

A Pentoxifilina Atenua a Remodelação Cardíaca Induzida pela Exposição à Fumaça de Cigarros

Pentoxifylline Attenuates Cardiac Remodeling Induced by Tobacco Smoke Exposure

Marcos Minicucci, Fernando Oliveira, Priscila Santos, Bertha Polegato, Meliza Roscani, Ana Angelica Fernandes, Beatriz Lustosa, Sergio Paiva, Leonardo Zornoff, Paula Azevedo

Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, SP – Brasil

Resumo

Fundamento: Exposição à fumaça de cigarros é um fator significativo de risco para a remodelação cardíaca. Nesta condição, estão presentes inflamação, estresse oxidativo, anormalidades do metabolismo energético, apoptose e hipertrofia. A pentoxifilina tem propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, anti-trombóticas e anti-proliferativas.

Objetivo: O presente estudo testou a hipótese de que a pentoxifilina atenuaria a remodelação cardíaca induzida pelo fumo.

Métodos: Ratos Wistar foram distribuídos em quatro grupos: Controle (C), Pentoxifilina (PX), Fumaça de Cigarro (FC), e PX-FC. Depois de dois meses, foram feitos ecocardiografia, medição de pressão arterial invasiva e estudos bioquímicos e histológicos. Os grupos foram comparados por ANOVA de duas vias com nível de significância de 5%.

Resultados: FC aumentou o diâmetro e a área do átrio esquerdo, o que foi atenuado pela PX. No estudo de coração isolado, FC diminuiu a derivada positiva (+dp/dt), o que foi atenuado por PX. Os antioxidantes enzima superóxido-dismutase e glutathione peroxidase foram reduzidos no grupo FC; PX recuperou essas atividades. FC aumentou o lactato desidrogenase (LDH) e reduziu as desidrogenases 3-hidroxiacil Coenzima A (OH-DHA) e citrato sintase (CS). PX atenuou alterações de LDH, 3-OH-DHA e CS no grupo PX-FC. FC aumentou IL-10, ICAM-1 e caspase-3. PX não teve influência nestas variáveis.

Conclusão: FC induziu remodelação cardíaca, associada a um aumento de inflamação, estresse oxidativo, apoptose e metabolismo energético alterado. PX atenuou remodelação cardíaca, reduzindo estresse oxidativo e melhorando bioenergética cardíaca, mas não agiu nas citocinas cardíacas nem na apoptose. (Arq Bras Cardiol. 2016; 106(5):396-403)

Palavras-chave: Poluição por Fumaça de Tabaco; Remodelação Ventricular; Pentoxifilina; Estresse Oxidativo; Cardiomiopatias.

Abstract

Background: Tobacco smoke exposure is an important risk factor for cardiac remodeling. Under this condition, inflammation, oxidative stress, energy metabolism abnormalities, apoptosis, and hypertrophy are present. Pentoxifylline has anti-inflammatory, anti-apoptotic, anti-thrombotic and anti-proliferative properties.

Objective: The present study tested the hypothesis that pentoxifylline would attenuate cardiac remodeling induced by smoking.

Methods: Wistar rats were distributed in four groups: Control (C), Pentoxifylline (PX), Tobacco Smoke (TS), and PX-TS. After two months, echocardiography, invasive blood pressure measurement, biochemical, and histological studies were performed. The groups were compared by two-way ANOVA with a significance level of 5%.

Results: TS increased left atrium diameter and area, which was attenuated by PX. In the isolated heart study, TS lowered the positive derivate (+dp/dt), and this was attenuated by PX. The antioxidants enzyme superoxide dismutase and glutathione peroxidase were decreased in the TS group; PX recovered these activities. TS increased lactate dehydrogenase (LDH) and decreased 3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenases (OH-DHA) and citrate synthase (CS). PX attenuated LDH, 3-OH-DHA and CS alterations in TS-PX group. TS increased IL-10, ICAM-1, and caspase-3. PX did not influence these variables.

Conclusion: TS induced cardiac remodeling, associated with increased inflammation, oxidative stress, apoptosis, and changed energy metabolism. PX attenuated cardiac remodeling by reducing oxidative stress and improving cardiac bioenergetics, but did not act upon cardiac cytokines and apoptosis. (Arq Bras Cardiol. 2016; 106(5):396-403)

Keywords: Tobacco Smoke Pollution; Ventricular Remodeling; Pentoxifylline; Oxidative Stress; Cardiomyopathies.

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

Correspondência: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla •

Faculdade de Medicina de Botucatu – Unesp – Distrito de Rubião Jr s/n. CEP 18618-000, Botucatu, SP – Brasil

E-mail: paulasa@fmb.unesp.br

Artigo recebido em 05/11/15; revisado em 01/12/15; aceito em 19/02/16.

