

ARTIGO ORIGINAL

Apoptose muscular esquelética em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva

Skeletal muscle apoptosis in patients with congestive heart failure

Sírio Hassem Sobrinho¹, Moacir Fernandes de Godoy²

Mestre em Cardiologia pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto¹, Professor Doutor de Cardiologia, Livre Docente em Cardiologia pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto².

Resumo A disfunção do músculo cardíaco não é necessariamente responsável pela maioria dos sintomas que ocorrem em pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva. Especula-se que a disfunção da musculatura esquelética por apoptose seja também um dos componentes da síndrome. Os objetivos do presente estudo foram de avaliar a presença ou não de apoptose muscular esquelética em miócitos do músculo vasto lateral da coxa em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva da classe funcional II e III da NYHA, e observar se há correlação entre apoptose e os parâmetros hemodinâmicos. Catorze pacientes com ICC, sob terapêutica otimizada, foram submetidos à biópsia do músculo vasto lateral a céu aberto com análise sob a coloração de Hematoxilina Eosina. Deste grupo, dois pacientes (14,3%) apresentaram positividade para apoptose, além disso, todos os catorze tinham algum grau de degeneração muscular. Não houve correlação entre a presença de apoptose e os parâmetros hemodinâmicos. Estes resultados mostraram que os pacientes com ICC podem apresentar apoptose em musculatura esquelética, associada a maior ou menor grau de degeneração muscular, achado que justificaria alguns dos sintomas. A análise dos tecidos por outras técnicas poderá constatar maior prevalência do fenômeno.

Palavras-chave Apoptose; Insuficiência Cardíaca Congestiva; Músculo esquelético.

Abstract Cardiac muscle dysfunction does not necessarily accounts for some symptoms in patients with heart failure. Dysfunction of skeletal muscle due to apoptosis may be one of the components of the syndrome. The objectives of this study were to evaluate the presence or absence of apoptosis in skeletal muscles myocytes of vastus lateralis of the thigh in patients with congestive heart failure in the NYHA functional classes II and III, and to observe if there was any correlation between apoptosis and hemodynamics parameters. Fourteen patients with congestive heart failure undergoing conventional therapy were submitted to biopsies of the vastus lateralis muscle with open surgery. These were stained by Haematoxylin Eosin. Two patients out of this group (14.3%) showed positive results for apoptosis. All of them presented some degree of muscle degeneration. These results showed that the patients with congestive heart failure may present apoptosis of the skeletal muscle; moreover, they had some muscular degeneration degree; these can be associated with one of those symptoms. There was no correlation between apoptosis and hemodynamics parameters. Analysis of tissues using others alternative techniques may provide an effective rate in relation to this phenomenon.

Keywords Apoptosis; Congestive heart failure; Skeletal muscle.

Introdução

A Insuficiência Cardíaca Congestiva é uma complexa síndrome clínica, caracterizada por anormalidade ventricular e disfunção neurohumoral, acompanhada por intolerância ao esforço, retenção hídrica e redução da longevidade.¹ Ela está associada com alterações endoteliais, hipertrofia ventricular, ativação neurohormonal, alteração nas citocinas e distúrbio hemodinâmico.²

A maioria dos pacientes com insuficiência cardíaca congestiva

apresenta intolerância ao esforço e fadiga muscular. Tem sido questionado se a intolerância à atividade física pode ser justificada apenas pelos clássicos parâmetros da disfunção miocárdica.^{3,4} É conhecido o papel do fluxo sanguíneo regional e da musculatura esquelética na intolerância ao esforço. Anormalidades intrínsecas da musculatura esquelética incluem: atrofia⁵, disfunção muscular⁶, mudança na composição da fibra⁷⁻⁹, e alterações do metabolismo.¹⁰⁻¹² Todas estas mudanças são par-

cialmente responsáveis pela intolerância ao esforço na Insuficiência Cardíaca Congestiva, embora uma relação entre a incapacidade muscular e a performance do coração ainda não foi estudada adequadamente até agora.

Tem-se questionado se a apoptose muscular esquelética teria alguma importância no mecanismo de fadiga muscular nos pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva.

