excretado varia de indivíduo para indivíduo, e em uma mesma pessoa podem

ocorrer variações diárias. Além disso, é também influenciada por fatores genéticos, idade, sexo, dieta habitual, função renal e condições clínicas ⁽²⁶⁾.

Boas fontes alimentares de taurina englobam o leite materno e produtos de origem animal, principalmente peixes, frutos do mar e, em menor quantidade, ovos, carne branca e vermelha. Os níveis de taurina não sofrem alterações durante a cocção ^(68,69).

Diversos estudos experimentais têm sugerido que a redução dos níveis de taurina resulta em importantes ações cardiovasculares. Assim, no modelo com gatos, a manipulação dietética resultou em diminuição dos níveis de taurina em 13 vezes. Como resultado, os animais desenvolveram alterações características de cardiomiopatia ⁽⁷⁰⁾. O mesmo fenômeno foi observado em cães ⁽⁷¹⁾. No modelo do rato, a indução farmacológica da depleção de taurina levou a alterações eletrocardiográficas, de contratilidade no músculo papilar e desordens dos filamentos contrácteis e a perdas miofibrilares na ultraestrutura ^(72,73,74).

Outra linha de evidência sugestiva da relevância da taurina é que sua suplementação diminuiu os efeitos deletérios em diferentes situações de agressão. Assim, na isquemia cardíaca ou sobrecarga de cálcio em ratos, a administração de taurina atenuou as alterações causadas pelos dois modelos de injúria cardíaca ⁽²⁸⁾. Em modelos experimentais de ratos com regurgitação aórtica, em que a taurina foi suplementada oralmente, notou-se significativa redução do comprometimento miocárdico, além de aumento da sobrevivência nos animais tratados ⁽⁷⁵⁾. Em outro estudo, ratos albinos foram divididos em dois grupos, sendo um recebendo 100mg/kg de taurina e outro com placebo após procedimento cirúrgico produzindo regurgitação aórtica. Os resultados mostraram que aqueles animais com placebo apresentaram 52% de mortalidade, contra 11% daqueles tratados com taurina ⁽⁷⁶⁾. Observou-se também em dois estudos nos quais ratos foram tratados com 20mM de taurina que esse aminoácido preveniu algumas das ações maléficas causadas pela angiotensina II ^(77,78). Finalmente, o

índice de mortalidade de ratos com insuficiência cardíaca foi significativamente reduzido naqueles que mantiveram uma dieta contendo 100mg/kg de taurina ⁽⁷⁶⁾.

Em seres humanos, semelhante ao que ocorre em animais, também existem evidências de que a taurina possa ser importante modulador da função e morfologia cardíaca. Em estudo realizado durante cirurgia com pacientes que apresentavam insuficiência cardíaca foi realizada uma biópsia que evidenciou significativa redução de nutrientes, inclusive taurina, confirmando sua deficiência em cardiomiopatias ⁽⁷⁹⁾. Foi observado, em portadores de quadro clínico de insuficiência cardíaca, que os pacientes que mantinham dose oral diária de 4g de taurina melhoraram significativamente os sintomas de congestão, em relação aos pacientes com ingesta mais baixa ⁽⁸⁰⁾. Outro estudo mostrou que a ingestão oral, em dose de 1g três vezes ao dia, foi bem tolerado e melhorou tanto o estado hemodinâmico como a capacidade funcional do coração ⁽²⁵⁾. Em estudo realizado por Eby e Halcomb, foram avaliados três pacientes em diferentes faixas etárias, que sofriam de freqüentes contrações prematuras atriais e ventriculares. Esses pacientes receberam diferentes doses de taurina e L-arginina. Os resultados obtidos mostram que o paciente que recebeu 20g de taurina por dia apresentou redução das contrações prematuras em 50%. O paciente em uso contínuo de 10g de taurina por dia apresentou remissão completa da ocorrência dessas contrações. Já o indivíduo que ingeriu 4g de taurina, três vezes ao dia, apresentou redução de seu quadro de arritmia cardíaca em 95% a 100% ⁽⁶⁹⁾.

Portanto, as evidências acumuladas até o momento permitem a suposição de que a taurina possa ser benéfica em diferentes situações de agressão cardíaca. Existem quatro mecanismos propostos para explicar os efeitos benéficos da taurina no processo de remodelação cardíaca e na insuficiência cardíaca ⁽²⁷⁾.