DOI: 10.5935/abc.20160057

Introdução

A fumaça de cigarro (FC) é um dos fatores de risco mais significativos para doenças cardiovasculares e prejudica diretamente o tecido do miocárdio.¹ Os efeitos tóxicos de FC no coração são chamados de cardiomiopatia por fumaça de cigarro.²

O potencial mecanismo envolvido em cardiomiopatia por fumaça de cigarro e outros danos induzidos por FC incluem inflamação, estresse oxidativo, anormalidades no metabolismo energético, apoptose, remodelação de junções comunicantes, hipertrofia e angiogênese.³⁻⁷ A inflamação tem um papel-chave neste processo.^{8,9} Uma das possibilidades é que a inflamação ative enzimas, como NADPH oxidase, que gera espécies reativas de oxigênio (EROs).^{10,11} A inflamação contribui para anormalidade no metabolismo energético, que leva à regeneração de EROs e baixos níveis de trifosfato de adenosina (ATP).² Durante o processo de remodelação, inflamação, estresse oxidativo e metabolismo energético foram reconhecidos como anormalidades bioquímicas que induzem alterações celulares, como apoptose.^{12,13} As consequências do processo de remodelação são alterações no tamanho, massa e geometria do coração, o que leva à disfunção cardíaca.¹⁴

Em geral, fumantes têm níveis elevados de citocinas inflamatórias.^{8,11} TNF- α , IFN- γ and ICAM-1 são consideradas citocinas-chave envolvidas na remodelação cardíaca, levando a disfunção endotelial, cascata de morte intracelular e produção de EROs.^{9,15,16}

A inflamação constitui uma característica comum na patogênese de remodelação cardíaca, mas terapias anti-inflamatórias para insuficiência cardíaca mostraram dados controversos.⁹

Os ensaios clínicos RENEWAL e ATTACH analisaram o efeito de medicamentos anti-TNF- α , etanercept e infliximab, em insuficiência cardíaca. Nenhum desses medicamentos teve efeito positivo. Em ensaios pequenos, pentoxifilina (PX), outro agente anti-TNF- α , proporcionou efeitos benéficos.^{15,17}

PX é um inibidor de fosfodiesterase com propriedades imunomoduladoras, incluindo a regulação negativa da síntese de TNF- α e a inibição da apoptose, proliferação celular e trombose.^{16,17} PX parece retardar deterioração cardíaca por mecanismos obscuros, mas uma combinação de efeitos imunomoduladores e vasodilatadores é possível.¹⁷

Prevenção e cessação do tabagismo são a estratégia mais importante para a redução de danos induzidos por FC, mas considerando-se o alto número de fumantes e o alto risco de morte cardiovascular nessa população, o estudo de medicamentos potencialmente benéficos para a minimização de danos cardíacos é extremamente relevante. PX é considerada um medicamento relevante, especialmente nas condições em que inflamação, estresse oxidativo e apoptose estão envolvidos.^{18,19}

Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o papel de PX na remodelação cardíaca induzida por exposição a FC.

Métodos

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de nossa Instituição. O estudo está em conformidade com os princípios éticos de

experimentação animal preconizados pelo Conselho Brasileiro de Experimentação Animal.

Ratos Wistar machos, pesando entre 200 e 300 g, foram divididos em quatro grupos experimentais: grupo controle (C), composto por animais não expostos a fumaça de cigarro; grupo fumaça de cigarro (FC), composto por animais expostos a fumaça de cigarro; grupo pentoxifilina (PX), composto por animais não expostos a fumaça de cigarro, alimentados com 100 mg/kg de pentoxifilina adicionada à ração;²⁰ e grupo (PX-FC) composto de animais expostos à fumaça de cigarro alimentados com 100mg/kg de pentoxifilina adicionada à ração. Todos os animais foram observados durante dois meses.

Durante a primeira semana, a fumaça foi liberada numa proporção de 10 cigarros, duas vezes por dia no período da tarde, com intervalos de descanso de 10 minutos. O número de cigarros foi aumentado para uma proporção de 40 cigarros por dia (20 cigarros/30 min. de intervalo de manhã e à tarde) até a finalização do estudo.^{21,22}

Depois deste período, foram feitas análises morfológicas e funcionais, e amostras biológicas foram coletadas para análises bioquímicas.

Pressão arterial sistólica invasiva

As medições de pressão arterial invasiva foram tiradas por canulação da artéria femoral. Os ratos foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg) e xilazina (1 mg/kg) por via intraperitoneal. A musculatura da região inguinal foi dissecada para permitir a visualização da artéria femoral esquerda.

A artéria femoral foi dissecada e isolada, e a porção distal foi amarrada. Um cateter interno com cloreto de polivinilo (diâmetro 0.5 mm) cheio de heparina (500 IU/mL) foi colocado na artéria femoral, e o cateter foi conectado a um polígrafo (Windograf, GOULD, Ohio, EUA). A média de 10 medições consecutivas da pressão arterial diastólica (PAD) e sistólica (PAS), obtida por meio de registros gráficos do polígrafo foi registrada. A pressão arterial média foi calculada usando a fórmula $(PAS + 2 \times PAD) / 3$. Depois da medição de pressão, o cateter foi removido e a porção proximal da artéria femoral foi ocluída.²³

Estudo Ecocardiográfico

Antes da eutanásia, todos os animais foram pesados e avaliados por um exame de ecocardiografia transtorácica, como previamente descrito.²⁴ Os exames foram feitos usando um ecocardiógrafo (SONO CT HDI-5000, Philips Healthcare, Holanda, Europa), equipado com transdutor de raios fásicos de 7.5MHz. Todas as medições foram obtidas pelo mesmo observador, em acordo com o método recomendado pela Associação Europeia de Ecocardiografia.²⁵

Função ventricular esquerda in vitro

O estudo isovolumétrico do coração isolado foi feito como previamente descrito.²⁴ O coração inteiro foi rapidamente removido do tórax e transferido para o aparelho de perfusão (modelo 830 Hugo Sachs Electronick – Grunstasse, Alemanha). A solução Krebs-Henseleit tinha a seguinte composição (mmol/L): 115 NaCl, 5,4 KCl, 1,25 CaCl, 1,2 MgSO₄, 1,15 NaH₂SO₄,

