

EDSON CASTARDELI

**Efeito da exposição à fumaça de
cigarro no processo de remodelação
ventricular em ratos**

BOTUCATU-SP
2004

EDSON CASTARDELI

**Efeito da exposição à fumaça de
cigarro no processo de remodelação
ventricular em ratos**

**Dissertação apresentada
ao Curso de Pós-
Graduação "Fisiopatologia
em Clínica Médica" da
Faculdade de Medicina de
Botucatu para obtenção do
título de Mestre. Área de
Concentração: Cardiologia.**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO
FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Castardeli, Edson.

Efeito da exposição à fumaça de cigarro no processo de remodelação
ventricular em ratos / Edson Castardeli. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Assunto CAPES: 40101100

1. Coração - Doenças - Estudos experimentais

CDD 616.12

Palavras-chave: Dilatação ventricular; Função cardíaca; Hipertrofia;
Tabagismo

Ao Professor, que mesmo não tendo um contato profissional prévio comigo, aceitou o desafio de orientar-me, sendo eu de uma área diferente, o que tornou o desafio ainda maior. Por sua confiança e apoio:

Muito Obrigado.

Ao Professor, que teve paciência suficiente desde meu começo, como aluno especial, acompanhando os meus passos até a fase final desta dissertação. Por sua colaboração, confiança e apoio:

Muito Obrigado.

Este trabalho é dedicado a toda minha família, em especial, a Carmen
Fernandes Castardeli: minha Mãe (*in memoriam*).

À grande família, que é a UNESP – Botucatu.

Aos Professores, que desempenharam um papel de suma importância no transcorrer desse trabalho, pois, só assim, foi possível concluí-lo. Pela dedicação, apoio e principalmente pelo prazer de trabalhamos juntos:

Muito Obrigado.

- Professor Emérito Álvaro Oscar Campana
- Professora Adjunta Beatriz Bojikian Matsubara
- Professora Doutora Beatriz Funayama Alvarenga Freire
- Professor Adjunto Luis Shiguero Matsubara

Nossos agradecimentos, de forma especial, às seguintes pessoas, pelo auxílio prestado na realização deste trabalho:

- Alessandro Bruno
- Angela Isabel Mussi Petrício
- Aparecida Yooko Outa Angeleli
- Camila Renata Corrêa
- Corina Julieta Corrêa
- Elenize Jamas
- Guilherme Moraes Fábio
- José Carlos Georgette
- Luzia Ferrari Gouveia
- Mário Augusto Dallaqua
- Mário Batista Bruno
- Marta Regina Russo Sarki
- Sandra Ângela Fábio
- Sueli Aparecida Clara
- Vitor Marcos de Souza

Resumo

O efeito da exposição à fumaça de cigarro (EFC) tem sido extensivamente estudado; entretanto, os efeitos diretos cardíacos à fumaça de cigarro despertam menos atenção. O objetivo deste estudo foi determinar se a exposição à fumaça de cigarro durante oito semanas está associada com depressão da função cardíaca e alteração morfométrica ventricular em ratos. Material e método – Ratos Wistar adultos foram alocados em dois grupos: controle (**C**, $n=10$) e grupo fumante (**F**, $n=8$) que foi exposto à fumaça de cigarro. Todos os animais foram pesados e tiveram mensurado na cauda a pressão arterial sistólica (PAS). A função cardíaca foi estudada pelo método do coração isolado contraindo isovolumetricamente. Resultados – Não houve diferença significativa no peso do corpo (PC) entre os grupos. Foram observados valores significantes maiores para ventrículo esquerdo (VE) ajustado para o PC ($p=0,019$), ventrículo direito (VD) ajustado para o PC ($p=0,016$) e para PAS nos ratos EFC em comparação com o grupo **C** (118 ± 15 vs 103 ± 16 mmHg, $p=0,045$). Houve um decréscimo significativo na pressão sistólica do VE, diminuição no índice máximo de pressão VE (dp/dt) e decréscimo no índice máximo de decréscimo de pressão no VE ($-dp/dt$) no grupo **F** quando comparado com o grupo controle. Como conclusão, nosso estudo indica que a exposição de ratos à fumaça de cigarro por um período de dois meses resultou em remodelação miocárdica com diminuição da capacidade da função ventricular.

SUMMARY

The vascular effects of exposure to smoke of cigarettes have been extensively studied; however, the cardiac effects of tobacco smoke deserved less attention. The aim of this study was to determine if exposure to smoke of cigarettes during eight weeks is associated with depression of cardiac function and alteration of the ventricular morphology in rats. Material and Methods - Adult Wistar rats were allocated into two groups: control (**C**, $n=10$) and exposed to tobacco smoke (**S**, $n=8$). All animals were weighed and had the tail cuff systolic arterial pressure (SAP) measured. The cardiac function was studied by isolated isovolumetrically beating heart method. Results - There was no significant difference in body weight (BW) between groups. Significantly higher values were found for left ventricular (LV) weight/BW ratio ($P=0.019$), right ventricular (RV) weight/BW ratio ($P=0.016$) and for SAP in **S** in comparison with **C** group (118 ± 15 vs 103 ± 16 mmHg, $p=0,045$). Tobacco smoke induced a significant decrease in LV systolic pressure, maximal rate of rise of LV pressure (dp/dt) and maximal rate of decrease of LV pressure (-dp/dt) when compared to the control group. In conclusion, our study indicates that exposure of rats to tobacco smoking for a period of two months resulted in myocardial remodeling with impairment of the ventricular function.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Remodelação Cardíaca	2
1.1.1. Morte Celular	3
1.1.2. Alterações das Proteínas Contráteis	3
1.1.3. Fibrose	4
1.1.4. Alterações das Metaloproteases	4
1.1.5. Alterações da Via Beta-Adrenérgica e Transporte de Cálcio..	5
1.1.6. Citoesqueleto	6
1.1.7. Déficit Energético	6
1.1.8. Hipertrofia e Alterações Geométricas	7
1.2. Fumo	8
1.2.1. Fumo e Vaso/Endotélio.....	9
1.2.2. Fumo e Coração.....	11
2. OBJETIVO GERAL	15
3. OBJETIVO ESPECÍFICO	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Grupos Experimentais.....	16
4.2. Exposição ao Fumo.....	17
4.3. Peso Corporal dos Animais.....	17
4.4. Hemogasimetria	18
4.5. Estudo Funcional	18
4.5.1. Pressão Sistólica Caudal	18

4.5.2. Estudo da Função Ventricular.....	19
4.6. Estudo Morfométrico do Coração	22
4.6.1. Percentual de Água	22
4.6.3. Variáveis Estruturais Estudadas	23
4.7. Análise Estatística	23
4.8. Figuras	24
5. RESULTADOS	25
6. DISCUSSÃO	41
6.1. Discussão dos Métodos	41
6.1.1. Dieta	41
6.1.2. Evolução do Peso Corporal	41
6.1.3. Estresse	42
6.1.4. Hemogasimetria	42
6.1.5. Método do Coração Isolado	43
6.2. Discussão do Estudo	45
7. CONCLUSÕES	52
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Lista de Abreviaturas e siglas

+dp/dt = Primeira derivada temporal da pressão ventricular

-dp/dt = Primeira derivada temporal negativa da pressão ventricular

ATP = Adenosina Trifosfato

C = Grupo Controle

COHb = Carboxiemoglobina

EFC = Exposição à Fumaça de Cigarro

F = Grupo Fumante

HDL = Lipoproteína de Alta Densidade

LDL = Lipoproteína de Baixa Densidade

PAS = Pressão Arterial Sistólica

PC = Peso Corporal

pCO₂ = Pressão Parcial de Dióxido de Carbono

PD = Pressão Diastólica

pO₂ = Pressão Parcial de Oxigênio

PS = Pressão Sistólica

SO₂ = Saturação de Oxigênio

u/s = Índice Úmido/Seco

V0 = Volume Ventricular Correspondente à Pressão Diastólica Nula

VD = Ventrículo Direito

VE = Ventrículo Esquerdo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Remodelação Cardíaca

A remodelação ou remodelagem cardíaca pode ser definida como uma série de variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração, em resposta a uma determinada agressão (Pfeffer et al., 1985; Pfeffer & Braunwald, 1990; Cohn et al., 2000).

Apesar do processo de remodelação ocorrer em situações fisiológicas, como, por exemplo, o desenvolvimento normal do coração até a vida adulta, usualmente esse termo descreve alterações cardíacas patológicas que ocorrem como consequência de diversos 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 β 1, fator de crescimento semelhante à insulina 1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e genéticos (cardiomiopatia hipertrófica e dilatada). O conceito atual é que esses fatores podem, tanto desencadear, como regular a remodelação cardíaca (Cohn et al., 2000).

A consequência do processo de remodelação ventricular é manter a estabilidade da função cardíaca frente a determinada agressão. Entretanto, com a continuidade e/ou com a progressão do processo de remodelação ventricular ocorrem diversas alterações genéticas,

bioquímicas e estruturais que resultam em disfunção ventricular progressiva, e conseqüente aparecimento dos sinais e sintomas de insuficiência cardíaca e morte súbita (Cicogna et al., 2000; Gaudron et al., 2001; Zornoff et al., 2002). Entre os mecanismos propostos para explicar a piora funcional presente em vários modelos de remodelação cardíaca, temos:

1.1.1. Morte Celular

Pode-se identificar dois mecanismos de morte dos miócitos: a necrose e a apoptose. Em diferentes modelos de remodelação, já foram identificados os dois mecanismos de morte celular. Assim, aceita-se que a perda progressiva dos miócitos possa participar da deterioração da função ventricular (Baldi et al., 2002; Bennett, 2002).

1.1.2. Alterações das Proteínas Contráteis

O processo de remodelação ventricular caracteriza-se por alterações da miosina, uma proteína contrátil composta por um par de cadeias pesadas (α e β) e dois pares de cadeias leves. Dependendo da composição das cadeias, podemos identificar três isoenzimas (V1, V2 e 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 composição das isoenzimas determina a capacidade contrátil do miócito, porque a capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativos localizados nas

cadeias pesadas, possuindo a fração α a maior capacidade ATPásica. Durante a remodelação, há um predomínio da isoforma V3. Assim, esse fenômeno poderia justificar a depressão funcional que acompanha a remodelação (Swynghedauw, 1999).

1.1.3. Fibrose

Circundando e interligando todas as estruturas miocárdicas, está uma complexa e organizada rede de colágeno. As principais funções dessa rede são: regular a apoptose, resistir às deformações patológicas, manter o alinhamento das estruturas e regular a distensibilidade cardíaca e a transmissão de força durante o encurtamento da fibra cardíaca. Portanto, o tecido colágeno é um importante modulador, tanto da função cardíaca diastólica, como da função sistólica. Já está bem documentado que há acúmulo de colágeno (fibrose) em diversas situações patológicas, como, no infarto agudo do miocárdio, na cardiopatia hipertensiva e na cardiopatia dilatada. Nessas condições, a fibrose está associada à deterioração da função ventricular (Weber et al., 1999; Weber, 2001; Zannad et al., 2001; Matsubara et al., 2002). Portanto, a fibrose poderia participar da disfunção ventricular observada no coração remodelado.

1.1.4. 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, possuem atividade

colagenolítica, entre as quais se destacam as metaloproteases. Essas enzimas encontram-se em formas inativas (proenzimas latente), podendo ser ativadas por uma série de estímulos, como mecânico, isquêmico, angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral e interleucina 1, entre outros.

