

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu

*Influência do inibidor da enzima conversora da
angiotensina na remodelação cardíaca induzida
pela exposição à fumaça do cigarro*

Daniella de Rezende Duarte

Botucatu

2009

Daniella de Rezende Duarte

**INFLUÊNCIA DO INIBIDOR DA ENZIMA CONVERSORA DA
ANGIOTENSINA NA REMODELAÇÃO CARDÍACA INDUZIDA PELA
EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DO CIGARRO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para a obtenção do título de doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Antônio Mamede Zornoff

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

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Duarte, Daniella de Rezende.

Influência do inibidor da enzima conversora da angiotensina na remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro / Daniela de Rezende Duarte. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,

Universidade Estadual Paulista, 2009.

Orientador: Leonardo Antônio Mamede Zornoff

Co-orientador: Sergio Alberto Rupp Paiva

Assunto CAPES: 40101002

1. Fumo - Efeito fisiológico - Estudo de caso 2. Coração - Doenças

CDD 615.71

Palavras chave: Cadeia pesada da miosina; Exposição à fumaça do cigarro; Inibidor da enzima; Junções comunicantes; Remodelação cardíaca

Dedicatória

*Aos meus pais pelo apoio incondicional
em todos os momentos.*

Agradecimientos

Ao meu orientador...

Prof Dr Leonardo A. M. Zornoff, pela competência, incentivo, dedicação e disponibilidade em todos os momentos.

Ao meu co-orientador...

Prof Dr Sergio A. R. Paiva, pelo exemplo de profissional e pesquisador, e que tanto contribuiu na minha formação.

Aos docentes do Departamento de Clínica Médica: Dra Beatriz B. Matsubara, Marina P. Okoshi, Luis S. Matsubara e Katashi Okoshi, por suas contribuições valorosas sempre.

Aos meus inestimáveis amigos de todas as horas que tanto colaboram nesse projeto, Paula S. Azevedo Gaiolla e Marcos F. Minicucci.

Ao meu marido Eugênio, pela compreensão, companheirismo e por me ajudar a superar todos os obstáculos.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Experimentais do Departamento de Clínica Médica, José Carlos, Mário, Elenize e Vitor pelo auxílio na realização deste trabalho.

As amigas Lucienne e Cristiana, que me auxiliaram no desenvolvimento deste projeto, pelas horas passadas no laboratório.

*Porque eu sou do tamanho do que vejo
E não do tamanho da minha altura...*

Fernando Pessoa

Resumo

O hábito de fumar apresenta importante impacto na saúde da população. A associação entre fumo e doença cardiovascular tem sido amplamente explorada em relação à aterosclerose. Recentemente, evidências clínicas e experimentais sugerem que a exposição ao cigarro pode modular o processo de remodelação ventricular. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do inibidor da enzima conversora da angiotensina no processo de remodelação induzido pela exposição à fumaça do cigarro. Ratos Wistar foram distribuídos em três grupos: 1) grupo controle (C, n=8); 2) grupo exposto à fumaça do cigarro (EFC, n=8); 3) grupo exposto à fumaça do cigarro e recebendo 20 mg/kg/dia de lisinopril (EFC-LIS, n=8). Após dois meses os animais foram submetidos ao estudo funcional, morfométrico, e bioquímico. Para a análise estatística foi utilizado o teste de variância ANOVA complementado por Holm-Sidak, o teste Kruskal-Wallis complementado por Tukey e o teste Mann-Whitney. O nível de significância foi 5%. Resultados: a pressão sistólica caudal foi menor no grupo EFC-LIS ($C = 116 \pm 27$, $EFC = 126 \pm 16$, $EFC-LIS = 89 \pm 12$ mmHg; $p = 0,003$) em relação aos grupos C e EFC; o grupo EFC apresentou maior valor do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, corrigido pelo peso ($C = 8,25 \pm 2,16$, $EFC = 11,76 \pm 1,20$, $EFC-LIS = 9,27 \pm 2,00$ mm/kg; $p = 0,003$), em comparação aos grupos C e EFC-LIS; o diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ajustado pelo peso foi maior nos grupos EFC e EFC-LIS ($C = 18,42 \pm 3,57$, $EFC = 22,94 \pm 1,98$, $EFC-LIS = 22,05 \pm 1,30$ mm/kg; $p = 0,003$); a relação EPP/DDVE foi menor no grupo EFC-LIS em relação ao controle ($C = 0,20$ (0,18-0,23), $EFC = 0,15$ (0,14-0,18), $EFC-LIS = 0,14$ (0,14-0,18); $p = 0,026$). O grupo EFC apresentou menor fração de ejeção ($C = 0,91 \pm 0,02$, $EFC = 0,86 \pm 0,02$, $EFC-LIS = 0,92 \pm 0,02$; $p = 0,002$), comparado aos grupos C e EFC-LIS; o mesmo foi observado em relação à porcentagem de encurtamento ($C = 55,77 \pm 4,41$, $EFC = 48,71 \pm 3,43$,

EFC-LIS = $58,23 \pm 7,63$; $p = 0,006$). O peso do ventrículo esquerdo, corrigido pelo peso foi menor no grupo EFC-LIS ($C = 1,96 \pm 0,10$, $EFC = 2,03 \pm 0,12$, $EFC-LIS = 1,68 \pm 0,14$ mg/g; $p < 0,001$), comparado aos grupos C e EFC. A área seccional dos miócitos foi maior no grupo EFC ($C = 245 \pm 8$, $EFC = 260 \pm 17$, $EFC-LIS = 238 \pm 12$ μm^2 ; $p = 0,01$), em comparação ao grupo EFC-LIS. A distribuição da conexina 43 no disco intercalar foi menor nos grupos EFC e EFC-LIS ($C = 3,70 \pm 0,38$, $EFC = 2,37 \pm 0,58$, $EFC-LIS = 2,32 \pm 0,62$; $p = 0,004$); o grupo EFC apresentou maior porcentagem da isoforma β da cadeia pesada da miosina em relação ao grupo EFC-LIS ($EFC = 23,1$ (11,8-46,6), $EFC-LIS = 6,3$ (5,3-7,1) %; $p = 0,05$). Conclusão: o inibidor da enzima conversora da angiotensina atenua o processo de remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça do cigarro, no modelo do rato. Esse efeito protetor parece ser modulado, pelo menos em parte, por redução da pressão arterial e pela distribuição das isoformas da cadeia pesada da miosina.

Palavras-chave: exposição á fumaça do cigarro, remodelação cardíaca, inibidor da enzima conversora da angiotensina, junções comunicantes, cadeia pesada da miosina.

Abstract

The habit of smoking has important impact on population health. The association between tobacco and cardiovascular disease has been widely explored in relation to atherosclerosis. Recently, clinical and experimental evidences suggest that the exposure to tobacco smoke can modulate the process of ventricular remodeling. The objective of that study was to evaluate the role of the angiotensin-converting enzyme inhibitor on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. Wistar rats were allocated in three groups: 1) group control (C, n=8); 2) group exposed to tobacco smoke (EFC, n=8); 3) group exposed to tobacco smoke and treated with lisinopril 20mg/kg/day (EFC-LIS, n=8). After two months the animals were submitted to the functional study, morphometric, and biochemical. For the statistical analysis was used the ANOVA test of variance complemented by Holm-Sidak, the test Kruskal-Wallis complemented by Tukey and the test the Mann-Whitney. The significance level was 5%. Results: the caudal systolic pressure was smaller in the group EFC-LIS (C = 116 ± 27 , EFC = 126 ± 16 , EFC-LIS = 89 ± 12 mmHg; $p = 0,003$) in relation to the groups C and EFC; the group EFC presented higher value of the systolic diameter of the left ventricle, corrected by body weight (BW) (C = $8,25 \pm 2,16$, EFC = $11,76 \pm 1,20$, EFC-LIS = $9,27 \pm 2,00$ mm/kg; $p = 0,003$), in comparison with the groups C and EFC-LIS; the diastolic diameter of the left ventricle, adjusted by BW was higher in the groups EFC e EFC-LIS (C = $18,42 \pm 3,57$, EFC = $22,94 \pm 1,98$, EFC-LIS = $22,05 \pm 1,30$ mm/kg; $p = 0,003$); the relationship EPP/DDVE was smaller in the group EFC-LIS in relation to the control (C = $0,20$ (0,18-0,23), EFC = $0,15$ (0,14-0,18), EFC-LIS = $0,14$ (0,14-0,18); $p = 0,026$). The group EFC presented smaller ejection fraction (C = $0,91 \pm 0,02$, EFC = $0,86 \pm 0,02$, EFC-LIS = $0,92 \pm 0,02$; $p = 0,002$), compared to the groups C and EFC-LIS; the same was observed in relation to the shortening percentage (C = $55,77 \pm 4,41$, EFC = $48,71 \pm 3,43$, EFC-

LIS = $58,23 \pm 7,63$; $p = 0,006$). The weight of the left ventricle, corrected by BW was smaller in the group EFC-LIS ($C = 1,96 \pm 0,10$, $EFC = 2,03 \pm 0,12$, $EFC-LIS = 1,68 \pm 0,14$ mg/g; $p < 0,001$), compared to the groups C and EFC, the myocyte cross-sectional area was higher in the group EFC ($C = 245 \pm 8$, $EFC = 260 \pm 17$, $EFC-LIS = 238 \pm 12$ m²; $p = 0,01$), in comparison with the group EFC-LIS. The distribution of connexin 43 in the intercalated discs was smaller in the groups EFC e EFC-LIS ($C = 3,70 \pm 0,38$, $EFC = 2,37 \pm 0,58$, $EFC-LIS = 2,32 \pm 0,62$; $p = 0,004$); the group EFC presented higher percentage of the myosin heavy chain β isoform in relation to the group EFC-LIS ($EFC = 23,1$ (11,8-46,6), $EFC-LIS = 6,3$ (5,3-7,1)%; $p = 0,05$). Conclusion: the angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates the process of cardiac remodeling induced by exposure to cigarette smoke, in the rat model. This protective effect appears to be modulated, at least partly, for reduction of the blood pressure and for the distribution of the myosin heavy chain isoform.

Key words: exposure to tobacco smoke, cardiac remodeling, angiotensin-converting enzyme inhibitor, gap junctions, myosin heavy chain.

Sumário

Sumário

Introdução.....	15
Hipótese.....	29
Objetivo.....	31
Material e Métodos.....	33
Resultados.....	43
Discussão.....	62
Conclusão.....	78
Referências Bibliográficas.....	80

Introdução

Fumo

O uso do tabaco surgiu cerca de 1000 anos a.C. nas sociedades indígenas da América Central em rituais religiosos. A partir do século XVI seu uso disseminou-se pela Europa por meio do diplomata francês Jean Nicot. O tabaco era consumido na forma de fumo para cachimbo, mascado ou em charutos. Somente no século XIX teve início a industrialização sob a forma de cigarro e assim, o seu uso se propagou de forma epidêmica por todo o mundo (Goodman; 1993). Atualmente, estima-se que 47% dos homens e 10% das mulheres no mundo são usuários de tabaco.

O hábito de fumar apresenta importante impacto na saúde da população mundial e representa a segunda causa de morte (Yanbaeva et al., 2007). Estima-se que metade de todos os fumantes irá morrer em consequência do uso do tabaco (Peto et al., 1994). Atualmente, o fumo é responsável por mais de 4 milhões de mortes ao ano e em 2030, o fumo irá matar mais de nove milhões de pessoas ao ano (Yanbaeva et al., 2007). Outro dado relevante é que aproximadamente 33% das mortes atribuídas ao cigarro são causadas por doenças cardiovasculares (CDC; 2008). Adicionalmente, estimativas de risco relativo para o fumo e a doença cardiovascular variam entre os estudos de 1,5 a 3,0 (Shaper et al., 1985, Doll et al., 1994).

O fumo é composto por cerca de 6700 substâncias, das quais 4720 foram identificadas (Green et al., 1996) e ao menos 250 delas são tóxicas ou causam câncer (Giovino et al., 2007). Essas substâncias possuem duas procedências: a folha do fumo e a sua combustão que origina a fumaça. A fumaça pode ser dividida em duas fases. A primeira compreende a fase de vapor, composta por monóxido de carbono, dióxido de carbono, óxidos de nitrogênio, ácido acético, formaldeído,

benzeno, dentre outros. A segunda fase é a de partículas, que compreende partículas metálicas, nicotina, anabatina, fenol, naftalina, catecol, hidroquina, colesterol, g-butirolacetona, quinolina, harmana, ácido benzóico, ácido láctico, ácido glicólico e ácido succínico, entre outras. Entretanto, alguns componentes como o fenol e cresol estão divididos entre as fases de vapor e partícula (Smith et al., 2001). A fumaça pode ainda ser dividida em fumaça central, “mainstream smoke”, que é inalada pelo fumante, fumaça secundária, “sidestream smoke”, proveniente da queima do cigarro e em fumaça ambiental composta pela fumaça secundária e pela fumaça expirada pelo fumante (Penn et al; 1994).

Além do grande número de substâncias que compõem o fumo, as reações químicas entre elas durante a combustão resultam em outras tantas substâncias tóxicas. O fumo pode ainda conter resíduos químicos da agricultura como inseticidas, pesticidas e fungicidas.

O fumo afeta múltiplos órgãos e sistemas resultando em várias doenças, chamadas doenças relacionadas ao tabaco. Os efeitos do tabagismo no pulmão e sua relação com as doenças respiratórias, principalmente a doença pulmonar obstrutiva crônica e o câncer de pulmão, estão bem estabelecidos (Yanbaeva et al; 2007). Considerando a relação entre tabagismo e doença cardiovascular, aceita-se que a principal consequência da exposição ao cigarro é o infarto agudo do miocárdio, decorrente da lesão aterosclerótica. English e colaboradores (1940) foram os primeiros a mostrarem a relação entre fumo e aterosclerose e, desde então, diversos autores têm reforçado essa associação. Adicionalmente, o cigarro pode resultar em aumento do estresse oxidativo, ativação e liberação de células e mediadores inflamatórios, aumento da agregação plaquetária, aumento dos níveis

das moléculas de adesão e fibrinogênio com distúrbios de hemostasia e coagulação, disfunção endotelial e vasoconstrição (Yanbaeva et al., 2007).

Recentemente, evidências clínicas e experimentais sugerem que a exposição ao fumo, ou aos compostos produzidos pela queima do cigarro, pode modular o processo de remodelação ventricular.

Remodelação ventricular

A remodelação ventricular é definida como variações moleculares, celulares, genéticas e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, na massa, na geometria e na função do coração (Cohn et al., 2000a; Zornoff et al., 2002).