1,2 Na₂SO₄, 25 NaHCO₃ e 11 glicose. No ventrículo com batimento isovolumétrico (200 batidas/min), foi inserido um balão no ventrículo esquerdo. O volume do balão foi aumentado em incrementos de 0,02 mL sobre a faixa de pressão diastólica final de 0-30 mm Hg. A pressão e o volume dentro do balão foram registradas seguindo cada incremento, e as pressões corresponderam ao volume e à pressão diastólica final.²⁴

Amostras

Os animais foram sacrificados com uma grande dose de pentobarbital, e seu coração e sangue foram dissecados. Uma porção do coração foi armazenada a -80°C. Cortes transversais do ventrículo esquerdo foram colocadas em formalina tamponada a 4% e embebidas em parafina. O resto do coração foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C.

Metabolismo energético e estresse oxidativo

Amostras do ventrículo esquerdo (200 mg) foram usadas para medir o total do hidroperóxido de proteínas de lipídio (LH) e enzimas de estresse oxidativo: glutatona peroxidase (GSHPx, E.C.1.11.1.9), dismutação do superóxido (SOD, E.C.1.15.1.1), catalase (CAT, E.C.1.11.1.6) e as enzimas do metabolismo energético desidrogenases 3-hidroxiacil Coenzima A (OHADH, E.C.1.1.1.35.), desidrogenase de lactato (LDH, E.C.1.1.1.27) e citrato sintase (CS; E.C.4.1.3.7.), como previamente descrito.²⁴

Western blot para avaliação de Caspase 3 e expressão de BCL-2

A extração da proteína foi feita com tampão RIPA, diluída em tampão Laemmle, e separada por eletroforese usando o Mini Protean system 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). As proteínas foram transferidas para um sistema de membrana de nitrocelulose no Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A membrana foi incubada com o anticorpo primário, o anticorpo caspase-3 (Cell Signaling Technology®) e BCL-2 (linfoma de células B-2) durante a noite. A membrana foi lavada e incubada com o anticorpo secundário, anti-IgG HRP (Cell Signaling Technology®), por duas horas sob agitação. Foi feita a imunodeteção usando a quimioluminescência em acordo com instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, EUA). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes de raio x (X-Omat AR film) (Eastman Kodak Co., EUA) em períodos de tempo pré-determinados para cada proteína estudada. O anticorpo usado para normalização foi o GAPDH (6C5), IgG de coelho (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Europe) a uma diluição de 1:5000. Análises quantitativas das manchas foram feitas pelo software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), que é um software gratuito, disponível no site <http://www.scioncorp.com/>.

Estatísticas

Os dados estão representados como média e o desvio padrão. Variáveis com distribuições não-normais foram normalizados antes das comparações. Um teste ANOVA de duas vias, complementado pelo teste Holm-Sidak, foi usado

para comparar os grupos. Os dois fatores considerados foram exposição FC e PX. No caso de uma interação entre os fatores ($p < 0,05$), os grupos foram analisados independentemente (C X FC; C X PX; FC X PX-FC e PX X PX-FC). Se não houve interação, comparações marginais foram feitas dentro dos fatores FC (com ou sem exposição a FC) ou PX (com ou sem PX).

O teste estatístico mostra 3 valores "P": um valor P para a interação entre FC e PX [P (FC x PX)], outro valor P para a influência de FC [P (FC)], e o terceiro para a influência de PX [P (PX)]. A análise dos dados foi feita com SigmaStat para Windows v2.03 (SPSS Inc, Chicago, IL). O nível de significância foi considerado 5%.

Resultados

A pressão arterial média (C = 84 ± 3 ; PX = 86 ± 4 ; FC = 93 ± 3 ; PX-FC = 90 ± 3 mmHg) ($p = 0,5$), frequência cardíaca e peso corporal eram similares entre os grupos.

Com relação aos efeitos do tabagismo, a exposição a FC aumentou o diâmetro e a área do átrio esquerdo e prejudicou a função sistólica, diminuindo a derivada positiva (+dp/dt) (Tabela 1).

Os dados inflamatórios evidenciaram que os grupos expostos a FC apresentaram níveis mais altos de IL-10 e ICAM (Tabela 2).

Sobre o estresse oxidativo, as enzimas antioxidantes SOD (C = $20,0 \pm 1,93$; PX = $16,4 \pm 1,65$; FC = $11,0 \pm 0,89$; PX-FC = $21,8 \pm 2,96$) ($p < 0,001$) e GSHPx (C = $36,4 \pm 4,80$; PX = $33,2 \pm 6,45$; FC = $17,0 \pm 3,92$; PX-FC = $35,8 \pm 5,29$) ($p < 0,001$) mostraram diminuição no grupo FC (figura 1). Além disso, os grupos expostos a FC (FC e PX-FC) apresentaram níveis mais elevados de LH em comparação com os grupos que não foram expostos a FC (C = $132 \pm 14,7$; PX = $103 \pm 14,5$ X FC = $176 \pm 11,5$; PX-FC = $126 \pm 11,9$) (Figura 1).