A quebra da rede de colágeno interfibrilar, resultante da ativação das metaloproteases, pode levar a inúmeras conseqüências, tanto na arquitetura, como na função ventricular. Esse fato sugere participação importante dessas enzimas na remodelação e na disfunção ventricular secundária a diversos estímulos (Cleutjens, 1996; Iwanaga et al., 2002; Spinale, 2002).

1.1.5. Alterações da Via Beta-Adrenérgica e do Transporte de Cálcio

A via beta-adrenérgica refere-se às interações das catecolaminas com seus receptores, seguido da conversão do estímulo extracelular em resposta intracelular (Barros et al., 1999).

O transporte de cálcio pelo retículo sarcoplasmático é um processo ativo, complexo, que envolve a participação da via beta-adrenérgica, além de outros componentes. Portanto, estímulos inadequados da via beta-adrenérgica podem interferir na captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático, interferindo no relaxamento cardíaco (Hasenfus et al., 1997). Da mesma forma, canais intracelulares de cálcio regulam a

quantidade de cálcio ofertado às proteínas contráteis durante o processo de contração.

Em condições patológicas, em que ocorrem remodelação e disfunção cardíaca, já foram identificadas diversas alterações, tanto na via beta-adrenérgica como na cinética de cálcio. Portanto, a via beta-adrenérgica e o trânsito de cálcio provavelmente desempenham papel relevante na deterioração da função cardíaca no coração remodelado (Okoshi et al., 1999; Swynghedauw, 1999).

1.1.6. Citoesqueleto

O citoesqueleto é formado por diversas proteínas que contribuem para a manutenção da geometria, da integridade estrutural e para a resistência mecânica dos miócitos cardíacos. Além disso, esse componente desempenha importante papel na transmissão de sinais da membrana celular ao núcleo (Hein et al., 2000).

Especula-se que as anormalidades do citoesqueleto também possam desempenhar papel de destaque na deterioração da função cardíaca no coração remodelado (Tagawa et al., 1998).

1.1.7. Déficit Energético

Outro fator responsável pela alteração da função cardíaca é o déficit energético resultante do desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio. Já foram identificadas diversas alterações na remodelação que se manifestam pela diminuição da produção de ATP: alterações funcionais

mitocondriais, decréscimo da razão entre a área de superfície dos capilares e o volume das células miocárdicas, aumento da distância para a difusão de oxigênio entre os capilares e as mitocôndrias, redução do tônus dos vasos, diminuição da reserva coronariana e aumento do consumo de oxigênio. Por consequência, o coração pode apresentar déficit em suas funções com deterioração, tanto da função cardíaca sistólica, como da diastólica (Cicogna et al., 2000).

1.1.8. Hipertrofia e Alterações Geométricas

Um dos principais mecanismos pelos quais os miócitos se adaptam a um determinado estímulo é o processo de hipertrofia, que pode se apresentar de dois tipos:

- O tipo excêntrico, no qual ocorre um aumento desproporcional do raio da câmara cardíaca em relação à espessura da parede.
- O tipo concêntrico, no qual há um aumento da espessura da parede do miocárdio, geralmente com diminuição do raio da cavidade.

Aceita-se que, quanto maior for o raio da câmara, maior será o comprometimento da função ventricular miocárdica, devido provavelmente ao aumento da pós-carga (Norton et al., 2002). Pois, frente à agressão ocorrida no miocárdio, há diminuição no volume sistólico, promovendo, assim, aumento do raio da câmara e conseqüentemente, aumento da pós-carga que por sua vez vai aumentar volume sanguíneo de chegada na câmara, na tentativa de estabilizar o

volume sistólico. Desse modo, o próprio processo de remodelação, pelas mudanças geométricas ocorridas, poderia comprometer a função global do coração (Brower et al., 1996; Matsubara et al., 2002; Zornoff et al., 2002).

Portanto, embora seja amplamente aceito que a remodelação ventricular resulte em deterioração progressiva da função ventricular, os mecanismos responsáveis por esse fenômeno ainda não estão completamente esclarecidos. Pois, todos esses fatores, analisados em conjunto ilustram a complexidade do processo de remodelação miocárdica, com mecanismos subjacentes.

1.2. Fumo

O fumo é composto por cerca de 6.700 substâncias, das quais 4.720 foram bem identificadas (Dube & Green, 1982; Green & Rodgmana, 1996). Estas substâncias têm duas procedências, uma é a folha do fumo e a outra é proveniente da combustão do fumo, que é a sua fumaça.

A fumaça pode ser dividida em duas fases, a fase do vapor, na qual temos monóxido de carbono, dióxido de carbono, sulfeto carbonila, benzeno, tolueno, formaldeído, acrileno, acetona, piridina, 3-metilpiridina, 3-vinilpiridina, cianeto de hidrogeno, amônia, metilamina, dimetilamina, óxidos de nitrogênio, ácido fórmico, ácido acético e cloreto de metil entre outras.

A fase de partículas, que compreende partículas metálicas, nicotina, anabatina, fenol, catecol, hidroquinona, colesterol, γ -butirolacetona,

quinolina, harmana, ácido benzóico, ácido láctico, ácido glicólico e ácido succínico entre outras (Smith & Fisher, 2001).

As composições químicas da folha e fumaça são: alcanos, esteróis, compostos isoprenóides oxigenados, álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, quinonas, nitrilas, compostos de enxofre, ácidos, fenóis, polifenóis, ésteres fenólicos, alcalóides e bases. Como a reação entre esses elementos químicos, por ocasião da combustão, resultando em outras tantas substâncias tóxicas. Encontram-se alguns elementos inorgânicos, tanto na folha, como na fumaça, tais como, alumínio, arsênico, ferro, manganês, níquel, titânio e zinco entre outros. Outras propriedades do fumo e sua fumaça foram observadas, como: radioatividade, radicais livres, íons, alcilação e inibição enzimática. Verificou-se a existência de produtos pirolíticos e alterações térmicas dos constituintes do fumo, como: terpenos, ligninas, entre outros.

O fumo pode conter ainda resíduos químicos da agricultura, como: inseticidas, pesticidas e fungicidas (Stedman, 1968).

1.2.1. Fumo e Vaso/Endotélio

Um dos mais meticolosos estudos anatomopatológicos, que se tornou clássico, efetuado há 25 anos em 1.056 autópsias de indivíduos entre 45 e 75 anos de idade falecidos por causas não cardíacas, constatou que a aterosclerose das coronárias estava presente em mais de quatro vezes nos indivíduos que haviam fumado dois ou mais maços de cigarros diariamente em comparação com os que nunca haviam fumado. O

espessamento fibroso da íntima das coronárias foi encontrado em 22,2% dos primeiros e apenas 0,8% nos segundos. Esse espessamento estava presente também nas arteríolas intramiocárdicas (Auerbach et al., 1976). Outro estudo de coorte populacional, realizado com 10.914 participantes, entre 1987 e 1989, mostrou que indivíduos expostos à fumaça de cigarro, tanto de forma passiva como de forma ativa, apresentavam aumento da espessura da íntima-média da artéria carótida. Pode-se observar que a exposição à fumaça de cigarro está associada à progressão da aterosclerose (Howard et al., 1998).

Os mecanismos responsáveis pela ação aterosclerótica da fumaça de cigarro não estão completamente esclarecidos. As lipoproteínas de alta densidade (HDL) diminuem, o que é prejudicial porque são ricas em apolipoproteínas AI e AII, protetoras da parede do vaso contra a aterosclerose. Ao mesmo tempo, há aumento das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) importante fator de risco para o desenvolvimento da aterosclerose (Craig et al., 1989; Bertolami, 2000; Ridker et al., 2001). Além disso, a exposição à fumaça de cigarro promove aumento na viscosidade sanguínea.

Estudo realizado com 20 japoneses fumantes saudáveis, que permaneceram de seis a dez horas antes do experimento em total abstinência de fumo, analisou os efeitos de um único cigarro. Após cinco e 60 minutos foi observado que as concentrações plasmáticas de nitrato e nitrito (produtos finais estáveis da degradação do óxido nítrico) diminuíram de forma estatisticamente significativa cinco minutos após os

indivíduos terem fumado o cigarro. Do mesmo modo, as concentrações dos antioxidantes analisados no plasma também diminuíram (vitamina C; cisteína; metionina e ácido úrico) (Tsuchiya et al., 2002).

Esse efeito pode, potencialmente, diminuir a defesa do organismo contra o estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem papel importante na patogênese de várias doenças, não somente na disfunção endotelial, mas também, no envolvimento molecular que controla a inflamação. Este estresse resulta do desbalanço da relação oxidante/antioxidante, excesso de oxidantes e/ou depleção de antioxidantes. O estresse oxidativo aumenta a inflamação em fumantes e em pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica, por ativação de fatores de transcrição, *redox* sensíveis, tais como o fator nuclear-[kappa]B e o ativador de proteína-1, que regula genes de mediadores pró-inflamatórios e expressão gênica de antioxidantes (MacNee, 2000).

A exposição à fumaça de cigarro pode lesar a rede arterial, sistematicamente, por diferentes mecanismos, além de resultar em disfunção endotelial e aumento da viscosidade sanguínea.

1.2.2. Fumo e Coração

O coração participa do processo de manutenção das atividades dos diferentes tecidos, bombeando volume de sangue capaz de suprir as necessidades do organismo, em repouso ou durante atividade física. Para desempenhar esse papel, é necessário que suas propriedades primordiais básicas, ejeção e enchimento, regulado pela frequência de batimentos,

pré-carga, pós-carga e processos metabólicos, estejam funcionando adequadamente (Cicogna et al., 2000).

Estudo prospectivo, que se tornou modelo clássico de pesquisa epidemiológica, mostrando a estreita relação do fumo com as cardiopatias, envolveu 34.439 médicos ingleses, observados por 40 anos. Durante esse período, verificou-se que a mortalidade por infarto agudo do miocárdio, por aneurisma da aorta e por vasculopatias em geral foi maior nos indivíduos fumantes (10,8; 7,0; e 15,7 vezes, respectivamente) em comparação com os controles (Doll et al., 1994).

Um dos mais completos documentos sobre o vínculo do fumo com as cardiopatias foi publicado pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos, registrando pesquisas de doze países (Estados Unidos, Finlândia, Holanda, Iugoslávia, Itália, Inglaterra, Suécia, Noruega, Dinamarca, França, Grécia, Israel), com duração de dez ou mais anos. Em síntese, verificou-se que o tabagismo é responsável, em média, por 30% das mortes, resultado de diversas cardiopatias. Apesar das diferenças étnicas, geográficas, hábitos alimentares e condições sociais, todos os estudos confirmaram a íntima relação entre o consumo de tabaco e a morbiletalidade por coronariopatias, infarto do miocárdio, aterosclerose, angina pectoris, acidentes vasculares cerebrais, aneurisma da aorta, e doença vascular periférica. O relatório concluiu que o tabagismo é a mais importante causa de mortalidade por infarto do miocárdio (U.S. Department of Health and Human Service. 1983).

Apesar da relação entre o hábito de fumar e a doença arterial coronariana ser universalmente aceita, pouco se sabe sobre os efeitos morfo-funcionais do tabagismo diretamente sobre o coração.

Muitas substâncias contidas no cigarro estão sendo objeto de estudo, dentre elas, duas substâncias são marcantes agentes moduladores dos processos cardiovasculares: a nicotina e o monóxido de carbono.