A primeira evidência direta de dois tipos distintos de morte celular veio dos estudos histoquímicos de mudanças lisossômicas na isquemia hepática por Kerr e colaboradores nas décadas de 60 e 70.¹³⁻²⁰

A morte celular programada difere da necrose celular em muitos aspectos. A necrose celular ou morte acidental é uma morte passiva¹⁶ e é causada por um extremo trauma ou injúria.¹³ Durante o processo necrótico a cromatina torna-se muito floculada e o DNA dessas células é fagocitado aleatoriamente, dando um aspecto nodoso quando analisado pelo processo de eletroforese em agarose. O principal achado na necrose é o aumento do volume celular. O rápido aumento do volume celular resulta em rotura da membrana e lise da célula.^{15,21} A liberação de células mortas para o espaço extracelular pode causar mais injúria e até morte de células vizinhas, causando adicionalmente inflamação e infiltração. A apoptose clássica envolve marginalização e condensação da cromatina nuclear nos estágios iniciais, retração citoplasmática, membrana bolhosa, fragmentação cromatínica e finalmente formação dos corpos apoptóticos. Consideráveis mudanças bioquímicas ocorrem para facilitar a organização e remoção dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas. O plasmalema, as mitocôndrias, lisossomos, e a membrana sarcoplasmática permanecem intactas na apoptose e o processo de fagocitose é feito principalmente pelas células normais adjacentes e alguns macrófagos. O processo apoptótico requer energia, ao contrário do processo necrótico. A necrose sempre causa dano, ao contrário da apoptose que pode ser um processo útil ou danoso, dependendo das circunstâncias.²²

Vários genes têm sido identificados no processo de regulação da apoptose celular, em particular o oncogen dominante c-myc, Bcl-2 e os genes supressores tumorais, como o p-53, têm-se mostrado potentes reguladores da apoptose.^{23,24} Há 20 membros da família dos genes Bcl-2. Alguns são pró-apoptóticos ou genes da morte e a maioria são anti-apoptóticos ou genes da sobrevivência. O gene supressor tumoral p-53 é pró-apoptótico.

Os principais efetores da apoptose são uma família de proteases chamadas de caspases.²⁵ Além dos genes, o Óxido Nítrico tem importante papel na regulação da apoptose.²⁶ Baixos níveis de Óxido Nítrico são anti-apoptóticos e altos níveis provêm a apoptose.²⁶ Situações particulares que elevam o nível de Óxido Nítrico pela enzima Óxido Nítrico Sintetase propiciam a apoptose.^{27,28} Com base nas evidências descritas anteriormente e de que a expressão Óxido Nítrico Sintetase é encontrada significativamente aumentada na musculatura esquelética de pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva, fundamentou-se a hipótese de que a apoptose não só ocorre na musculatura miocárdica, mas também na musculatura esquelética de pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva.²⁹

Recentemente demonstrou-se que a apoptose muscular esquelética ocorre em quase metade dos pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva não ocorrendo em indivíduos normais. Além disso, ela depende do grau funcional do enfermo.²⁹

O objetivo do presente trabalho foi determinar a prevalência em nosso meio do fenótipo apoptose na musculatura esquelética de pacientes com insuficiência Cardíaca Congestiva, e se há

relação entre a apoptose e o grau de intolerância ao esforço.

Casuística e Métodos

Catorze pacientes participaram deste estudo. Dez eram homens e quatro eram mulheres. A idade variou de 39 anos a 76 anos. A média de idade foi de 51 ± 10 anos. Eles se apresentavam em Insuficiência Cardíaca Congestiva de Classe Funcional variando de II a III pela classificação da New York Heart Association e fração de ejeção, calculada pelo método do cubo, variando entre 0.28 e 0.62 ao ecocardiograma.

A causa da Insuficiência Cardíaca Congestiva foi determinada clinicamente. Sete pacientes eram chagásicos, um apresentava insuficiência coronária crônica, um cardiomiopatia hipertensiva, um com cardiomiopatia devido à quimioterapia e quatro cardiomiopatia de causa ignorada.

Todos estavam sendo tratados com drogas de forma otimizada, com digital, diuréticos, inibidor de enzima de conversão e beta bloqueadores. Nenhum paciente foi submetido à biópsia miocárdica.

Os pacientes foram submetidos a Eletrocardiograma, Ergometria, Ecocardiograma com doppler a cores e à biópsia do músculo vasto lateral da coxa.