Com relação ao metabolismo energético, FC aumentou LDH (C = $70,7 \pm 11,6$; PX = $73,5 \pm 10,6$; FC = $133 \pm 21,9$; PX-FC = $106 \pm 9,88$) ($p = 0,003$) e diminuiu as desidrogenases 3-hidroxiacil Coenzima A (OHDHA) (C = $31,4 \pm 1,48$; PX = $34,8 \pm 2,70$; FC = $15,9 \pm 2,12$; PX-FC = $55 \pm 9,88$) e CS (C = $31,9 \pm 5,00$; PX = $35,0 \pm 4,75$; FC = $24,2 \pm 3,57$; PX-FC = $36,1 \pm 1,71$) ($p = 0,02$) (Figura 2).

Por fim, FC também aumentou caspase 3, sem interferência em BCL-2 (Figura 3).

Sobre os efeitos de PX, o medicamento atenuou a área do átrio esquerdo e melhorou função sistólica, aumentando +dp/dt no grupo FC (Tabela 1). PX recuperou as atividades de enzimas antioxidantes e melhorou o metabolismo energético em grupos expostos a FC. Independentemente da exposição a FC, PX reduziu danos de estresse oxidativo, diminuindo LH (Figuras 1 e 2).

PX não teve influência na inflamação (Tabela 2) e apoptose (Figura 3).

Discussão

O objetivo deste estudo foi investigar o papel da PX na remodelação cardíaca induzida por exposição a FC. FC induziu remodelação cardíaca associada a inflamação,

Tabela 1 – Dados de estudos ecocardiográficos e isolados do coração

	C (8)	PX (11)	FC (10)	PX-FC (11)	P (PX-FC)	P (FC)	P (PX)
DDVE/PC (mm/kg)	19,0 ± 1,68	19,4 ± 1,13	19,96 ± 1,86	19,98 ± 1,57	0,18	0,70	0,67
DSVE /PC (mm/kg)	7,84 ± 0,77	8,60 ± 1,09	9,03 ± 1,59	8,89 ± 1,28	0,07	0,27	0,43
ERPVE	0,34 ± 0,05	0,37 ± 0,06	0,34 ± 0,05	0,35 ± 0,04	0,46	0,38	0,16
DAE /PC (mm/kg)	10,0 ± 0,48	11,3 ± 1,12	11,7 ± 1,27*	11,6 ± 0,96*	0,14	0,02	0,18
AAE /PC (cm ² / kg)	0,53 ± 0,79	0,56 ± 0,13	0,69 ± 0,06†	0,58 ± 0,08	0,03	0,00	0,20
AAE / AAD	1,14 ± 0,15	1,20 ± 0,16	1,31 ± 0,17*	1,25 ± 0,13*	0,20	0,04	0,07
IMVE (g/kg)	1,46 ± 0,20	1,52 ± 0,24	1,54 ± 0,19	1,49 ± 0,25	0,53	0,96	0,53
FEJ	92,8 ± 1,71	90,9 ± 3,30	90,3 ± 3,78	90,5 ± 4,56	0,37	0,48	0,20
FEN %	58,7 ± 3,30	55,6 ± 5,22	54,7 ± 6,15	55,3 ± 6,84	0,33	0,51	0,97
PS ‡(mmHg)	164 ± 14,5	153 ± 3,30	141 ± 7,18	156 ± 9,90	0,26	0,39	0,85
+dp/dt † (mmHg/s)	3851 ± 367	3500 ± 185	2725 ± 228†	3950 ± 320	0,02	0,30	0,20
-dp/dt ‡ (mmHg/s)	2082 ± 311	2417 ± 323	1925 ± 109	2200 ± 129	0,91	0,48	0,26

C: grupo de controle; PX: grupo pentoxifilina; FC: grupo fumaça de cigarro; PX-FC: grupo fumaça de cigarro e pentoxifilina. Valor de *P*-*p* para interação entre FC e PX. Na ausência de interações, *P*_{ts} e *P*_{px} devem ser considerados. Valor de *P*_{ts-p} para animais expostos a FC (FC + PX-FC) comparados com grupos não expostos a FC (C+PX). Valor de *P*_{px-p} para animais que receberam PX (PX + PX-FC) comparado aos grupos que não receberam PX (C+FC).

* Grupos expostos a FC são diferentes de grupos não expostos a FC.

† Grupo FC é diferente dos grupos PX-FC e C.

DDVE: diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo; ERPVE: espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo; DAE: diâmetro do átrio esquerdo; AAE: área atrial esquerda; AAD: área atrial direita; IMVE: índice de massa ventricular esquerda; FEN: fração de encurtamento; FEJ: fração de ejeção. Os dados são expressos como a média ± de desvio padrão. Nível de significância: 5%. PS: pressão sistólica cardíaca máxima; +dp/dt: derivada positiva máxima; -dp/dt: derivada positiva mínima; PC: peso corporal.

Tabela 2 – Dados inflamatórios

	C (6)	PX (6)	FC (6)	PX-FC (6)	P FC x PX	P (FC)	P (PX)
TNF-α (pg/mL)	3,00 ± 1,91	1,71 ± 0,70	3,71 ± 2,50*	5,50 ± 3,90*	0,21	0,07	0,90
IL-10 (pg/mL)	15,1 ± 7,91	9,20 ± 7,30	21,9 ± 16,6*	28,1 ± 14,7*	0,26	0,02	0,90
ICAM (pg/mL)	4,1 ± 0,40	3,70 ± 0,20	4,30 ± 0,30*	4,30 ± 0,60*	0,29	0,03	0,20

C: grupo de controle; PX: grupo pentoxifilina; FC: grupo fumaça de cigarro; PX-FC: grupo fumaça de cigarro e pentoxifilina. Valor de *P*-*p* para interação entre FC e PX. No caso de *P* < 0,05, diferentes letras indicam significância estatística. Na ausência de interações, *P*_{ts} e *P*_{px} devem ser considerados. Valor de *P*_{ts-p} para animais expostos a FC (FC+PX-FC) comparado a grupos não expostos a FC (C+PX). Valor de *P*_{px-p} para animais que receberam PX (PX+PX-FC) comparado a grupos que não receberam PX (C+FC).