Diversos estímulos influenciam o processo de remodelação. Fatores mecânicos (como a sobrecarga hemodinâmica pressórica ou volumétrica), bioquímicos (tais como a angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral, interleucinas 1 e 6, fator de crescimento transformador β 1, fator de crescimento símile-insulina-1, óxido nítrico, cálcio, estresse oxidativo) e fatores genéticos (como a cardiomiopatia hipertrófica e dilatada), podem tanto desencadear como regular a remodelação cardíaca (SOLVD Investigators, 1991).

O objetivo primário do processo de remodelação ventricular é manter a função cardíaca estável frente à determinada injúria (Zornoff et al., 2002). Cronicamente, entretanto, a remodelação desempenha papel fundamental na fisiopatologia da disfunção ventricular. A chave para compreender o papel da remodelação na perda da função ventricular foi o reconhecimento de que o processo pode persistir após

injúria inicial (Adams et al., 2004; Satwani et al., 2004), com permanente ativação de vários mecanismos, criando ciclo vicioso que pode resultar em progressiva disfunção cardíaca (Brilla et al., 2000a).

Estudos prévios identificaram diversos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da disfunção ventricular em consequência da remodelação, entre os quais se destacam: hipertrofia celular, alterações da geometria ventricular, modificações nas proteínas contráteis, alterações das junções comunicantes intercelulares e alterações da matriz extracelular.

Um dos principais mecanismos pelos quais os miócitos se adaptam a determinado estímulo é o processo de hipertrofia. De acordo com o mecanismo de hipertrofia, o ventrículo pode adquirir diferentes padrões morfológicos. Assim, sobrecargas de pressão resultam em desenvolvimento de hipertrofia de padrão concêntrico, com predomínio do aumento da espessura da parede sobre o crescimento da cavidade ventricular; em contraste, sobrecargas de volume resultam em replicação em série dos sarcômeros e hipertrofia de padrão excêntrico (Carabello et al., 1992). Usualmente, o padrão existente nas fases avançadas de disfunção ventricular é do tipo excêntrico, embora a relevância deste achado permaneça por ser determinada.

O papel das mudanças na geometria cardíaca no processo de remodelação tem sido estudado e vários estudos têm salientado a sua importância na progressão da falência cardíaca. No modelo de ratos submetidos à constrição da aorta, aproximadamente metade dos animais desenvolveu dilatação ventricular esquerda, acompanhada de sinais de insuficiência cardíaca congestiva, enquanto o outro grupo permaneceu com padrão concêntrico de hipertrofia, sem sinais de insuficiência. O estudo da função contrátil, por meio da análise do músculo papilar

não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos (Bregagnollo et al., 2007). Adicionalmente, no modelo de ratos infartados, diferentes estudos verificaram que a contratilidade miocárdica não apresentava alterações em comparação a animais sem infarto. Esse fenômeno ocorria apesar da presença de dilatação ventricular esquerda, acompanhada de sinais de disfunção e de insuficiência cardíaca, como congestão pulmonar (Anand, 2002). Os autores concluíram que, apesar da capacidade intrínseca do músculo na geração de força (contratilidade) não apresentar alteração, os ratos com insuficiência cardíaca apresentavam função da câmara ventricular deprimida. Deste modo, o próprio processo de remodelação, pelas mudanças geométricas ocorridas, poderia comprometer a função global do coração.

Outro fator que caracteriza o fenômeno da remodelação é a alteração qualitativa e quantitativa na expressão de várias proteínas miocárdicas. Um exemplo dessa modificação é a redução na quantidade de RNA mensageiro (RNAm) para proteínas formadoras dos canais responsáveis pela captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático no miócito. Com a redução da captação de cálcio, ocorre aumento do cálcio ligado a troponina, o que interfere no relaxamento miocárdico (Colucci et al., 1997). O processo de remodelação ventricular também se caracteriza por alterações na miosina, a principal proteína contrátil, composta de 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 capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativos localizados nas cadeias pesadas, sendo que a fração α possui maior capacidade

ATPásica. Portanto, a composição das isoenzimas determina a capacidade contrátil do miócito. Na remodelação ventricular usualmente ocorre aumento da isoforma V3, acompanhado de diminuição da isoforma V1 (Cicogna et al., 2000; Sampaio et al., 2003).

Durante o processo de remodelação cardíaca pode ocorrer remodelação das junções comunicantes, com conseqüente alteração na comunicação intercelular dos cardiomiócitos. As conexinas são os constituintes das junções comunicantes ou gap junctions, regiões que conectam o citoplasma das células permitindo o acoplamento elétrico e metabólico (Söhl & Willecke, 2004). As junções comunicantes estão localizadas nos discos intercalares dos miócitos. A conexina 43 (Cx43) é o principal componente das junções comunicantes do ventrículo de mamíferos (Schulz et al., 2004; van Veen et al., 2001). O acoplamento é fundamental para manutenção da organização celular e regulação dos processos biológicos, como homeostase tecidual, secreção glandular, crescimento e diferenciação celular (Quist et al., 2000; Lampe et al., 2006). Isso ocorre por meio da troca de moléculas hidrofílicas com baixo peso molecular, como sódio, potássio e cálcio e segundos mensageiros, como AMPc/GMPc, ADT/ATP e inositol trifosfato (van Veen et al., 2002; Formigli et al., 2003; King & Bertram, 2005). Diversos estudos, no modelo do rato, mostram ocorrência de alterações nas junções comunicantes em situações como hipertrofia ventricular induzida por hipertensão ou após infarto agudo do miocárdio (Uzzaman et al., 2000; Emdad et al., 2001; Kostin et al., 2003; Severs et al., 2004; Vetterlein et al., 2006; Fialová et al., 2007).

A matriz extracelular também sofre alterações no processo de remodelação. Em diversos modelos de agressão, foi verificado que pode ocorrer aumento do depósito de colágeno tipos I e III e de fibronectina. Adicionalmente, existem

evidências de que a fibrose miocárdica é conseqüente ao aumento da expressão de genes relacionados a fatores de crescimento derivado de peptídeos, principalmente fator de crescimento de transformação tipo $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Em diferentes modelos experimentais e clínicos, a fibrose está associada com a piora progressiva da função ventricular. Outro aspecto relevante é que inúmeras evidências sugerem que o sistema renina angiotensina aldosterona, noradrenalina e endotelina, via fibroblastos, são os principais mediadores bioquímicos envolvidos no aumento da matriz extracelular do tecido conjuntivo miocárdico (Boluyt et al., 1995).

Fumo e remodelação ventricular

Nos últimos anos, diversos estudos têm analisado as conseqüências do tabagismo sobre variáveis morfológicas e funcionais cardíacas.

Alguns estudos avaliaram a influência de componentes isolados do cigarro no coração. Por exemplo, Greenspan e colaboradores (1969) mostraram os efeitos da nicotina nas variáveis hemodinâmicas e funcionais do coração, com vasoconstrição e piora funcional. Loennechen e colaboradores (2002) observaram que a exposição crônica ao monóxido de carbono aumenta a expressão do gene para endotelina-1 e induz a hipertrofia miocárdica. Em animais submetidos à exposição ao monóxido de carbono após infarto agudo do miocárdio, foi observada intensificação da remodelação cardíaca com maior dilatação do ventrículo esquerdo, hipertrofia da parede contra lateral e piora da função cardíaca (Mirza et al., 2005).

Em 1999, Paiva e colaboradores iniciaram estudos sobre os efeitos da exposição à fumaça do cigarro sobre variáveis cardíacas. Inicialmente, foram

avaliados os efeitos do fumo sobre corações normais de ratos. A exposição à fumaça do cigarro por um mês resultou na redução da função sistólica avaliada por meio de variáveis ecocardiográficas: fração de ejeção e fração de encurtamento sistólico. Foi ainda verificada diferença no diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo. O estudo funcional por meio da avaliação do músculo papilar não mostrou alteração na contratilidade (Paiva et al., 2003). A exposição à fumaça do cigarro por dois e seis meses também resultou em piora da função sistólica, além de aumento do átrio esquerdo e dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, a avaliação da função diastólica através da relação E/A não encontrou diferença entre os grupos (Castardeli et al., 2005, Castardeli et al., 2008).

Os efeitos da exposição à fumaça do cigarro também foram analisados em animais submetidos a infarto agudo do miocárdio. O primeiro estudo avaliou os efeitos do tabagismo quando a exposição à fumaça era iniciada antes do infarto agudo do miocárdio. Os animais expostos apresentaram maior diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e maior pressão sistólica máxima (Paiva et al., 2005). Novo estudo avaliou os efeitos do tabagismo quando a exposição à fumaça do cigarro era iniciada após o infarto experimental. Após 6 meses de exposição os autores observaram alterações morfológicas do ventrículo esquerdo, caracterizadas pelo aumento da área seccional dos miócitos, indicando hipertrofia cardíaca. Essa alteração foi associada a maiores áreas ventriculares do ventrículo esquerdo, tanto sistólica como diastólica, sugerindo intensificação do processo de remodelação ventricular com a exposição ao fumo. Em adição, houve queda da função sistólica, avaliada pela fração de variação de área, e diastólica, observada pela derivada negativa de pressão ($-dp/dt$) no grupo fumante, apesar de não haver alteração em relação ao tamanho do infarto (Zornoff et al., 2006a).

Portanto, as evidências apresentadas até o momento permitem concluir que, no modelo de ratos, normais ou submetidos à agressão, a exposição à fumaça do cigarro resulta em hipertrofia, aumento da cavidade ventricular e piora de diferentes variáveis funcionais.

Papel do inibidor da enzima conversora da angiotensina na remodelação ventricular

Uma das características mais marcantes da remodelação cardíaca é que o processo resulta, freqüentemente, em queda progressiva da função ventricular e está relacionada ao aumento da mortalidade (Pfeffer et al., 1990). Assim, inúmeras estratégias vêm sendo utilizadas para prevenir ou atenuar o processo de remodelação ventricular secundário a diferentes modelos de agressão.

Existe número substancial de estudos experimentais e clínicos que suportam o papel do sistema renina angiotensina no processo de remodelação ventricular e na progressão da insuficiência cardíaca congestiva (Udelson et al., 2003). Assim como a norepinefrina plasmática, o grau de aumento na atividade da renina no plasma determina o prognóstico dos pacientes com ICC (Schrier et al., 1999).

Na via clássica do sistema renina angiotensina, a renina é secretada pelas células justaglomerulares do rim e atua na transformação do angiotensinogênio circulante em angiotensina I. A angiotensina I é, então, convertida nas células endoteliais em angiotensina II pela enzima conversora da angiotensina (ECA). A ECA também participa da inativação de dois peptídeos com ação vasodilatadora, a bradicinina e a kalidina (Boehm et al., 2002).

A angiotensina II é potente vasoconstritor e age no rim e coração por meio da ligação com a proteína G dos receptores AT-1 e AT-2. A angiotensina II é rapidamente liberada pelo miocárdio em resposta ao estresse mecânico e está relacionada com o aumento da síntese de proteínas (Sadoshima et al., 1993), estimulação da produção de colágeno e proliferação de fibroblastos (Brilla et al., 1994). Além disto, suprime a atividade das colagenases, responsáveis pela degradação do colágeno intersticial, resultando em progressivo aumento da deposição de colágeno no interstício (Brilla et al., 2000b). A angiotensina II também aumenta a permeabilidade da artéria coronária, permitindo difusão dos fatores de crescimento para o interstício e apresenta efeito mitogênico nos miócitos (Rakusan et al., 1992). A estimulação do receptor AT-1 pela angiotensina II ativa a via intracelular das MAP-kinases (“mitogen-activated protein kinase”), enzimas que participam da promoção do crescimento celular (extracellular signal-regulated kinase ou ERK1/2 e p38- β) e da apoptose (como a kinase amino-terminal c-Jun ou JNK e p38- α) (Opie, 2004).

A ativação dos receptores AT-1 da angiotensina II também está envolvido com o declínio das junções comunicantes, com conseqüente piora da comunicação intercelular, o que ocorre de forma progressiva na evolução da insuficiência cardíaca. (De Mello, 1996). Estudo com bloqueio do receptor AT-1, utilizando antagonista dos receptores da angiotensina II (losartan) em hamster com cardiomiopatia, reduziu a remodelação das junções comunicantes prevenindo a piora da condução e a fibrose miocárdica (De Mello & Specht, 2006).

Além dos efeitos diretos sobre miócito, vaso e matriz extracelular, a angiotensina II facilita a liberação de noradrenalina da extremidade do sistema

nervoso simpático miocárdico, intensificando o predomínio de mediadores tróficos e vasoconstritores (Colucci et al., 1997).

A angiotensina II participa também da retenção de sódio e água por meio da estimulação da secreção de aldosterona e por aumentar o transporte de sódio no túbulo proximal, o que perpetua a reabsorção de sódio determinada pela aldosterona (Schrier et al., 1999). Além disso, contribui para a retenção de água devido ao aumento da liberação de vasopressina, que acarreta redução da excreção de água livre (Colucci et al., 1997). A angiotensina II apresenta, ainda, outras ações no rim, como a vasoconstrição das arteríolas aferentes e eferentes e estimulação da contração mesangial no glomérulo reduzindo a superfície de filtração glomerular (Schrier et al., 1999).

Considerando os mecanismos fisiopatológicos descritos acima, o bloqueio do sistema renina angiotensina é estratégia atraente para a atenuação da remodelação. Essa hipótese foi testada em diversos trabalhos clínicos e experimentais.

Pfeffer e colaboradores (1985a), em estudo experimental, verificaram que a administração de inibidor da enzima conversora da angiotensina (IECA), nos primeiros dias após a instalação do infarto agudo do miocárdio em ratos, além de reduzir a pré e pós-carga, interferiu na remodelação ventricular, levando à atenuação da dilatação ventricular e da disfunção miocárdica. Esses efeitos resultaram, após seguimento de um ano, em aumento da sobrevivência dos animais tratados (Pfeffer et al., 1985b).

Em modelo de estenose aórtica, o tratamento com IECA reduziu a hipertrofia do ventrículo esquerdo induzida pela sobrecarga de pressão, além de diminuir a mortalidade, a incidência de insuficiência cardíaca congestiva e preservar a função sistólica (Bregagnollo et al., 2005; Gonçalves et al., 2005).

Em ratos com hipertensão renovascular, o lisinopril reduziu a necrose dos miócitos (Kabour et al., 1995). Estudo em ratos SHR, com diferentes doses de lisinopril, mostrou que houve atenuação da fibrose e redução da concentração miocárdica de angiotensina II, mesmo sem controle adequado da pressão arterial. De outro modo, o controle da hipertrofia do ventrículo esquerdo foi alcançado no grupo onde a dose do lisinopril foi suficiente para normalizar a pressão arterial (Brilla et al., 1991). Em estudo semelhante com ratos SHR já apresentando miocardiopatia hipertensiva avançada, também houve redução da fibrose e melhora na função sistólica com uso do lisinopril (Brilla et al., 1996).