Em primeiro lugar, é aceito que a taurina possa desempenhar papel semelhante aos diuréticos, por promover a excreção de sódio e água. Esse efeito natriurético é atribuído à sua

atividade de osmorregulação renal, além de modulação da secreção do fator natriurético atrial e regulação da liberação de vasopressina. Esses efeitos foram sugeridos pelo fato de que a excreção de taurina resulta em uma menor reabsorção de Na^+ e Cl^- pelo epitélio renal ⁽²⁷⁾.

Em segundo lugar, a taurina é importante modulador de diversos íons relevantes para o funcionamento normal da célula cardíaca, principalmente o sódio e o cálcio. A insuficiência cardíaca leva a aumento do cálcio intracelular e mitocondrial, resultando em queda da produção de energia miocárdica e aumento do estresse oxidativo. Por outro lado, a taurina é um aminoácido que exerce papel tanto na regulação do cálcio intracelular quanto na atuação como antioxidante, modulando os efeitos dos radicais livres produzidos na mitocôndria. Por meio da interação com os canais de cálcio e das trocas iônicas no retículo sarcoplasmático e sarcolema, a taurina exerce ação para aumentar ou diminuir os níveis de cálcio, mantendo, assim, sua homeostase. Do mesmo modo, a taurina modula os níveis de cálcio e sódio através da bomba trocadora de sódio-cálcio localizada no sarcolema e da bomba trocadora taurina-sódio. Além disso, sabe-se que a taurina controla arritmias cardíacas através da regulação dos níveis de potássio, cálcio e sódio no sangue e tecidos, e por regular a atividade dos nervos do sistema simpático e a liberação de epinefrina ⁽²⁷⁾.

O terceiro potencial mecanismo das ações cardiovasculares da taurina refere-se ao fato de que ela protege as membranas lipossômicas contra danos causados por radicais livres. O estresse oxidativo é um dos principais moduladores do processo de remodelação cardíaca. Entre outros mecanismos fisiopatológicos, uma das principais conseqüências do estresse oxidativo é a lipoperoxidação. Logo, o estresse oxidativo pode ser um indutor de danos celulares que alteram variáveis funcionais e estruturais cardíacas, participando da fisiopatologia da insuficiência cardíaca secundária a vários estímulos. A ação antioxidante da taurina seria por meio da eliminação desses componentes e por reforçar tanto as membranas dos miócitos como as terminações nervosas simpáticas do coração ⁽²⁷⁾. Como exemplo, de

acordo com Eby e Halcomb, o avançar da idade poderia levar à redução ou interrupção da síntese hepática de taurina. Esse fato resultaria em estresse oxidativo, comprometendo a produção de energia cardíaca, digestiva e cerebral, ocasionando morte prematura ⁽⁶⁹⁾.

Finalmente, a taurina parece ser um antagonista da angiotensina II. Aceita-se, atualmente, que a angiotensina II pode afetar a função cardíaca por regular a pressão arterial e o tônus vascular aumentando a retenção de sódio e água, estimulando a biossíntese protéica pelos miócitos, promovendo remodelação ventricular e fibrose cardíaca. Devido às ações da taurina estarem relacionadas à melhora da função cardíaca, como reduzindo o sódio e fluidos, melhorando a contratilidade cardíaca e antagonizando as ações da angiotensina II, esse aminoácido acaba por exercer o mesmo papel que os inibidores de ECA (enzima conversora de angiotensina). Como a angiotensina II pode levar ao desenvolvimento de hipertrofia do cardiomiócito através da estimulação do DNA e da síntese de proteínas, a taurina acaba sendo benéfica por exercer um papel contrário a esses efeitos ⁽²⁷⁾.

Outro fator importante que implica na hipertrofia dos miócitos através da angiotensina II refere-se à alteração da homeostase do cálcio. A angiotensina II é responsável por elevar o influxo de cálcio nos cardiomiócitos através da ativação do canal de cálcio tipo-L. Contudo, apesar do influxo de cálcio ser estimulado pela angiotensina II, o seu efluxo via bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ é ainda maior, causando uma perda de cálcio da célula. Sabe-se então que a taurina atua como um antagonista, pois interfere na habilidade da angiotensina II em estimular os canais de cálcio tipo-L. Sendo assim, esse aminoácido exerce um efeito positivo inotrópico em corações hemodinamicamente instáveis por promover melhora da função contrátil. Além disso, a taurina possivelmente influencia as ações tróficas da angiotensina II por modular a fosforilação de proteínas, o volume celular e o status dos receptores celulares sensíveis ao estiramento, localizados na membrana celular ⁽⁸¹⁾.