* Grupos expostos a FC são diferentes dos grupos não expostos a FC.

TNF-α: fator de necrose tumoral; IL-10: interleucina 10; ICAM: Molécula de Adesão Intercelular 1

estresse oxidativo, apoptose e metabolismo energético alterado. PX atenuou remodelação cardíaca, reduzindo estresse oxidativo e melhorando bioenergética cardíaca.

Considerando-se as consequências do processo de remodelação, estudos anteriores mostraram que animais expostos a FC apresentaram diferentes padrões de remodelação, incluindo hipertrofia, dilatação, hipocinesia e disfunção.^{3,21,26-29} Os presentes dados mostraram que FC alterou a morfologia cardíaca, como evidenciado pela área aumentada do átrio esquerdo e hipertrofia dos miócitos. Além disso, FC diminuiu +dp/dt, parâmetro de função sistólica cardíaca sob condições controladas. Portanto, PX atenuou as variáveis morfológicas e melhorou função cardíaca, sugerindo que este medicamento tem um efeito positivo na remodelação cardíaca induzida por exposição a FC.

Considerando-se os mecanismos do processo de remodelação, há uma ampla variedade de anormalidades bioquímicas, celulares, intersticiais e moleculares que contribuem para alterações morfológicas e disfunção cardíaca.³⁰ Portanto, a razão para o estudo do papel da PX na atenuação de remodelação cardíaca induzida por FC é baseada no fato de que este medicamento tem propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, anti-proliferativas e vasodilatadoras.¹⁷ Na doença isquêmica do coração, a PX melhorou marcadores inflamatórios e apoptóticos e fração de ejeção sistólica.^{15,16,31} Além disso, PX via oral no pré-operatório melhorou a fração de ejeção e reduziu citocinas inflamatórias pós cirurgia de revascularização.³² Contudo, os efeitos da PX em cardiomiopatia por fumaça de cigarro ainda são desconhecidos.

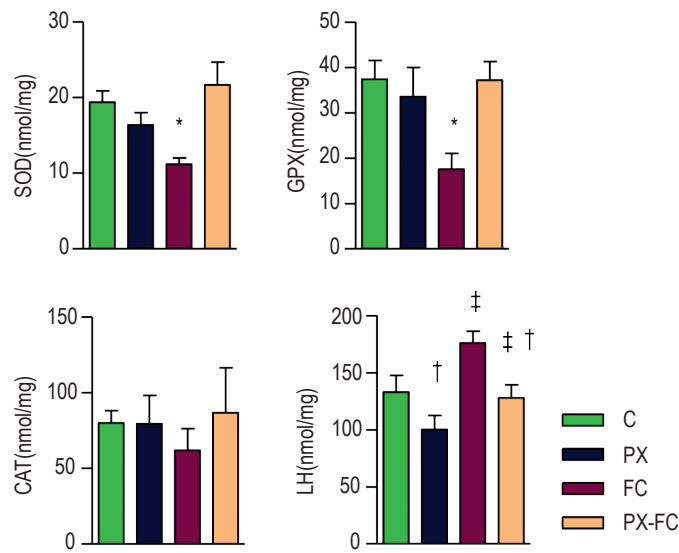


Figura 1 – Estresse Oxidativo. C: grupo de controle; PX: grupo pentoxifilina; FC: grupo fumaça de cigarro; PX-FC: grupo fumaça de cigarro e pentoxifilina; SOD: dismutação do superóxido. CAT: catalase; GSH-PX: glutatona peroxidase; LH: hidroperóxido lipídico. Houve interação entre FC e PX para SOD ($p < 0,001$) e GSH-PX ($p < 0,001$). Não houve interação entre FC e PX para LH que estava elevado em grupos expostos a FC ($p < 0,001$) e mais baixo em grupos que receberam PX ($p < 0,001$). * Grupo FC é diferente de PX-FC e C. † Grupos expostos a FC são diferentes de grupos não expostos a FC. ‡ Grupos que receberam PX são diferentes de grupos que não receberam PX. Os dados são expressos como a média \pm 2 SE. Nível de significância: 5%.

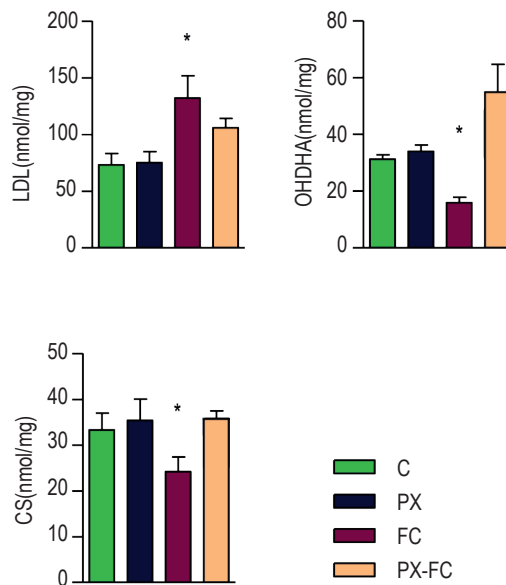


Figura 2 – Metabolismo Energético. C: grupo de controle; PX: grupo pentoxifilina; FC: grupo fumaça de cigarro; PX-FC: fumaça de cigarro e pentoxifilina. Houve interação entre FC e PX para LDH ($p = 0,02$), OHDHA ($p < 0,001$) e CS ($p = 0,01$). LDH: lactato desidrogenases; OHDHA: 3-hidroxiacil coenzima A desidrogenase; CS: citrato sintase. *Grupo exposto a FC é diferente de PX-FC e C. Os dados são expressos como a média \pm 2 SE. Nível de significância: 5%.