Os efeitos dos inibidores da enzima conversora da angiotensina também têm sido estudados na remodelação miofibrilar. Em ratos submetidos a infarto agudo do miocárdio, o uso do IECA atenuou a remodelação miofibrilar, prevenindo as mudanças na composição da cadeia pesada de miosina e melhorando a atividade ATPásica (Wang et al., 2002, Wang et al., 2004). Em animais com hipertrofia de ventrículo esquerdo o IECA aumentou a expressão do RNAm para isoforma α da cadeia pesada da miosina (Iwanaga et al., 2000).

Estudos clínicos confirmaram o efeito benéfico do IECA em diferentes situações. Em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, foi observado que a administração de IECA diminuiu a mortalidade (CONSENSUS, 1987, SOLVD, 1991), retardou a progressão da insuficiência cardíaca (Kleber et al., 1991) e aumentou a tolerância ao exercício (FEST, 1995), quando comparada ao placebo. Estudos clínicos envolvendo pacientes com infarto agudo do miocárdio observaram que os pacientes que receberam IECA apresentaram menor mortalidade (SAVE, 1992, AIRE, 1993, GISSI-3, 1994, ISIS-IV, 1995, TRACE, 1995, SMILE, 1995, FAMIS, 1997). Em pacientes com doença aterosclerótica ou alto risco para doença

cardiovascular, a administração de IECA reduziu a mortalidade (EUROPA, 2003; HOPE, 2000) e o desenvolvimento de insuficiência cardíaca (HOPE, 2003).

Portanto, a administração do IECA está associada com a atenuação da remodelação e melhora do prognóstico em diferentes modelos de agressão. No entanto, os efeitos do bloqueio do sistema renina angiotensina na remodelação induzida pelo tabagismo não são conhecidos.

Hipótese

Formulamos a hipótese de que a administração do IECA atenua o processo de remodelação ventricular induzido pela exposição à fumaça do cigarro em ratos.

Objetivo

Investigar o papel do lisinopril no processo de remodelação ventricular induzido pela exposição à fumaça do cigarro, considerando os seguintes aspectos: função ventricular, hipertrofia e geometria miocárdica, presença e distribuição da conexina 43 nas junções comunicantes e distribuição das isoformas da cadeia pesada da miosina.

Material e Métodos

Delineamento

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (protocolo nº 554/2006), estando em conformidade com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados ratos machos, Wistar, provenientes e condicionados no Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina - UNESP, Botucatu. Os animais foram expostos a ciclo claro-escuro de 12 horas, à temperatura ambiente de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade controlada, receberam dieta comercial padrão e livre acesso à água.

Ao atingirem cerca de 250g, os animais foram distribuídos em três grupos: 1) grupo controle (C, n=8); 2) grupo exposto à fumaça do cigarro (EFC, n=8); 3) grupo exposto à fumaça do cigarro e recebendo lisinopril na dose de 20 mg/kg/dia (EFC-LIS, n=8).

O lisinopril foi oferecido aos animais diluído na água ofertada na gaiola. Inicialmente, foi quantificada a média da ingesta diária de água dos animais e calculada a diluição para que os animais recebessem cerca de 20mg/kg/dia de lisinopril. Trabalhos anteriores mostraram que essa dose é eficaz em prevenir a hipertrofia ventricular, apresenta efeito anti-hipertensivo e reduz a necrose dos miócitos (Kabour et al., 1995).

O método utilizado para a exposição à fumaça do cigarro foi proposto por Simani e colaboradores (1974), implementado por Wang e colaboradores (1999) e já

padronizado em nosso laboratório (Paiva et al., 2003, Castardeli et al., 2005, Paiva et al., 2005, Zornoff et al., 2006a, Zornoff et al., 2006b, Castardeli et al., 2007, Zornoff et al., 2007; Castardeli et al., 2008). Os animais eram colocados em câmara transparente com dimensões de aproximadamente 95 x 80 x 65 cm, que permite que vários animais sejam expostos à fumaça ao mesmo tempo. Esta câmara é conectada ao aparelho de fumar que retira a fumaça por vácuo e a libera na câmara. Após trinta minutos, a fumaça era exaurida e o procedimento repetido. Inicialmente a fumaça foi liberada a uma taxa de cinco cigarros durante trinta minutos, duas vezes ao dia. A exposição foi aumentada progressivamente, durante a primeira semana até atingir a taxa de 10 cigarros/30 minutos quatro vezes por dia, duas vezes no período da manhã com intervalo de dez minutos, e duas no período da tarde, essa taxa permaneceu até o final do estudo, perfazendo dois meses de exposição. Esse modelo expõe os animais à fumaça denominada central “mainstream”, o que equivale ao fumo ativo.

Foi utilizado cigarro comercial composto por 1,1mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono.

O período de observação foi escolhido de acordo com experimento anterior, em que os animais submetidos à exposição à fumaça do cigarro por dois meses apresentaram alterações nas variáveis cardíacas semelhantes aos animais expostos por seis meses (Castardeli et al., 2008). A eficácia da exposição à fumaça do cigarro foi assegurada pela análise dos níveis de carboxihemoglobina realizada em estudo anterior em condições experimentais semelhantes (Castardeli et al., 2005).

Avaliação da pressão sistólica caudal e frequência cardíaca

Após 45 dias de exposição à fumaça do cigarro, a pressão sistólica caudal e a frequência cardíaca foram avaliadas.

A pressão sistólica foi avaliada utilizando plestimógrafo de cauda, constituído por polígrafo (Byo-Sistem PE 300, NARCO), sensor e eletroesfigmomanômetro, possibilitando o registro gráfico da pressão arterial. Os animais foram colocados em caixa aquecida durante cinco minutos. Após, foram transferidos para um cilindro que permite a exposição da cauda do animal onde é acoplado o sensor ligado ao plestimógrafo. A pressão foi registrada em papel na velocidade de 2,5mm/s. A frequência cardíaca foi avaliada por meio do registro eletrocardiográfico.

Estudo ecocardiográfico

Após dois meses de exposição à fumaça do cigarro e ao tratamento, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilidino (1 mg/kg), por via intramuscular, para realização do estudo ecocardiográfico. Foi realizada tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em canaleta especialmente projetada e que permite leve rotação lateral esquerda para realização do exame.

O ecocardiograma transtorácico foi realizado com ecocardiógrafo Philips (modelo TDI 5500) equipado com transdutor eletrônico multifrequencial até 12 MHz. A avaliação do fluxo sanguíneo intracardíaco transvalvar mitral e aórtico, foi realizada com o mesmo transdutor operando em 5,0 MHz. Para medir as estruturas

cardíacas, utilizamos imagens monodimensionais (modo-M), obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M entre os músculos papilares, logo abaixo do plano da valva mitral. 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 mono-dimensional (velocidade: 100 mm/s) foi realizado por meio da impressora modelo UP-890MD da Sony Co.

As medidas foram obtidas de acordo com as recomendações da American Society of Echocardiography (Henry et al., 1980). O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo (EPP) 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 (ondas E e A) obtido com o transdutor na posição apical quatro câmaras. As medidas referentes aos fluxos foram realizadas diretamente no monitor do ecocardiógrafo.

O conjunto de variáveis obtidas por meio do estudo ecocardiográfico possibilita avaliar a função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo além de permitir acesso aos indicadores de remodelação cardíaca (como massa miocárdica e dimensão da câmara cardíaca).

Estudo morfológico

Após o estudo funcional, os animais sofreram eutanásia com uso de 100mg/kg de pentobarbital. Os ventrículos direito e esquerdo, incluindo o septo interventricular, foram pesados e preparados para análise morfométrica. A relação entre a massa do coração, ajustada para a massa corporal do rato, foi usada para estimar o grau de hipertrofia ventricular. Fragmentos do átrio, VD, VE, fígado e pulmão foram separados e pesados, correspondendo ao peso úmido, em seguida, os fragmentos foram colocados em estufa, regulada em 80°C, por 48 horas, após esse período foram novamente pesados, obtendo-se assim o peso seco, o que permitiu determinar o percentual de água através da seguinte fórmula:

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

Amostras do ventrículo esquerdo foram armazenadas e congeladas e o restante foi mantido em solução de formol a 10% por 24 horas, após foi colocado em solução contendo álcool a 70%, onde permaneceu por mais 24 horas e, a seguir, foi incluído em parafina.

A análise da área seccional dos miócitos foi realizada através de cortes coronais entre 4-5 micras do tecido incluído em parafina. O tecido miocárdico obtido foi corado em lâmina, com solução de Hematoxilina-Eosina (HE). A área seccional dos miócitos foi medida com o auxílio de microcomputador equipado com programa de análise de imagens (IMAGE-PRO PLUS 3.0, Media Cybernetics, Silver Spring Maryland-USA), e foi utilizada como parâmetro de hipertrofia. Foram medidos na lâmina de cada animal cerca de 50 miócitos localizados na camada subendocárdica

da parede muscular do ventrículo esquerdo, com núcleo claramente central para uniformizar o conjunto de miócitos dos diferentes grupos.

Imunohistoquímica para Conexina 43

A análise da conexina 43 (Cx43) foi realizada por imunohistoquímica através da adaptação do método descrito por Saffitz e colaboradores (2000a). Lâminas foram previamente preparadas com solução aderente de poly-d-lisine (Fluka) e permaneceram em estufa a 60°C por 24 horas, para melhor fixação. Foram então fixados cortes histológicos de 3 µm dos fragmentos do ventrículo esquerdo emblocados em parafina. A desparafinização foi feita com banhos sucessivos de xilol, álcool 100°, álcool 95° e álcool 70°, seguida de hidratação em água destilada. Em seguida, os cortes histológicos foram colocados em solução tampão com citrato a 0,01M pH 6,0 e submetidos a ambiente de microondas por 10 minutos para recuperação antigênica. Após resfriamento de 20 minutos, as lâminas foram lavadas em tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,2 e incubadas por trinta minutos em solução de albumina sérica bovina (BSA) a 3% (solução de BSA em PBS) para bloqueio de reações inespecíficas. Após os trinta minutos, os cortes foram incubados “overnight” a 4°C em câmara úmida com anticorpo primário (*policlonal anti-rabbit connexin 43*; Abcam). A diluição utilizada foi de 1:100. Foi então realizada lavagem das lâminas em PBS e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (*Texas Red anti-rabbit IgG*; Vector), na diluição de 1:50, por uma hora em temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em PBS e cobertas com meio de montagem, composto de glicerina tamponada e laminula. Para cada bateria de reações de imunohistoquímica realizada (dez lâminas), o controle negativo correspondeu a uma

lâmina de ventrículo esquerdo em que se omitiu o anticorpo primário (Uzzaman et al., 2000).

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

As reações de imunohistoquímica foram analisadas quanto à localização da proteína no miócito (no disco intercalar ou fora do disco intercalar) e quanto à intensidade de marcação de acordo com escores pré-estabelecidos.

Localização:

- ++++ Totalmente no disco intercalar
- +++ Maioria no disco intercalar
- ++ Metade no disco intercalar e metade fora do disco
- + Minoria no disco intercalar
- Nenhuma marcação no disco intercalar

Intensidade de Marcação:

- +++ Fortemente marcado
- ++ Moderadamente marcado
- + Fracamente marcado

Eletroforese para cadeia pesada da miosina

O estudo das isoformas α e β da miosina de cadeia pesada foi realizado através da eletroforese de proteína em SDS-page (Vescovo et al., 1998).

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; e inibidor de protease 1:100) a 60 mg 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 (Talmadge & Roy; 1993). 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 μ g 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) (Vescovo et al., 1998).

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 (Vescovo et al., 1998). 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.

Análise Estatística

No caso de distribuição normal, foram calculados os valores médios e os desvios padrões dos grupos estudados e o teste de variância ANOVA complementado pelo teste de Holm-Sidak foi utilizado para a comparação dos grupos. Para as variáveis não paramétricas, foram calculados os valores da mediana e os intervalos interquartis dos grupos estudados e foram utilizados o teste de Mann-Whitney e o teste de Kruskal-Wallis complementado pelo teste de Tukey.

O nível de significância adotado foi de 5%.

As análises estatísticas foram feitas com o programa SigmaStat 3.1 e o gráficos foram elaborados a partir do programa SigmaPlot 9.0.

Resultados

Avaliação do peso final

Os animais não apresentaram diferença entre os grupos em relação ao peso corporal (C = 382 ± 46 g, EFC = 346 ± 42 g; EFC-LIS = 358 ± 15 g; $p = 0,174$), dados apresentados na tabela 1.

Pressão sistólica caudal e frequência cardíaca – 45 dias

Não houve diferença em relação aos valores da frequência cardíaca (C = 284 (273-297) bpm, EFC = 265 (257-291) bpm; EFC-LIS = 261 (253-294) bpm; $p = 0,429$) entre os grupos. Por outro lado, os valores da pressão sistólica caudal foram menores no grupo EFC-LIS (C = 116 ± 27 mmHg, EFC = 126 ± 16 mmHg; EFC-LIS = 89 ± 12 mmHg; $p = 0,003$) em relação aos grupos C e EFC (figura 1). Os dados estão apresentados na tabela 1.

Estudo ecocardiográfico

Os dados relativos às análises ecocardiográficas estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Considerando os dados morfológicos (tabela 2), o grupo EFC apresentou maiores valores do diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, corrigidos pelo peso corpóreo (C = $8,25 \pm 2,16$ mm/kg; EFC = $11,76 \pm 1,20$ mm/kg; EFC-LIS = $9,27 \pm 2,00$ mm/kg; $p = 0,003$), em comparação aos grupos C e EFC-LIS (figura 2). Os

animais dos grupos EFC e EFC-LIS apresentaram maiores valores do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, ajustado pelo peso corporal, comparado ao grupo C (C = $18,42 \pm 3,57$ mm/kg; EFC = $22,94 \pm 1,98$ mm/kg; EFC-LIS = $22,05 \pm 1,30$ mm/kg; $p = 0,003$). O grupo EFC-LIS apresentou menor relação EPP/DDVE que o grupo controle (C = $0,20$ ($0,18-0,23$); EFC = $0,15$ ($0,14-0,18$); EFC-LIS = $0,14$ ($0,14-0,18$); $p = 0,026$; figura 3). Na análise das outras variáveis, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Na avaliação dos dados funcionais (tabela 3), o grupo EFC apresentou menor fração de ejeção (C = $0,91 \pm 0,02$; EFC = $0,86 \pm 0,02$; EFC-LIS = $0,92 \pm 0,02$; $p = 0,002$), quando comparado aos grupos C e EFC-LIS (figura 4); o mesmo fenômeno foi observado em relação à porcentagem de encurtamento (C = $55,77 \pm 4,41$; EFC = $48,71 \pm 3,43$; EFC-LIS = $58,23 \pm 7,63$; $p = 0,006$; figura 5). Na análise das outras variáveis, não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Estudo morfométrico

Os dados relativos ao estudo morfométrico estão apresentados na tabela 4.