Os critérios de exclusão foram: Insuficiência Cardíaca Congestiva Descompensada, *Diabetes Mellitus*, Alcoolismo, Insuficiência Renal, Terapia Imunossupressora, Doença Muscular Esquelética, Infarto do Miocárdio recente (menos que 3 meses) e idade superior a 76 anos.

Ao Eletrocardiograma, nove pacientes apresentavam ritmo sinusal, dois fibrilação atrial de média frequência e três pacientes eram comandados por ritmo de marcapasso artificial.

O teste de esforço foi realizado com Esteira de velocidade e inclinação reguláveis a cada 3 minutos, seguindo o protocolo de Bruce. O Aparelho utilizado foi o da marca TEBAPEX 2000. As derivações utilizadas foram as MV5, D2M e V2M. Iniciou-se o teste com a inclinação de 10% e a velocidade de 1,7 milhas por hora. Na etapa seguinte houve inclinação de 12% com velocidade de 2,5 milhas por hora. A cada 3 minutos a rampa era inclinada adicionalmente 2% e a velocidade era incrementada para 3,4, 4,2, 5,0, 5,5 e 6.0 milhas por hora respectivamente. O procedimento era interrompido quando o paciente apresentava exaustão ou desenvolvia grave dispnéia ou tontura. Foi determinado o Consumo Máximo de Oxigênio, o Consumo Miocárdico Máximo de Oxigênio, o Duplo Produto e a distância percorrida (Tabela 1).

O Duplo Produto médio foi de 18643 ± 7955 bpm x mmhg. O MVO2 médio foi de $18,94 \pm 10$ mL/kg/minuto. O VO2 máximo médio foi de 22 ± 11 mL/kg/minuto. A distância média percorrida foi de 338 ± 271 metros.

O Ecocardiograma foi realizado com o aparelho SSS-H140 A da TOSHIBA e SIM 7000 CHALLENGE da ESAOTE BIOMÈDICA. Todos apresentavam diminuição da Fração de Ejeção e de Encurtamento e aumento do Diâmetro Diastólico e Sistólico do Ventrículo Esquerdo. A Fração de Ejeção Média foi de 0.41 ± 0.10 . A Fração de Encurtamento teve uma Média de 0.16 ± 0.5 . O diâmetro diastólico apresentou média de 73 ± 9 mm e o diâmetro sistólico apresentou média de 61 ± 10 mm. A menor Fração de Ejeção foi de 0.31 e a menor de Encurtamento foi 0.10. A maior Fração de Ejeção foi 0.62 e a maior de Encurtamento foi 0.27. O maior DSVE foi 82mm e o maior DDVE 94 mm.

A biópsia do músculo vasto lateral foi feita a céu aberto com anestesia local e retirada de 3 a 4 fragmentos do músculo, medindo cada fragmento meio centímetro no seu maior diâmetro. As peças foram fixadas em formol a 10% e em seguida emblocados

em parafina misturada com cera de abelha, na proporção nove para um. Após o toailete e resfriamento dos blocos eles foram preparados para a microtomia. O método de coloração utilizado foi o da Hematoxilina Eosina

Foi considerado positivo para apoptose, no mínimo a constatação de um núcleo com o fenótipo apoptótico por lâmina.

Utilizamos o Z escore para comparar as variáveis e admitimos como normal o valor Z menor que 2,0.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética, e o consentimento informado foi obtido de todos os pacientes antes do início do estudo.

Resultados

Dos catorze pacientes estudados, todos apresentavam algum grau de degeneração muscular. Esta degeneração foi caracterizada por fibrose endomisial, degeneração medular das miofibrilas (Figura 1) e lesões proliferativas.

A fibrose endomisial perivascular com acúmulo de leucócitos e hemácias, a fibrose endomisial perivascular sem infiltrado inflamatório e a degeneração medular das miofibrilas foi comum a todos os pacientes.

As lesões proliferativas suspeitas de serem células satélites em proliferação foram detectadas com frequência.

Dois pacientes apresentavam o fenótipo apoptótico que se caracterizou por compactação periférica da cromatina assumindo o aspecto de “blebbs” (Figura 2).

Não foi constatada correlação entre a presença de apoptose e variáveis da hemodinâmica, tais como a Fração de Ejeção, Fração de Encurtamento e Consumo de Oxigênio. Houve correlação entre apoptose e DDVE e DSVE em um paciente.