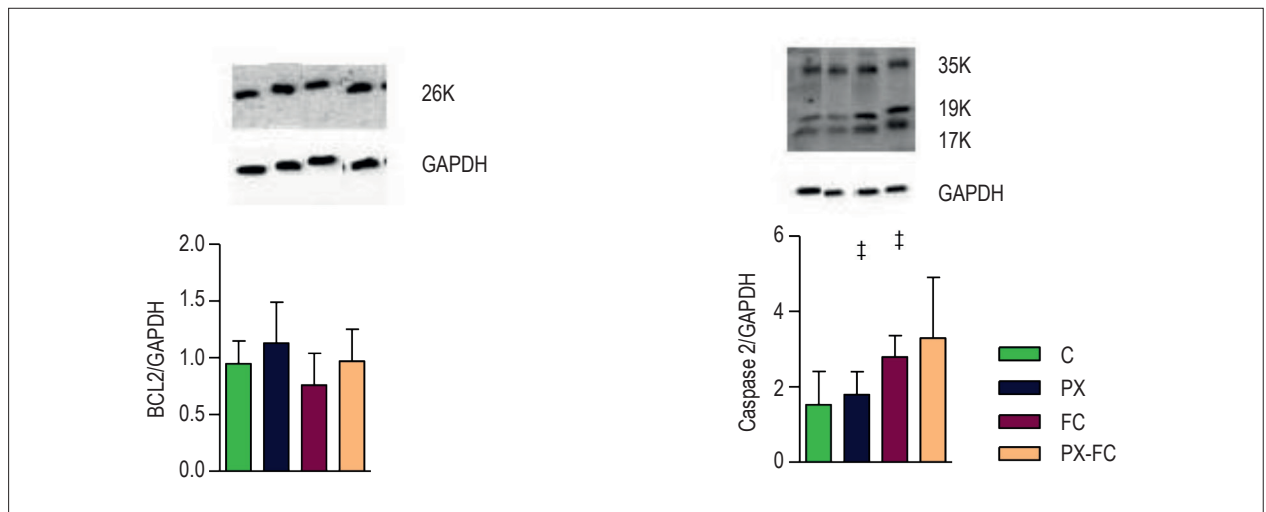


Figura 3 – Apoptose. C: grupo de controle; PX: grupo pentoxifilina; FC: grupo fumaça de cigarro; PX-FC: grupo fumaça de cigarro e pentoxifilina; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. BCL-2 (B-cell lymphoma-2). ‡ Grupos expostos a FC (a) são diferentes de animais não expostos a FC ($p = 0,01$). Os dados são expressos como a média \pm 2 SE. Nível de significância: 5%.

Do ponto de vista dos parâmetros bioquímicos, nossos dados mostram que FC aumentou adesão molecular e citocinas Th2, como ICAM e IL-10.³¹ Expressão elevada de ICAM e IL-10 indica que uma lesão imunologicamente mediada está presente neste modelo.¹⁶ Ao mesmo tempo, PX não influenciou esses parâmetros inflamatórios. Na literatura atual, há alguns dados que mostram que PX reduziu citocinas pró-inflamatórias, como a molécula de adesão celular-1, e aumentou citocinas anti-inflamatórias, como IL-10.^{15,16} Há outros estudos em que PX não teve influência sobre a via de TNF- α .¹⁷ Porém, foi sugerido que PX exerce efeitos biológicos e imunomoduladores independentemente do nível de citocinas.¹⁷

Com relação a anormalidades celulares, o presente estudo mostrou que FC aumentou atividade de caspase-3. PX foi descrita como um agente anti-apoptótico e anti-proliferativo. Por exemplo, administração de PX inibe apoptose do miocárdio após cardiomiopatia dilatada induzida por adriamicina, bloqueando o circuito apoptótico dependente de caspase-3.³³ Contudo, em nosso estudo, PX não influenciou estes parâmetros.