O peso do ventrículo esquerdo, corrigido pelo peso corporal dos animais, foi estatisticamente menor no grupo EFC-LIS (C = $1,96 \pm 0,10$ mg/g; EFC = $2,03 \pm 0,12$ mg/g; EFC-LIS = $1,68 \pm 0,14$ mg/g; $p < 0,001$), quando comparado aos grupos controle e fumo (figura 6).

Em relação à área seccional dos miócitos, o grupo EFC apresentou maiores valores (C = 245 ± 8 μm^2 ; EFC = 260 ± 17 μm^2 ; EFC-LIS = 238 ± 12 μm^2 ; $p = 0,01$), em comparação ao grupo EFC-LIS (figura 7).

Considerando as demais variáveis, não foram encontradas diferenças significantes entre os dois grupos.

Imunohistoquímica

Os dados relativos à imunohistoquímica estão apresentados na tabela 5.

A intensidade de marcação da conexina 43 não apresentou diferença entre os grupos. Entretanto a sua distribuição no disco intercalar foi menor nos grupos EFC e EFC-LIS (C = $3,70 \pm 0,38$; EFC = $2,37 \pm 0,58$; EFC-LIS = $2,32 \pm 0,62$, $p = 0,004$; figura 8) em relação ao grupo controle.

Eletroforese para cadeia pesada da miosina

O grupo EFC apresentou maior porcentagem da isoforma β da cadeia pesada da miosina em relação ao grupo tratado com lisinopril (EFC = 23,1 (11,8 - 46,6) %; EFC-LIS = 6,3 (5,3 - 7,1) %; $p < 0,05$), tabela 6. Por problemas técnicos, não conseguimos realizar a análise do grupo controle.

Tabela 1. Peso, frequência cardíaca e pressão sistólica caudal.

	Grupo C (n=8)	Grupo EFC (n=8)	Grupo EFC-LIS (n=8)
PC (gramas)	382 ± 46	346 ± 42	358 ± 15
FC (bpm)	284 (273-297)	265 (257-291)	261 (253-294)
PS (mmHg)	116 ± 27	126 ± 16	89 ± 12 * ‡

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; PC: peso corporal do animal; FC: frequência cardíaca; PS: pressão sistólica caudal. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). * $p < 0,05$ vs C; ‡ $p < 0,05$ vs EFC.

Tabela 2. Resultados morfológicos do Ecocardiograma.

	Grupo C (n=8)	Grupo EFC (n=8)	Grupo EFC-LIS (n=8)
AE (mm)	3,88 ± 0,65	4,06 ± 0,76	3,93 ± 0,42
Ao (mm)	3,35 ± 0,29	3,26 ± 0,28	3,22 ± 0,33
AE/Ao	1,16 ± 0,18	1,24 ± 0,19	1,23 ± 0,16
AE/PC (mm/kg)	10,22 ± 1,69	11,69 ± 1,38	10,99 ± 1,32
DDVE (mm)	6,92 ± 0,99	7,87 ± 0,58	7,90 ± 0,56
DDVE/PC (mm/kg)	18,42 ± 3,57	22,94 ± 1,98 *	22,05 ± 1,30 *
DSVE (mm)	3,09 ± 0,67	4,03 ± 0,35	3,32 ± 0,72
DSVE/PC (mm/kg)	8,25 ± 2,16	11,76 ± 1,20 * #	9,27 ± 2,00
EPP (mm)	1,40 (1,27-1,67)	1,28 (1,11-1,46)	1,15 (1,10-1,33)
EPP/DDVE	0,20 (0,18-0,23)	0,15 (0,14-0,18)	0,14 (0,14-0,18) *
IMVE (g/kg)	1,79 ± 0,22	1,94 ± 0,37	1,77 ± 0,21

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; AE: diâmetro do átrio esquerdo; Ao: diâmetro da aorta; PC: peso corporal do animal; DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; EPP: espessura da parede posterior; IMVE: índice de massa do ventrículo esquerdo. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). *p < 0,05 vs C; # p < 0,05 vs EFC-LIS.

Tabela 3. Resultados funcionais do Ecocardiograma.

	Grupo C (n=8)	Grupo EFC (n=8)	Grupo EFC-LIS (n=8)
Onda E (cm/s)	76 ± 14	76 ± 6	74 ± 9
Onda A (cm/s)	49 (43-54)	43 (40-54)	42 (35-44)
E/A	1,60 ± 0,36	1,66 ± 0,23	1,85 ± 0,42
TRIV (ms)	24,25 ± 5,85	23,12 ± 5,11	19,50 ± 4,24
VAo	83,75 ± 21,78	88,87 ± 15,22	98,25 ± 4,24
FC (bpm)	284 (273-297)	265 (257-291)	261 (253-294)
FE	0,91 ± 0,02	0,86 ± 0,02 *#	0,92 ± 0,02
% ENC	55,77 ± 4,41	48,71 ± 3,43 *#	58,23 ± 7,63

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; E/A: relação entre as ondas E e A avaliadas pelo fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; VAo: velocidade do sangue na aorta; FC: frequência cardíaca ; FE: fração de ejeção; % de Enc: porcentagem de encurtamento. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica) ou mediana com percentil 25 e 75 (para distribuição não paramétrica). * p < 0,05 vs C; # p < 0,05 vs EFC-LIS.

Tabela 4. Resultados morfométricos.

	Grupo C (n=8)	Grupo EFC (n=8)	Grupo EFC-LIS (n=8)
VE (g)	0,75 ± 0,12	0,70 ± 0,11	0,60 ± 0,06
VD (g)	0,20 ± 0,04	0,19 ± 0,04	0,19 ± 0,04
VE/PC (mg/g)	1,96 ± 0,10	2,03 ± 0,12 #	1,68 ± 0,14 *
VD/PC (mg/g)	0,53 ± 0,05	0,55 ± 0,09	0,53 ± 0,05
Teor água no pulmão (%)	3,41 ± 0,29	3,24 ± 0,47	3,49 ± 0,44
Teor água fígado (%)	3,18 ± 0,11	3,19 ± 0,35	3,49 ± 0,44
Área do miócito (μm ²)	245 ± 8	260 ± 17 #	238 ± 12

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; PC: peso corporal do animal; AE: átrio esquerdo; Área seccional do miócito. Os dados são expressos em média ± desvio padrão (para distribuição paramétrica). *p < 0,05 vs C; # p < 0,05 vs EFC-LIS.

Tabela 5. Resultados conexina 43.

	Grupo C (n=4)	Grupo EFC (n=6)	Grupo EFC-LIS (n=6)
I-cx43	2,50 ± 0,71	2,13 ± 0,53	2,17 ± 0,73
D-cx43	3,70 ± 0,38	2,37 ± 0,58 *	2,32 ± 0,62 *

Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; I –cx43: intensidade de marcação da conexina 43 no disco intercalar; D-cx43: distribuição da conexina 43 no disco intercalar. Os dados são expressos em média ± desvio padrão. * p < 0,05 vs C.

Tabela 6. Resultado isoforma β da cadeia pesada da miosina

	Grupo EFC (n=3)	Grupo EFC-LIS (n=3)
Isoforma β (%)	23,1 (11,8 – 46,6)	6,3 (5,3 – 7,1) *

Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril; Isoforma β : porcentagem da isoforma β da cadeia pesada da miosina. Os dados são expressos em mediana com percentil 25 e 75.

*p < 0,05 vs EFC.

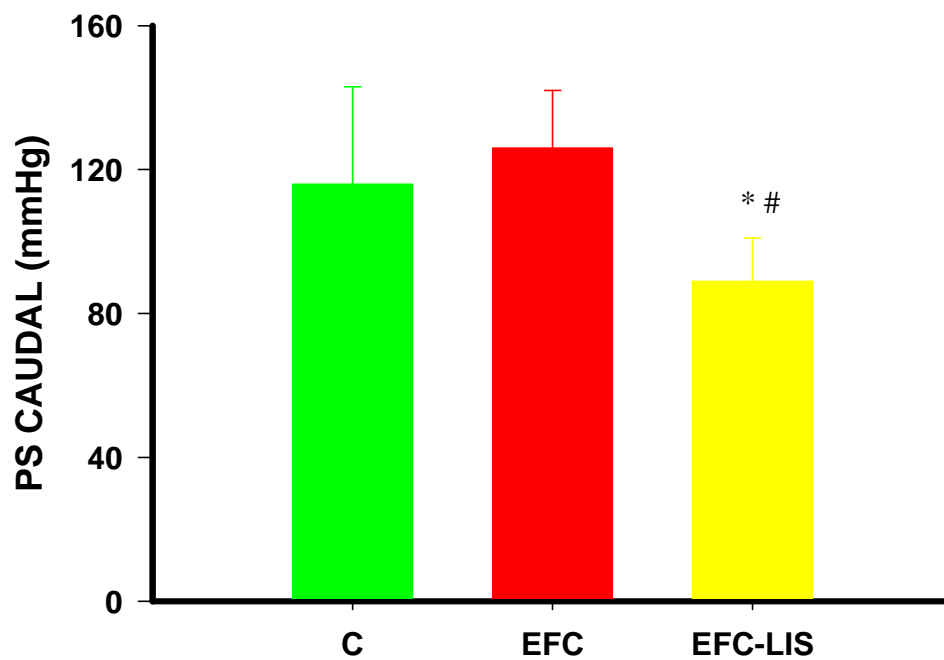


Figura 1: Pressão sistólica caudal. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs EFC.

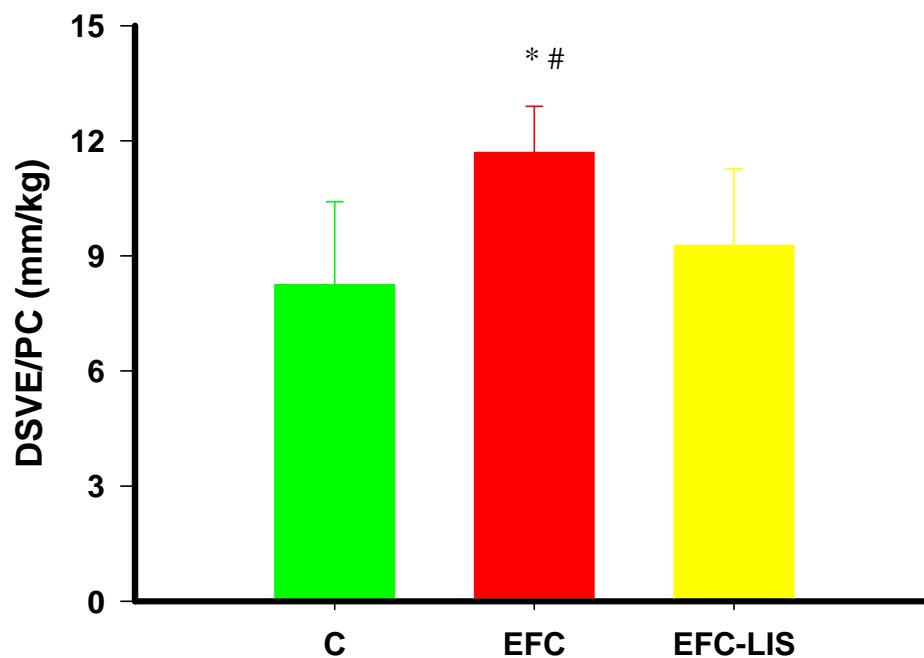


Figura 2: Diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal do animal. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs EFC-LIS.

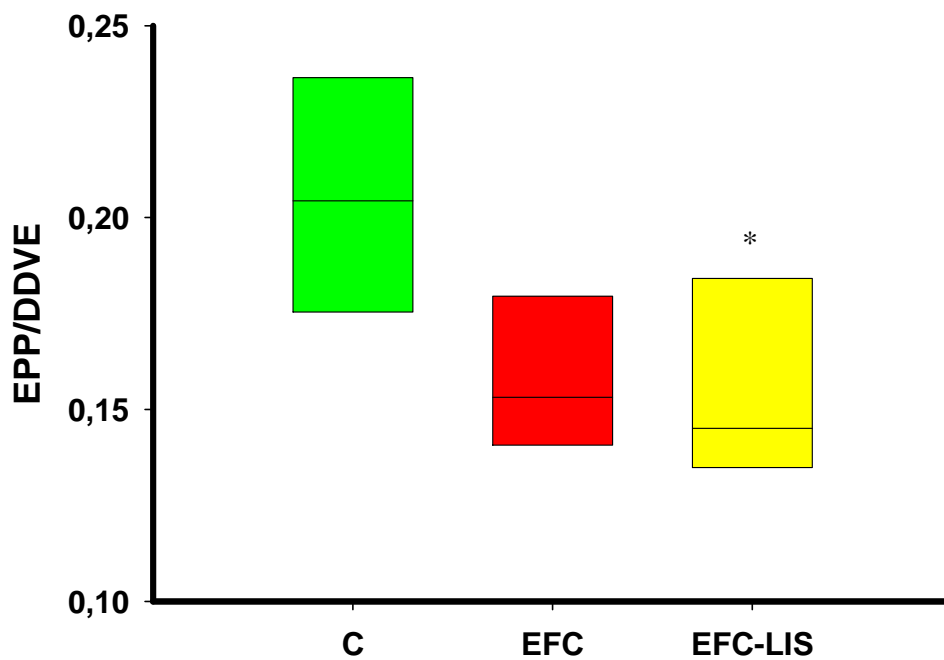


Figura 3: Espessura da parede posterior corrigida pelo diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C.