Considerando que: 1) trabalhos anteriores sugerem que o tabagismo pode induzir sobrecarga de volume, estresse oxidativo e ativação do sistema renina-angiotensina; 2) os mecanismos propostos para a proteção cardiovascular da taurina englobam a atividade de osmorregulação, a modulação de íons como o sódio e o cálcio, a atividade antioxidante e antagonização das ações da angiotensina II; 3) a taurina parece ser benéfica em outros modelos de agressão cardíaca; testamos a hipótese de que a suplementação com taurina poderia ser benéfica no modelo de agressão cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro.

Em nosso trabalho, os estudos ecocardiográficos e morfométricos foram realizados com o intuito de avaliar se houve melhora dos parâmetros morfológicos cardíacos nos animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina, quando comparados aos animais apenas expostos ao fumo. Dentre as variáveis ecocardiográficas morfológicas, as quais foram representadas pelo diâmetro do átrio esquerdo e da aorta, diâmetro sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo, apenas esta última variável apresentou diferença estatística entre os dois grupos. Quanto ao estudo morfométrico, nenhuma variável (peso do ventrículo esquerdo e direito, teor de água, área seccional do miócito e índice de colágeno) foi estatisticamente significativa quando comparamos os dois grupos. Portanto, contrariamente à nossa hipótese, a taurina não influenciou as alterações morfológicas induzidas pelo tabagismo.

Com o objetivo de analisar os efeitos da taurina na função cardíaca, variáveis funcionais também foram exploradas em nosso trabalho.

Em relação à análise da função sistólica, as variáveis avaliadas pelo ecocardiograma englobaram: porcentagem de encurtamento, fração de ejeção, índice cardíaco, débito cardíaco, volume sistólico, velocidade máxima na aorta e integral tempo velocidade. Aspecto relevante a ser considerado é que estudos prévios mostraram, de forma consistente, que o tabagismo

compromete a função sistólica. No entanto, diferentemente do esperado, a taurina não interferiu com as variáveis da função sistólica.

Em relação à análise da função diastólica, as variáveis utilizadas foram a velocidade da onda E e da onda A, relação E/A, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado pela frequência cardíaca. Todas essas variáveis apresentaram diferença significativa quando os dois grupos foram comparados. O grupo taurina apresentou diminuição da velocidade da onda E e da onda A. Em contrapartida, a taurina resultou em aumento da relação E/A, tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de relaxamento normalizado pela frequência cardíaca. Assim, os dados são compatíveis com piora da diástole induzida pela taurina.

Devemos considerar, no entanto, que a frequência cardíaca foi diferente entre os grupos, sendo que a quantidade de batimentos cardíacos por minuto no grupo taurina foi menor do que no grupo controle. É importante lembrar que a frequência cardíaca pode interferir nas variáveis de função diastólica. Contudo, quando normalizamos o índice diastólico pela frequência cardíaca, como o tempo de relaxamento isovolumétrico, os grupos mantiveram significância estatística entre eles. Portanto, nossos resultados evidenciaram que a taurina levou à piora da função diastólica em animais expostos à fumaça do cigarro.

Nosso trabalho também avaliou alguns dos principais mecanismos fisiopatológicos envolvidos na remodelação cardíaca.

Como colocado anteriormente, alterações tanto na distribuição das isoformas das cadeias pesadas da miosina como na produção de citocinas pró-inflamatórias podem modular a remodelação cardíaca. Em nosso trabalho, a taurina não interferiu com essas variáveis. Importante ressaltar, no entanto, que a ausência de alterações dessas variáveis está em concordância com a ausência de alterações na morfologia e na função sistólica em consequência da suplementação de taurina.

Em relação à avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco, a suplementação com taurina resultou em maior atividade da lactato desidrogenase quando comparado com o grupo somente exposto ao fumo. Devemos considerar que o aumento da glicólise anaeróbica é uma característica patológica do coração frente a diversas agressões. Assim, esse resultado poderia ter duas implicações. Em primeiro lugar, poderíamos inferir que o coração de animais fumantes e suplementados com taurina tem redução na produção de energia, pois a diminuição na utilização dos ácidos graxos livres e o aumento na utilização de glicose como substrato energético se acompanha por déficit energético. Adicionalmente, esse achado poderia contribuir para a piora da função diastólica, já que a retirada de cálcio das proteínas contráteis é processo extremamente dependente de energia.