As ações da nicotina no coração são variadas e numerosas, já que essa substância afeta o índice cardíaco (estimulado por catecolaminas), a contratilidade e o fluxo coronariano, apesar da maioria dos estudos analisarem o efeito agudo e não crônico da administração de nicotina. Em modelo experimental de músculo papilar isolado de cachorro, a administração aguda de nicotina promoveu aumento da contratilidade (Greenspan et al., 1969). Entretanto, em ratos tratados com nicotina por sete dias, e que foram submetidos a infarto do miocárdio, foi mostrado dilatação do ventrículo esquerdo (VE), com a parede infartada pouco densa, sugerindo que a nicotina teve um efeito adverso na remodelação ventricular após o infarto do miocárdio (Villarreal et al., 1999).

O monóxido de carbono possui cerca de 250 vezes maior afinidade pela hemoglobina do que o oxigênio, formando, assim, a carboxiemoglobina. Esse fenômeno diminui a oxigenação do miocárdio e dos tecidos em geral (Aronow et al., 1971). A exposição crônica ao monóxido de carbono, com o nível de carboxiemoglobina similar ao

observado em fumantes, aumentou a expressão da endotelina 1 e a indução da hipertrofia do miocárdio em ratos (Loennechen et al., 1999).

As informações disponíveis na literatura permitem elaborar a hipótese de que a exposição à fumaça de cigarro resulta em alterações cardíacas morfométricas e funcionais.

2. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos da exposição à fumaça de cigarro no processo de remodelação ventricular em ratos.

3. OBJETIVO ESPECÍFICO

A conseqüente influência da remodelação cardíaca na função ventricular esquerda.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP (Protocolo Nº 279).

Foram utilizados ratos machos, Wistar, pesando entre 200 a 250g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu; para determinação e distribuição dos dois grupos, os animais foram escolhidos por uma tabela de números ao acaso.

4.1. Grupos Experimentais

1) **grupo fumante (F)** composto por dez animais que foram expostos à fumaça de cigarro, na taxa de 40 cigarros/dia.

2) **grupo controle (C)** composto por dez animais, sem o tratamento.

Os animais do grupo **F** receberam dieta de rotina do laboratório do departamento de Clínica Médica da Faculdade, que utiliza a ração da marca Purina®, *ad libitum*. A quantidade de ração não consumida era pesada diariamente. Desta forma, foi possível calcular a quantidade média de ração ingerida pelos animais. Para os animais do grupo **C**, foi ofertada dieta de rotina do laboratório do departamento de Clínica Médica da Faculdade, na mesma quantidade ingerida pelo grupo **F**.

Durante o período experimental, os ratos foram mantidos em grupos de cinco animais por gaiola, à temperatura ambiente de 23°C, com ciclos de luminosidade de 12 horas; os animais foram observados por um período de dois meses.

4.2. Exposição ao Fumo

Foi utilizado o método descrito por Simani et al., (1974), adaptado por Wang et al., (1999) e utilizado por Paiva et al., (2003); que utiliza um aparato especialmente desenhado para expor os animais à fumaça de cigarro. Os ratos foram colocados na câmara transparente conectada ao aparato de fumar com um volume de aproximadamente 95x80x65 cm (figura 1). *Puffs* de fumaça foram tirados do cigarro por vácuo e jogados na câmara (figura 2). A fumaça foi liberada a uma taxa de cinco cigarros/30 min, com intervalos de descanso de 10 minutos duas vezes por dia, no período da tarde, durante a primeira semana. O número de cigarros foi aumentado, a partir da segunda semana, para uma taxa de 10 cigarros/30 min, com intervalos de descanso de 10 minutos duas vezes no período da manhã e duas no período da tarde, até o final do período de estudo para o grupo **F** que foi de dois meses. Utilizou-se cigarro comercial com a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono. O sacrifício dos ratos ocorreu no final do 2º mês do experimento.

4.3. Peso Corporal dos Animais

Todos os animais, tanto do grupo fumante como do grupo controle, foram pesados semanalmente e no momento do sacrifício em balança analítica de precisão.

4.4. Hemogasimetria

Para determinação de pH, HCO_3 , pO_2 , pCO_2 , SO_2 e COHb as amostras de sangue arterial ou venoso da cauda de cada animal foram obtidas com o auxílio de um *butterfly* conectado a uma seringa de 5ml previamente heparinizada (figura 3). A coleta foi realizada após um mês de exposição à fumaça de cigarro, portanto, um mês antes do sacrifício. A análise foi processada imediatamente após as coletas de sangue, em analisador de gases automático Technicon, modelo RA-XT* disponível no Serviço de rotina do Laboratório de Bioquímica da Seção de Análises Clínicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

4.5. ESTUDO FUNCIONAL

4.5.1. Pressão Sistólica Caudal

A medida da pressão sistólica caudal foi aferida após um mês de exposição à fumaça de cigarro, portanto, um mês antes do sacrifício. Foi utilizando um plestimógrafo de cauda, constituído por um polígrafo (Byo-Sistem PE 300, NARCO) com um sensor colocado na região proximal da cauda e um eletroesfigmomanômetro, possibilitando assim o registro gráfico da pressão arterial. Os animais foram aquecidos em uma caixa de madeira a 37°C com o calor gerado por duas lâmpadas de filamentos, por quatro minutos, e transferidos para um suporte de ferro, cilindro especialmente desenhado para permitir a completa exposição da cauda do

animal. Na região proximal da cauda foi colocado o sensor (KSM-microfone) ligado ao plestimógrafo. A pressão arterial na cauda foi registrada em papel com o polígrafo na velocidade de 2,5mm/s (figura 4).

4.5.2. ESTUDO DA FUNÇÃO VENTRICULAR

O estudo *in vitro* do ventrículo esquerdo (VE) foi realizado no coração isolado contraindo isovolumetricamente, segundo a técnica de Langendorff, utilizando-se o aparato da Hugo Sachs Elektronik, modelo 803. Essa técnica consiste na perfusão retrógrada do coração, pela aorta ascendente, com solução nutriente. A solução nutriente utilizado foi a solução de Krebs-Henseleit modificada, com a seguinte composição: NaCl 115 mM; KCl 5,4 mM; MgSO₄ 1,2 mM; CaCl₂ 1,25 mM; NaH₂PO₄ 1,15 mM; NaHCO₃ 25 mM; glicose 11 mM. À solução acima foi acrescentado manitol (8 mM), com objetivo de reduzir o edema miocárdico (Zornoff et al., 1995).

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) administrado por via intraperitoneal. Pela mesma via, foi administrado o anticoagulante heparina (1.000 UI).

Após verificação do efeito desejado da anestesia, o tórax foi submetido à abertura mediana extensa com tesoura cirúrgica. A seguir, a aorta ascendente foi dissecada e reparada com fios de seda; a veia cava inferior foi clampeada com uma pinça hemostática com o intuito de diminuir o retorno venoso. Um clipe hemostático foi colocado

momentaneamente no início da aorta ascendente a fim de evitar lesão da valva aórtica durante a canulação retrógrada do vaso.

Uma pequena incisão foi realizada na aorta ascendente e uma cânula metálica (número 15, 23 x 1,5 mm) foi introduzida retrogradamente e conectada ao aparato de perfusão por meio de um tubo de *silastic*. Esse procedimento permitiu o início da perfusão miocárdica estando o coração ainda *in situ*, após a retirada do clipe arterial e da pinça da veia cava inferior (figura 5).

A perfusão miocárdica foi realizada com solução de Krebs-Henseleit modificada. Essa solução foi continuamente impulsionada para dentro de um reservatório de vidro de dupla parede onde circulava água deionizada a 37° C, mantendo constante a temperatura da solução. A oxigenação foi efetuada com mistura gasosa (95% O₂, 5% CO₂) mantendo-se a pressão parcial de oxigênio entre 550-600 mmHg e pH entre 7,3 e 7,4. A pressão de perfusão coronariana foi mantida em 75 mmHg e monitorizada com auxílio do transdutor de pressão Stathan P23 XL acoplado ao aparato.

A seguir, o coração foi cuidadosamente removido do tórax e montado no equipamento de coração isolado.

O átrio foi aberto e o ápice do VE puncionado com agulha, de modo a drenar a cavidade ventricular, evitando-se acúmulo de líquido no seu interior. Um balão de borracha, tipo látex, atado o tubo rígido de duplo lúmen foi colocado na cavidade ventricular, com as bordas do balão para fora da cavidade ventricular (figura 6). Uma das comunicações do tubo

rígido foi conectada ao transdutor de pressão (STATHAN P₂₃ X L) e a outra, a uma seringa de 1 ml.

O transdutor foi acoplado ao amplificador modelo 1205 de polígrafo VR-12 *Eletronics for Medicine*. A pressão do VE, obtida por este sistema manométrico, foi utilizada para determinar a derivada de pressão (dp/dt) por meio de diferenciador RC-1 com constante de tempo de 0,01s e resposta linear até 200 hertz.

O volume ventricular correspondente à pressão diastólica final igual a zero foi denominado **V0**. Em outras palavras, V0 correspondia ao volume ventricular quando a pré-carga foi, teoricamente, nula. Este parâmetro foi utilizado como indicador de tamanho da cavidade ventricular. Pelo fato de serem comparados animais de pesos diferentes, V0 foi normalizado para o peso do VE, sendo esse valor utilizado na composição de algumas relações para análise da função sistólica e diastólica do VE.

A musculatura atrial direita, compreendendo a região do nódulo sinoatrial, foi extirpada e eletrodo de marcapasso artificial foi colocado no miocárdio do ventrículo direito (VD) para se manter, artificialmente, a frequência cardíaca entre 180 e 200 batimentos por minuto.

Assim, curvas de *Starling* foram obtidas com infusão de líquido no balão, que permitiu variar a pressão diastólica (PD) do VE de 0 a 25 mmHg, através de incrementos graduais de 5 mmHg, registrando-se a pressão sistólica (PS) correspondente a cada variação de volume (figura 6). Em preparações assim concebidas, em que o coração opera em

contrações isovolumétricas, a PS é considerada um bom indicador da capacidade contrátil. A primeira derivada de pressão ($+dp/dt$) e a derivada negativa de pressão ($-dp/dt$) foram registradas e serviram, como parâmetros de função sistólica e diastólica do VE, respectivamente.

Para calibrar o registro das pressões sistólicas e diastólicas do VE foi utilizado manômetro de coluna de mercúrio. Os traçados correspondentes a 0 e 100 mmHg foram registrados no papel fotográfico, para posterior calibração dos valores pressóricos.

4.6. ESTUDO MORFOMÉTRICO DO CORAÇÃO

Após o estudo funcional, os corações foram retirados do aparelho de perfusão e secos com papel filtro. Os ventrículos direito e esquerdo (incluindo o septo ventricular) foram separados e pesados.

4.6.1. Percentual de Água

Fragments do VE do VD foram pesados em balança analítica de precisão (modelo B-6000 da Micronal), correspondendo ao peso úmido, em seguida, os fragmentos foram colocados em estufa, previamente regulada em 80°C, por 48 horas. Depois deste período de permanência na estufa, os fragmentos já desidratados foram novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco de cada fragmento de VE e VD, podendo-se, assim, obter o percentual de água.

Procedimento semelhante foi utilizado para o fígado e os pulmões.