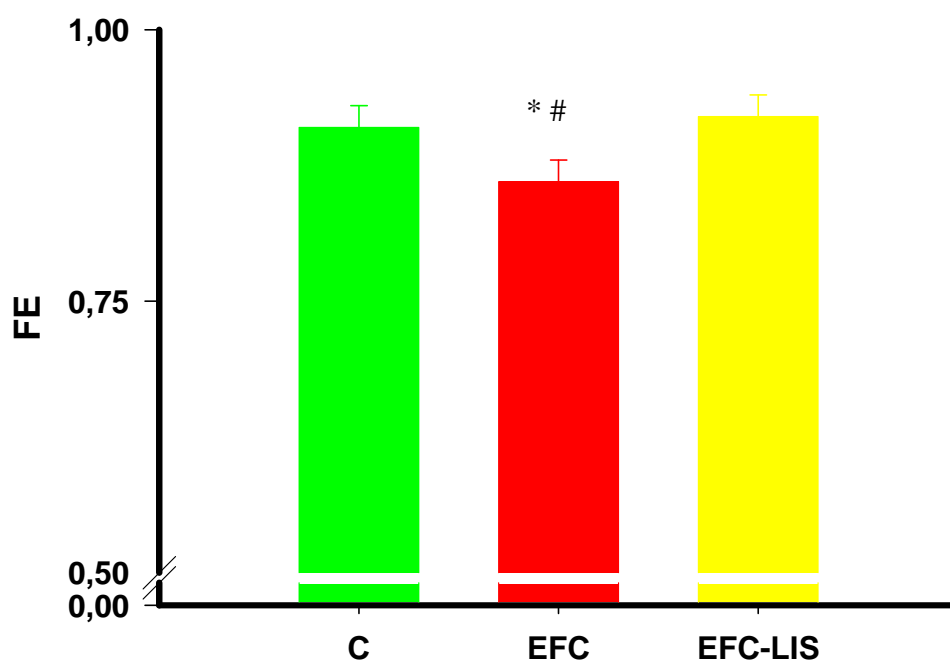


Figura 4: Fração de ejeção. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs EFC-LIS.

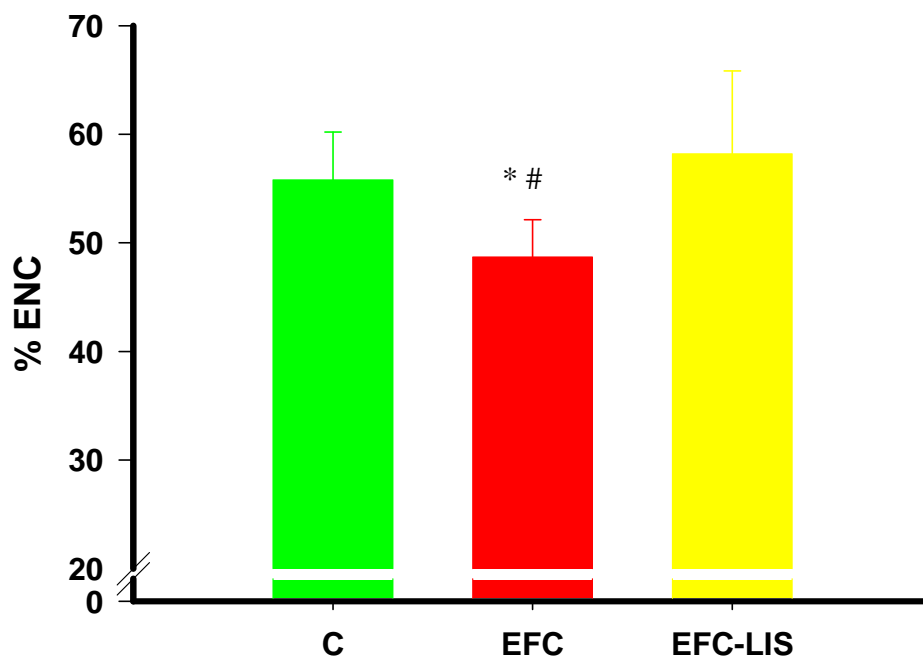


Figura 5: Porcentagem de encurtamento. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs EFC-LIS.

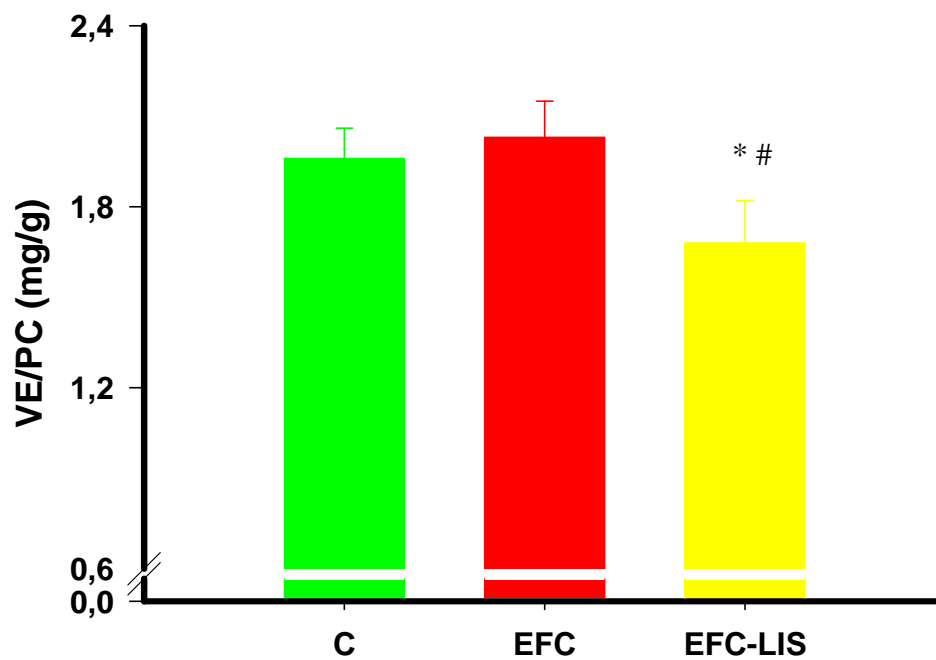


Figura 6: Peso do ventrículo esquerdo corrigido pelo peso corporal do animal. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril.

* $p < 0,05$ vs C; # $p < 0,05$ vs EFC.

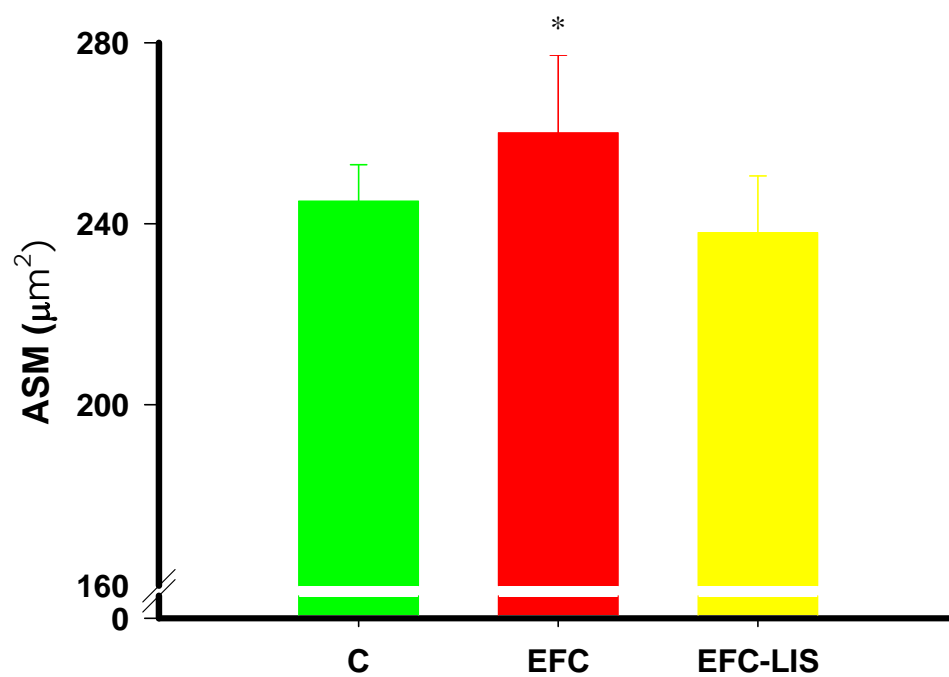


Figura 7: Área seccional do miócito. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs EFC-LIS.

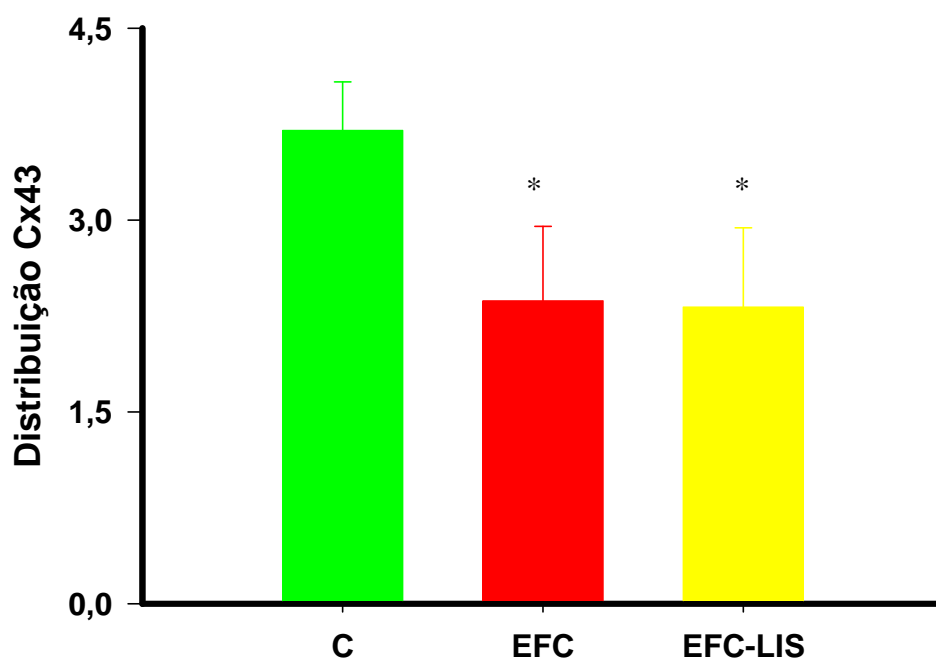


Figura 8: Distribuição da conexina 43 no disco intercalar. Grupo C: animais controle; Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs C.

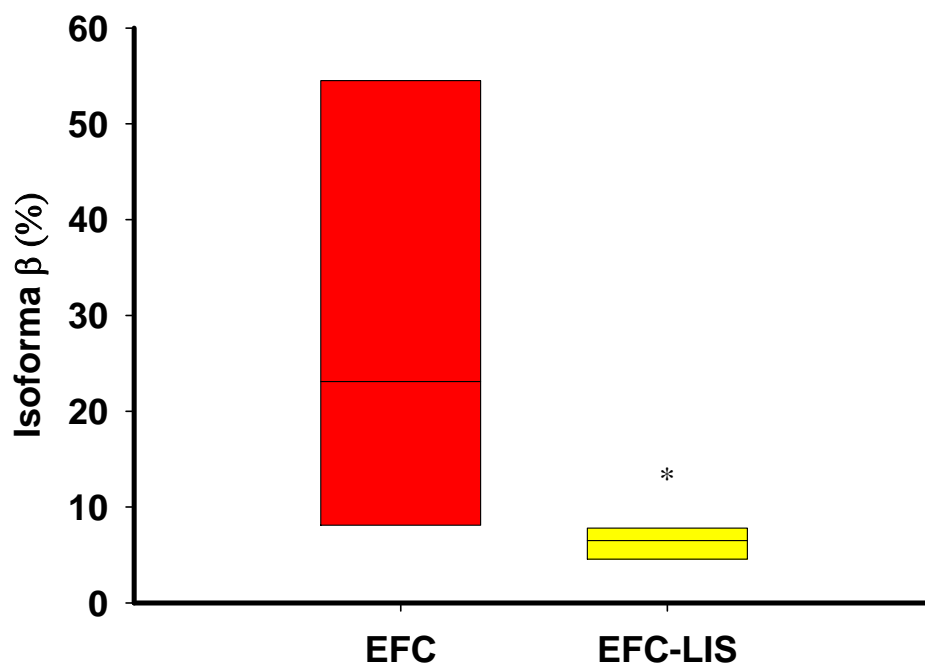


Figura 9: Porcentagem da Isoforma β da cadeia pesada da miosina. Grupo EFC: animais expostos à fumaça do cigarro; Grupo EFC-LIS: animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril. * $p < 0,05$ vs EFC.

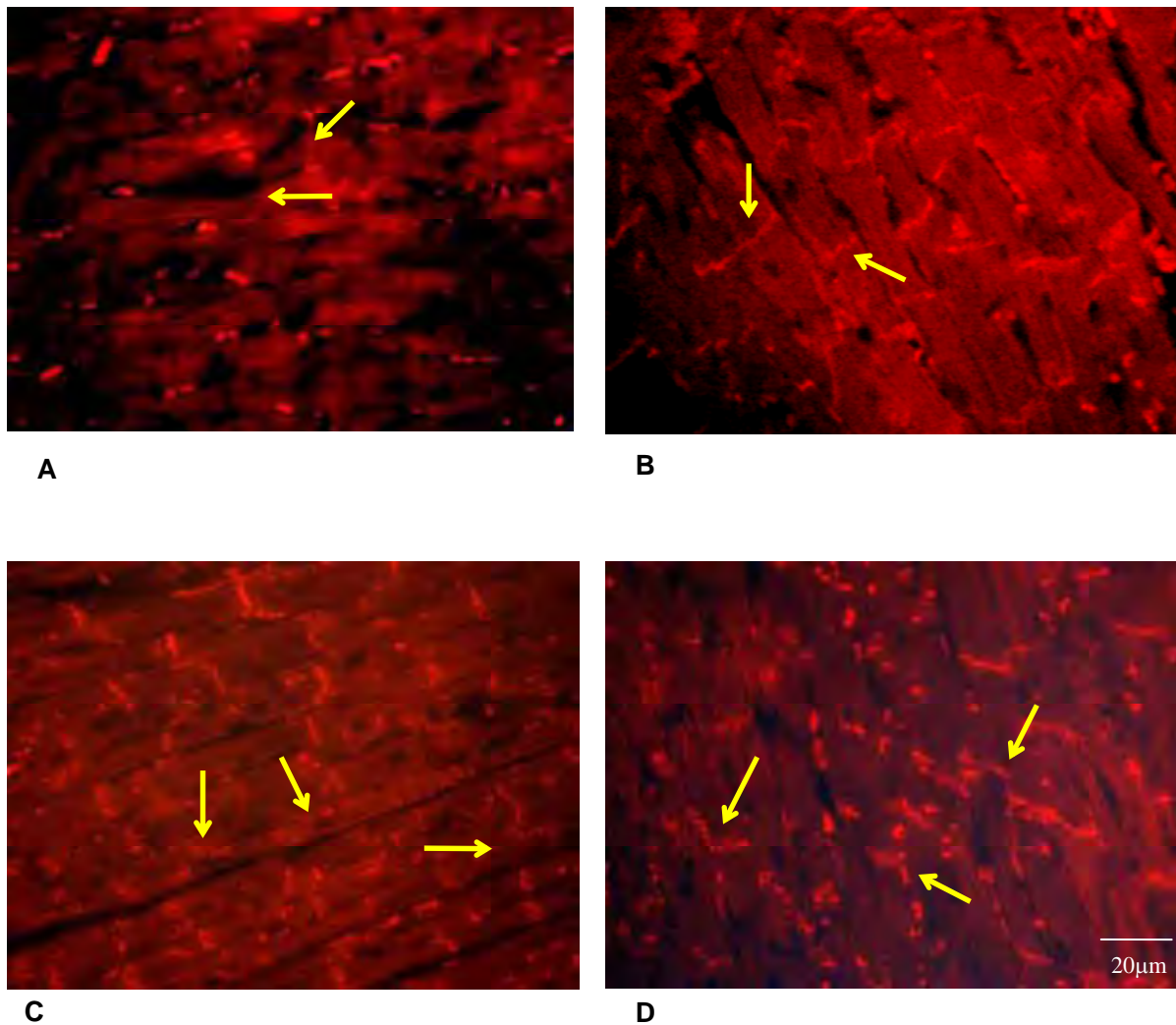


Figura 10. Imunohistoquímica para conexina 43 em ventrículo esquerdo de ratos. A – controle negativo: disco intercalar livre de marcação para conexina 43; B – grupo controle: marcação da conexina 43 restrita aos discos intercalares; C – grupo EFC – LIS: marcação para conexina 43 presente no disco intercalar e fora do mesmo; D – grupo EFC: marcação para conexina 43 presente no disco intercalar e fora do mesmo.