Discussão

Durante muitos anos morte celular, com raras exceções foi sinônimo de necrose.³⁰ Em 1972 Kerr e cols apresentaram fortes evidências de uma segunda forma de morte celular, caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas diferentes da necrose.¹³ Aquele novo processo foi denominado apoptose. Ra-

pidamente, oncologistas, imunologistas, hematologistas abraçaram esta nova idéia. Os cardiologistas foram dos últimos a aceitar o conceito de morte celular programada.³⁰

Hoje sabemos que apoptose está envolvida em muitas doenças do coração. Há relatos de apoptose na Miocardiopatia Dilatada em estágio final,^{31,32} na Displasia Arritmogênica do Ventrículo Direito,^{33,34} na Doença de Uhl, na Síndrome de Brugada, Síndrome do QT longo³⁰ e no Infarto do Miocárdio.³⁵

Recentemente foi descrita associação entre Insuficiência Cardíaca Congestiva e apoptose em musculatura não cardíaca, e esta foi a razão do presente trabalho.

O objetivo foi pesquisar a presença de apoptose muscular esquelética em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Volker e cols já tinham descrito a ocorrência de apoptose nestas mesmas circunstâncias num estudo de 1999.²⁹

Naquele estudo, analisaram 34 pacientes com ICC, de classe funcional variando entre II e III da NYHA. Apoptose muscular esquelética foi demonstrada em 16/34 (47% dos pacientes) e em nenhum dos oito pacientes do grupo controle. A técnica de coloração utilizada para a detecção de apoptose foi a do TUNEL, associada ao método histoquímico e videodensitometria para analisar a expressão do gene Bcl2 e do iNOS.

Na apoptose, há diminuição da expressão do gene Bcl2, que é um agente anti-apoptótico e aumento da expressão do iNOS, que é um agente pró-apoptótico. A expressão do iNOS foi detectada na musculatura esquelética de todos dos pacientes com ICC, no trabalho de Volker, sendo significativamente mais prevalente nos pacientes com apoptose presente ($p=0,015$). O fator anti-apoptótico Bcl2 foi significativamente menos prevalente nos pacientes normais e naqueles sem o fenótipo apoptótico ($p=0,03$). Houve correlação entre a apoptose muscular esquelética e capacidade reduzida ao esforço nos pacientes que se apresentavam em ICC, calculada pela análise do consumo de O₂ pela Ergoespirometria ($p=0,0005$).

A perda de miócitos por apoptose, poderia ser uma das explicações para fadiga muscular naqueles pacientes. Naquele trabalho somente pequeno número de células musculares esqueléti-

Tabela I – Distância percorrida (em metros), Duplo produto (em bpm x mmHg), Consumo de Oxigênio pelo miocárdio (mL/kg/min) e Consumo Máximo de Oxigênio (mL/kg/min) em pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva submetidos a biópsia de musculatura esquelética.

Pte	Distância (metros)	DP bpm mmHg	MVO2 ml/kg/minuto	VO2 ml/kg/minuto
1	213	10200	7.9	22.3
2	331	31140	37	20.8
3	608	26640	31	31.3
4	132	14700	14.2	10.8
5	150	22350	24	13.3
6	88	6930	3.4	10.4
7	510	23100	26	34.2
8	300	13910	13	33.1
9	300	28560	23.4	31.2
10	170	10500	8.4	13.9
11	431	18600	19.7	26.7
12	1110	28350	33.3	47.5
13	312	12640	11.4	21.4
14	84	13390	12.4	7.0
Média	338	18643	18.9	23.1
Desvio Padrão	271	7955	10.4	11.5