Em todos tecidos foram calculados o percentual de água com a seguinte fórmula:

$$\text{Percentual de Água} = \frac{\text{Peso Úmido} - \text{Peso Seco}}{\text{Peso Úmido}} \times 100$$

4.6.3. VARIÁVEIS ESTRUTURAIS ESTUDADAS

As seguintes variáveis estruturais foram obtidas:

- VE: massa do VE;
- VE/PC: normalização da MVE para o peso corporal;
- VD: massa do VD;
- VD/PC: normalização da MVD para o peso corporal;
- V0: indicador da dimensão da cavidade ventricular;
- V0/PC: normalização do V0 para o peso corporal;
- VE/V0: índice para avaliação da geometria do VE.

4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre os grupos foram feitas com o teste *t* de Student quando os dados apresentavam distribuição normal. Quando os dados tinham distribuição não normal, as comparações entre os grupos foram feitas com o teste *U* Mann-Whitney. Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão ou mediana, inclusive amplitude entre quartílica. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes se

$p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas com o programa para computadores *Sigmastat*.

4.8. FIGURAS



Figura 1 - Aparato de Fumar



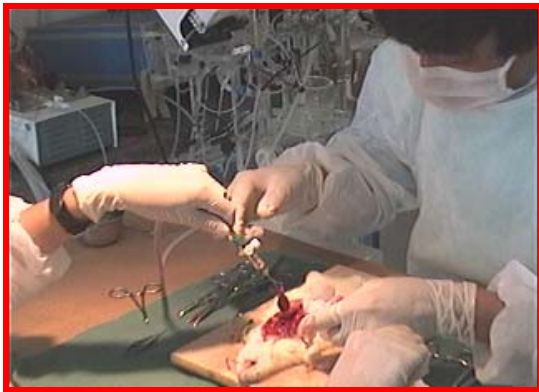
Figura 2 - Câmara de Contenção



Figura 3 - Coleta de Sangue



Figura 4 - Pressão Sistólica Caudal



Figuras 5 - Extração do Coração



Figura 6 - Inserção do Balão

5. Resultados

Dois animais do grupo **F** morreram durante o decorrer do período experimental de estudo. Dados ilustrativos dos efeitos da exposição à fumaça de cigarro (EFC) na pressão arterial sistólica (PAS) e variáveis morfométricas são mostradas nas figuras 7 a 16. Na figura 7, podemos observar que não houve diferença significativa no PC entre o grupo **F** ($410,75 \pm 26,53$) e o grupo **C** ($430,30 \pm 18,20$). A análise morfométrica mostrou valores significativamente superiores para o VE, corrigido pelo peso do corpo (VE/PC), com $p=0,019$ (figura 8). O mesmo ocorreu com o VD, corrigido pelo peso do corpo (VD/PC), com $p=0,016$ (figura 9) e para o VE somado com VD dividido pelo peso do corpo ($p=0,01$), no grupo **F** (figura 10). Não houve diferença significativa entre os grupos considerando-se o peso úmido em relação ao peso seco do VE (figura 11), VD (figura 12) e fígado (figura 13). Entretanto, foram encontrados valores superiores para peso úmido em relação ao peso seco do pulmão com $p=0,046$ (figura 14). No grupo **F**, a PAS foi maior (figura 15), comparado com o grupo controle (118 ± 15 vs. 103 ± 16 mmHg, $p=0,045$). Considerando a análise da dilatação do VE, expresso pelo volume do balão no qual a PD era igual a zero (V0), corrigido pelo peso do corpo (V0/PC), não houve diferença entre os grupos (figura 16).

A figura 17 mostra o comportamento da PS, para PD variando de 0 a 25 mmHg nos dois grupos. O tratamento com EFC causou prejuízo significativo da capacidade de contratilidade do VE para a PD de 0 a 10 mmHg. Do mesmo modo, o grupo controle mostrou valores maiores para

a dp/dt (figura 18), em comparação com o grupo fumante. Resultados similares foram achados quando a variável funcional foi analisada a $-dp/dt$ (figura 19).

Os resultados da hemogasimetria são mostrados na tabela 1. Não houve diferença significativa para as variáveis pO_2 , pCO_2 e SO_2 entre os grupos. Entretanto, encontramos valores superiores para COHb no grupo **F** ($p < 0,008$).

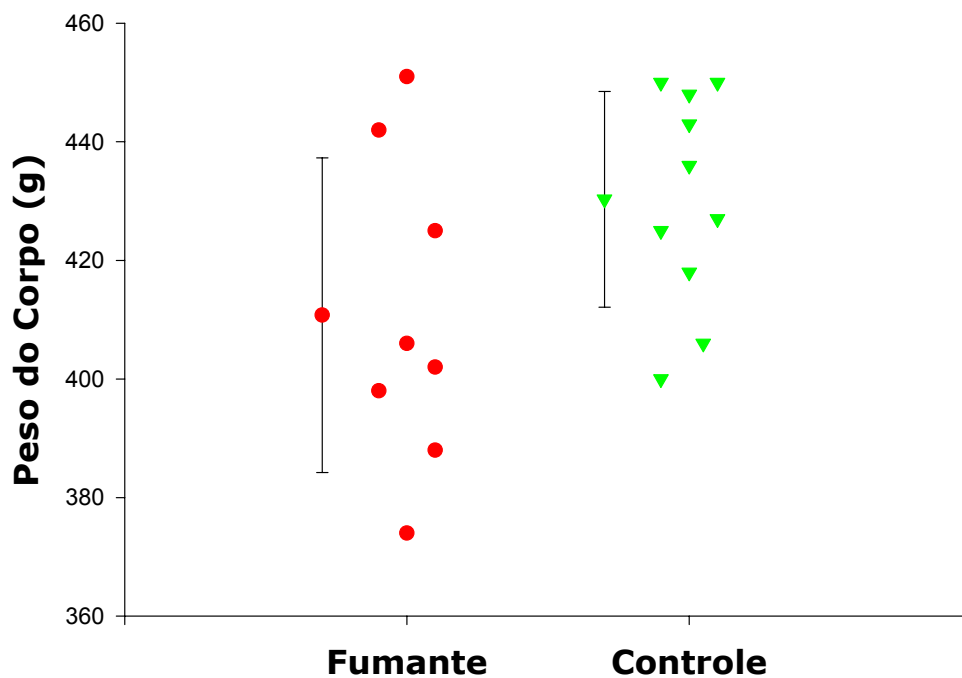


Figura 7- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do **Peso do Corpo** dos ratos, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

$p > 0,05$

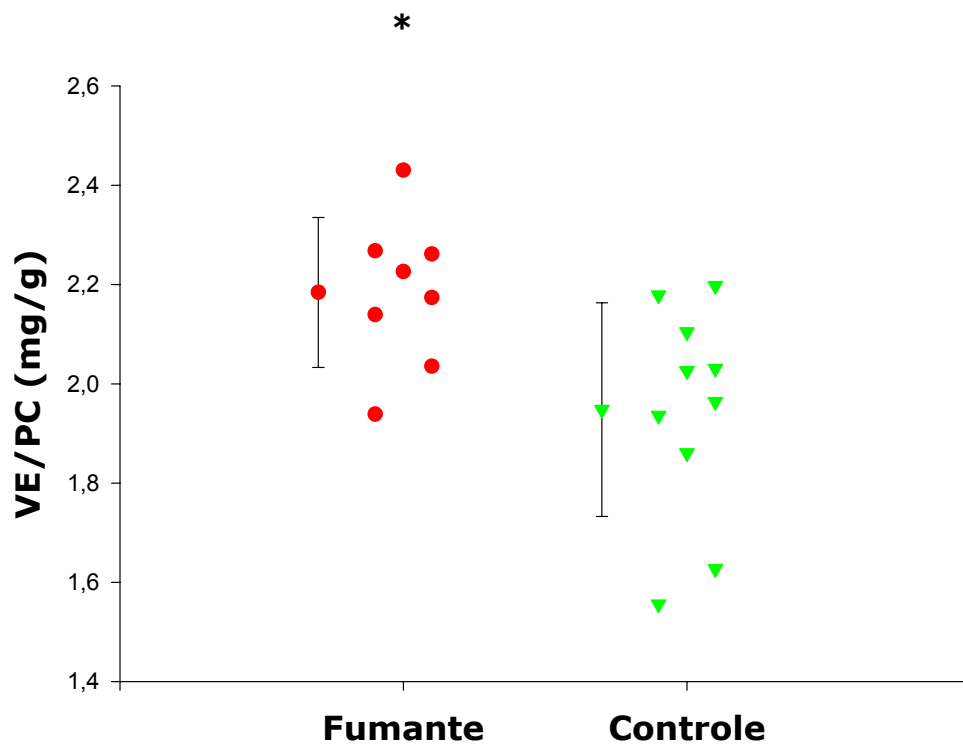


Figura 8- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do peso do **Ventrículo Esquerdo** normalizado pelo **peso corporal** dos ratos, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste *t* de Student.

* $p < 0,05$

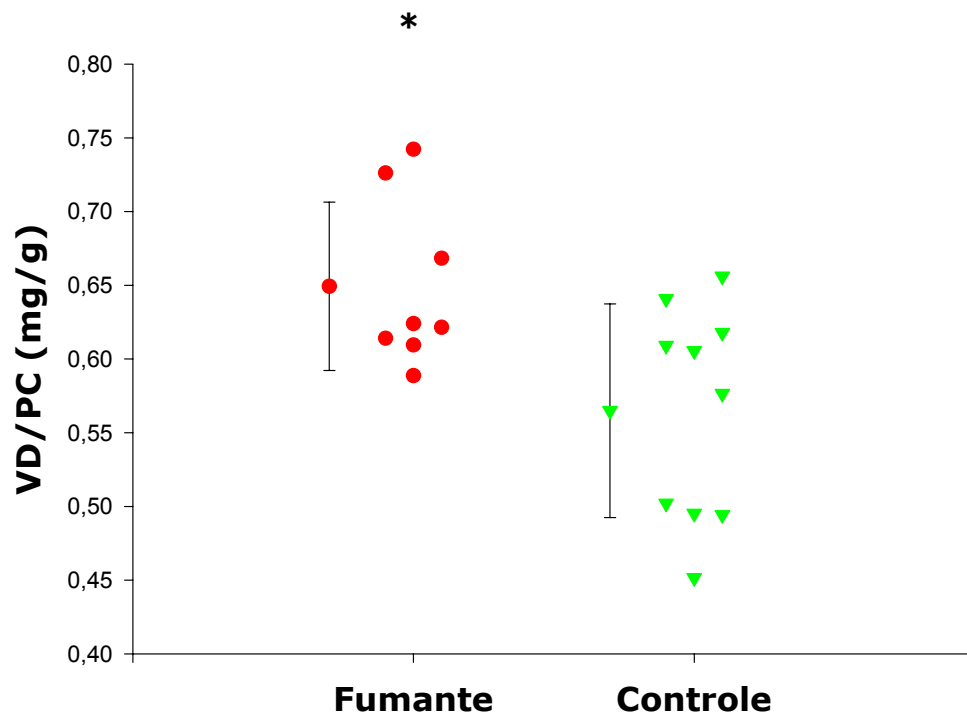


Figura 9- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do peso do **Ventrículo Direito** normalizado pelo **peso corporal** dos ratos, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