Discussão

O objetivo desse estudo foi avaliar o papel do IECA no processo de remodelação ventricular induzido pela exposição à fumaça do cigarro em ratos. Nossos dados indicam que a administração de lisinopril resultou em atenuação das alterações causadas pelo fumo. Desse modo, podemos concluir que o sistema renina angiotensina participa, pelo menos em parte, das alterações cardíacas induzidas pelo tabagismo.

A associação entre o fumo e a doença cardiovascular tem sido amplamente explorada, principalmente em relação à aterosclerose e hemostasia. Recentemente, entretanto, diversos trabalhos analisaram os efeitos do tabagismo diretamente nas variáveis cardíacas funcionais e morfológicas.

Estudos experimentais no modelo do rato, envolvendo a exposição à fumaça do cigarro por um, dois, quatro e seis meses, mostraram piora na função sistólica, verificada por meio da fração de ejeção e porcentagem de encurtamento, aumento dos diâmetros sistólico e diastólico do ventrículo esquerdo, além de aumento da área seccional dos miócitos e da massa do ventrículo esquerdo (Paiva et al., 2003, Castardeli et al., 2005, Castardeli et al., 2007, Castardeli et al., 2008). A exposição à fumaça do cigarro também foi avaliada em animais submetidos ao infarto agudo do miocárdio. O conjunto dos dados mostra que os animais expostos ao fumo apresentaram maiores áreas sistólicas e diastólicas do ventrículo esquerdo e maior área seccional dos miócitos, demonstrando hipertrofia miocárdica. Em relação à avaliação funcional, o fumo resultou em disfunção sistólica, avaliada através da fração de variação de área, e em disfunção diastólica avaliada por meio da derivada negativa de pressão ($-dp/dt$) (Paiva et al., 2005, Zornoff et al., 2006a). Estudos clínicos também analisaram os efeitos do tabagismo diretamente no coração. Em pacientes com doença arterial coronariana, a inalação aguda da fumaça de cigarro

foi acompanhada por alterações da função diastólica (Kyriakides et al., 1992, Stork et al., 1992). No estudo CARDIA, foi observado, através de ecocardiograma, que indivíduos fumantes apresentavam maior massa ventricular esquerda em comparação aos não fumantes (Gidding et al., 1995). Assim, podemos concluir que, em modelos experimentais e clínicos, a exposição à fumaça do cigarro pode resultar em remodelação cardíaca, com prejuízo da função ventricular.

O primeiro aspecto relevante de nosso estudo refere-se ao protocolo utilizado. Os animais foram submetidos à exposição à fumaça central do cigarro, simulando o fumo ativo. O período de exposição, de dois meses, foi determinado de acordo com estudos anteriores. Nesses estudos, com delineamento semelhante ao atual, a exposição à fumaça por um mês foi suficiente para levar a alterações morfológicas e funcionais (Paiva et al; 2003), com a exposição por dois meses foi observado aumento do diâmetro diastólico da cavidade ventricular esquerda, aumento do átrio esquerdo e do índice de massa do ventrículo esquerdo em relação ao grupo controle, resultados semelhantes foram observados em relação aos animais expostos à fumaça por seis meses (Castardeli et al., 2008). Importante ressaltar que a eficácia da exposição à fumaça do cigarro com esse modelo foi verificada em estudo anterior por meio da análise dos níveis de carboxihemoglobina, após 1 mês os animais expostos à fumaça apresentaram aumento significativo dos níveis de carboxihemoglobina em relação os grupo controle ($C = 0,9 \pm 0,7\text{mg/dl}$; $EFC = 5,3 \pm 2,8\text{mg/dl}$) (Castardeli et al., 2005).

O segundo aspecto a ser considerado em nosso estudo refere-se ao fato de que o lisinopril teve efeito biológico em relação às alterações induzidas pelo tabagismo. Podemos observar que os animais submetidos à exposição à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril apresentaram menor diâmetro sistólico do ventrículo

esquerdo, corrigido pelo peso corporal em relação aos animais não tratados e expostos a fumaça do cigarro. Adicionalmente, os animais tratados apresentaram menor peso do ventrículo esquerdo e menor área seccional dos miócitos. Apesar da extrema complexidade do processo de remodelação ventricular, esse termo é freqüentemente utilizado como sinônimo de crescimento celular. Portanto, nossos dados permitem a afirmação de que a administração de lisinopril atenuou a remodelação cardíaca induzida pelo fumo.

O terceiro aspecto a ser considerado é que, embora o objetivo primário da remodelação seja manter a função ventricular, cronicamente esse processo pode resultar em disfunção ventricular, como discutido anteriormente. Nosso trabalho está em concordância com esse conceito, pois os animais tratados com inibidor da enzima conversora da angiotensina apresentaram melhor função sistólica, avaliada pela fração de ejeção e porcentagem de encurtamento, em relação ao grupo exposto à fumaça do cigarro. Portanto, a atenuação das alterações induzidas pelo fumo foi acompanhada, nos animais tratados com lisinopril, por atenuação da disfunção sistólica ventricular esquerda.

Diversos mecanismos podem estar envolvidos no efeito cardioprotetor do lisinopril, no modelo de remodelação induzido pelo tabagismo.

Inicialmente, um dos potenciais mecanismos envolvidos nos efeitos benéficos do lisinopril é o controle da pressão arterial. Em nosso estudo, os animais que receberam IECA apresentaram menores valores de pressão arterial. Entretanto, as diferenças nos valores da pressão arterial e o curto tempo de evolução de dois meses não parecem ser suficientes para justificar as alterações encontradas. Evidências sugerem que os efeitos do IECA podem ser independentes dos efeitos hemodinâmicos. Assim, estudo em ratos SHR com diferentes doses de lisinopril

mostrou que, mesmo sem controle adequado da pressão arterial, houve atenuação da fibrose e redução da concentração miocárdica de angiotensina II (Brilla et al., 1991). Em animais com cardiopatia dilatada o IECA atenuou a dilatação do ventrículo esquerdo e melhorou a função contrátil do miócito, entretanto não houve diferença na pressão arterial em relação ao grupo não tratado (Spinale et al., 1995). Estudo clínico que analisou o efeito do IECA em corações com hipertrofia de ventrículo esquerdo secundária a hipertensão, mostrou redução da fibrose e melhora na função diastólica no grupo tratado; esse resultado não foi associado ao controle pressórico (Brilla et al., 2000b). Do mesmo modo, estudo com o uso de enalapril atenuou a remodelação miofibrilar e melhorou a função contrátil, entretanto não foi verificada diferença na pressão arterial entre os grupos (Wang et al., 2004). Portanto, acreditamos que variação na pressão arterial pode participar, mas provavelmente não é o único mecanismo envolvido na cardioproteção induzida pelo IECA, nesse modelo.

Devemos considerar que, apesar de aceito o conceito de que a remodelação cardíaca, na maioria das vezes, está associada com falência cardíaca, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na progressão da disfunção ventricular não estão completamente esclarecidos.

Diversos mecanismos foram propostos para explicar o aparecimento da disfunção ventricular no coração remodelado, dentre os quais se destacam: modificações no trânsito de cálcio, alterações da via beta-adrenérgica, aumento da morte celular, acúmulo de colágeno, alterações das metaloproteases, aumento do estresse oxidativo, déficit energético, alterações das proteínas do citoesqueleto, da membrana e da matriz e alterações da geometria ventricular. Recentemente, vem ganhando destaque na literatura o papel das alterações das cadeias pesadas da

miosina e das junções comunicantes. As junções comunicantes são um conjunto de canais localizados nos discos intercalares dos miócitos, que permitem a propagação de potenciais de ação entre células vizinhas. Outra função é permitir a passagem de pequenas moléculas, que podem ativar vias de sinalização intracelulares. Nos cardiomiócitos de mamíferos, a conexina 43 é a principal constituinte das junções comunicantes (Schulz et al., 2001; van Veen et al., 2001).

As funções da conexina 43 dependem da sua quantidade, localização e grau de fosforilação. Diferentes estudos mostraram que vários estímulos podem interferir com a conexina 43, entre os quais se destacam: citocinas (fator de necrose tumoral, interleucinas), endotelina, noradrenalina, glicosídeos, íons (sódio, cálcio, magnésio, hidrogênio), fatores natriuréticos, tromboxano. Do mesmo modo, estudos têm descrito alterações na localização, quantidade e fosforilação da conexina 43 em diferentes modelos de agressão, como sobrecarga de volume (Formigli et al., 2003), sobrecarga de pressão (Kostin et al., 2004) e infarto agudo do miocárdio (Kostin et al., 2003). Em geral, a expressão da conexina parece estar inalterada ou aumentada nas fases iniciais da remodelação. Com a progressão do processo, ocorre diminuição na expressão, redistribuição de sua localização normal no disco intercalar e diminuição na fosforilação da conexina 43. Assim, a piora da comunicação intercelular, se dá de forma progressiva na evolução da insuficiência cardíaca (Saffitz et al., 1999; Kano et al., 2001).

Recentemente, os efeitos do fumo sobre as junções comunicantes foram avaliados em nosso laboratório utilizando o mesmo modelo de exposição à fumaça do cigarro utilizado nesse trabalho. Após cinco semanas de observação, a intensidade de marcação para a conexina 43 foi menor nos animais submetidos à exposição à fumaça do cigarro, em relação aos animais controle. Além disso, foi

observada alteração na distribuição da conexina 43, caracterizada por redução da quantidade de conexina no disco intercalar e aumento da conexina no sarcolema lateral. Adicionalmente, houve alteração na fosforilação dessa proteína, com diminuição na quantidade da conexina fosforilada e conseqüente redução na comunicação intercelular (Novo, 2008). Esses resultados foram semelhantes aos dados observados nos modelos de isquemia (Hatanaka et al., 2004, Vetterlein et al., 2006). Assim, o tabagismo parece induzir alterações na expressão, na distribuição e na fosforilação da conexina 43, de forma semelhante ao que ocorre em diferentes modelos de agressão cardíaca.

O papel da angiotensina II na ativação da expressão da conexina 43 também tem sido avaliado. Dodge e colaboradores (1998) observaram que a angiotensina II ativa a expressão da conexina 43 em células miocárdicas de ratos, *in vitro*. Do mesmo modo, a adição de angiotensina II, em células miocárdicas neonatais de ratos, aumentou em cerca de 50% a expressão da conexina 43 (Polontchouk et al., 2002). Em células da musculatura lisa vascular, a administração de IECA e do antagonista AT-1 inibiu a expressão do RNAm para conexina 43 (Cai et al., 2006). Shyu et al (2001) mostrou que antagonistas AT-1 podem inibir o aumento na expressão da conexina 43 induzida por estresse mecânico, em miócitos de ratos. O papel do sistema renina angiotensina na regulação da conexina também foi estudado em animais com hipertrofia de ventrículo esquerdo por estenose aórtica, onde o uso de losartam preveniu a remodelação das junções comunicantes (Emdad et al., 2001). Em ratos SHR com hipertrofia do ventrículo esquerdo, foi observado aumento na expressão da conexina 43 e desorganização na sua distribuição; o tratamento com antagonista do receptor da angiotensina II reduziu o aumento na expressão da conexina 43 e manteve a sua distribuição (Zhao et al., 2008). Portanto,

as evidências apresentadas até o momento permitem concluir que o sistema renina angiotensina modula a expressão e a distribuição da conexina 43 em diferentes modelos de agressão.

Em nosso trabalho, as alterações morfológicas e funcionais cardíacas nos animais expostos à fumaça do cigarro foram acompanhadas por diminuição da distribuição da conexina 43 no disco intercalar e aumento no sarcolema lateral. Entretanto o inibidor da enzima conversora da angiotensina não atenuou essas alterações.

Adicionalmente às alterações na conexina 43, o processo de remodelação caracteriza-se por alterações na miosina, a principal proteína contrátil, composta de 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). Dado relevante é que a capacidade ATPásica da miosina depende de sítios ativos localizados nas cadeias pesadas (Barany, 1967).

Em relação à expressão das cadeias pesadas da miosina, ela é regulada durante todo o período de desenvolvimento. No modelo do rato, no período fetal, há predomínio da isoforma β . Imediatamente antes do nascimento, a expressão da isoforma α começa a aumentar, tornando-se a forma dominante (>90%) em animais adultos jovens. Com o envelhecimento, a expressão da isoforma α começa a cair, tornando-se a isoforma não dominantes, com 40% da quantidade total das cadeias pesadas da miosina (Lompre et al., 1981, 1984).

Considerando as conseqüências funcionais das variações nas isoformas das cadeias pesadas da miosina, se aceita que a velocidade do encurtamento da fibra muscular correlaciona-se com a capacidade de hidrólise do ATP das miosinas. Aspecto a ser considerado é que, em todas as espécies estudadas, a isoforma α apresentou aproximadamente três vezes maior capacidade ATPásica que a isoforma β (Gupta, 2007). Por esse motivo, a substituição de 100% por 20% da isoforma α , por meio de manipulação nas concentrações do hormônio tireoidiano no modelo do rato, resultou em diminuição do volume sistólico em 50% (Korte et al., 2005). Resultados semelhantes foram observados em camundongos transgênicos em que a expressão da isoforma β alcançou níveis de 75% do total das miosinas (Krenz et al., 2003). Portanto, a composição das isoenzimas das cadeias pesadas da miosina determina a capacidade contrátil do miócito.