Outra variável analisada em nosso estudo foram proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio. Como citado anteriormente, em situações de agressão existem diversas alterações nas proteínas do trânsito de cálcio. Estas alterações foram evidentes em nosso trabalho, pois os animais expostos à fumaça do cigarro e suplementados com taurina apresentaram menor quantidade de fosfolambam e menor fosforilação da fosfolambam, assim como desproporção da relação fosforilação da fosfolambam e quantidade de fosfolambam total, quando comparados aos animais fumantes. Assim, a redução da fosforilação da fosfolambam pode ter influenciado negativamente a atividade da SERCA-2, prejudicando a captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e, conseqüentemente, promovendo piora do relaxamento.

Outro aspecto a ser considerado em nosso trabalho é a ausência de grupos controle. Em primeiro lugar, trabalho anterior de nosso laboratório mostrou que a taurina não tem qualquer efeito em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas em ratos normais, avaliadas por ecocardiograma. Adicionalmente, os efeitos da exposição à fumaça do cigarro em variáveis morfológicas e funcionais cardíacas são consistentes e estão bem documentados.

Assim, frente aos nossos resultados, acreditamos que a adição de grupo controle e controle suplementado com taurina não acrescentaria informações relevantes ao nosso estudo.

Pelo exposto, podemos concluir que a disfunção diastólica presente nos animais expostos ao fumo e suplementados com taurina pode ser resultado de alteração do metabolismo energético cardíaco, com diminuição da produção de energia e de alterações nas proteínas reguladoras do trânsito de cálcio, mais precisamente por redução da fosforilação da fosfolambam.

Conclusão

Em conclusão, nosso trabalho evidenciou que a suplementação de taurina em ratos expostos à fumaça do cigarro não alterou a morfologia cardíaca, mas resultou em deterioração da função diastólica ventricular. Assim, nossos achados sugerem que a taurina não resulta em benefícios em relação ao processo de remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro em ratos.

Referências Bibliográficas

1. Cunha GH, Jorge ARC, Fonteles MMF, Sousa FCF, Viana GSB, Vasconcelos SMM. Nicotina e tabagismo. REPM. 2007; 1: 1-10.
2. World Health Organization. WHO report on the global tobacco epidemic, 2008: The MPOWER package. Geneva: World Health Organization; 2008.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa nacional por amostra de domicílios 2008 – tabagismo. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2009.
4. Instituto Nacional do Câncer - INCA. Tabagismo um grave problema de saúde pública. Rio de Janeiro: All Type Assessoria Editorial LTDA; 2007.
5. Stolerman IP, Jarvis MJ. The scientific case that nicotine is addictive. *Psychopharmacology*. 1995; 117: 2-10.
6. Smith CJ, Fisher TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2001; 158: 257-67.
7. Trap-Jansen J. Effects of smoking on the heart and peripheral circulation. *Am Heart J*. 1988; 115: 263-7.
8. Issa JS, Francisco YA. Obesidade e doenças cardíacas: aspectos epidemiológicos e preventivos. *RSCESP*. 1996; 6: 558-63.
9. Araújo AAN, Rassi RH, Labbadia EM. Tabagismo e doenças cardiovasculares. In: Porto CC. *Doenças do coração, prevenção e tratamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.133-41.
10. Benowitz NL. Pharmacology of nicotine: addiction and therapeutics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1996; 36: 597-613.
11. Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, et al. Chronic cigarette smoke exposure results in cardiac remodeling and impaired ventricular function in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2005; 84: 320-4.

12. Zornoff LAM, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS, Camapanha AO, et al. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 276-82.
13. Zornoff LAM, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Efeitos do betacaroteno e do tabagismo sobre a remodelação cardíaca pós-infarto do miocárdio. *Arq Bras Cardiol.* 2007; 89: 151-7.
14. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit.* 2008; 14: BR62-6.
15. Duarte DR, Oliveira LC, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Efeitos da administração de beta-bloqueador na remodelação ventricular induzida pelo tabagismo em ratos. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 92: 479-83.
16. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* 1985; 57: 84-95.
17. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 35: 569-82.
18. Zornoff LAM, Spadaro J. Remodelação ventricular após infarto agudo do miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol.* 1997; 68: 453-60.
19. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo.* 2000; 1: 8-16.
20. Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadaro J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol de São Paulo.* 2002; 12: 371-8.