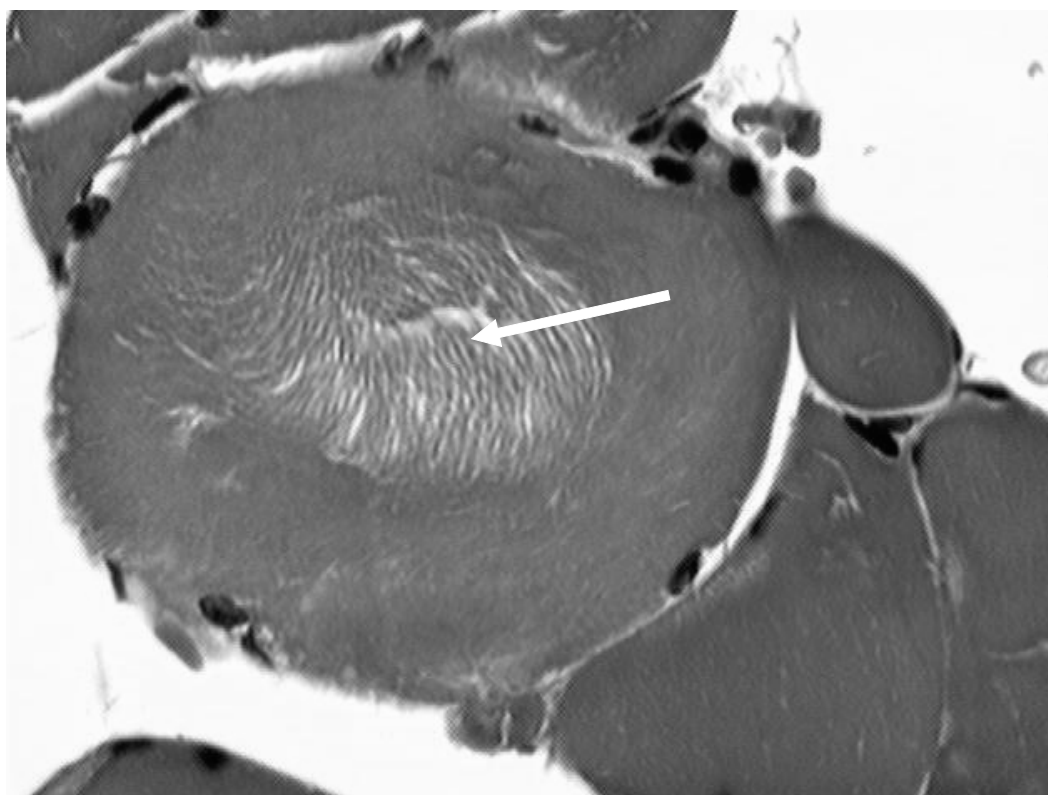


Figura 1: Corte transversal de fibras musculares esqueléticas estriadas em processos diferenciados de degeneração. Detalhe de uma fibra em início de degeneração das miofibrilas (seta) na região medular. Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 400x