Outro aspecto relevante é que a expressão das cadeias pesadas da miosina pode ser regulada por diversos fatores. A administração de hormônio tireoidiano, hormônio de crescimento, atividade física regular e estimulação β_2 adrenérgica aumentam a expressão da isoforma α . De outra maneira, hipóxia, diabetes, hipertrofia por sobrecarga pressórica e estimulação α e β_1 adrenérgica aumentam a expressão da isoforma β (Gupta, 2007). Além do potencial papel da fisiopatologia da disfunção ventricular, o aumento na expressão da isoforma β é considerado marcador de fenótipo fetal e, portanto, de remodelação patológica.

O papel dos inibidores da enzima conversora da angiotensina na remodelação miofibrilar também tem sido estudado. Wang e colaboradores (2002) observaram que em ratos submetidos a infarto do miocárdio o uso de um IECA, o imidapril, atenuou a remodelação miofibrilar melhorando a atividade ATPase e reduzindo as

mudanças na composição das miosinas de cabeça pesada atenuando o aumento das cadeias beta. Resultados semelhantes foram encontrados com enalapril (Wang et al., 2004).

Em nosso estudo, podemos observar que os animais expostos à fumaça do cigarro e tratados com lisinopril apresentaram menor porcentagem da isoforma β em relação aos animais não tratados. Assim, nossos resultados têm duas importantes implicações. Em primeiro lugar, nossos dados confirmam, por meio da análise de marcador de fenótipo fetal, que o lisinopril atenuou a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça do cigarro. Em segundo lugar, considerando o papel das cadeias pesadas da miosina no desempenho contrátil, a melhora da função sistólica nos animais tratados com lisinopril pode estar relacionada, pelo menos em parte, aos efeitos do IECA na distribuição das isoformas da miosina.

Finalmente, devemos considerar que apesar dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações cardíacas induzidas pelo tabagismo não serem conhecidos, diversos potenciais candidatos têm sido propostos.

O primeiro fator que poderia estar envolvido no processo de remodelação induzido pelo tabagismo é a sobrecarga hemodinâmica. Em estudo prévio, as conseqüências funcionais cardíacas do tabagismo foram avaliadas por meio do ecocardiograma e do estudo do músculo papilar. Esse método permite avaliar a função miocárdica sem interferência de fatores externos, como a frequência cardíaca, pré e pós-carga. A análise do músculo papilar não encontrou diferença entre o grupo exposto à fumaça do cigarro e o grupo controle. O ecocardiograma, no entanto, mostrou diminuição da fração de ejeção e da porcentagem de encurtamento nos animais fumantes. Desse modo, apesar de não haver alteração nas

propriedades mecânicas intrínsecas do miocárdio, a função da câmara ventricular esquerda estava prejudicada pelo tabagismo (Paiva et al, 2003).

Uma explicação para a alteração na função sistólica da câmara ventricular diz respeito à estimulação adrenérgica e a liberação de endotelina provocada pela nicotina, que pode causar retenção de sódio e água. Em consequência, haveria alterações nas condições de carga a que o coração é submetido. Entretanto neste mesmo estudo não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto ao peso corporal dos animais e na relação peso seco e peso úmido do pulmão e fígado. Outra hipótese diz respeito à vasoconstrição relacionada ao tabagismo, que pode ocorrer em consequência da liberação de fatores neurohumorais e acarretam alterações no tônus vascular com consequente aumento da pós-carga. Em estudo prévio com exposição à fumaça do cigarro, foram avaliados os níveis pressóricos após dois meses de exposição. O grupo tabagista apresentou aumento da pressão sistólica caudal em relação ao grupo controle (Fumo = 127 ± 13 mmHg, C = 114 ± 15 mmHg; $p < 0,05$) (Castardeli et al., 2008), resultados semelhantes foram observados após a exposição por três meses (Fumo = 118 ± 15 mmHg, Controle = 103 ± 16 mmHg; $p < 0,05$) (Castardeli et al., 2005). Esse fenômeno poderia sugerir que a vasoconstrição tenha participação nas alterações morfológicas e funcionais induzidas pelo tabagismo. Entretanto, o tempo de exposição não foi longo e os níveis pressóricos não foram tão altos como os encontrados em outros modelos, por exemplo, em estudos experimentais utilizando ratos SHR, modelo bem estabelecido para estudo da hipertensão, a média de pressão sistólica varia em torno de 219 ± 2 mmHg (Tanaka et al., 2004), 195 ± 17 mmHg (Zhao et al., 2008), 190 ± 24 mmHg (Okoshi et al., 2004). Portanto, acreditamos que variações na pressão arterial podem

participar, mas não são os únicos mecanismos envolvidos nas alterações induzidas pela exposição à fumaça do cigarro.

Estudos prévios, com períodos de observação maiores que o do presente trabalho, quatro e seis meses, não observaram alterações na pressão parcial de oxigênio (PO₂) e na porcentagem de saturação da hemoglobina pelo O₂ (SO₂). Assim, hipoxemia crônica e alterações na viscosidade sanguínea secundárias a hipóxia, potenciais candidatos que poderiam explicar os resultados de nosso estudo, provavelmente não tem participação na fisiopatologia das alterações induzidas pelo cigarro (Castardeli et al., 2005; Castardeli et al., 2008).

Outro potencial mecanismo proposto para explicar a remodelação ventricular induzida pelo fumo é o estresse oxidativo. Já está bem estabelecido que o aumento na produção de radicais livres, gerados pelo fumo, contribuem para os seus efeitos deletérios em outros órgãos (Pryor et al., 1990; Counts et al., 2004). O estresse oxidativo também tem sido implicado na patogênese da disfunção cardíaca (Ferrari et al., 1998; Singal et al., 1998). Admite-se que o estresse oxidativo possa contribuir para a disfunção endotelial e para o envolvimento molecular que controla a inflamação e, conseqüentemente, pode induzir alterações funcionais e estruturais nos miócitos (Sawyer et al., 2002; Giordano, 2005). Adicionalmente, o aumento dos radicais livres pode provocar apoptose e/ou necrose de miócitos (Ferrari et al., 1998) e induzir proliferação de fibroblastos e de genes fetais (Colucci et al., 1997).

Considerando a participação do estresse oxidativo na remodelação induzida pelo tabagismo, trabalho realizado com a suplementação de beta-caroteno, substância que apresenta ação antioxidante, em animais expostos à fumaça do cigarro analisou as alterações ultra-estruturais por meio da microscopia eletrônica. Nos animais fumantes, foi observada desorganização ou ausência de miofilamentos,

irregularidades na membrana plasmática, dilatação do retículo sarcoplasmático, mitocôndrias polimórficas, edemaciadas e com diminuição das cristas. Já os animais fumantes e suplementados com beta-caroteno apresentaram alterações significativamente menores que os fumantes sem beta-caroteno, com a maioria das fibras apresentando aspecto normal, indicando que a suplementação de substância antioxidante atenuou as alterações ultra-estruturais induzidas pela fumaça do cigarro (Zornoff et al., 2006b). O papel do estresse oxidativo na intensificação do processo de remodelação após o infarto agudo do miocárdio também foi avaliado. Trabalho em animais submetidos a infarto experimental e expostos à fumaça do cigarro por seis meses mostrou que houve intensificação do processo de remodelação cardíaca no grupo fumo acompanhado de maiores valores das variáveis referentes ao estresse oxidativo (Azevedo et al., 2008). Portanto, o processo de remodelação induzido pelo fumo parece ser, pelo menos em parte, dependente do aumento do estresse oxidativo.

Durante o processo de remodelação ventricular ocorrem alterações na matriz extracelular envolvendo a regulação da síntese e degradação de colágeno. Entretanto estudos anteriores não mostraram fibrose miocárdica em animais expostos à fumaça do cigarro. A porcentagem de colágeno foi avaliada em animais expostos à fumaça do cigarro por cinco semanas e não houve diferença em relação ao grupo controle (Novo, 2008), o mesmo foi observado em animais expostos à fumaça por quatro meses (Castardeli et al., 2007). Estudos com animais infartados e expostos a fumaça do cigarro por seis meses também não encontraram diferença na porcentagem de colágeno (Zornoff et al., 2006a, Zornoff et al., 2007). O papel das metaloproteases na remodelação induzida pelo tabagismo também foi avaliado em estudos anteriores. As alterações na matriz extracelular estão em parte relacionadas

com a ativação da família de enzimas proteolíticas, as metaloproteases (MMP) (Iwanaga et al; 2002). Diversas metaloproteases têm sido associadas com o processo de remodelação secundário a diferentes estímulos, entre elas a MMP-2 e MMP-9 (Deschamps et al., 2006; Janicki et al., 2006; Jugdutt et al., 2006). Estudo prévio analisou o grau de ativação das MMP-2 e MMP-9 em ratos expostos à fumaça do cigarro, em comparação a animais controle. Como nos estudos anteriores, o tabagismo foi associado com alterações morfológicas e queda da função ventricular. Não foram encontradas, entretanto, diferenças na ativação da MMP-2 e da MMP-9 nos animais fumantes em relação aos animais controle (Castardeli et al., 2007). Portanto, a remodelação induzida pelo tabagismo não parece ser dependente da ativação das MMP-2 ou MMP-9.

Recentemente, a participação do sistema adrenérgico também foi avaliada. Os animais fumantes e tratados com propranolol apresentaram menor frequência cardíaca, menores diâmetros e massa do ventrículo esquerdo que os animais fumantes sem tratamento. De maneira interessante, não houve diferença entre os grupos na pressão arterial. Assim, a administração de propranolol atenuou algumas variáveis da remodelação ventricular induzida pela exposição à fumaça do cigarro, sugerindo participação adrenérgica nesse processo (Duarte et al., 2008).

Portanto, o conjunto dos resultados apresentados permite a suposição de que a remodelação induzida pelo tabagismo é dependente da sobrecarga hemodinâmica, do estresse oxidativo e da ativação do sistema adrenérgico, mas não está relacionada com a hipóxia, aumento da viscosidade sanguínea e ativação das MMP-2 ou MMP-9.

Com o atual estudo, nossos conhecimentos sobre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na remodelação cardíaca induzida pelo fumo foram

ampliados. Outro potencial candidato, a participar da remodelação induzida pelo tabagismo, é a ativação do sistema renina angiotensina.

Em relação aos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ativação do sistema renina angiotensina, a angiotensina II, principal componente do sistema, participa do processo de remodelação ventricular por meio de várias vias, dentre as quais se destacam: proliferação de fibroblastos, alteração da matriz extracelular com aumento do colágeno intersticial e perivascular (Brilla et al., 2000b), interferência na síntese de proteínas, estímulo ao crescimento celular e na atividade das collagenases (Rakusan et al., 1992), aumento da apoptose e necrose (Santos et al., 2002) e aumento do estresse oxidativo (Cohn., 2000b) .

É bem estabelecido que os inibidores da enzima conversora da angiotensina atenuam a remodelação cardíaca em diferentes modelos de agressão. Em estudo com ratos SHR já apresentando miocardiopatia hipertensiva avançada houve melhora na função sistólica com uso do lisinopril (Brilla et al., 1996). Weber e colaboradores (1991) observaram regressão da hipertrofia do ventrículo esquerdo em ratos após administração de lisinopril. No modelo de infarto experimental em ratos, o uso de lisinopril atenuou a remodelação ventricular, com melhora da função (Zornoff et al, 2000). O mesmo fenômeno foi observado em ratos submetidos à estenose aórtica (Bregagnollo et al., 2005). Como discutido anteriormente, nossos dados estão em concordância com esse conceito, considerando que a administração de lisinopril atenuou a remodelação ventricular e melhorou variáveis da função sistólica em relação aos animais fumantes não tratados.

Pelo exposto, o conjunto de nossos resultados sugere que o sistema renina angiotensina modula o processo de remodelação cardíaco induzido pela exposição à fumaça do cigarro. Entre os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nesse

fenômeno estão a redução da pressão arterial e a atenuação das alterações na distribuição das isoformas da cadeia pesada da miosina. Por outro lado, a intensidade e distribuição da conexina 43 parece não participar desse processo.

Conclusão

Em conclusão, nosso trabalho sugere que o inibidor da enzima conversora da angiotensina atenua o processo de remodelação cardíaca induzido pela exposição à fumaça do cigarro, no modelo do rato. Esse efeito protetor parece ser modulado, pelo menos em parte, por redução da pressão arterial e pela distribuição das isoformas da cadeia pesada da miosina.

Referências Bibliográficas

Adams Jr KF. Pathophysiologic role of the rennin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. *Am J Health-Syst Pharm* 2004; 61(Suppl 2): S4-13.

Anand IS. Ventricular remodeling without cellular contractile dysfunction. *J Card Fail* 2002; 8: 401-8.

Azevedo PS, Duarte DR, Minicucci MF, Matsubara BB, Matsubara LS, Novo R, et al. Papel da lipoperoxidação na intensificação da remodelação causada pelo beta-caroteno após o infarto. *Arq Bras Cardiol* 2008; in press.

Barany M. ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 1967; 50: 197-218.

Boehm M, Nabel EG. Angiotensin-Converting Enzyme 2 – A new cardiac regulator. *N Engl J Med* 2002; 347: 1795-7.

Boluyt MO, Bing OHL, Lakatta EG. The ageing spontaneously hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J* 1995; 16: 19-30.

Borghi C, Marino P, Zardini P, Magnani B, Collatina S, Ambrosioni E. Post acute myocardial infarction. The fosinopril in acute myocardial infarction study (FAMIS). *AJH* 1997 ; 10 : 247S-54S.

Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo IF, Padovani CR, Okoshi MP, Cicogna AC. Efeitos da inibição prolongada da enzima de conversão da angiotensina sobre as características morfológicas e funcionais da hipertrofia ventricular esquerda em ratos com sobrecarga pressórica persistente. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84(3): 225-32.

Bregagnollo EA, Mestrinel MA, Okoshi K, Carvalho FC, Bregagnollo IF, Padovani CR et al. Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supraaortic stenosis. *Arq Bras Cardiol* 2007; 88: 225-33.

Brilla CG, Janicki JS, Weber KT. Impaired diastolic function and coronary reserve in genetic hypertension. Role of interstitial fibrosis and medial thickening of intramyocardial coronary arteries. *Circ Res* 1991; 69: 107-15.

Brilla CG, Zhou G, Matsubara L, Weber KT. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 809-20.

Brilla CG, Matsubara L, Weber KT. Advanced hypertensive heart disease in spontaneously hypertensive rats. Lisinopril-mediated regression of myocardial fibrosis. *Hypertension* 1996; 28: 269-75

Brilla CG. Renin-angiotensin system mediated mechanisms: cardioreparation and cardioprotection. *Heart* 2000a; 84 (Suppl I): i18-i19.