* $p < 0,05$

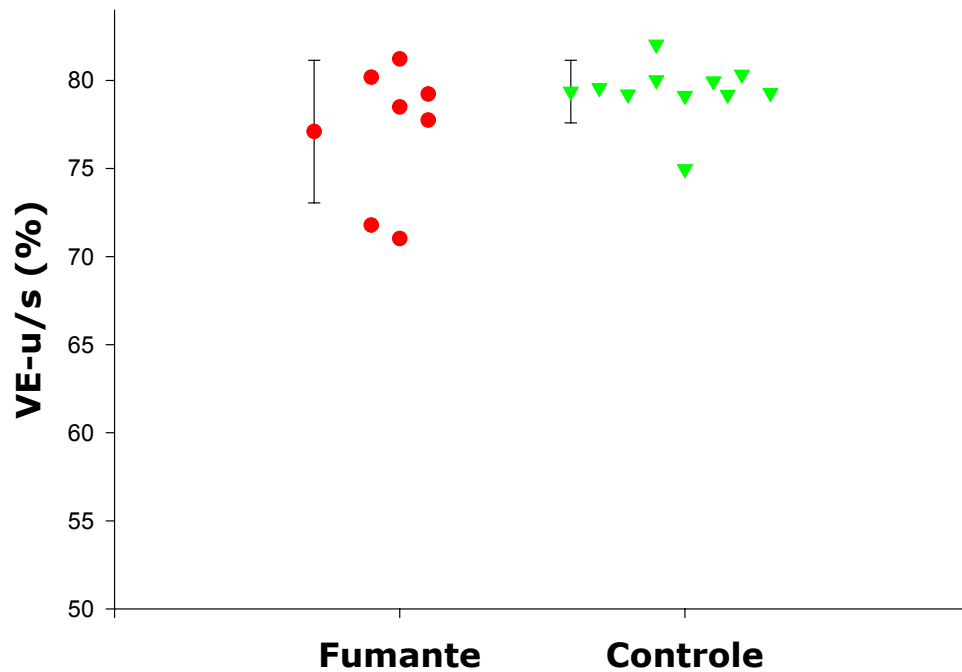


Figura 11- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do percentual de água do **Ventrículo Esquerdo**, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

u/s: índice úmido/seco

$p > 0,05$

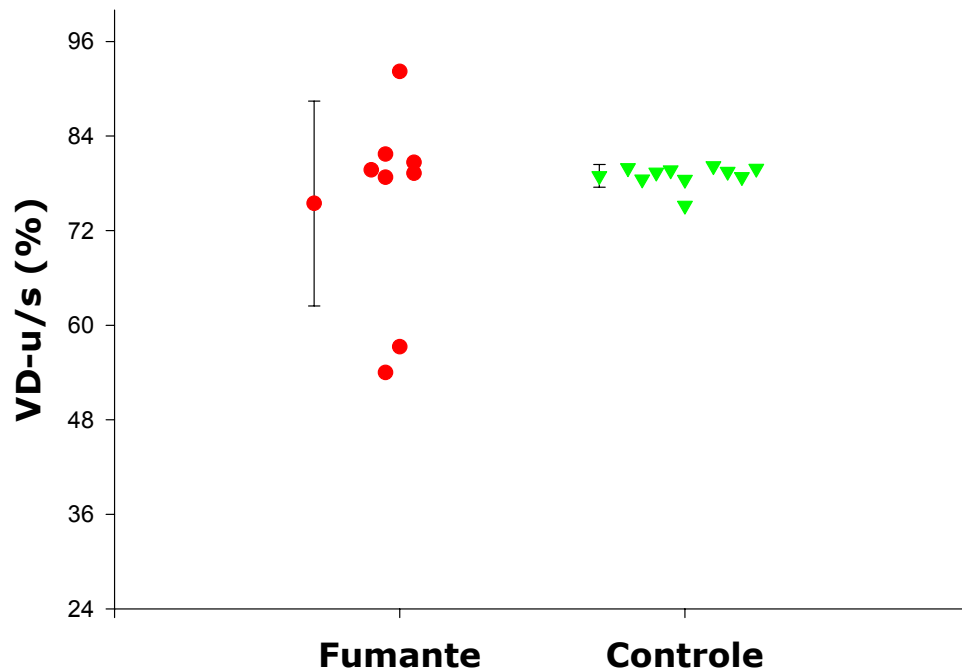


Figura 12- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do percentual de água do **Ventrículo Direito**, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

u/s: índice úmido/seco

$p > 0,05$

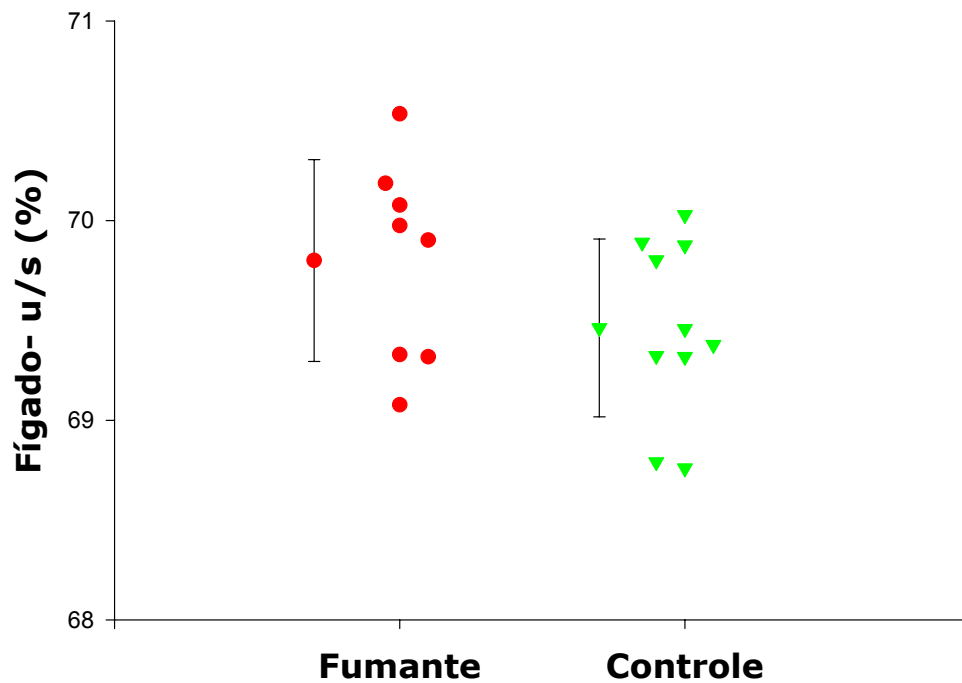


Figura 13- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do percentual de água do **Fígado**, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

u/s: índice úmido/seco

$p > 0,05$

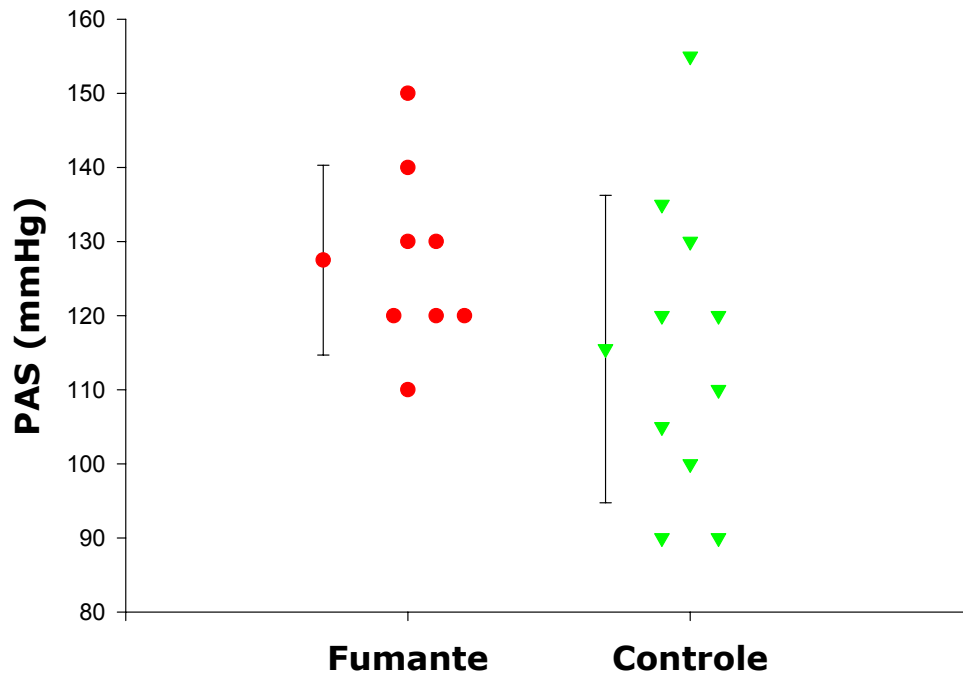


Figura 15- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, da **Pressão Arterial Sistólica** dos ratos, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste t de Student.

* $p < 0,05$

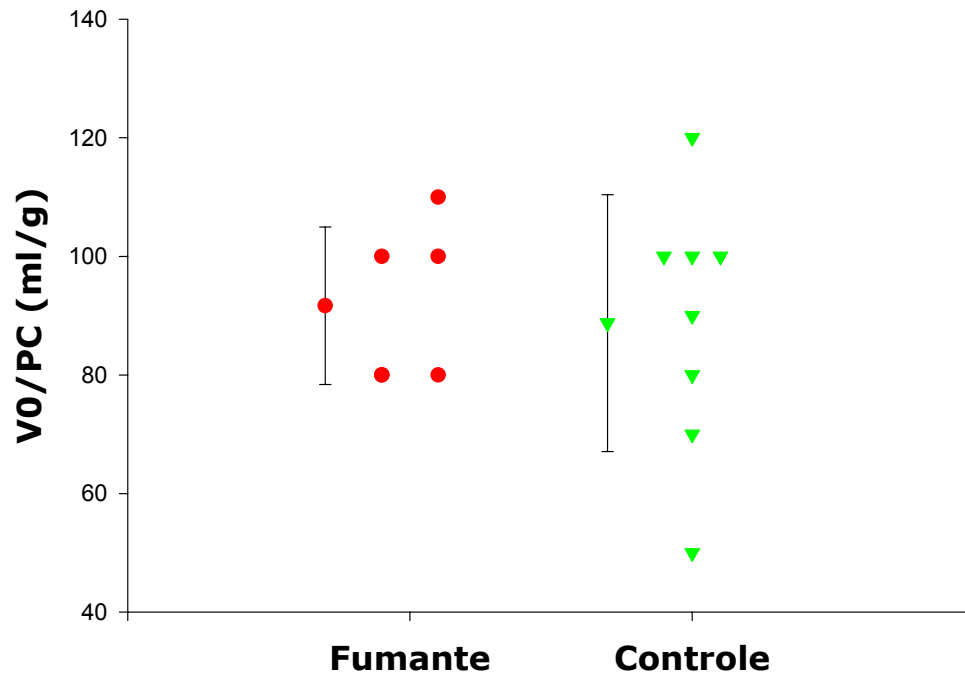


Figura 16- Representação gráfica, na forma de pontos, com média $\pm$ desvio padrão, do estudo funcional, do **V0** igual **volume ventricular** correspondente à pressão diastólica nula, normalizada para o **peso corporal** dos ratos, do grupo **Fumante**, do grupo **Controle** e da análise do teste *t* de Student.