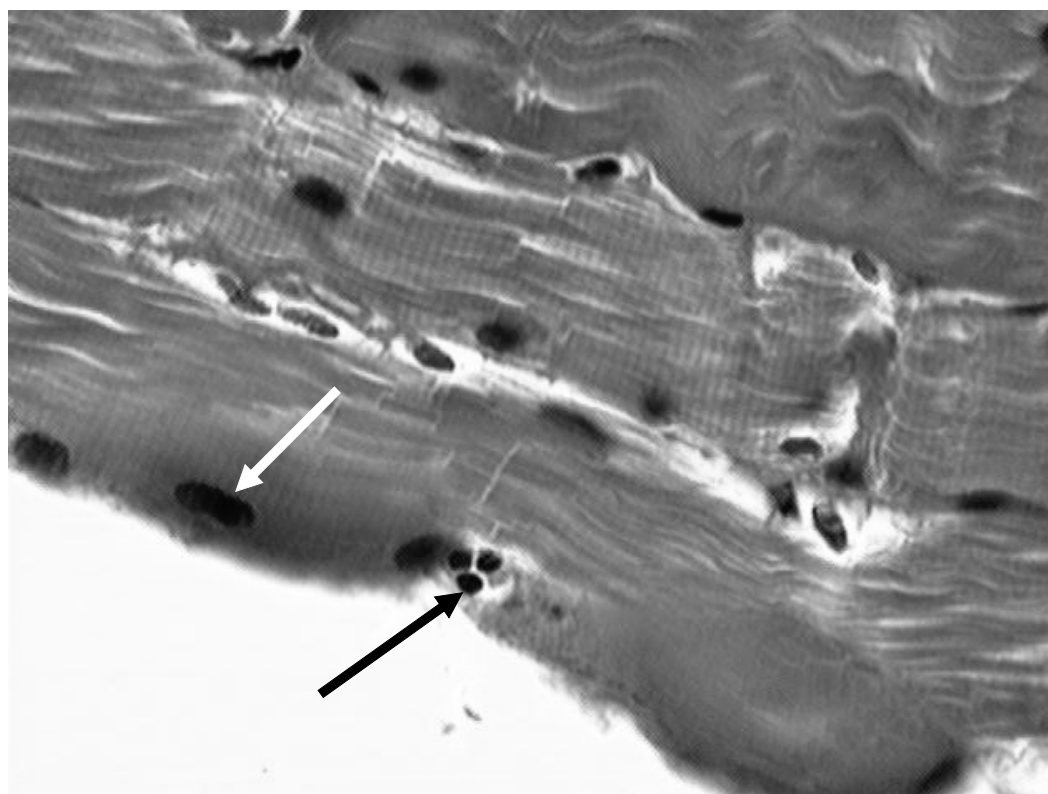


Figura 2: Corte histológico de musculatura esquelética estriada corados pela Hematoxilina-eosina. Na figura pode ser observado fenótipo apoptótico (seta negra), que é caracterizado pela compactação periférica da cromatina, assumindo aspectos de "blebbs". O núcleo íntegro é evidenciado pela seta branca. Aumento: 400x.

cas apresentavam apoptose, menos que 1% das células. O número delas não foi subestimado pela técnica empregada (TUNEL), pois houve coloração de 100% dos núcleos. A longo prazo porém, como este processo é dinâmico, a perda pode ser expressiva.

Aquele estudo mostrou que a apoptose é bastante prevalente na musculatura esquelética de pacientes com ICC, e que pode levar a diminuição significativa da capacidade física. A outra conclusão do estudo é que o gene Bcl-2 e iNOS estão possivelmente envolvidos na regulação da apoptose da musculatura esquelética daqueles pacientes.

Em catorze pacientes por nós estudados, a apoptose foi demonstrada em 2 pacientes. Não houve correlação com o consumo de O₂ e apoptose para os dois pacientes, sendo o Z escore para MVO₂ respectivamente 1,4 e 0,5. No estudo de Volker e cols, o consumo de O₂ foi o mais importante marcador da apoptose muscular. Houve correlação isolada entre apoptose e DDVE e DSVE em um paciente, com Z escore de 2,1 e 2,4 respectivamente.

Embora não tenha sido o objetivo principal do estudo, vale a pena ressaltar que todos os nossos pacientes apresentaram algum tipo de degeneração muscular. As degenerações mais frequentes foram: degeneração medular, fibrose endomisial com ou sem inflamação e proliferação de células satélites e intersticiais. Estes achados não foram descritos por Volker e mereceriam um posterior estudo para analisá-los mais profundamente. Na literatura consultada não encontramos trabalhos que mostrassem correlação entre degeneração muscular esquelética e ICC.

No nosso estudo, a detecção do fenótipo da apoptose foi feita pela coloração do tecido muscular esquelético pela técnica Hematoxilina-Eosina e posterior análise à microscopia óptica. Um mesmo examinador analisou todas as lâminas.

O músculo escolhido foi o vasto lateral da coxa, por se tratar de músculo de fácil acesso pela biópsia e pela sua importância na locomoção.

Por questões éticas não incluímos no estudo um grupo controle.

Embora a população estudada por Volker, seja diferente da nossa, (os pacientes estudados por ele eram todos do sexo masculino, nenhum deles era chagásico, a idade média era maior e a população era caucasiana), atribuímos a baixa prevalência de apoptose, aqui encontrada, ao método de detecção do processo.

No método de coloração H.E a análise do fenótipo apoptótico é feita pelo aspecto morfológico celular, podendo haver o viés do examinador e da técnica de coloração. Na técnica do TUNEL, somente os núcleos com apoptose são corados, sendo mais fácil a detecção e interpretação do processo.

Neste estudo foi diagnosticado apoptose pela análise do aspecto morfológico celular com coloração não específica. Nos

dois métodos a análise celular foi feita “in situ”.

Não foi estudado o gene Bcl2, a expressão do iNOs e a coloração por TUNNEL, por não estarem ainda disponíveis no nosso Serviço na ocasião do estudo.