21. Zornoff, LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol.* 2009; 9: 157-64.
22. Sole MJ, Jeejeebhoy KN. Conditioned nutritional requirements and the pathogenesis and treatment of myocardial failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2000; 3: 417-24.
23. Allard ML, Jeejeebhoy KN, Sole MJ. The management of conditioned nutritional requirements in heart failure. *Heart Fail Rev.* 2006; 11: 75-82.
24. Birdsall TB. Therapeutic applications of taurine. *Altern Med Rev.* 1998; 3: 128-36.
25. Schuller-Levis G, Park E. Taurine: new implications for an old amino acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 226: 195-202.
26. Lourenço R, Camilo ME. Taurine: a conditionally essential amino acid in humans? An overview in health and disease. *Nutr Hosp.* 2002;17: 262-70.
27. Denipote FG, Paiva SAR, Zornoff LAM. Influência da taurina na remodelação cardíaca. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr.* 2009; 34: 211-23.
28. Kramer JH, Chovan JP, Schaffer SW. The effect of taurine on calcium paradox and ischemic heart failure. *Am J Physiol.* 1981; 240: H238-46.
29. Abe M, Shibata K, Matsuda T, Furukawa T. Inhibition of hypertension and salt intake by oral taurine treatment in hypertensive rats. *Hypertension.* 1987; 10: 383-9.
30. Harada N, Ninomiya C, Osako Y, Morishima M, Mawatari K, Takahashi A, et al. Taurine alters respiratory gas exchange and nutrient metabolism in type 2 diabetic rats. *Obes Res.* 2004; 12: 1077-84.
31. Colivicchi MA, Raimondi L, Bianchi L, Tipton KF, Pirisino R, Della Corte L. Taurine prevents streptozotocin impairment of hormone-stimulated glucose uptake in rat adipocytes. *Eur J Pharmacol.* 2004; 497: 209-15.

32. Simani AS, Inoue S, Hoggs JC. Penetration of the respiratory epithelium of guinea pigs following exposure to cigarette smoke. *Lab Invest.* 1974; 31: 75-81.
33. Wang X-D, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russel RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given b-carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 60-6.
34. Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol.* 2003; 18: 225-228.
35. Sahn DJ, DeMaria A, Kisslo J, Weyman AE. The Committee on M-Mode Standardization of the American Society of Echocardiography, Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation.* 1978; 58: 1072-83.
36. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, Bjornerheim R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* 2000; 89: 1445-54.
37. Spadaro J, Fishbein MC, Hare C, Pfeffer MA, Maroko PR. Characterization of myocardial infarcts in the rat. *Arch Pathol Lab Med.* 1980; 104: 179-83.
38. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol.* 2000; 279: 1534-9.
39. Doering CV, Jalil JE, Janicki JS, Pick R, Aghili S, Abrahams C, et al. Collagen network remodeling and diastolic stiffness on the rat left ventricle with pressure overload hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 22: 686-95.
40. Vescovo G, Ceconi C, Bernocchi P, Ferrari R, Carraro U, Ambrosio GB, et al. Skeletal muscle myosin heavy chain expression in rats with monocrotaline-induced

- cardiac hypertrophy and failure. Relation to blood flow and degree of muscle atrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 39: 233-41.
41. Talmadge RJ, Roy RJ. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol.* 1993; 75: 2337-40.
42. Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level enzymatic organization. *Eur J Biochem.* 1969; 11: 198-206.
43. Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition.* 2004; 20: 230-34.
44. Novelli ELB. *Nutrição e vida saudável: estresse oxidativo e metabolismo energético.* Ribeirão Preto: Tecmedd; 2005.
45. 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.
46. Relling DP, Esberg LB, Frang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens.* 2006; 24: 549-61.
47. Hasenfuus G, Meyer M, Schillinger W, Preus M, Pieske B, Just H. Calcium handling proteins in the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 1997; 92: 87-93.
48. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* 1999; 79: 215-62.
49. Duarte DR. *Influência do inibidor da enzima conversora da angiotensina na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro [tese].* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2009.

50. Weber KT, Sun Y, Guntaka RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dial Cardiovasc Med.* 1999; 4: 3-19.
51. Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res.* 1996; 816-21.
52. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* 2002; 90: 520-30.
53. Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. Tobacco smoke-induced left ventricular remodeling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *Eur J Heart Fail.* 2007; 9: 1081-5.
54. Neubauer SN. The failing heart – an engine out of fuel. *N Engl J Med.* 2007; 356: 1140-51;
55. Ashrafian H, Frenneaux MP, Opie LH. Metabolic mechanisms in heart failure. *Circulation.* 2007; 116: 434-48.
56. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.* 2001; 110: S37-46.
57. Mann DL. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J Card Fail.* 2002; 8: S379-84.
58. Anand IS. Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction. *J Card Fail.* 2002; 8: S401-8.
59. Peron AP, Saraiva RM, Antonio EL, Tucci PJ. Mechanical functions is normal in remanent myocardium during the healing period of myocardial infarction-despite congestive heart failure. *Arq Bras Cardiol.* 2006; 86: 105-12.
60. Ockene IS, Miller NH. Cigarette smoking, cardiovascular disease, and stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association.