Este estudo mostrou que PX atenuou estresse oxidativo e melhorou metabolismo energético. Danos mediados por EROs foram observados no grupo FC, evidenciado por baixa atividade de SOD e GPX seguida por níveis elevados de LH. PX reduziu LH em animais expostos ou não a FC. PX aumentou atividade de SOD e GPX nos animais expostos a FC. Acredita-se atualmente que estresse oxidativo tem papel central na toxicidade cardíaca, enquanto defesas anti-oxidantes têm papel crucial na proteção de tecidos contra danos.¹¹ Foi reportado que PX pode atenuar significativamente o estresse oxidativo cardíaco. Ratos alimentados com a dieta ocidental apresentaram hipertensão leve e o uso de PX aumentou atividades de

antioxidantes e reduziu pressão arterial.³⁴ Além disso, os efeitos terapêuticos previamente descritos de pentoxifilina via óxido nítrico sintase em tecido cardíaco em modelo experimental de diabetes representam outra importante via do estresse oxidativo.³⁵

Com relação ao metabolismo energético, FC elevou LDH, o que pode ser responsável por dano cardíaco ou metabolismo de glicose elevada. As atividades de CS e OHDHA foram reduzidas no grupo FC, sugerindo comprometimento da oxidação de ácidos gordos e respiração e densidade mitocondrial. O padrão anormal de bioenergéticas cardíacas mostrou que esses dados também foram previamente observados em modelos de remodelação cardíaca seguida por disfunção cardíaca.^{29,36} Apoio à hipótese de que FC prejudica bioenergética cardíaca vem de estudos em que FC introduziu diminuição significativa nas taxas de respiração e fosforilação da mitocôndria.²

A consequência desta alteração é a formação de EROs e a baixa geração de energia para relaxamento e contração de miócitos.

O papel da PX como antioxidante e modulador do metabolismo energético foi descrito em modelos diferentes da remodelação cardíaca. No contexto de esteatose hepática, os efeitos benéficos observados em pacientes que receberam PX podem ser mediados por uma redução no estresse oxidativo e na peroxidação lipídica.^{37,38} Num modelo de edema de pata, PX aumentou a atividade de SOD e GSH-PX, atenuando a peroxidação de lipídios. Considerando a função mitocondrial, é possível que PX melhore respiração mitocondrial no músculo esquelético de pacientes ateroscleróticos.³⁹ PX pode elevar os níveis intracelulares de AMP cíclico (cAMP) e GMP cíclico (cGMP).⁴⁰

Limitação de Estudo

O presente estudo tem algumas limitações, que devem ser abordadas devido à falta de avaliação das vias totais de apoptose e inflamação. Além disso, diferentes doses de PX não foram testadas. Por fim, são dados experimentais que nos permitem fazer hipóteses, mas não recomendações terapêuticas.

Conclusão

Em conclusão, o presente estudo revelou que FC induziu remodelação cardíaca, associada a inflamação elevada, estresse oxidativo, apoptose e metabolismo energético alterado. PX atenuou a remodelação cardíaca, reduzindo estresse oxidativo e melhorando bioenergética cardíaca, mas não agiu sobre citocinas cardíacas nem apoptose.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Minicucci M, Paiva S, Zornoff L, Azevedo P; Obtenção de dados: Minicucci M,

Oliveira F, Santos P, Polegato B, Roscani M, Fernandes AA, Lustosa B,; Análise e interpretação dos dados: Minicucci M, Oliveira F, Santos P, Polegato B, Paiva S, Zornoff L, Azevedo P; Análise estatística: Minicucci M, Oliveira F, Santos P, Paiva S, Zornoff L, Azevedo P; Obtenção de financiamento: Azevedo P; Redação do manuscrito: Minicucci M, Azevedo P; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Fernandes AA, Paiva S, Zornoff L, Azevedo P.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Referências

- Rosen BD, Saad MF, Shea S, Nasir K, Edvardsen T, Burke G, et al. Hypertension and smoking are associated with reduced regional left ventricular function in asymptomatic individuals: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(6):1150-8.
- Gvozdkajova A, Bada V, Sany L, Kucharska J, Kruty F, Bozek P, et al. Smoke cardiomyopathy: disturbance of oxidative processes in myocardial mitochondria. *Cardiovasc Res*. 1984;18(4):229-32.
- Gu L, Pandey V, Geenen DL, Chowdhury SA, Piano MR. Cigarette smoke-induced left ventricular remodeling is associated with activation of mitogen-activated protein kinases. *Eur J Heart Fail*. 2008;10(11):1057-64.
- Zhou X, Li C, Xu W, Chen J. Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis, and inflammation. *PLoS One*. 2012;7(7):e40424.
- Zapaterini JR, de Moura NA, Ribeiro DA, Rodrigues MA, Barbisan LF. Effects of cigarette smoke and ethanol intake on mouse oesophageal mucosa changes induced by dietary zinc deficiency and deoxycholic acid supplementation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;111(2):92-8.
- Rua Ede A, Porto ML, Ramos JP, Nogueira BV, Meyrelles SS, Vasquez EC, et al. Effects of tobacco smoking during pregnancy on oxidative stress in the umbilical cord and mononuclear blood cells of neonates. *J Biomed Sci*. 2014;21:105.
- Novo R, Freire CM, Felisbino S, Minicucci MF, Azevedo PS, Zornoff LA, et al. Smoking is associated with remodeling of gap junction in the rat heart: smoker's paradox explanation? *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(3):274-80.
- Arnsen Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 2010;34(3):J258-65.
- Mann DL. Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circ Res*. 2015;116(7):1254-68.
- Rafaco BP, Azevedo PS, Polegato BF, Fernandes AA, Bertoline MA, Fernandes DC, et al. Tobacco smoke induces ventricular remodeling associated with an increase in NADPH oxidase activity. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(3-4):305-12.
- Comandini A, Marzano V, Curradi G, Federici G, Urbani A, Saltini C. Markers of anti-oxidant response in tobacco smoke exposed subjects: a data-mining review. *Pulm Pharmacol Ther*. 2010;23(6):482-92.
- Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301(6):H2181-90.
- Minicucci MF, Azevedo PS, Polegato BF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling induced by smoking: concepts, relevance, and potential mechanisms. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 2012;11(6):442-7.
- Zornoff LA, Paiva SA, Duarte DR, Spadaro J. Ventricular remodeling after myocardial infarction: concepts and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(2):150-64.
- Sliwa K, Woodiwiss A, Kone VN, Candy G, Badenhorst D, Norton G, et al. Therapy of ischemic cardiomyopathy with the immunomodulating agent pentoxifylline: results of a randomized study. *Circulation*. 2004;109(6):750-5.
- Fernandes JL, de Oliveira RT, Mamoni RL, Coelho OR, Nicolau JC, Blotta MH, et al. Pentoxifylline reduces pro-inflammatory and increases anti-inflammatory activity in patients with coronary artery disease--a randomized placebo-controlled study. *Atherosclerosis*. 2008;196(1):434-42.
- Shaw SM, Shah MK, Williams SC, Fildes JE. Immunological mechanisms of pentoxifylline in chronic heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2009;11(2):113-8.
- Rosato V, Abenavoli L, Federico A, Masarone M, Persico M. Pharmacotherapy of alcoholic liver disease in clinical practice. *Int J Clin Pract*. 2016;70(2):119-31.
- Bhanot S, Leehey DJ. Pentoxifylline for diabetic nephropathy: an important opportunity to re-purpose an old drug? *Curr Hypertens Rep*. 2016;18(1):8.
- Boerma M, Roberto KA, Hauer-Jensen M. Prevention and treatment of functional and structural radiation injury in the rat heart by pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2008;72(1):170-7.
- 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(11):1081-5.
- 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(1):60-6.