$p > 0,05$

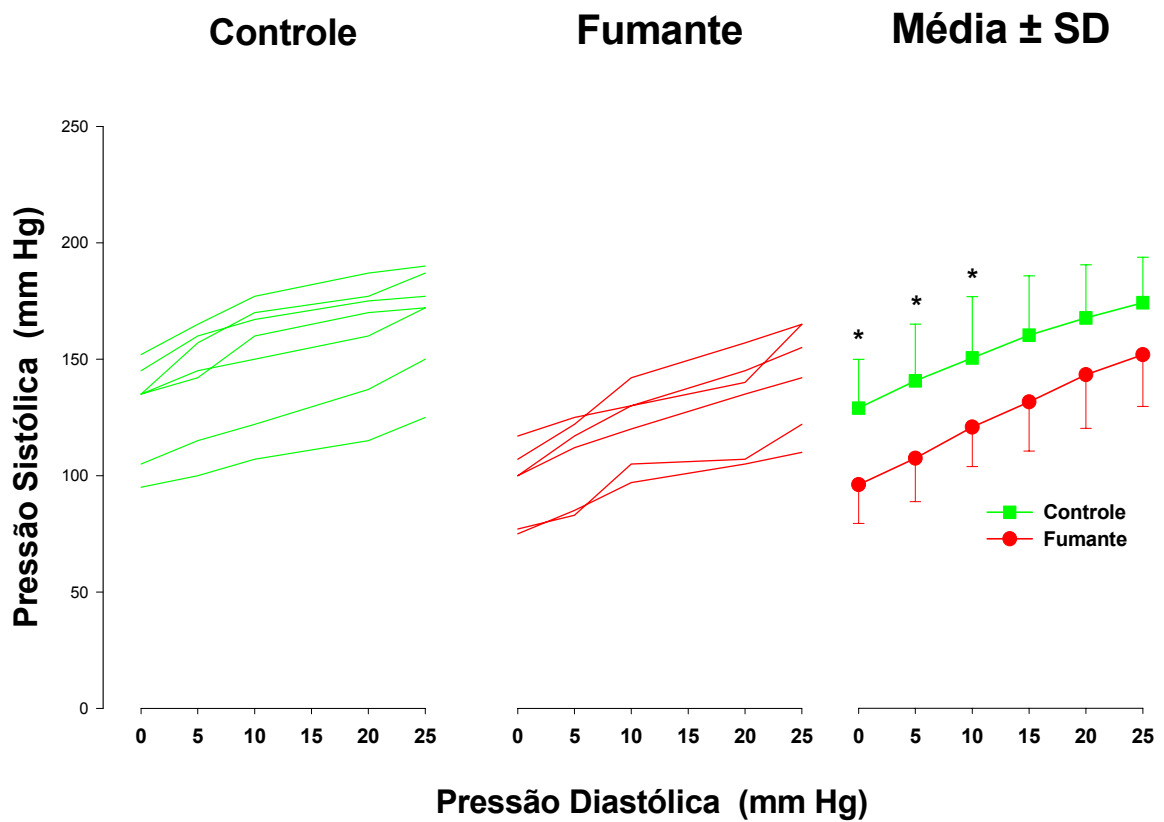


Figura 17- Representação gráfica, na forma de curvas individuais com curva da média $\pm$ desvio padrão, do estudo funcional, da **Pressão Sistólica**, utilizada como parâmetro de contratilidade.

* $p < 0,05$

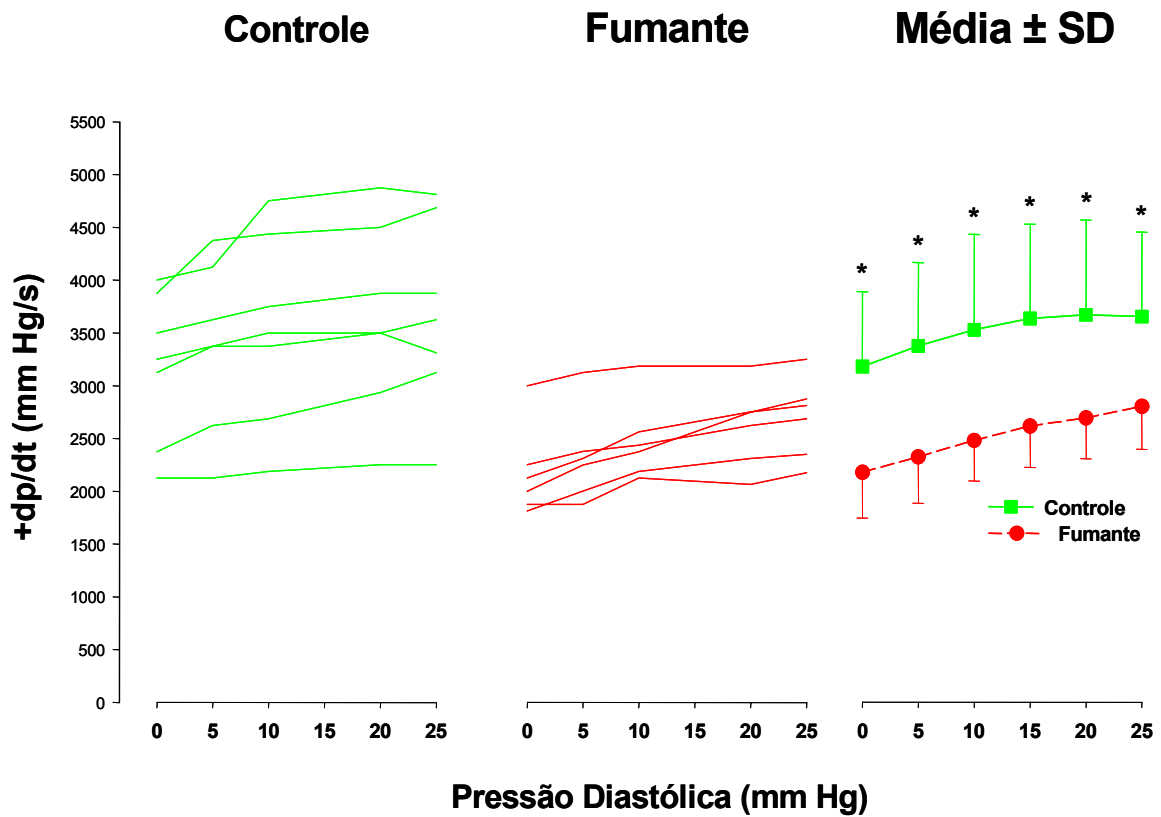


Figura 18- Representação gráfica, na forma de curvas individuais com curva da média $\pm$ desvio padrão, do estudo funcional, usando como parâmetro de contração a **primeira derivada de pressão (+dp/dt)**.

* $p < 0,05$

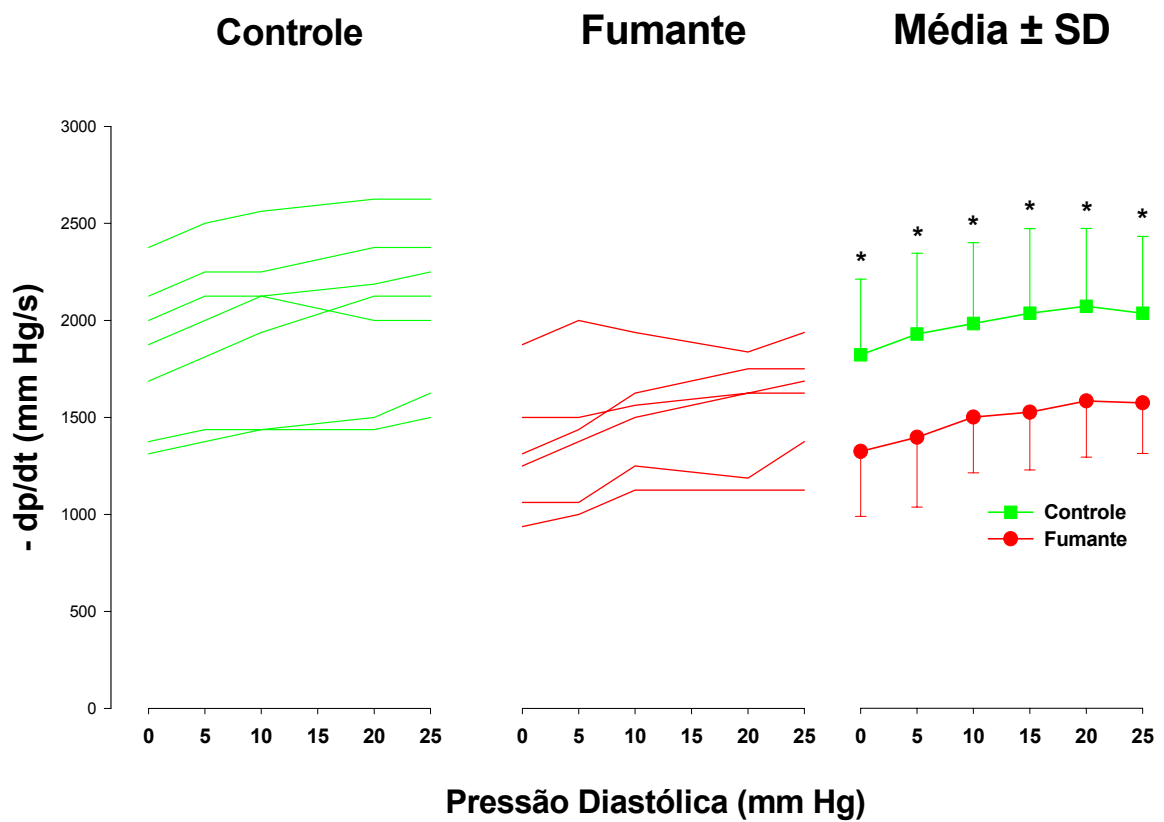


Figura 19- Representação gráfica, na forma de curvas individuais com curva da média $\pm$ desvio padrão, do estudo funcional, usando como parâmetro de relaxamento a **primeira negativa de pressão (-dp/dt)**.

* $p < 0,05$

Tabela 1. Resultados da Hemogasimetria

	F	C	P
pO ₂	55,56 ± 4,69	58,43 ± 6,37	0.305
pCO ₂	34,03 ± 2,39	34,80 ± 3,56	0.613
SO ₂	87,81 ± 2.32	89,96 ± 3,43	0.150
COHb	5,35 ± 2,79	0,94 ± 0,73	0.008 *

F: Grupo Fumante; C: Grupo Controle; pO₂ (mmHg): Pressão Parcial de Oxigênio; pCO₂ (mmHg): Pressão Parcial de Dióxido de Carbono; SO₂ (%): Saturação de Oxigênio; COHb (%): Carboxiemoglobina.

* **$p < 0,05$**

6. DISCUSSÃO

6.1. Discussão dos Métodos

6.1.1. Dieta

Em estudo realizado por Cicogna et al, 2000, ratos submetidos à desnutrição energético-protéica por 90 dias, apresentaram lesões ultra-estruturais no miocárdio, acarretando alterações funcionais nos corações. Assim, a oferta de ração para os ratos do grupo controle foi cuidadosamente controlada. Considerando-se, ainda, que os ratos expostos à fumaça de cigarro podem ingerir quantidades inferiores de alimento, pelo fato do fumo ser inibidor do apetite, o grupo fumante foi utilizado como referencial na ingestão de ração para o presente estudo. Desse modo, a oferta de ração para os ratos do grupo controle foi de forma que todos os animais ingerissem a mesma quantidade de ração.

6.1.2. Evolução do Peso Corporal

Os ratos foram pesados semanalmente, os dados passados para uma planilha eletrônica (*Excel*), pôde-se assim traçar uma curva de crescimento dos animais (dados não apresentados). Dessa forma, seria possível detectar qualquer irregularidade entre os grupos, como, por exemplo, disputas pelo alimento ou a presença de doenças em algum dos animais. Porém, não ocorreu nenhuma irregularidade entre os grupos durante o período de estudo.