Demonstrando que a apoptose tem importante atuação na musculatura esquelética de pacientes com ICC, têm surgido trabalhos na literatura testando drogas que poderiam bloquear o efeito deletério decorrente da apoptose. Dalla Libera e cols descrevem os efeitos positivos protetores contra apoptose muscular esqueléticas em ratos com ICC, utilizando o irbesartana, inibidor do receptor da angiotensina II. O fator de necrose tumoral alfa foi o gatilho do processo apoptótico naqueles ratos.³⁶

Em outro estudo, Vescovo e cols demonstrou a L-carnitina como uma droga em potencial para bloquear a apoptose e prevenir miopatia esquelética em ratos com ICC. Naquele trabalho também o fator de necrose tumoral alfa foi o gatilho do processo de apoptose.³⁷

Recentemente Rossing e cols mostraram efeito protetor do carvedilol, um beta bloqueador não cardioseletivo, na apoptose de células endoteliais umbilicais submetidas ao soro de pacientes com Insuficiência Cardíaca Congestiva. Células endoteliais de veia umbilical humana foram expostas ao soro de 15 pacientes com ICC e 11 pacientes voluntários saudáveis. A técnica de coloração utilizada foi a do TUNEL. A apoptose nas células submetidas ao soro de pacientes com ICC quando comparadas ao soro de pacientes saudáveis, foi significativamente maior ($p < 0.001$). Naqueles pacientes o carvedilol suprimiu totalmente o processo de morte celular, sendo que o seu efeito protetor foi devido a sua ação antioxidante e não à ação beta bloqueadora.³⁸

Em atualização publicada no Progress Cardiovascular Disease Feuerstein e cols também enfatizam o papel do carvedilol na inibição de radicais livres e seu efeito protetor de apoptose em pacientes com ICC. Vários mecanismos tornam o carvedilol importante no tratamento da ICC. Sua ação Beta-1, Beta-2 e alfa bloqueadora, diminuem o trabalho cardíaco o consumo de oxigênio e promove a vasodilatação periférica em pacientes com ICC. Além do que, o carvedilol é a única droga beta bloqueadora que tem ação antioxidante, sendo que esta característica é fundamental na proteção contra o fenômeno apoptótico que ocorre na ICC.³⁹

Conclusão

Demonstrou-se que a apoptose muscular esquelética pode ocorrer em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva. Esse comprometimento muscular periférico poderia explicar parte dos sintomas referidos pelos pacientes. É possível que a prevalência varie de acordo com a metodologia empregada. A técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina, é de simples execução, baixo custo e factível para detecção deste fenômeno.