23. Wang Y, Cong Y, Li J, Li X, Li B, Qi S. Comparison of invasive blood pressure measurements from the caudal ventral artery and the femoral artery in male adult sd and wistar rats. *PLoS One*. 2013;8(4):e60625.
24. Azevedo PS, Minicucci MF, Chiuso-Minicucci F, Justulin LA Jr, Matsubara LS, Matsubara BB, et al. Ventricular remodeling induced by tissue vitamin A deficiency in rats. *Cell Physiol Biochem*. 2010;26(3):395-402.
25. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(12):1440-63.
26. Azevedo PS, Minicucci MF, Matsubara BB, Matsubara LS, Duarte DR, Paiva SA, et al. [Remodeling pattern and ventricular function in rats exposed to cigarette smoke.]. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(2):209-12.
27. Denipote F, Ardisson LP, Azevedo PS, Minicucci MF, Lima-Leopoldo AP, Chiuso-Minicucci F, et al. Influence of taurine on cardiac remodeling induced by tobacco smoke exposure. *Cell Physiol Biochem*. 2011;27(3-4):291-8.
28. Hartz AJ, Anderson AJ, Brooks HL, Manley JC, Parent GT, Barboriak JJ. The association of smoking with cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 1984;311(19):1201-6.
29. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*. 2013;21(3):135-40.
30. Azevedo PS, Polegato BF, Minicucci MF, Paiva SA, Zornoff LA. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. *Arq Bras Cardiol*. 2016;106(1):62-9.
31. Wrigley BJ, Lip GY, Shantsila E. The role of monocytes and inflammation in the pathophysiology of heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2011;13(11):1161-71.
32. Mansourian S, Bina P, Fehri A, Karimi AA, Boroumand MA, Abbasi K. Preoperative oral pentoxifylline in case of coronary artery bypass grafting with left ventricular dysfunction (ejection fraction equal to/less than 30%). *Anatol J Cardiol*. 2015;15(12):1014-9.
33. Zang Z, Li S, Lin Y, Li X, Li Y, Qin Y, et al. Pentoxifylline prevents diamycin-induced myocardial fibrosis and apoptosis in rats. *Int Heart J*. 2015;56(6):651-5.
34. Mayyas F, Alzoubi KH, Al-Taleb Z. An evaluation of the effect of pentoxifylline on blood pressure and myocardial oxidative status following intake of western diet. *Clin Exp Hypertens*. 2015;37(8):666-73.
35. Karabulut D, Ulusoy HB, Kaymak E, Sonmez MF. Therapeutic effects of pentoxifylline on diabetic heart tissue via NOS. *Anatol J Cardiol*. 2015 May 5. [Epub ahead of print].
36. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VC, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, et al. The role of lipotoxicity in smoke cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014;9(12):e113739.
37. Zein CO, Lopez R, Fu X, Kirwan JP, Yerian LM, McCullough AJ, et al. Pentoxifylline decreases oxidized lipid products in nonalcoholic steatohepatitis: new evidence on the potential therapeutic mechanism. *Hepatology*. 2012;56(4):1291-9.
38. Vircheva S, Alexandrova A, Georgieva A, Mateeva P, Zamfirova R, Kubera M, et al. In vivo effects of pentoxifylline on enzyme and non-enzyme antioxidant levels in rat liver after carrageenan-induced paw inflammation. *Cell Biochem Funct*. 2010;28(8):668-72.
39. Pipinos II, Boska MD, Shepard AD, Anagnostopoulos PV, Katsamouris A. Pentoxifylline reverses oxidative mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle. *J Surg Res*. 2002;102(2):126-32.
40. Sridharan V, Tripathi P, Sharma S, Corry PM, Moros EG, Singh A, et al. Effects of late administration of pentoxifylline and tocotrienols in an image-guided rat model of localized heart irradiation. *PLoS One*. 2013;8(7):e68762.