6.1.3. Estresse

O efeito do estresse causado aos animais foi minimizado pelas seguintes medidas: manejo, coleta de sangue e aferição da pressão arterial foram realizados no mesmo dia e de forma consecutiva, imediatamente após a aferição da pressão arterial foi feita a coleta de sangue.

Com o intuito de permitir aos animais a recuperação plena do estresse causado pelo manejo desses procedimentos, por ocasião do sacrifício, a realizações dos procedimentos de aferição da pressão arterial e coleta de sangue foram feitos com um mês de exposição à fumaça de cigarro e não foi repetido ao final dos dois meses por ocasião do sacrifício dos animais.

Pelo mesmo motivo, no dia do sacrifício, os ratos não foram expostos à fumaça de cigarro. Assim, não houve estresse no dia da realização do procedimento do estudo do coração isolado. Pois, os animais foram sacrificados antes do horário da exposição à fumaça de cigarro.

6.1.4. Hemogasimetria

A hemogasimetria possibilitou mostrar que não ocorreu hipoxemia crônica nos animais expostos à fumaça de cigarro, pois, pressão de oxigênio, pressão de dióxido de carbono e saturação de oxigênio não houve diferença significativa entre os grupos. Entretanto, encontramos concentrações de COHb, estatisticamente mais elevados no grupo

fumante em comparação com o grupo controle, mostrando, assim, que os ratos do grupo fumante foram realmente expostos à fumaça de cigarro.

6.1.5. Método do Coração Isolado

Entre os diversos métodos disponíveis para o estudo do desempenho mecânico do coração destacam-se, pela facilidade no seu manuseio, as preparações de coração isolado. A mais divulgada das técnicas foi desenvolvida por Langendorff, em 1895, que consiste na perfusão coronariana retrógrada, com solução nutriente ou sangue, por meio de uma cânula inserida na aorta ascendente.

A técnica de Langendorff pode ser aplicada à várias espécies de animais como: cão, gato, rato e coelho. A escolha de uma ou outra espécie freqüentemente é empírica e baseia-se na tentativa de reproduzir condições fisiológicas apropriadas e na experiência dos pesquisadores.

Pelas razões expostas anteriormente, foi adotada a preparação de Langendorff com solução nutriente para o estudo funcional do coração isolado de ratos.

É preciso considerar que nesse tipo de preparação pode ocorrer edema miocárdico, com conseqüente deterioração da função ventricular (Tabayshi et al., 1991). O desenvolvimento ou não do edema do miocárdio está na dependência, entre outros, de vários fatores como: pH e temperatura do líquido nutriente; oxigenação da solução; pressão de perfusão coronariana e duração do experimento (Doring & Dehnert, 1988).

No presente estudo o líquido nutriente foi constituído de solução modificada de Krebs-Henseleit acrescida de manitol, na concentração de 8 mM, para diminuir o grau de edema de forma a assegurar melhor preservação miocárdica (Zornoff et al., 1995). Esta solução foi aquecida a 37 °C, tamponada em pH variando entre 7,3 e 7,4 e oxigenada com mistura gasosa de 95% de oxigênio e 5% de gás carbônico. A pressão de perfusão coronariana foi mantida constante em 75 mmHg durante a aplicação do protocolo experimental para estudo da função cardíaca. Esse valor de pressão de perfusão vem sendo utilizado há vários anos em nosso laboratório, com boa confiabilidade (Zornoff et al., 1995; Paiva et al., 2003).

A função ventricular foi avaliada submetendo o coração a aumento progressivo do volume de líquido de um balão colocado dentro da cavidade ventricular esquerda.

Permitiu-se um tempo de estabilidade de, aproximadamente, cinco minutos, após a colocação do coração no aparelho de perfusão. O tempo total destinado a realização do estudo funcional foi de, no Máximo, 20 minutos. Conforme Doring & Dehnert (1988), esse protocolo não causa deterioração por problemas relacionados com formação de edemas e com hipóxia prolongada.

Tomando esses cuidados acreditou-se que, na preparação utilizada no presente estudo, não houve edema suficiente para prejudicar a função cardíaca. Por outro lado, se o edema ocorreu, assumi-se que sua influência foi semelhante nos dois grupos estudados.

A frequência cardíaca é outro parâmetro que deve ser controlado nesse tipo de avaliação funcional. Na literatura, há muito tempo, é descrita a relação entre frequência de contração e força desenvolvida pelo músculo cardíaco (Woodworth, 1902). Essa relação, conhecida como efeito Bowditch, estabelece-se ao nível da membrana celular miocárdica, de forma que com o aumento da frequência de estimulação, há maior entrada de íons sódio para o meio intracelular, o que contribui para a elevação da concentração de cálcio intracelular e conseqüente aumento da contratilidade (Vatner & Braunwald, 1975). Por esse motivo, optou-se por estabelecer controle da frequência cardíaca dos animais por meio da retirada de parte da musculatura atrial direita e implantação de marcapasso artificial de forma a manter a frequência cardíaca de 180 a 200 bpm.

6.2. Discussão do Estudo

A proposta desse estudo foi analisar o efeito da exposição crônica à fumaça de cigarro no processo de remodelação ventricular em ratos. Os resultados mostraram que a EFC, durante um período de dois meses, resultou em hipertrofia do miocárdio com diminuição da capacidade funcional ventricular. Desse modo, os efeitos cardíacos diretos, freqüentemente negligenciados, podem promover dano suplementar aos fumantes agredidos pela fumaça inalada. Esse efeito seria adicional aos efeitos bem conhecidos no endotélio vascular e pulmões, entre outros

(Klein et al., 1983; Maouad et al., 1984; Zhu & Parmley, 1995; Hays et al., 1998).

Um importante achado no presente estudo foi que a EFC resultou em aumento da massa tanto do ventrículo esquerdo, como do direito. Alterações da geometria, volume, massa e constituição do coração em resposta à agressão miocárdica ou às alterações nas condições da carga têm sido estudadas, recentemente, com o nome de remodelação cardíaca (Pfeffer et al., 1985; Pfeffer & Braunwald, 1990; Cohn et al., 2000). Está bem estabelecido que a hipertrofia desempenha papel importante no processo de remodelação. O realinhamento dos miócitos pode levar a um padrão excêntrico ou concêntrico de crescimento celular, dependendo do estímulo para o processo hipertrófico. Sobrecargas de pressão resultam no desenvolvimento de hipertrofia concêntrica, caracterizadas por aumento da espessura da parede ventricular, em consequência da replicação dos sarcômeros em paralelo. Assim, há diminuição da relação entre o volume da cavidade e a espessura da parede. De outra maneira, sobrecargas de volume resultam na replicação em série dos sarcômeros, caracterizando a hipertrofia ventricular do tipo excêntrica. Podemos identificar esse fenômeno pelo encontro da relação aumentada entre volume da cavidade e espessura da parede (Carabello et al., 1992). No estudo, não foi encontrada dilatação da cavidade ventricular esquerda, já que os valores de V0 ajustados ao peso corporal dos animais não foram diferentes no grupo fumante em comparação com os animais controle. Desse modo, podemos concluir que a exposição à fumaça induziu o

crescimento celular com manutenção do volume do ventrículo esquerdo, o que é sugestivo de processo de hipertrofia de padrão concêntrico.

A EFC induziu a relevantes alterações nas variáveis de função do VE analisadas. A preparação do coração isolado possibilitou análise direta da função miocárdica excluindo as influências dos efeitos indiretos da EFC no coração (carga hemodinâmica e variações na frequência cardíaca). Os dados da pressão sistólica indicaram um decréscimo na capacidade de desenvolver força no grupo **F**. Além disso, tanto a dp/dt , com a $-dp/dt$ foram deprimidas no grupo **F**, em comparação com os animais do grupo controle. Esses dados sugerem que a EFC resultou em contratilidade e relaxamento mais lentos.

Assim, os dados morfométricos e funcionais indicam que a EFC, durante dois meses, está associado com remodelação ventricular esquerda e também ventricular direita. Inicialmente a remodelação ventricular é um processo compensatório, influenciado por sobrecarga hemodinâmica ou ativação neurohumoral. Entretanto, a remodelação ventricular crônica é atualmente reconhecida como variável patológica importante, pelo fato do processo de remodelação usualmente resultar em disfunção ventricular progressiva e apresentação clínica de insuficiência cardíaca ou morte súbita (Pfeffer & Braunwald, 1990; Cohn et al., 2000). O presente estudo está de acordo com esta concepção, uma vez que o processo de remodelação no grupo **F** foi associado com disfunção ventricular significativa. Seguido por altos valores da relação peso úmido ajustado pelo peso seco nos pulmões, indicando congestão pulmonar.

Dois possíveis mecanismos podem ser considerados para explicar a presença da remodelação ventricular em animais expostos à fumaça de cigarro: ação indireta da EFC, devido a sobrecarga de pressão, ou ação direta da EFC nas células do miocárdio. O presente estudo mostrou que a EFC induziu aumento da pressão sistólica, em comparação ao grupo controle. Esse fato reforça dados anteriores que mostraram que a administração de nicotina em ratos conscientes resultou em vasoconstrição. Na tentativa de explicar esse achado, a simpactomia aboliu os efeitos vasoativos da nicotina (Marano et al., 1999). No mesmo modelo, à fumaça de cigarro causou elevação dos níveis de endotelina 1 (Haak et al., 1994) e a administração de antagonista seletivo dos receptores A da endotelina atenuaram a resposta pressórica induzida pela nicotina (Tanus-Santos et al., 2000). Em outro estudo, a administração de nicotina diminuiu a síntese de prostaciclina pelo endotélio vascular (Klein, 1984). Outro fato que pode contribuir para os efeitos vasculares da EFC é a vasopressina, já que a administração de antagonista da vasopressina atenuou a vasoconstrição induzida pela nicotina nos vasos sanguíneos da pele (Khosla et al., 1994). Dessa forma, existem diversas evidências indicando que a EFC induz vasoconstrição, em consequência de desequilíbrio neuro-humoral.

Devemos considerar, entretanto, que no modelo de ratos hipertensos, as alterações na massa cardíaca e a transição do estágio de remodelação adaptativa para fases em que ocorre disfunção ventricular são dependentes, principalmente, de duas variáveis: altos níveis de

pressão arterial e prolongada exposição a níveis elevados de pressão. Como exemplo, citaríamos que foram identificados sinais de disfunção ventricular após 52 semanas em ratos espontaneamente hipertensos e após 17 semanas no modelo de ratos Dahl sensíveis ao sal (Iwanaga et al., 2002). Usualmente, a PAS nesses animais atinge níveis próximos de 200 mmHg. Pelo exposto, é pouco provável que níveis de PAS médios de 118 mmHg, por período de apenas 8 semanas, justifiquem as alterações morfo-funcionais encontradas nos animais do grupo **F**. Portanto, não podemos descartar que as alterações morfológicas encontradas no presente estudo, acompanhadas de disfunção ventricular, sejam consequência de efeitos diretos da fumaça de cigarro no miocárdio dos animais fumantes.