- American Heart Association Task Force on Risk Reduction. *Circulation*. 1997; 96: 3243-7.
61. Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SAK, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodelling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *Eur J Heart Fail*. 2008; 10: 1057-64.
62. Ambrose JA, Barua RS. The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol*. 2004; 43: 1731-7.
63. Zornoff LAM, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Carvalho RF, et al. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicol Sci*. 2006; 90: 259-66.
64. Hayes KC, Sturman JA. Taurine in metabolism. *Ann Rev Nutr*. 1981; 1: 401-25.
65. Redmond HP, Stapleton PP, Neary P, Bouchier-Hayes DJ. Immunonutrition: the role of taurine. *Nutrition*. 1998; 14: 599-604.
66. Anderson CMH, Howard A, Walters JRF, Ganapathy V, Thwaites DT. Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁺- and Cl⁻-dependent TauT (SLC6A6). *J Physiol*. 2009; 4: 731-44.
67. Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney W. The taurine transporter: mechanisms of regulation. *Acta Physiol*. 2006; 187: 61-73.
68. Hansen SH. The role of taurine in diabetes and the development of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001; 17: 330-46.
69. Eby G, Halcomb WW. Elimination of cardiac arrhythmias using oral taurine with L-arginine with case histories: Hypothesis for nitric oxide stabilization of the sinus node. *Med Hypotheses*. 2006; 67: 1200-4.

70. Pion PD, Kittleson MD, Rogers QR, Morris JG. Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy. *Science*. 1987; 237: 764-8.
71. Fascetti AL, Reed JR, Rogers QR, Backus RC. Taurine deficiency in dogs with dilated cardiomyopathy: 12 cases. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 223: 1137-41.
72. Lake N, Roode MD, Nattel S. Effects of taurine depletion on rat cardiac electrophysiology: in vivo and in vitro studies. *Life Sci*. 1987; 40: 997-1005.
73. Lake N, Splawinski J, Juneau C, Rouleau JL. Effects of taurine depletion on intrinsic contractility of rat ventricular muscles. *Can J Physiol Pharmacol*. 1990; 68: 800-6.
74. Lake N. Loss of cardiac myofibrils: mechanism of contractile deficits induced by taurine deficiency. *Am J Physiol*. 1993; 264: H1323-26.
75. Takihara K, Azuma J, Awata N. Beneficial effect of taurine in rabbits with chronic congestive heart failure. *Am Heart J*. 1986; 112: 1278-84.
76. Azuma J, Takihara K, Awata N, Ohta H, Sawamura A, Harade H, et al. Beneficial effect of taurine on congestive heart failure induced by chronic aortic regurgitation in rabbits. *Res Commun Chem Pathol Pharm*. 1984; 45: 261-70.
77. Takihashi K, Azuma M, Taira K, Baba A, Yamamoto I, Schaffer SW, et al. Effect of taurine on angiotensin II-induced hypertrophy on neonatal rat cardiac cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997; 30: 725-30.
78. Rao MR, Tao L. Effects of taurine on signal transduction steps induced during hypertrophy of rat heart myocytes. In: Schaffer S, Lombardini JB, Huxtable RJ, editors. *Advances in experimental medicine and biology. Taurine 3: Cellular and regulatory mechanisms*. New York: Plenum Press; 1998. v. 442, p. 137-43.
79. Jeejeebhoy F, Keith M, Freeman M, Barr A, McCall M, Kurian R, et al. Nutritional supplementation with My-oVive repletes essential cardiac myocyte nutrients and

- reduces left ventricular size in patients with left ventricular dysfunction. *Am Heart J.* 2005; 143: 1092-100.
80. Azuma J, Sawamura A, Awata N, Hasegawa H, Ogura K, Harada H, et al. Double-blind randomized crossover trial of taurine in congestive heart failure. *Curr Ther Res.* 1983; 34: 543-57.
81. Schaffer SW, Lombardini JB, Azuma J. Interaction between the actions of taurine and angiotensin II. *Amino Acids.* 2000; 18: 305-18.