Referências bibliográficas

1. Packer M. Drug treatment of heart failure. In: Cohn JN, editor. Heart failure. Survival in patients with chronic heart failure and its potential modification by drug therapy secaucus. 2nd ed. New York: ATC International; 1988.
2. Schier RW, Abraham WT. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N Engl J Med* 1999;341(8):577-85.
3. Szlachcic J, Massie BM, Kramer BL, Topic N, Tubau J. Correlates and prognostic implication of exercise capacity in chronic congestive heart failure. *Am J Cardiol* 1985;55(8):1037-42.
4. Higginbotham MB, Morris KG, Conn EH, Coleman RE, Cobb FR. Determinants of variable exercise performance among patients with severe left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 1983;51(1):52-60.
5. Minotti JR, Pillay P, Oka R, Wells I, Cristoph I, Massie BM. Skeletal muscle size: relationship to muscle function in heart failure. *J Appl Physiol* 1993;75(1):373-81.
6. Minotti JR, Christoph I, Oka R, Weiner MW, Wells L, Massie BM. Impaired skeletal muscle function in patients with congestive heart failure: relationship to systemic exercise performance. *J Clin Invest* 1991;88(6):2077-82.
7. Massie BM, Simonini A, Sahgal P, Wells L, Dudley GA. Relation of systemic and local muscle exercise capacity to skeletal muscle characteristics in men with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1996;27(1):140-5.
8. Drexler H, Riede U, Munzel T, König H, Funke E, Just H. Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure. *Circulation* 1992;85(5):1751-9.
9. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Skeletal muscle biochemistry and histology in ambulatory patients with long-term heart failure. *Circulation* 1990;81(2):518-27.
10. Massie B, Conway M, Yonge R, Frostick S, Ledingham J, Sleight P et al. Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure relation to clinical severity and blood flow. *Circulation* 1987;76(5):1009-19.
11. Ralston MA, Merola AJ, Leier CV. Depressed aerobic enzyme activity of skeletal muscle in severe chronic heart failure. *J Lab Clin Med* 1991;117(5):370-2.
12. Sullivan MJ, Green HJ, Cobb FR. Altered skeletal muscle metabolic response to exercise in chronic heart failure. Relation to skeletal muscle aerobic enzyme activity. *Circulation* 1991;84(4):1597-607.
13. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26(4):239-57.
14. Kerr JF. A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 1965;90(2):419-435.
15. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971;105(1):13-20.
16. Boobis AR, Fawthrop DJ, Davies DS. Mechanism of cell death. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10(7):275-80.
17. Duvall E, Wyllie AH. Death and the cell. *Immunol Today* 1986;7:115-9.
18. Sen S. Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1992;67(3):287-319.
19. Willie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980;68:251-306.
20. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or others? *Cell Death Diff* 1995;2:87-96.
21. Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in tissue fate of granulocytes. *Clin Sci* 1992;83(6):639-48.
22. Trump BF, Ginn FL. Pathogenesis of subcellular reaction to lethal injury. In: Bajusz E, Jasmin G, editors. Examples of descriptive and functional morphology. Basel: Karger; 1969. p.1-29. (Methods and achievements in experimental pathology, v. 4)
23. Kroemer G. The Proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3(6):614-20.
24. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997;1(4):275-81.
25. Renahan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001;322(7301):1536-8.
26. Messmer UK, Lapetina EG, Brune B. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C and protein kinase A-activating compounds. *Mol Pharmacol* 1995;47:757-65.
27. Fehsel K, Kroncke KD, Neyer KL, Herber H, Wahn V, Kohb-Bachofen V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 1995;155(6):2858-65.
28. Adams V, Yu J, Mobius-Winkler S, Linke A, Weigl C, Hilbrich L et al. Increased nitric oxide synthase in skeletal muscle biopsies from patients with chronic heart failure. *Biochem Mol Med* 1997;61(2):152-60.
29. Adams V, Jiang H, Yu J, Mobius-Winkler S, Fiehn E, Linke A et al. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol* 1999;33(4):959-65.
30. James TN. Apoptosis in Cardiac Disease. *Am J Med* 1999;107:606-20.
31. Olivetti G, Abbi R, Quaini F, Kajstura J, Cheng W, Nitahara JA et al. Apoptosis in the failing human heart. *N Engl J Med* 1997;336(16):1131-41.
32. Narulla J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar R et al. Apoptosis in myocytis in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 1996;335(16):1182-9.
33. Mallat Z, Tedgui A, Fontaliran F, Frank R, Durigan M, Fontaine G. Evidence for Apoptosis in arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *N Engl J Med* 1996;335(16):1190-6.
34. Valente M, Calabrese F, Thiene G, Angelini A, Basso C, Nava A et al. In vivo evidence of apoptosis in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1998;152(2):479-84.
35. Maulik N, Yoshida T, Das DK. Oxidative stress developed during the reperfusion of ischemic myocardium induces apoptosis. *Free Radic Biol Med* 1998;24(5):869-75.
36. Dalla Libera L, Ravara B, Angelini A, Rossini K, Sandri M, Thiene G et al. Beneficial effects in skeletal muscle of the angiotensin II type I receptor blocker irbesartan in experimental heart failure. *Circulation* 2001;103(17):2195-200.
37. Vescovo G, Ravara B, Gobbo V, Sandri M, Angelini A, Della Barbera M et al. L-Carnitine: a potential treatment for blocking apoptosis and preventing skeletal muscle myopathy in heart failure. *Am J Cell Physiol* 2002;283(3):C802-10.
38. Rossig L, Haendeler J, Mallat Z, Hugel B, Freyssinet J M, Tedgui A et al. Congestive heart failure induces endothelial cell apoptosis: protective role of carvedilol. *J Am Coll Cardiol* 2000;36(7):2081-9.
39. Feuerstein G, Yue T L, Ma X, Ruffolo RR. Novel mechanisms in the treatment of heart failure: inhibition of oxygen radicals and apoptosis by carvedilol. *Prog Cardiovasc Dis* 1998;41(1 Suppl 1):17-24.

Correspondência

Sírío Hassem Sobrinho.

Av. José Munia, 7301

São José do Rio Preto – SP

Fone: (17)227-8199

sirio@institutodocoracao.com.br