Outros estudos também avaliaram os efeitos da EFC em variáveis cardíacas. Assim, houve melhora da performance contrátil do músculo cardíaco isolado de cachorro após a administração aguda de nicotina (Greenspan et al., 1969). No modelo de infarto experimental, observou-se dilatação do ventrículo esquerdo, com a parede enfartada mais delgada, em ratos tratados com nicotina submetidos ao infarto do miocárdio (Villarreal et al., 1999). A exposição crônica ao monóxido de carbono, com o nível de carboxiemoglobina similar aos observados em fumantes, resultou em acréscimo da expressão da endotelina 1 e indução de hipertrofia do miocárdio em ratos (Loennechen et al., 1999). Ratos submetidos à EFC, por um mês, apresentaram função sistólica da câmara ventricular esquerda deprimida (Paiva et al., 2003). Além disso, em

estudo clínico, com 28 pacientes com doença arterial coronária, a inalação aguda da fumaça de cigarros foi associada com distúrbios de função diastólica (Stork et al., 1992). Do mesmo modo, em 20 indivíduos expostos agudamente à fumaça de cigarro, com angina pectoris e documentada doença arterial coronária, avaliados pelo ecocardiograma, também foram encontrados sinais de disfunção diastólica (Kyriakides et al., 1992). A avaliação cardíaca em fumantes, com o coração em repouso, observou-se aumento na massa do VE em comparação com não fumantes, avaliados no ecocardiograma (Gidding et al., 1995). Desta maneira, a exposição aguda à nicotina/fumaça de cigarro resultou em algumas alterações tanto em variáveis funcionais como morfológicas.

O presente estudo mostrou que a EFC, durante o período de seguimento de dois meses, resultou em remodelação miocárdica com consistente diminuição de capacidade funcional ventricular. Os mecanismos envolvidos no processo de disfunção ventricular progressiva, associado com a remodelação cardíaca, não estão completamente esclarecidos, mas provavelmente envolvem alterações moleculares, celulares e intersticiais incluindo: hipertrofia, necrose, apoptose, ativação da matriz metaloprotease, fibrose intersticial, déficit energético e alterações nas proteínas contráteis, via beta-adrenérgica e homeostase de cálcio (Swynghedauw, 1999).

Em conclusão, apesar dos mecanismos pelos quais a EFC produz efeitos cardíacos adversos não estarem totalmente esclarecidos, o presente estudo mostrou que a crônica EFC, durante o período de

seguimento de dois meses, resultou em remodelação miocárdica com diminuição da capacidade funcional ventricular.

7. Conclusões

O conjunto de nossos dados permite as seguintes conclusões:

1. A exposição crônica à fumaça de cigarro, durante o período de dois meses, resultou em remodelação miocárdica.
2. O processo de remodelação ventricular foi associado com diminuição da capacidade funcional ventricular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

Aronow WS, Dendinger J, Rokaw SN. Heart rate and carbon monoxide level after smoking hight, low non nicotine cigarette. *Ann Inst Med* 1971; 74:697-702.

Aurerbach O, F.C.C.P, Carter HW, Garfinkell F, Hammond EC. Cigarette smoking and coronary artery disease. A macroscopy and microscopy study. *Chest* 1976; 70:697-705.

Baldi A, Abbate A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A, et al. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34:165-174.

Barros RA, Okoshi MP, Cicogna AC. Via beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. *Arq Bras Cardiol* 1999; 72:641-8.

Bennett MR. Apoptosis in the cardiovascular system. *Heart* 2002; 87:480-487.

Bertolami MC. A conexão entre as lipoproteínas e a aterosclerose. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 2000; 6:694-699.

Brower GL, Henegar JR, Janicki JS. Temporal evaluation of left ventricular remodeling and function in rats with chronic volume overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1996; 40:H2071-8.

Carabello BA, Zile MR, Tanaka R, Cooper IV G. Left ventricular hypertrophy due to volume overload versus pressure overload. *Am J Physiol* 1992; 263: H1137-H44.

Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 2000; 1:6-16.

Cleutjens JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 816-821.

* Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas. Requisitos uniformes para originais submetidos a revistas biomédicas. *Ann Intern Med* 1997; 126:36-47.

National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

Cohn JN, Ferrari R and Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol 2000; 35: 569-582.

Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipoprotein concentrations: and analys of published data. Br Med J 1989; 298:784-788.

Doring HJ & Dehnert H. The isolated warm-blooded heart according to Langendorff. In: C Doring ed. Methods in experimental physiology and pharmacology. Biological measurement techniques, 1988.

Doll R, Peto R, Wheathey R, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years observation on male British doctors. Br Med J 1994; 309:901-11.

Dube M, Green CR. Methods of collection of smoke for analytical purpose. Recent Adv Tobacco Sci 1982; 2:42.

Gaudron P, Kugler L, Hu K, Bauer W, Eilles C, Erti G. Time course of cardiac structural, functional and electrical changes in asymptomatic patients after myocardial infarction: their inter-relation and prognostic impact. J Am Coll Cardiol 2001; 38:33-40.

Gidding SS, Xie X, Liu K, Manolio T, Flack JM, Gardin JM. Cardiac function in smokers and nonsmokers: the CARDIA study. The Coronary Artery Risk Development in Yong Adults Study. J Am Coll Cardiol 1995; 26:211-6.

Green CR, Rodgmana. The tobacco chemist research for conference a half-century forum for advances inalytical methodology of tobacco and produs. Recent Adv Tobacco Sci 1996; 22:131.

Greenspan K, Edmands RE, Knoebel SB, Fish C. Some effects of nicotine on cardiac automaticity, conduction, and inotropy. Arch Intern Med 1969; 707-12.

Haak T, Jungmann E, Raab C, Usadel KH. Elevated endothelin-1 levels after cigarette smoking. Metabolism 1994; 43: 267-9.

Hasenfus 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.

Hays JT, Dale LC, Hurt RD, Croghan IT. Trends in smoking-related diseases: why smoking cessation is still the best medicine. Postgrad Med 1998; 104: 56-66.

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in the heart failure. *Cardiovasc Res* 2000; 45:273-8.

Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, et al. Tabagismo e progressão da aterosclerose. *J Am Med Assoc Br* 1998; 279:119-24.

Iwanaga Y, Aoyama T, Kihara Y, Onozawa Y, Yoneda T, Sasayama S. Excessive activation of matrix metalloproteinases coincides with left ventricular remodeling during transition from hypertrophy to heart failure in hypertensive rats. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:1384-91.

Khosla S, Laddu A, Ehrenpreis S, Somberg JC. Cardiovascular effects of nicotine: relation to deleterious effects of cigarette smoking. *Am Heart J* 1994; 127: 1669-72.

Klein LW, Pichard AD, Holt J, Smith H, Gorlin R, Teichholtz LE. Effects of chronic tobacco smoking on coronary circulation. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 421-426.

Klein LW. Cigarette smoking, atherosclerosis and the coronary hemodynamic response: a unifying hypothesis. *J Am Coll Cardiol* 1984; 4: 972-4.

Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Rentoukas E, Mavrogheni S, Kremastinos DI, Toutouzas P. Acute effects of cigarette smoking on left ventricular diastolic function. *Eur Heart J* 1992; 13: 743-8.

Loennechen JP, Beisvag V, Arbo I, Waldum HL, Sandvik AK, Knardah S, et al. Chronic carbon monoxide exposure in vivo induces myocardial endothelin-1 expression and hypertrophy in rat. *Pharmacol Toxicol* 1999; 85: 192-7.

MacNee W. Oxidants/Antioxidants and COPD. *Chest* 2000; 117:303-17.

Maouad J, Fernandez F, Barrillon A, Gerbaux A, Gay J. Diffuse or segmental narrowing (spasm) of the coronary arteries during smoking demonstrated on angiography. *Am J Cardiol* 1984; 53: 354-5.

Marano G, Ramirez A, Mori I, Ferrari AU. Sympathectomy inhibits the vasoactive effects of nicotine in conscious rats. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 201-5.

Matsubara BB, Ferreira ALA, Matsubara LS. Aspectos anatomopatológicos da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 2002; 3:361-70.

Norton GR, Woodiwitss AJ, Gaasch WH, Mela T, Chung ES, Aurigemma GP, et al. Heart failure in pressure overload hypertrophy: the relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39:664-71.

Okoshi K, Fioretto JR, Bonato RC, Tornero MTT, Tucci PJF. Influence of the elevation of the left ventricular diastolic pressure on the first temporal derivative of the ventricular pressure (dP/dt). *Arq Bras Cardiol* 1999; 73:42-6.

Paiva SAR, Zornoff LAM, Okoshi MP, Okoshi K, Cicogna AC, Campana AO. Comportamento de variáveis cardíacas em animais expostos à fumaça de cigarro. *Arq Bras Cardiol* 2003; 81:221-4.

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.

Pfeffer MA and Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial-infarction - experimental-observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161-72.

Ridker PM, Genest J, Libby P. Risk factors for atherosclerotic disease. In: Braunwarld E, Zipes DP, Libby P, editors. *Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001. p. 1010-39.

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.

Smith CJ, Fisher TH. Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction. *Atherosclerosis* 2001; 158: 257-67.

Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res* 2002; 90:520-30.

Stedman RL. The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 1968:153-207.

Stork T, Eichstadt H, Mockel M, Bortfeldt R, Muller R, Hochrein H. Changes of diastolic function induced by cigarette smoking: an echocardiographic study in patients with coronary artery disease. *Clin Cardiol* 1992; 15: 80-6.

Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999; 79: 215-62.

Tabayashi K, Mckeown PP, Miyamoto M, Luedke AE, Thomas R, Breazeale DG, et al. Diastolic mechanical properties of the left ventricle after global ischemia. *J Cardiovasc Surg* 1991; 32:250-8.

Tagawa H, Koide M, Sato H, Zile MR, Carabello BA, Cooper IV G. Cytoskeletal role in the transition from compensated to decompensated hypertrophy during adult canine left ventricular pressure overloading. *Circ Res* 1998; 82:741-61.

Tanus-Santos JE, Sampaio RC, Hyslop S, Franchini KG, Moreno Jr H. Endothelin ETA receptor antagonism attenuates the pressor effects of nicotine in rats. *Eur J Pharmacol* 2000; 396:33-7.

Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M. Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* 2002; 105:1155-7.

U. S. Department of Health and Human Service. The health consequences of smoking, Cardiovascular disease: a report of the Surgeon General. Washington, 1983.

Vatner SF & Braunwald E. Cardiovascular control mechanisms in the conscious state. *N Engl J Med* 1975; 239:970-6.

Villarreal FJ, Hong D, Omens J. Nicotine-modified postinfarction left ventricular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 276: H1103-H6.

Wang X-D, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russel RM. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given β -carotene supplements and exposure to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 60-6.

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.

Weber KT. Cardioreparation in hypertensive heart disease. *Hypertension* 2001; 38(suppl 3):588-91.

Woodworth RS. Maximal contraction, "staircase" contraction, refractory period and compensatory pause of the heart. *Am J Physiol* 1902; 8:213-49.

Zannad F, Dousset B, Alfa F. Treatment of congestive heart failure: interfering the aldosterone-cardiac extracellular matrix relationship. *Hypertension* 2001; 38:1227-32.

Zhu B-Q, Parmley WW. Hemodynamic and vascular effects of active and passive smoking. *Am Heart J* 1995; 130: 1270-5.

Zornoff LAM, Cicogna AC, Paiva SAR, Spadado J. Remodelamento e seu impacto na progressão da disfunção ventricular. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo* 2002; 3:371-8.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Tornero MTT, Carvalho MSS, Tucci PJF. Influência do acréscimo de manitol à solução nutriente no desempenho mecânico e no grau de edema miocárdico de corações isolados de ratos. *Arq Bras Cardiol* 1995; 64:225-9.