Brilla CG, Funck RC, Rupp H. Lisinopril mediated regression of myocardial fibrosis in patients with hypertensive heart disease. *Circulation* 2000b; 102: 1388-93.

Cai W, Ruan LM, Wang YN, Chen JZ. Effects of angiotensin II on connexin 43 of VSMCs in arteriosclerosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2006; 7: 648-53.

Carabello BA, Zile MR, Tanaka R, Cooper G. Left ventricular hypertrophy due to volume overload versus pressure overload. *Am J Physiol* 1992; 263: 1137-44.

Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo PS et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84: 320-324.

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.

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: 62-66.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57: 1226-8.

Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo* 2000; 10: 8-16.

Colucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol* 1997; 80: 15L-25L.

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* 2000a; 35: 569-82.

Cohn JN. Rationale for angiotensin II receptor blocker therapy in chronic heart failure. *JRAAS* 2000b; 1(suppl 2): S38-S40.

Counts ME, Hsu FS, Laffoon SW, Dwyer RW, Cox RH. Mainstream smoke constituent yields and predicting relationships from a worldwide market sample of cigarette brands: ISO smoking conditions. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 39: 111-34.

De Mello WC. Renin angiotensin system and cell communication in the failing heart. *Hypertension* 1996; 2: 1267-72.

De Mello WC, Specht P. Chronic blockade of angiotensin II AT1-receptors increased cell-to-cell communication, reduced fibrosis and improved impulse propagation in the failing heart. *JRAAS* 2006; 7: 201-5.

Deschamps AM, Spinale FG. Pathways of matrix metalloproteinases induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 666-76.

Dodge SM, Beardslee MA, Darrow BJ, Green KG, Beyer EC, Saffitz JE. Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin 43 in neonatal rat ventricular myocytes. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 800-7.

Doll R, Peto R, Wheatley K, Gray R, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 40 years' observations on male British doctors. *BMJ* 1994; 309: 901-911.

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. *Arq Bras Cardiol* 2008; in press.

Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, et al. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin II type 1 receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 219-31.

English JP, Willius FA, Berkson J. Tobacco and coronary disease. *JAMA* 1940; 115: 1327-1329.

Erhardt L, MacLean A, Ilgenfritz J, Gelperin K, Blumenthal M. Fosinopril attenuates clinical deterioration and improves exercise tolerance in patients with heart failure. Fosinopril Efficacy/Safety Trial (FEST) Study Group. *Eur Heart J* 1995; 16:1892-9.

Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, et al. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J* 1998; 19 (Suppl B): B2-B11.

Fialová M, Dlugosová K, Okruhlicová L, Kristek F, Manoach M, Tribulová N. Adaptation of heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodelling. *Physiol Res.* 2007 2:1-13.

Formigli L, Ibba-Manneschi L, Perna AM, Pacini A, Polidori L, Nediani C, et al. Altered CX43 expression during myocardial adaptation to acute and chronic volume overloading. *Histol Histopathol.* 2003; 18: 359-69.

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 Young Adults Study. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 211-6.

Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-8.

Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. *Am J Prev Med* 2007; 33 (6S): S318–S326.

GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6 week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo italiano per lo studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet* 1994; 343: 1115-22.

Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro FRS, Okoshi K, et al. O Bloqueio do sistema renina-angiotensina atenua a remodelação cardíaca de ratos submetidos a estenose aórtica. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84: 304-8.

Goodman J. *Tobacco in History: the cultures of dependence*. Routledge; 1993.

Greenspan K, Edmands RE, Knobel SB, Fisch C. Some effects of nicotine on cardiac automaticity, conduction, and inotropy. *Arch Intern Med* 1969; 123: 707-12.

Green CR, Rogman A. The tobacco chemist's research conference: a half-century forum for advances analytical methodology of tobacco and its products. *Recent Adv Tobacco Sci* 1996; 22: 131.

Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Moll Cell Cardiol* 2007; 43: 388-403.

Hatanaka K, Kawata H, Toyofuku T, Yoshida K-I. Down-regulation of connexin-43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo. *Jpn Heart J* 2004; 45: 1007-19.

Henry WL, De Maria A, Gramyak R: Report of the American Society of

Echocardiography Committee on Nomenclature and Standards in Two dimensional echocardiography. *Circulation* 1980; 62: 212-17.

ISIS-4 (Fourth International Study of Infarction Survival). A randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1995; 345: 669-85.

Iwanaga Y, Kihara Y, Yoneda T, Aoyama T, Sasayama S. Modulation of in vivo cardiac hypertrophy with insulin-like growth factor-1 and angiotensin-converting enzyme inhibitor: relationship between change in myosin isoform and progression of left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 635-42.

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.

Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart Jr JA, Murray DB, et al. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res* 2006; 69: 657-5.

Jugdutt BI. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction. *J Card Failure* 2006; 12: 73-6.

Kabour A, Henegar JR, Devineni VR, Janicki JS. Prevention of angiotensin II induced myocyte necrosis and coronary vascular damage by lisinopril and losartan in the rat. *Cardiovas Res* 1995; 29: 543-8.

Kanno S, Saffitz JE. The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Pathol* 2001; 10: 169-77.

King TJ, Bertram JS. Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1719:146-60.

Kleber FX, Niemöller L, Fischer M, Doering W. Influence of severity of heart failure on the efficacy of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1991;68:121-6.

Korte FS, Herron TJ, Rovetto MJ, McDonald KS. Power output is linearly related to MHC content in rat skinned myocytes and isolated working hearts. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2005; 289: H801-12.

Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn W-P, et al. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in the failing human heart. *Mol Cell Biochem*. 2003; 242: 135- 44.

Kostin S, Dammer S, Hein S, Klovekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 426-36.

Krenz M, Sanbe A, Bouyer-Dalloz F, Gulick J, Klevitsky R, Hervett TE, et al. Analysis of myosin heavy chain functionality in the heart. *J Biol Chem* 2003; 278: 17466-74.

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.

Lampe PD, Cooper CD, King TJ, Burt JM. Analysis of connexin 43 phosphorylated at S325, S328 and S330 in normoxic and ischemic heart. *J Cell Sci.* 2006; 119: 3435-42.

Loennechen JP, Nilsen OG, Arbo I, Aadahl P, Nielsen T, Waldum HL, et al. Chronic exposure to carbon monoxide and nicotine: endothelin ET(A) receptor antagonism attenuates carbon monoxide-induced myocardial hypertrophy in rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 178: 8-14.

Lompre AM, Mercadier JJ, Wisnewsky C, Pantaloni P, d'Albis A, Schwartz K. Species and age-dependent changes in the relative amounts of cardiac myosin isoenzymes in mammals. *Dev Biol* 1981; 84: 286.

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Expression of the cardiac ventricular alpha- and-beta myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J Biol Chem* 1984; 259: 6437-46.

Mirza A, Eder V, Rochefort GY, Hyvelin JM, Machet MC, Fauchier L, et al. CO inhalation at dose corresponding to tobacco smoke worsens cardiac remodeling after experimental myocardial infarction in rats. *Toxicological Science* 2005; 85: 976-82.

Novo R. Influência da exposição à fumaça do cigarro e da suplementação da dieta com beta caroteno sobre a comunicação intercelular em cardiomiócitos de ratos. [tese] São Paulo: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina de Botucatu; 2008.

Okoshi K, Fioretto JR, Okoshi MP, Cicogna AC, Aragon FF, Matsubara LS, et al. Food restriction induces in vivo ventricular dysfunction in spontaneously hypertensive

rats without impairment of in vitro myocardial contractility. *Braz J Med Biol Res* 2004; 37:607-13.

Opie LH. Cellular basis for therapeutic choices in heart failure. *Circulation* 2004; 110:2559-61.

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.

Paiva SAR, Novo R, Matsubara BB, Matsubara LS, Azevedo PS, Minicucci MF et al. β -carotene attenuates the paradoxical effect of tobacco smoke on the mortality of rats after experimental myocardial infarction. *J Nutr* 2005; 135: 2109-3113.

Penn A, Chen L, Shyder CA. Inhalation of steady-state sidestream smoke from one cigarette promotes arteriosclerotic plaque development. *Circulation* 1994; 90: 1363-7.

Peto R, Lopez AD, Boreham J, Thun M, Heath C Jr. Mortality from smoking in developed countries 1950–2000: indirect estimation from national vital statistics. Oxford: Oxford University Press, 1994. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54: 625–8.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985a; 57: 84-95.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985b; 72: 406-412.

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

Polontchouck L, Ebelt B, Jackeis M, Dhein S. Chronic effect of endothelin 1 and angiotensin II on gap junctions and intercellular communication in cardiac cells. *FASEB J* 2002; 16:87-89.

Pryor WA, Church DF, Evans MD, Rice WY, Hayes JR. A comparison of the free radical chemistry of tobacco-burning cigarettes and cigarettes that only heat tobacco. *Free Radic Biol Med* 1990; 8: 275-9.

Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R. Physiological role of gap-junctional hemichannels: extracellular calcium-dependent volume regulation. *J Cell Biol.* 2000; 148: 1063-74.

Rakusan K, Flanagan MF, Geva T, Southern J, Van Praagh R. Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 1992; 86: 38-46.

Sadoshima J, Izomo S. Molecular characterization of angiotensin II – induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts: critical role of the AT1 receptor subtype. *Circ Res* 1993; 73: 413-23.

Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 309-17.

Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, Schechtman KB, Yamada KA. Effects of diminished expression of connexin 43 on gap junction number and size in ventricular myocardium. *Am J Physiol.* 2000a; 278: H1662-70.

Santos RAS, Sampaio WO. Sistema renina-angiotensina. Aspectos fisiológicos. Hipertensão 2002; 5: 47-50.

Sampaio RO, Nigri M. Remodelação ventricular esquerda: aspectos de interesse clínico. Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo 2003; 3: 312-6.

Satwani S, Dec W, Narula J. Adrenergic blockers in heart failure: Review of mechanisms of action and clinical outcomes. J Cardiovasc Pharmacol Therapeut 2004; 9(4): 243–55.

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

Schrier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. N Engl J Med 1999; 341:577-85.

Schulz R, Heusch G. Connexin 43 and ischemic preconditioning. Cardiovasc Res. 2004; 62: 335-44.

Severs NJ, Coppin SR, Dupont E, Yeh H-I, Ko Y-S, Matsushita T. Gap junction alterations in human cardiac disease. Cardiovasc Res. 2004; 62: 368-77.

Shaper AG, Pocock SJ, Walker M, Phillips AN, Whitehead TP, Macfarlane PW. Risk factors for ischemic heart disease: the prospective phase of the British Regional Heart Study. J Epidemiol Community Health 1985; 39: 197-209.

Shyu KG, Chen CC, Wang BW, Kuan P. Angiotensin II receptor antagonist blocks the expression of connexin 43 induced by cyclical mechanical stretch in cultured neonatal rat cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 2001; 33:691-8.

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.

Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D. The role of oxidative stress in the genesis of heart disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 426-32.

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, Holzgrefe HH, Mukherjee R, Hird RB, Walker JD, Arnim-Barker A et al. Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and the Progression of Congestive Cardiomyopathy. Effects on Left Ventricular and Myocyte Structure and Function. *Circulation* 1995; 92:562-78.

Söhl G, Willecke K. Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 228-32.

Stork T, Eichstadt H, Mockel M, Bortfeldt R, Müller 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.

Talmadge RJ, Roy RJ. Electrophoretic separation of rat skeletal muscle myosin heavy-chain isoforms. *J Appl Physiol* 1993; 75(5): 2337-40.

Tanaka T, Olmo N, Kubo K, Yonetani Y, Nakashima T. Pharmacodynamic Effects of Chronic Cigarette Smoke Exposure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26(1): 9-18.

The AIRE study. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. *Lancet* 1993; 342: 821-8.

The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987; 316: 1429-35.

The EUROPA study. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet* 2003; 362: 782-88.

The HOPE study (The heart outcomes prevention evaluation study investigators). Effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342: 145-53.

The HOPE study. Prevention of heart failure in patients in the heart outcomes prevention evaluation (HOPE) study. *Circulation* 2003; 107: 1284-1290.

The SAVE Investigators. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-77.

The SMILE study. The effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor zofenopril on mortality and morbidity after anterior myocardial infarction. *N Engl J Med* 1995; 332: 80-5.

The SOLVD Investigators. The effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fraction and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991; 325: 293-302.

The TRACE study. A clinical trial of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor trandolapril in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1995; 333: 1670-6.

Udelson JE, Patten RD, Konstam MA. New concepts in post-infarction ventricular remodeling. *Rev Cardiovasc Med* 2003; 4(Suppl 3):S3-12.

Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Embad L, Magee AI, Severs NJ, et al. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2000; 86: 871-8.

van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res.* 2001; 51: 217-29.

van Veen TAB, van Rijen HVM, Wiegerinck RF, Opthof T, Colbert MC, Clement S, et al. Remodeling of gap junctions in mouse hearts hypertrophied by forced retinoic acid signaling. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34: 1411-23.

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.

Vetterlein F, Mühlfeld C, Cetegen C, Volkmann R, Schrader C, Hellige G. Redistribution of connexin43 in regional acute ischemic myocardium: influence of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006; 291: H813-19.

Wang XD, Liu C, Bronson RT, Smith DE, Krinsky NI, Russell M. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 60-6.

Wang J, Liu X, Ren B, Rupp H, Takeda N, Dhalla N. Modification of myosin gene expression by imidapril in failing heart due to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 847-57.

Wang J, Guo X, Dhalla N. Modification of myosin protein and gene expression in failing hearts due to myocardial infarction by enalapril or losartan. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1690: 177-84.

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Cardioreparation with lisinopril in the management of hypertension and heart failure. *Cardiology* 1991; 79 (Suppl) I: 62-73.

Yanbaeva DG, Dentener MA, Creutzberg EC, Wesseling G, Wouters EFM. Systemic effects of smoking. *Chest* 2007; 131: 1557–66.

Zhao L, Chen HJ, Chen JZ, Yu M, Ni YL, Zhang WF. Losartan reduced connexin 43 expression in left ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 448-54.

Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Paiva SA, Spadaro J. Early rather than delayed administration of lisinopril protects the heart after myocardial infarction in rats. *Basic Res Cardiol* 2000; 95: 208-14.

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

Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, Minicucci MF, Azevedo OS, Campana AO e col. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. Arq Bras Cardiol 2006a; 86: 276-82.

Zornoff LA, Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Okoshi K, Pai-Silva MD, Carvalho RF, Cicogna AC, Padovani CR, Novelli EL, Novo R, Campana AO, Paiva SAR. Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. Toxicol Sci 2006b; 90: 259-66.

Zornoff LAM, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana AO, Paiva SAR. Effects of beta-carotene and smoking on heart remodeling after myocardial infarction. Arq Bras Cardiol 2007; 89: 135-41.